



Rôles du Proliferating Cell Nuclear Antigen et de p21/waf1, protéines régulatrices du cycle cellulaire dans l'apoptose du polynucléaire neutrophile : Intérêt potentiel dans la modulation de l'inflammation

Julie Mocek

► To cite this version:

Julie Mocek. Rôles du Proliferating Cell Nuclear Antigen et de p21/waf1, protéines régulatrices du cycle cellulaire dans l'apoptose du polynucléaire neutrophile : Intérêt potentiel dans la modulation de l'inflammation. Sciences du Vivant [q-bio]. 2013. hal-01491544

HAL Id: hal-01491544

<https://ephe.hal.science/hal-01491544>

Submitted on 17 Mar 2017

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

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

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté
par

Julie MOCEK

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Rôles du Proliferating Cell Nuclear Antigen et de
p21/waf1, protéines régulatrices du cycle cellulaire dans
l'apoptose du polynucléaire neutrophile :
Intérêt potentiel dans la modulation de l'inflammation**

soutenu le 3 Décembre 2013 devant le jury suivant :

Dr. Sylvie Demignot – Président
Dr. Pham My-Chan Dang – Rapporteur
Dr. Nadine Varin-Blank – Examineur
Dr. Véronique Witko-Sarsat – Tuteur scientifique
Pr. Bernard Lacour – Tuteur pédagogique

Mémoire préparé sous la direction du Dr. Véronique Witko-Sarsat (tuteur scientifique) et du
Pr. Bernard Lacour (tuteur pédagogique)

Laboratoire d'accueil: INSERM U1016, Institut Cochin, Paris
Laboratoire EPHE: NLRFCV, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE
présenté
par

Julie MOCEK

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Rôles du Proliferating Cell Nuclear Antigen et de
p21/waf1, protéines régulatrices du cycle cellulaire dans
l'apoptose du polynucléaire neutrophile :
Intérêt potentiel dans la modulation de l'inflammation**

soutenu le 3 Décembre 2013 devant le jury suivant :

Dr. Sylvie Demignot – Président
Dr. Pham My-Chan Dang – Rapporteur
Dr. Nadine Varin-Blank – Examineur
Dr. Véronique Witko-Sarsat – Tuteur scientifique
Pr. Bernard Lacour – Tuteur pédagogique

Mémoire préparé sous la direction du Dr. Véronique Witko-Sarsat (tuteur scientifique) et du
Pr. Bernard Lacour (tuteur pédagogique)

Laboratoire d'accueil: INSERM U1016, Institut Cochin, Paris
Laboratoire EPHE: NLRFCV, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry

Je tiens à remercier le Dr. Véronique Witko-Sarsat de m'avoir permis et surtout encouragé à réaliser mon diplôme EPHE au sein de son laboratoire. Merci pour son soutien, sa motivation et ses précieux conseils scientifiques depuis plusieurs années maintenant...

Merci au Pr. Bernard Lacour pour avoir accepté d'être mon directeur de l'EPHE et son aide au bon déroulement de mon mémoire et de ma soutenance.

Merci au Dr. Pham My-Chan Dang pour avoir pris le temps de corriger mon mémoire avec beaucoup de précision et d'enthousiasme. Merci au Dr. Sylvie Demignot et au Dr. Nadine Varin-Blank d'avoir accepté de faire parti de mon jury.

Je tiens également à remercier chaleureusement les membres de l'équipe: Arnaud, Alessia et Magali pour leur soutien constant et pour le bon temps passé ensemble. Un grand merci à ma Céline pour sa présence, nos discussions, ses encouragements...

SOMMAIRE

Abréviations	1
---------------------	----------

Introduction

<u>I. Le polynucléaire neutrophile, une cellule essentielle de l'immunité innée</u>	2
1. Différenciation du polynucléaire neutrophile	3
1.1. Engagement des cellules souches vers la lignée myéloïde	3
1.2. Morphologie du polynucléaire neutrophile	4
2. Fonctions du polynucléaire neutrophile dans l'immunité innée et l'inflammation	4
2.1. Mobilisation des polynucléaires neutrophiles de la circulation vers le site inflammatoire	4
2.2. Phagocytose et mécanismes microbicides	5
 <u>II. L'apoptose du polynucléaire neutrophile, élément clé dans la résolution de l'apoptose</u>	 9
1. Mécanismes moléculaires de l'apoptose	9
1.1. La voie extrinsèque	12
1.2. La voie intrinsèque	12
1.3. Les caspases	14
2. Régulation de l'apoptose des polynucléaires neutrophiles	15
2.1. Les régulateurs de l'apoptose des polynucléaires neutrophiles	15
2.1.1. La famille Bcl-2	15
2.1.2. La voie NFkb	16
2.2. Les protéines du cycle cellulaire et de la réplication, nouvelle voie de recherche dans le contrôle de l'apoptose du polynucléaire neutrophile	17
2.3. Expression et localisation de PCNA dans le polynucléaire neutrophile	19
 <u>III. PCNA, une protéine plateforme contrôlant la survie cellulaire</u>	 19
1. PCNA, protéine clé de la réplication et de la réparation de l'ADN	19
2. PCNA est une protéine plateforme	19
2.1. PCNA et ses partenaires dans la phase S du cycle de la division cellulaire	19
2.2. PCNA et ses partenaires de la réparation de l'ADN	21
3. Autres fonctions de PCNA	22
3.1. Rôle de PCNA dans les cellules qui ne prolifèrent pas	22
3.2. PCNA et apoptose	22

<u>Projet de recherche</u>	24
-----------------------------------	-----------

Matériels et méthodes

A. Le polynucléaire neutrophile humain mature 26

I. Obtention d'un cytosol de polynucléaires neutrophiles 26

1. Isolement des polynucléaires neutrophiles à partir du sang	26
2. Fractionnement subcellulaire des polynucléaires neutrophiles pour l'obtention d'une fraction cytosolique	27
2.1. La cavitation	27
2.2. La pottérisation	29
2.3. La sonication	30
3. Recherche de partenaires de PCNA dans le cytosol de polynucléaires neutrophiles	30
3.1. Mise au point de L'immunoprécipitation de PCNA	30
3.2. Co-immunoprécipitation de PCNA (Co-IP)	32

II. Détection de l'apoptose dans les polynucléaires neutrophiles 32

1. Marquage annexine-V / 7AAD	33
2. Marquage DIOC6	34
3. Marquage à l'iodure de propidium (IP)	35
4. Marquage Hoeschst	36
5. Mesure de l'activité des caspases par cytométrie en flux	37
6. Mesure de l'activité des caspases par colorimétrie	37

III. Mise au point de la transduction de la protéine PCNA 38

IV. Le western blot 39

B. Mise au point de la transfection de la lignée promyélocytaire PLB-985 et de la différenciation granulocytaire 41

I. Transfection des cellules PLB-985 41

II. Différenciation des PLB-985 en polynucléaires neutrophiles 43

1. Coloration au <i>May Grünwald Giemsa</i>	43
2. Marquage CD11b par cytométrie en flux	44
3. Mesure de l'explosion oxydative par chimioluminescence	44

III. Induction et mesure de l'apoptose dans les PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles 45

Résultats

I. Le polynucléaire neutrophile humain mature 47

1. Mise en évidence de la présence de PCNA dans le cytosol de polynucléaire neutrophile mature	47
--	----

2. Modulation de l'expression de PCNA au cours de l'apoptose du polynucléaire neutrophile	48
3. Mise au point de la transduction de la protéine PCNA par « Chariot™ »	54
4. Modulation de l'apoptose du polynucléaire neutrophile par un peptide compétiteur de p21	57
5. Recherche des partenaires de PCNA dans le cytosol de polynucléaires neutrophiles	58

II. Les PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles,

modèle cellulaire **62**

1. Influence de PCNA sur l'apoptose des PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles	63
1.1. Surexpression de PCNA dans une lignée promyélocytaire	63
1.2. Différenciation des PLB-985 en polynucléaires neutrophiles	64
1.3. Analyse de l'apoptose des PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles surexprimant PCNA	66
1.4. Inhibition de PCNA dans une lignée promyélocytaire	70
2. Influence de p21 sur l'apoptose des PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles	71
2.1. Surexpression de p21 dans une lignée promyélocytaire	71
2.2. Effet de la surexpression de p21 sur la différenciation des cellules PLB-985	72
2.3. Analyse de l'apoptose des PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles surexprimant p21	73

Discussion **75**

Perspectives **80**

Bibliographie **82**

Liste des annexes:

Annexe 1: Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival, Witko-Sarsat et al., J. exp. Med. 2010.

Annexe 2: P21/waf1 potentiates neutrophil apoptosis and favor the resolution of inflammation, Pederzoli-Ribeil et al., ESCI Budapest 2012.

Annexe 3: Nuclear-to-cytoplasmic relocalization of the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) during differentiation involves a chromosome region maintenance 1 (CRM1)-dependent export and is a prerequisite for PCNA anti-apoptotic activity in mature neutrophils, Bouayad et al., JBC 2012.

ABBREVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ATRA	All Trans Retinoïc Acid
Bcl2	B cell Lymphoma-2
BSA	Bovine Serum Albumin
CARD	Caspase Recrutement Domain
CD	Cluster of Differentiation
CDK	Cyclin Dependant Kinase
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DMF	DiméthylFormamide
DMSO	Dimethylsulfoxyde
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tetra Acétique
EFS	Etablissement Français du Sang
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-Associated-Death Domain
fMLP	N formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor α
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor α
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IAP	Inhibitors of Apoptosis
ICL	Interdomain Connecting loop
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
LPS	Lipopolyssaccharide
MCL-1	Myeloid Cell Leukemia-1
MGG	May Grünwald Giemsa
MPO	Myélopéroxydase
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide PhosphHate
NF κ B	Nuclear Factor-kappa B
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PE	Phycoerythrine
PMA	Phorbol Myristate Acétate
PVDF	Polyvinylidene Fluoride (polyfluorure de vinylidène)
PS	Phosphatidylsérine
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
trs/min	tours par minute

INTRODUCTION

I. Le polynucléaire neutrophile, cellule essentielle de l'immunité innée

Les polynucléaires neutrophiles représentent 50% à 70% des leucocytes dans la circulation. Ce sont les premières cellules leucocytaires à migrer, en très grand nombre, vers le site de l'inflammation. Ils tiennent également le premier rang dans la défense contre les infections fongiques et bactériennes. Les polynucléaires neutrophiles phagocytent puis éliminent les microorganismes grâce à la mobilisation de systèmes effecteurs lytiques de deux types, dépendants ou non de l'oxygène. Le polynucléaire neutrophile peut en effet générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) *via* l'activation de la NADPH-oxydase et libérer ses composants lytiques des granules.

Si le polynucléaire neutrophile est une cellule indispensable dans l'immunité innée, sa persistance dans le site inflammatoire peut être délétère pour le tissu. En effet, il contient de nombreuses molécules cytotoxiques qui peuvent être libérées si celui-ci nécrose. Ainsi, l'apoptose des polynucléaires neutrophiles et leur phagocytose par les macrophages représentent une étape essentielle de la résolution de l'inflammation (**Figure 1**).

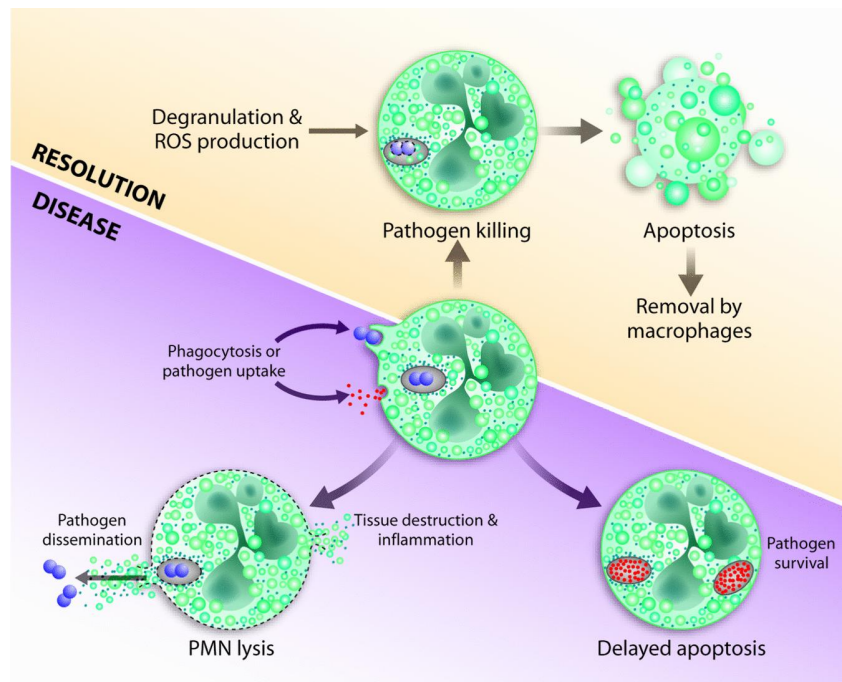


Figure 1 : Le polynucléaire neutrophile et l'inflammation (DeLeo 2004)

Après avoir détruit le pathogène, le polynucléaire neutrophile entre en apoptose et est éliminé *via* un processus de phagocytose par des macrophages. Si le pathogène entraîne une lyse du polynucléaire neutrophile ou un retard de son apoptose, le polynucléaire neutrophile persiste au site de l'inflammation amplifiant ainsi l'inflammation.

Il existe un large pool de polynucléaires neutrophiles matures dans la moelle osseuse. Chaque jour, environ 10^{11} polynucléaires neutrophiles sortent de la moelle en conditions basales. Cependant lors de la phase aiguë d'une inflammation, c'est le pool marginé constitué

de polynucléaires neutrophiles adhérents aux vaisseaux, en particulier dans les poumons, qui est mobilisé en premier. La mobilisation des polynucléaires neutrophiles de la moelle osseuse est une seconde étape permettant de recruter plus de polynucléaires neutrophiles sur le site inflammatoire. Les polynucléaires neutrophiles vont migrer dans les tissus, assurer leurs fonctions de cellule de l'immunité, apoptoser et être éliminés par des phagocytes. La courte durée de vie du polynucléaire neutrophile, estimée entre 6 et 18 heures dans le sang, nécessite un renouvellement quotidien de polynucléaires neutrophiles à partir de la moelle osseuse de façon à maintenir un taux suffisant pour la protection contre les pathogènes. Ainsi, les polynucléaires neutrophiles matures sont continuellement libérés dans la circulation.

1. Différenciation du polynucléaire neutrophile

Les polynucléaires neutrophiles sont libérés dans la circulation au terme d'une série d'étapes de différenciation, impliquant des mécanismes moléculaires hautement régulés, qui s'effectue dans la moelle osseuse. Les cellules myéloïdes proviennent toutes de la même cellule souche hématopoïétique (« *Hematopoietic Stem Cell* », *HSC*).

1.1. Engagement des cellules souches vers la lignée myéloïde

Le polynucléaire neutrophile est produit dans les tissus hématopoïétiques et libéré dans la circulation à la suite d'une série d'étapes de détermination, maturation et différenciation. Dans la moelle osseuse, une cellule souche pluripotente se différencie en cellule progénitrice CFU-GM (« *Colony Forming Unit – Granulocyte Macrophage* ») (**Figure 2**). La différenciation du polynucléaire neutrophile est sous la dépendance de plusieurs facteurs de croissance comme le G-CSF (« *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* »), GM-CSF (« *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* »), l'interleukine-3 et le SCF (« *Stem Cell Factor* ») (Glasser and Fiederlein 1987).

Les cellules orientées vers la lignée granulocytaire sont dans l'ordre de maturation : le myéloblaste, le promyélocyte, le myélocyte, le métamyélocyte, le granulocyte non segmenté et enfin le polynucléaire neutrophile mature. Au cours de ces différentes étapes de différenciation, les cellules acquièrent séquentiellement des organites et des constituants cytoplasmiques et membranaires indispensables à leurs fonctions effectrices.

Au terme de leur différenciation, les polynucléaires neutrophiles possèdent un nombre très faible de ribosomes et de mitochondries, ce qui reflète une activité de synthèse réduite de ces cellules.

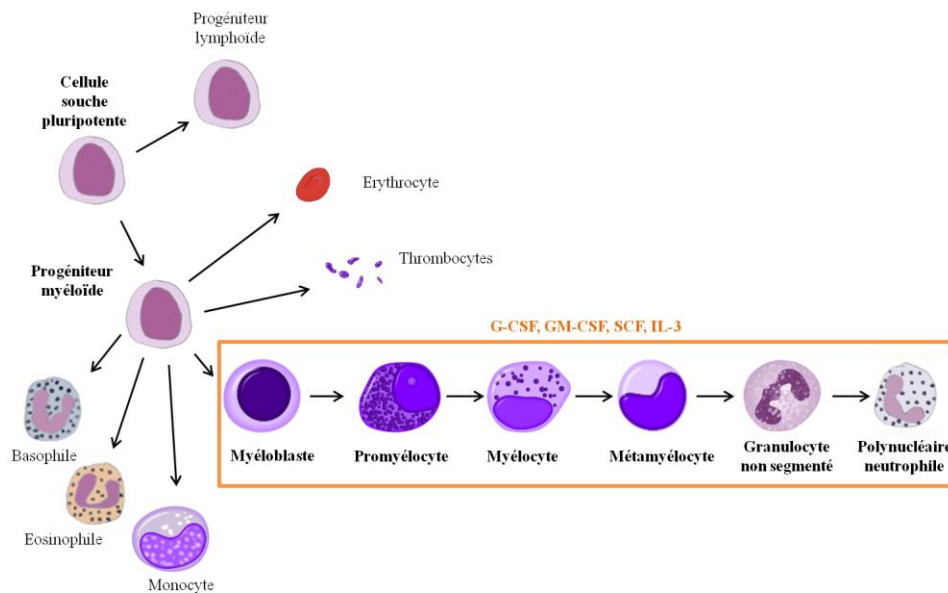


Figure 2 : Schéma général de l'hématopoïèse

Le polynucléaire neutrophile est formé à partir d'une cellule souche pluripotente lors de la granulopoïèse.

1.2. Morphologie du polynucléaire neutrophile

Le polynucléaire neutrophile est une cellule de 12 à 14 μm dont le rapport nucléocytoplasmique est d'environ 30%. Il est appelé « polynucléaire » en raison d'une erreur historique : en effet, par le caractère lobé de son noyau, on a longtemps cru qu'il possédait plusieurs noyaux. Il comporte en réalité un noyau multilobé (de deux à cinq lobes) et de minces ponts de chromatine relient ces lobes les uns aux autres. Le qualificatif « polynucléaire neutrophile » provient du caractère particulier des granules de cette cellule qui restent neutres et ne fixent pas les colorants, en particulier la coloration *May Grünwald Giemsa* (MGG). Son cytoplasme contient un réticulum endoplasmique bien développé. Il contient en revanche très peu de mitochondries et de ribosomes. Il tient son nom de « granulocyte » par les différents granules observés dans son cytoplasme. Ces granules sont formés séquentiellement durant la granulopoïèse et les gènes codant pour les constituants de ces granules ne s'expriment que pendant la différenciation.

2. Fonctions du polynucléaire neutrophile dans l'immunité innée et l'inflammation

2.1. Mobilisation des polynucléaires neutrophiles de la circulation vers le site inflammatoire

Les polynucléaires neutrophiles dans la circulation ne constituent qu'une partie des polynucléaires neutrophiles matures puisque environ 50% constituent le pool dit "marginé".

Ces polynucléaires neutrophiles sont fixés à la paroi des vaisseaux et peuvent être mobilisés de manière rapide et efficace en réponse à un stress, une inflammation, vers les tissus (Ley, Laudanna et al. 2007). Des signaux d'alerte sont émis depuis le tissu inflammé pour recruter les polynucléaires neutrophiles. Ces signaux sont des chimiokines (IL-8) ou des molécules dérivées de microorganismes (le Lipopolysaccharide : LPS ou les fMLP).

En conditions dites normales, donc non-inflammatoires, les PNN circulent librement dans les vaisseaux sanguins et s'attachent faiblement aux cellules endothéliales grâce à des molécules d'adhésion de faible affinité se trouvant à la surface des PNN mais également des cellules endothéliales. Les polynucléaires neutrophiles roulent sur la paroi du vaisseau par la force du flux sanguin, cette migration est appelée « *rolling* ». Au cours de ce « *rolling* », les polynucléaires neutrophiles peuvent se trouver en contact avec des chimioattractants (produits bactériens, molécules pro-inflammatoires). Dans ce cas, les PNN, mais également les cellules endothéliales, sont activés et expriment à leurs surfaces de nouvelles molécules d'adhésion de très forte affinité telles que les intégrines contenues dans les vésicules de sécrétion. Les PNN adhèrent alors très fermement à l'endothélium activé et organisent leur cytosquelette et l'externalisation de protéines, telle que la gélatinase des granules tertiaires, afin de traverser facilement la couche de cellules endothéliales, étape nommée diapédèse, et d'arriver au site inflammatoire.

2.2. Phagocytose et mécanismes microbicides

Sur le site inflammatoire, le polynucléaire neutrophile phagocyte puis détruit et élimine les agents pathogènes (Cassatella 2013). Cette reconnaissance s'effectue par l'intermédiaire de récepteurs présents sur les polynucléaires neutrophiles, en particulier les récepteurs aux opsonines tels que les récepteurs au fragment constant des IgG (ou Rfc) et les récepteurs du complément (**Figure 3**). Après l'étape de reconnaissance du pathogène, ce dernier est internalisé et déclenche l'activation du polynucléaire neutrophile. Les polynucléaires neutrophiles ont également à leur surface des récepteurs TLR (*Toll-like receptors*). Les TLR peuvent reconnaître des motifs moléculaires dénommés PAMP (*pathogen-associated microbia pattern*), comme par exemple les lipopolysaccharides (LPS), l'ADN bactérien ou l'ADN viral double brin.

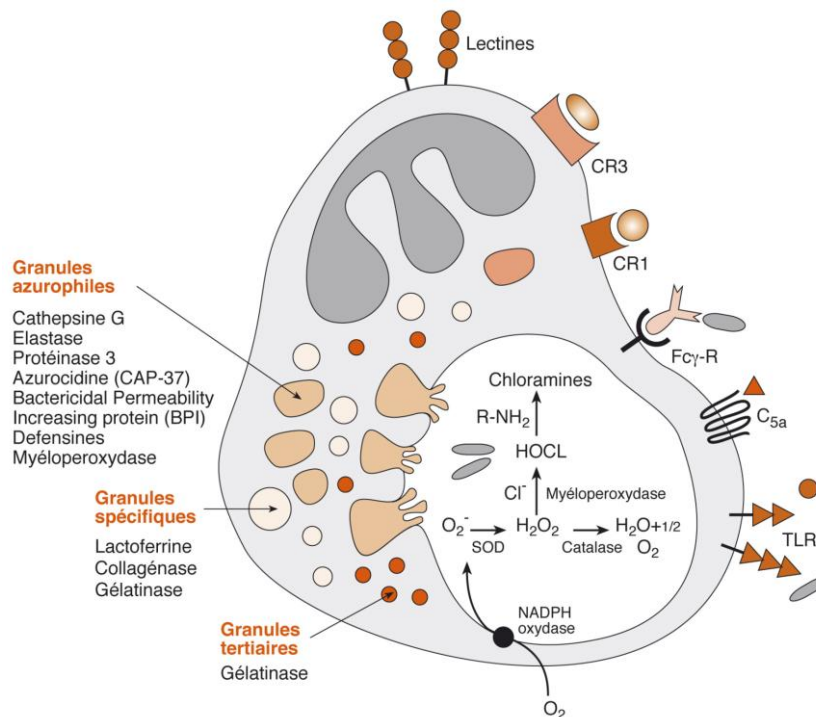


Figure 3: Les mécanismes effecteurs du polynucléaire neutrophile impliqués dans la défense anti-infectieuse et l'activité pro-inflammatoire
Bach et al., Immunologie Médecine-Science, 2008

Les mécanismes effecteurs du polynucléaire neutrophile sont mobilisés consécutivement à la phagocytose d'un agent pathogène. Les opsonines du complément C3b et C4b sont reconnus par les récepteurs CR1 et CR3. Les particules opsonisées par les IgG sont reconnues *via* les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines (FcγR).

La NADPH oxydase va générer à partir de deux molécules d'oxygène (O_2), la production d'anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) qui sera transformé grâce à une superoxyde-dismutase (SOD) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La myéloperoxydase (MPO), relarguée dans le phagosome au cours de l'activation du polynucléaire neutrophile, produit à partir du peroxyde d'hydrogène des oxydants chlorés comme l'acide hypochloreux (HOCl) et les chloramines

La coopération des deux types de mécanismes microbicides, dépendants ou indépendants de l'oxygène aboutira à l'élimination du pathogène par le polynucléaire neutrophile. Les mécanismes non oxydatifs mettent en jeu des protéines antibiotiques, des protéases, qui lorsqu'elles sont déversées dans le phagolysosome permettent la lyse des pathogènes. Les mécanismes oxydatifs permettent la production d'anion superoxyde par le complexe enzymatique de la NADPH oxydase (ou NOX2) et d'oxydants chlorés par la myéloperoxydase (MPO). Ces oxydants ont un fort pouvoir bactéricide. En effet, un déficit génétique en l'un des composants de la NADPH-oxydase aboutit à la granulomatose septique chronique au cours de laquelle les patients ne peuvent se défendre contre les infections. Il est important de noter que le polynucléaire neutrophile dispose de molécules lytiques très puissantes qui vont être également très toxiques pour l'hôte. Si cette activation n'est pas

étroitement contrôlée, une inflammation chronique peut s'installer avec ses effets très délétères sur les tissus de l'hôte (**Figure 1**). Ainsi, l'apoptose du polynucléaire neutrophile et sa phagocytose par les macrophages représentent des étapes capitales dans la résolution de l'inflammation.

La dégranulation : système indépendant de l'oxygène

En tant que granulocytes, les polynucléaires neutrophiles possèdent plusieurs types de granules pouvant être classés en quatre catégories selon leurs contenus (**Tableau I**) et leur apparition au sein du polynucléaire neutrophile (**Figure 3**) (Witko-Sarsat, Rieu et al. 2000).

Les granules primaires (azurophiles) sont les premiers granules formés, ils apparaissent au stade de myéloblaste. Ils sont considérés comme les compartiments bactéricides du polynucléaire neutrophile mobilisés lors de la phagocytose pour la destruction du microorganisme ingéré. Cette destruction se fait essentiellement grâce à la myéloperoxydase (MPO), aux sérine-protéases (l'élastase, la cathepsine G et la protéinase 3), aux protéines antibiotiques comme les défensines ou l'azurocidine ou encore aux lysozymes qu'ils contiennent.

Les granules secondaires (spécifiques) apparaissent au stade de promyélocyte et sont identifiables par leur contenu en lactoferrine qui inhibe la multiplication des bactéries. Ils contiennent des molécules essentielles aux fonctions du polynucléaire neutrophile comme l'intégrine CD11b/CD18 ou encore une collagénase capable d'hydrolyser des protéines de la matrice extracellulaire permettant aux polynucléaires neutrophiles de migrer plus facilement vers le site de l'inflammation. Dans les polynucléaires neutrophiles au repos, le cytochrome b558 est concentré dans les granules spécifiques. Lors de l'activation du polynucléaires neutrophiles, les granules fusionnent avec la membrane de la vacuole phagocytaires.

Les granules tertiaires (gélatinases) sont visibles au stade métamyélocyte et ont comme principal rôle de stocker les enzymes servant à la dégradation de la matrice extracellulaire mais sont aussi une réserve de récepteurs membranaires nécessaires lors de la diapédèse vers le site inflammé.

Les vésicules de sécrétion apparaissent tardivement au stade métamyélocyte et polynucléaire neutrophile mature. Elles sont les premières à être mobilisées en réponse à des stimuli inflammatoires, elles possèdent de nombreux récepteurs membranaires, tels que le récepteur au complément CR1 (CD35), la β 2-intégrine, le récepteur du LPS (CD14),

nécessaires lors de l'activation du polynucléaire neutrophile qui adhère alors fermement à l'endothélium.

Les granules contiennent des protéines microbicides déversées dans le phagosome et/ou dans le milieu extracellulaire, mais ils contiennent également des protéines capables de modifier la composition de la membrane du polynucléaire neutrophile, modifications nécessaires à l'adhésion ou à la diapédèse.

Tableau I : Contenu des granules du polynucléaire neutrophile

Granules primaires	Granules secondaires	Granules tertiaires	Vésicules sécrétoires
<u>Protéines à activité microbicide</u> (myéloperoxydase, défensines, lysozyme, BPI " <i>Bacterial permeability increasing protein</i> ")	<u>Protéines de transport</u> (lactoferrine, transcobalamines)	<u>Gélatinase</u> (MMP-9)	<u>Récepteurs</u> (fMLP-R, TNF α -R, GM-CSF-R)
<u>Sérine-protéases</u> (élastase, cathepsine G, estérase, Protéinase 3)	Lysosyme	<u>Intégrines</u> (CD11b)	<u>Intégrines</u> (CD11b)
	Métalloprotéases	Cytochrome b558	Cytochrome b558
	<u>Molécules d'adhérence</u> (CD11, CD18)		Albumine
	<u>Récepteurs</u> (fMLP-R, TNF α -R, GM-CSF-R)		
	cytochrome b558		

L'explosion oxydative : système dépendant de l'oxygène

La NADPH oxydase constitue un système bactéricide puissant en produisant les formes réactives de l'oxygène (« *Radical Oxygen Species* » : ROS), molécules hautement bactéricides pour les particules phagocytées (El-Benna, Dang et al. 2008). La NADPH oxydase est un complexe enzymatique formé de sous-unités membranaires (p22phox et gp91phox qui constituent le flavocytochrome b558) et cytoplasmiques (p40phox, p47phox et p67phox) et une petite protéine G de type Rac-1 (monocyte) ou Rac-2 (polynucléaire neutrophile) permettant l'assemblage d'une chaîne de transport d'électrons. Dans le polynucléaire neutrophile au repos, le complexe est inactif et les sous-unités sont réparties entre les fractions membranaire et cytosolique. L'activation du polynucléaire neutrophile entraîne la formation de la NADPH oxydase active, par translocation des sous-unités

cytoplasmiques vers la membrane suivie de leur assemblage avec les sous-unités membranaires. Par transfert d'électron du NADPH vers l'oxygène moléculaire, la NADPH oxydase va générer des anions superoxydes (O_2^-) (**Figure 4**). Ces derniers seront transformés en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) grâce à une superoxyde-dismutase (SOD), oxydant aux forts pouvoirs microbicides. La myéloperoxydase (MPO), libérée dans le phagosome au cours de l'activation du polynucléaire neutrophile, produit l'acide hypochloreux (HOCl) à partir du peroxyde d'hydrogène. L'association de l'acide hypochloreux et d'amines libres engendre une production de chloramines. Ces réactions se réalisent rapidement, néanmoins le processus n'évite pas tous les dommages tissulaires provoqués par ces facteurs toxiques dans les tissus avoisinants. Il est grandement responsable de la nécrose tissulaire et de la formation du pus. Les cellules voisines risquent d'être endommagées, ce qui peut engendrer une propagation incontrôlée de la réaction inflammatoire.

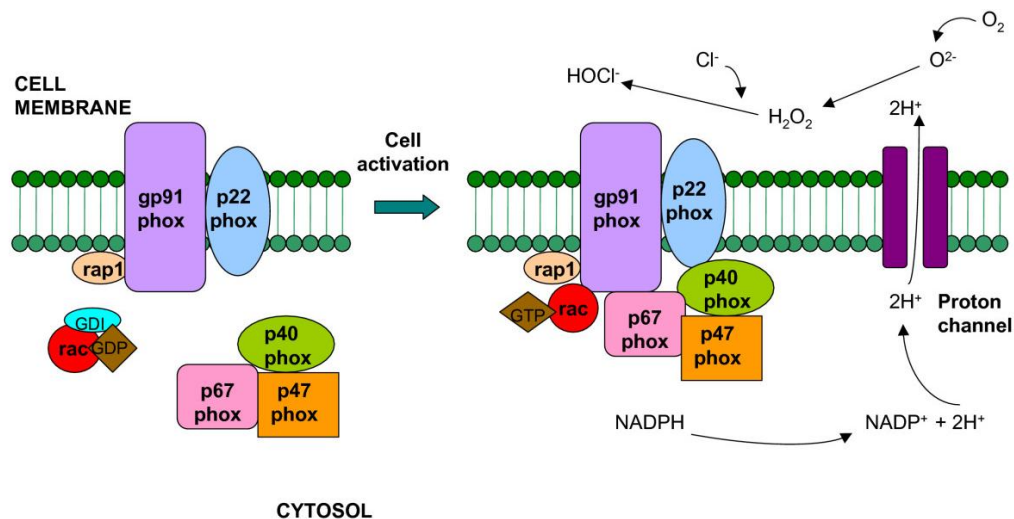


Figure 4 : Représentation schématique de l'activation de la NADPH oxydase

La membrane interne du phagocyte est constituée de 2 sous-unités: p22 phox et gp91 phox qui forment respectivement la petite et la grande chaîne du cytochrome b558. Deux sous-unités cytosoliques: p67 phox et p47 phox, une protéine accessoire p40 phox et Rac-GTP migrent à la membrane cellulaire après activation du phagocyte. Elles forment ainsi le complexe de la NADPH oxydase capable de générer une explosion oxydative.

II. L'apoptose du polynucléaire neutrophile, élément clé dans la résolution de l'apoptose

1. Mécanismes moléculaires de l'apoptose

Dans tous les types cellulaires, l'apoptose définie comme une mort cellulaire programmée de la cellule, implique la mise en jeu de différentes voies de signalisation qui vont aboutir à des modifications morphologiques et biochimiques.

Une modification caractéristique est une condensation du noyau et du cytoplasme, conduisant à une diminution significative du volume cellulaire. La mitochondrie va subir plusieurs modifications majeures comme la diminution du potentiel transmembranaire et la libération du cytochrome c dans le cytoplasme. Le noyau se condense puis la chromatine est clivée selon un profil caractéristique dit « en barreaux d'échelle ».

La membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Les cellules apoptotiques vont exprimer des molécules à leur membrane appelées « eat-me », dont la plus étudiée est la phosphatidylserine (PS), qui vont permettre leur élimination par les macrophages. L'une des caractéristiques de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane est préservée, évitant ainsi le déversement du contenu cellulaire et les dommages aux tissus. Toutes ces caractéristiques de l'apoptose l'opposent à la nécrose, qui est une mort cellulaire « désordonnée », au cours de laquelle les cellules vont se lyser et déverser leurs enzymes toxiques au niveau des tissus (Figure 5).

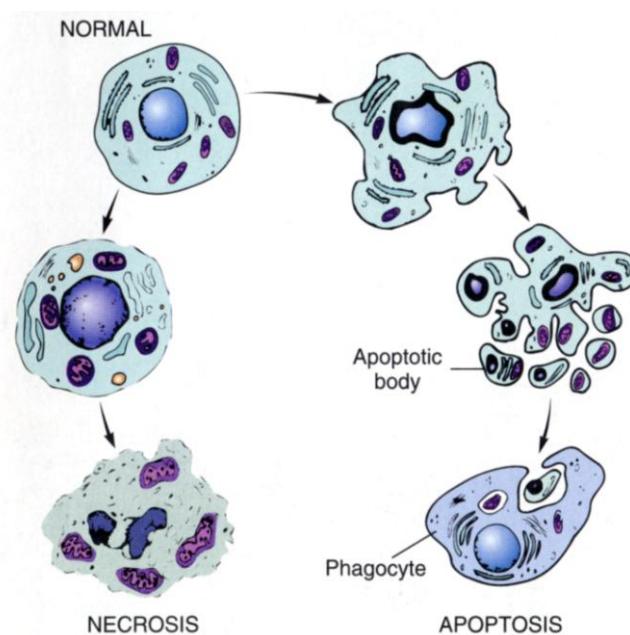


Figure 5: Les modifications ultrastructurales séquentielles de la nécrose et de l'apoptose (Walker, Harmon et al. 1988)

Dans l'apoptose, la chromatine nucléaire se condense et se fragmente. La membrane plasmique bourgeonne, ce qui conduit à la formation des corps apoptotiques qui vont être phagocytés. Au cours de la nécrose, la chromatine est dégradée, les organites grossissent et la membrane plasmique est endommagée.

A ces modifications morphologiques, vont s'ajouter des modifications transcriptionnelles. Elles résultent d'un programme de régulation de gènes impliqués dans diverses fonctions cellulaires (chimiotactisme, phagocytose, dégranulation et explosion respiratoire dépendante de la NADPH oxydase, reconnaissance des cellules phagocytées). L'expression de gènes codant pour des récepteurs (des immunoglobulines, intégrines) impliqués dans la chimiotaxie et la phagocytose est diminuée. Alors que l'expression de gènes de molécules impliquées dans la reconnaissance des polynucléaires neutrophiles apoptotiques par les macrophages est augmentée.

Ces changements morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose peuvent être observés dans le polynucléaire neutrophile apoptotique. Classiquement et schématiquement, deux voies de signalisation intrinsèque ou extrinsèque (**Figure 6**), peuvent aboutir à l'apoptose du polynucléaire neutrophile.

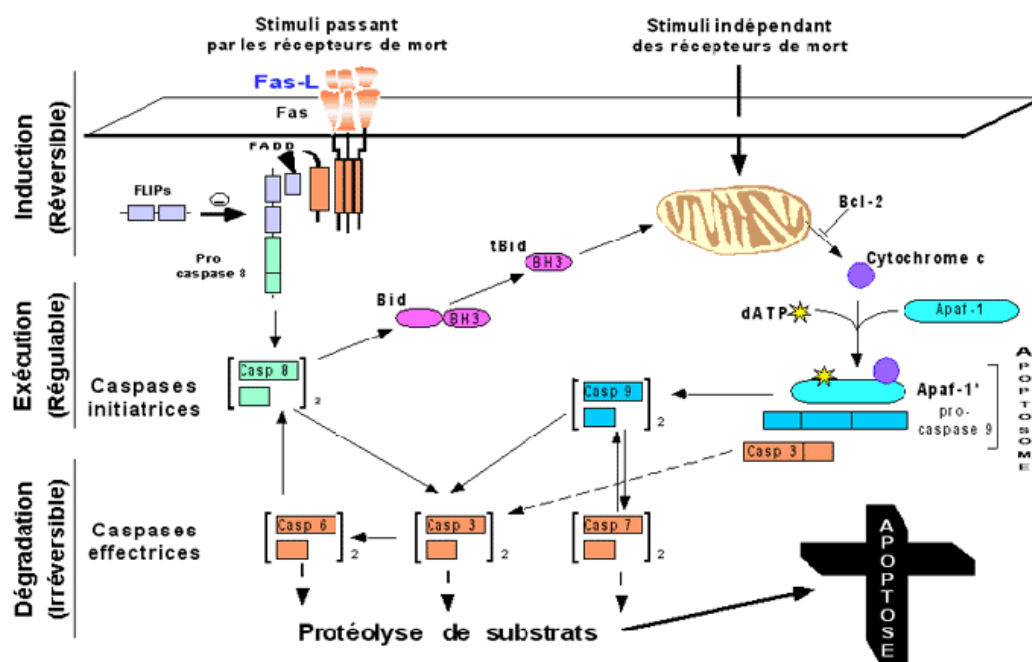


Figure 6: Les voies de l'apoptose *Adapté de (Los, Wesselborg et al. 1999)*

La voie extrinsèque ou « récepteurs de mort »: la liaison du ligand sur les récepteurs de mort à la surface de la cellule apoptotique induit la trimérisation de ce dernier et le recrutement des protéines comme FADD. L'interaction entre ces protéines et la pro-caspase-8 induit sa dimérisation et son activation. La caspase-8 activée va, à son tour, activer notamment la caspase-3, caspase effectrice qui va induire l'apoptose de la cellule. La caspase-8 peut également cliver Bid en une forme tronquée tBid qui va déclencher le relargage du cytochrome c vers le cytoplasme de la cellule. Cet événement va initier la voie intrinsèque de l'apoptose. Le cytochrome c interagit alors avec la protéine Apaf-1 et la pro-caspase-9 pour former un complexe appelé apoptosome. La caspase-9 est activée dans ce complexe et va à son tour activer la caspase-3. L'activation des caspases effectrices aboutit à la protéolyse de substrats impliqués dans la régulation de l'apoptose de la cellule.

1.1. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est induite par des stimuli extracellulaires et permet l'activation de « récepteurs de mort » (Yan and Shi 2005). La voie extrinsèque de l'apoptose dans le polynucléaire neutrophile implique l'activation des récepteurs (FAS, TNFRI et TNFRII) par leurs ligands (TNF- α , FASL, CD95L). D'autres récepteurs sont exprimés par le polynucléaire neutrophile : les récepteurs TRAILR (TRAILR 1, 2, 3, 4, 5). Or, seuls les récepteurs TRAILR1 et TRAILR2 peuvent induire une apoptose dépendante des caspases. Du fait de l'absence de « *death domain* » sur les récepteurs TRAILR3 et TRAILR4, ces derniers servent de leurres et piègent à la fois le ligand TRAIL et les récepteurs TRAILR1 et TRAILR2 *via* leur interaction. Les récepteurs de mort présentent un domaine de mort à des protéines adaptatrices comme la protéine FADD (*Fas-associated-death domain*) et/ou la protéine TRADD (*TNFR1-associated death domain*). Ainsi, un complexe multiprotéique est formé appelée *Death-inducing signaling* (DISC). Ce complexe permet le recrutement des caspases dites initiatrices (caspases-2,-8,-9 et -10).

1.2. La voie intrinsèque

La voie intrinsèque appelée voie mitochondriale est induite par des stimuli intracellulaires (dommages d'ADN, infection virale, agents génotoxiques, privation de facteurs de croissance). L'apoptose constitutive du polynucléaire neutrophile semble être dépendante de la voie mitochondriale. En absence de stimuli, le polynucléaire neutrophile isolé du sang s'engage spontanément vers l'apoptose dite « constitutive ». Mais, les mécanismes moléculaires qui la régulent ne sont pas encore bien connus. Il semblerait que cette apoptose spontanée soit liée à une diminution de l'activité de la voie de survie PI3K/Akt du polynucléaire neutrophile. L'apoptose constitutive met également en jeu la voie mitochondriale bien que la présence des mitochondries dans cette cellule ait été longtemps l'objet de controverse. En effet, les mitochondries des polynucléaires neutrophiles présents sous forme d'un réseau de tubules, ne synthétisent pas d'ATP mais possèdent un potentiel transmembranaire (Maiani, Geissler et al. 2004). La voie mitochondriale est strictement contrôlée par les membres de la famille Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) qui régulent le relargage dans le cytoplasme du cytochrome c, contenu dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Dans le polynucléaire neutrophile apoptotique, les mitochondries forment des "clusters" et colocalisent avec la protéine pro-apoptotique Bax (Maiani, Mul et al. 2002). Les polynucléaires neutrophiles possèdent de fortes concentrations de protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bak, Bad, Bik et Bid. En revanche, ils n'expriment pas la

protéine anti-apoptotique Bcl-2 mais expriment Mcl-1 et A1, protéines homologues de Bcl-2 majoritaires dans ce type cellulaire.

L'oligomérisation de protéines telles que Bax ou Bak permet de former des pores dans la membrane mitochondriale et de faciliter ainsi la libération du cytochrome c. Ainsi, le cytochrome c se fixe à la protéine *Apoptosis protease-activating factor-1*, (Apaf-1). Apaf-1 change de conformation pour former des heptamères. Ce qui permet une association homophile de type CARD-CARD de la pro-caspase 9 avec chaque Apaf-1. Ce multicomplexe constitue l'apoptosome. La pro-caspase 9 est alors activée et peut à son tour activer d'autres caspases effectrices comme la caspase-3 (**Figure 7**).

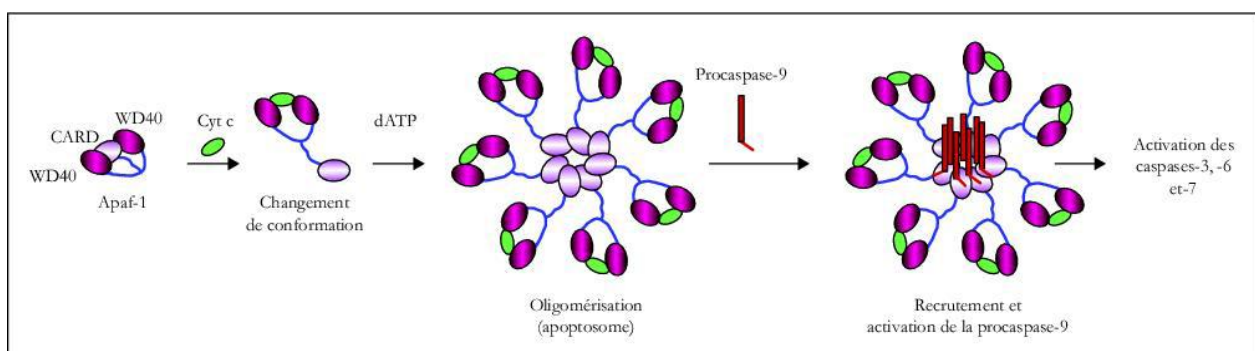


Figure 7 : L'apoptosome, d'après *Bulletin du Cancer Volume 92 Numéro 1, 23-25, Janvier 2005, Synthèse*

Au cours de l'apoptose, le cytochrome c (cyt c) relargué de la mitochondrie va se fixer sur la région carboxy-terminale d'Apaf1, riche en répétitions WD40. Cette fixation induit un changement de conformation de cette protéine qui, en présence d'ATP, va s'oligomériser en une structure heptamérique, l'apoptosome. Cette structure va recruter et activer la pro-caspase-9. Celle-ci, à son tour, active la cascade dont les caspases 7 et 3.

Dans le polynucléaire neutrophile, la quantité de cytochrome c libérée dans le cytosol est très faible en comparaison aux autres cellules (Maiani, Geissler et al. 2004). Il a été suggéré que les polynucléaires neutrophiles présentaient un taux plus faible que les autres cellules pour induire l'apoptose. Mais ce faible taux est compensé par l'expression élevée de la caspase-9 et de Apaf-1 (Murphy, O'Neill et al. 2003).

La voie mitochondriale fait également intervenir des protéines régulatrices telles que Smac/Diablo et les IAPs (*X linked inhibitors of apoptosis*) exprimés dans les polynucléaires neutrophiles. Les IAPs se fixent aux caspases activées et ainsi inhibent leurs fonctions apoptotiques. L'activité de ces IAPs est inhibée par la protéine Smac/Diablo. Cette dernière, libérée dans l'espace inter-membranaire mitochondriale, se lie aux IAPs et empêche leur fixation aux caspases. La protéine AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) libérée par la

mitochondrie va agir selon un mécanisme indépendant des caspases. Elle va se relocaliser dans le noyau pour assurer la condensation de la chromatine et le clivage de l'ADN.

1.3. Les caspases

Les voies intrinsèque et extrinsèque aboutissent à l'activation des caspases, cystéine protéinases jouant un rôle clé dans l'apoptose. Elles sont synthétisées sous forme de précurseurs ou zymogènes appelés pro-caspases. Sous l'influence d'un stimulus apoptotique, les caspases initiatrices sont activées par recrutement au complexe DISC (caspases-8,-10) (voie extrinsèque) ou à l'apoptosome (caspases-9). L'activation des caspases se fait par des clivages successifs qui permettent leur dimérisation. Les caspases initiatrices vont cliver les caspases effectrices (caspases-3,-6,-7) pour les rendre actives. Ces dernières seront impliquées dans l'exécution des processus apoptotiques. Après liaison du TNF- α sur les récepteurs de mort, la pro-caspase-8, caspase initiatrice, est activée en caspase-8 et va cliver les caspases effectrices. De façon très particulière, la voie extrinsèque est activée par la cathepsine D libérée des granules azurophiles. Ce mode d'activation de la caspase-8 est spécifique au polynucléaire neutrophile (Conus, Perozzo et al. 2008). La caspase-9 joue un rôle important dans l'activation de la caspase-3. La protéine Bid joue le rôle de connecteur entre la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. L'activation de Bid implique son clivage par la caspase 8. La protéine Bid tronquée peut alors être transloquée à la membrane de la mitochondrie et déclencher sa dépolarisation. La caspase-10 est également impliquée dans l'apoptose physiologique ou spontanée du polynucléaire neutrophile. L'exécution des processus apoptotiques est assurée par les caspases effectrices (caspases-3 et -7). La caspase-3, effectrice majeure, a un rôle important dans l'apoptose du polynucléaire neutrophile. En ce qui concerne la caspase-7, seul son ARNm a été détecté. Néanmoins, une étude d'activité de caspases dans les polynucléaires neutrophiles a révélé une activité de la caspase-7 combinée à celle de la caspase-3, du fait de l'utilisation d'un substrat peu spécifique (Dragon, Saffar et al. 2008). Ainsi, les substrats de ces caspases rendent compte des caractéristiques de l'apoptose évoquées ci-dessus.

Les protéines structurales, de signalisation, du métabolisme ADN/ARN et du cycle cellulaire sont clivées afin de répondre aux signaux de mort induits par des stimuli intracellulaires ou extracellulaires.

2. Régulation de l'apoptose des polynucléaires neutrophiles

2.1. Les régulateurs de l'apoptose des polynucléaires neutrophiles

2.1.1. La famille Bcl-2

De nombreux facteurs interviennent pour favoriser l'apoptose et de nombreux stimuli aboutissent à une voie passant par les protéines de la famille Bcl-2. Les membres de cette famille ont soit une activité anti-apoptotique comme Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 ou A1, soit une activité pro-apoptotique comme Bax, Bik, Bad, Bak ou Bid (Zha and Reed 1997). Les protéines de la famille Bcl-2 régulent positivement ou négativement l'ouverture des pores de la membrane de la mitochondrie, ce qui conduit ou non à la libération du cytochrome c dans le cytosol. L'alignement de leurs séquences protéiques a permis de définir quatre régions de forte conservation appelées domaines BH (pour « *Bcl-2 homology* ») 1 à 4 (**Figure 8**). La distribution de ces domaines permet de regrouper cette famille en trois classes :

- Les membres anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X_L, A1 et Mcl-1 présentent des homologies de séquence dans les domaines BH1, 2, 3 et 4. Il est à signaler toutefois que certains de ces membres ne possèdent pas de domaine BH4.
- Les membres pro-apoptotiques comme Bax, Bak et Bad présentent des homologies de séquence dans les domaines BH1, 2 et 3 mais pas ou peu dans les domaines BH4.
- Les membres n'ayant qu'un seul domaine BH3, les protéines « *BH3 only* ». Ce sont des protéines pro-apoptotiques (Bid, Bim, Bad).

Ces protéines interagissent entre elles formant des homodimères ou des hétérodimères. Le niveau relatif de l'ensemble de ces protéines, anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques, dans la cellule, détermine la sensibilité de celle-ci à un signal de mort (Adams and Cory 1998). Par ailleurs, une grande majorité d'entre elles contiennent une partie carboxy-terminale hydrophobe qui assure leur ancrage au niveau de la membrane externe mitochondriale, mais également des membranes externes du réticulum endoplasmique et du noyau. Les molécules anti-apoptotiques seraient localisées dans la mitochondrie tandis que les protéines pro-apoptotiques posséderaient une localisation différente (cytosol ou microtubules). À la suite d'un signal apoptotique, ces dernières s'inséreraient dans la membrane mitochondriale et induiraient sa perméabilisation (Crompton 2000). Il a été proposé que cette capacité d'insertion soit liée à leur similitude de structure avec certaines toxines bactériennes, leur permettant de former des pores transmembranaires modulant ainsi la libération de molécules. De façon surprenante, certains mécanismes mis en jeu au cours de l'apoptose sont très spécifiques aux polynucléaires neutrophiles. En effet, l'absence de protéines anti-apoptotiques

comme Bcl-2 ou Bcl X_L sont des particularités observées dans le polynucléaire neutrophile (Edwards, Derouet et al. 2004) (**Tableau II**). En revanche, Mcl-1 a été décrit comme le principal homologue de Bcl-2 à contrôler l'apoptose du neutrophile (Edwards, Derouet et al. 2004).

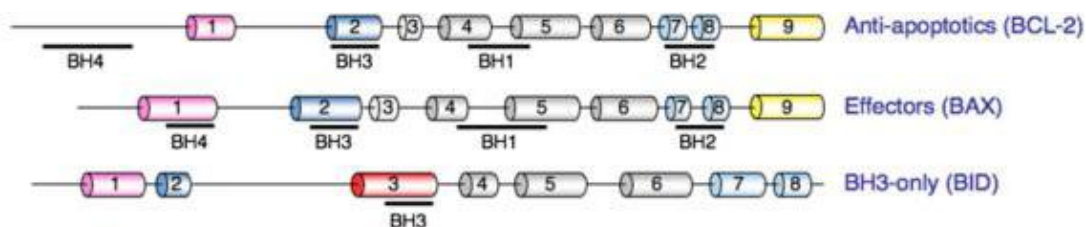


Figure 8 : Composition de la famille Bcl-2 (Chipuk, Moldoveanu et al. 2010)

Les protéines de la famille Bcl-2 sont constituées de domaines homologues de Bcl-2 (Domaines BH). Représentation d'une molécule anti-apoptotique (Bcl-2), effectrice (Bax) et BH3-only (Bid).

Tableau II : Les molécules pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Le polynucléaire neutrophile possède des molécules régulatrices spécifiques de son apoptose. On note au niveau des molécules anti-apoptotiques, l'absence de Bcl-2 mais la présence d'A1.

	Molécules pro-apoptotiques	Molécules anti-apoptotiques
Polynucléaire neutrophile	Bax, Bid, Bak et Bad, Bim, Bik	Mcl-1, A1
Autres cellules	Bax, Bid, Bak, Bad, Bim	Bcl-2, Bcl-X _L , Mcl-1

2.1.2. La voie NFκB dans les polynucléaires neutrophiles

NFκB (facteur nucléaire kappa B) est un facteur transcriptionnel séquestré dans le cytoplasme sous une forme inactive, liée à sa protéine inhibitrice IκBα. Des stimuli variables permettent la phosphorylation de IκBα par des protéines kinases. IκBα est alors dégradé par le système ubiquitine-protéasome. NFκB, ainsi libéré, migre du cytoplasme vers le noyau et se fixe au niveau des régions promotrices de gènes de survie tels que Bcl-X_L, « *Inhibitors of Apoptosis Proteins* » (IAP) ou « *FADD-Like ICE Inhibitory Proteins* » (FLIP) (Schultz and Harrington 2003). La protéine FLIP est capable de se fixer au pro-domaine de la caspase-8 et donc d'empêcher leur recrutement par les récepteurs de mort.

2.2. Les protéines du cycle cellulaire et de la réplication, nouvelle voie de recherche dans le contrôle de l'apoptose du polynucléaire neutrophile

Le polynucléaire neutrophile est une cellule singulière dans la mesure où sa survie ne dépend que de l'inhibition de l'apoptose car elle n'a pas de possibilité de différenciation ou de multiplication. La régulation de cette survie doit être extrêmement minutieuse et orchestrée en fonction de la situation dans laquelle se trouve le polynucléaire neutrophile, état physiologique ou inflammatoire. Il a été observé que certaines protéines régulant le cycle cellulaire étaient exprimées dans le polynucléaire neutrophile mais leur fonction n'était pas définie.

Des études récentes ont mis en évidence que le polynucléaire neutrophile pouvait ré-exprimer des protéines régulatrices du cycle cellulaire et anti-apoptotiques comme la survivine (Altznauer, Martinelli et al. 2004), considérée comme un marqueur des cellules cancéreuses. La survivine est une protéine membre de la famille des IAPs. Sa surexpression inhibe l'apoptose des cellules induite par différents stimuli. Il a été montré que la survivine était fortement exprimée dans les polynucléaires neutrophiles immatures de la moelle osseuse. L'inhibition de la voie PI3K/Akt induit une diminution de son expression dans ces cellules immatures. En revanche, celle-ci est faiblement exprimée dans le polynucléaire neutrophile mature libéré dans la circulation. La réactivation de son expression au stade mature n'est possible qu'après stimulus inflammatoire. L'utilisation d'oligonucléotides spécifiques de la survivine a montré un retard d'apoptose des polynucléaires neutrophiles matures après traitement par des cytokines telles que GM-CSF et G-CSF. Ainsi, il semblerait que le polynucléaire neutrophile utilise des protéines régulatrices du cycle cellulaire de cellules proliférantes, pour réguler son apoptose.

De façon intéressante, il a été montré qu'un inhibiteur pharmacologique des cyclines dépendantes des kinases, la roscovitine pouvait déclencher l'apoptose du polynucléaire neutrophile, posant ainsi la question de l'activité des CDKs dans une cellule non proliférante (Rossi, Sawatzky et al. 2006). Les CDKs sont des enzymes qui régulent le cycle cellulaire dans les cellules proliférantes. Les CDKs forment des complexes hétérodimères avec les cyclines, leurs sous-unités régulatrices, et catalysent la phosphorylation de protéines cibles jouant un rôle dans les événements du cycle cellulaire ou dans l'avancement du cycle.

Les protéines p21^{Cip1/Waf1} et p27^{Kip1} appartiennent à la même famille Cip/Kip d'inhibiteurs des CDKs. En raison de leur homologie de séquence, elles possèdent les mêmes fonctions d'inhibition sur leurs protéines cibles et donc régulent le cycle cellulaire. Elles

assurent ce rôle dans le noyau des cellules cyclantes. Elles possèdent d'autres fonctions dans le noyau notamment, elles jouent le rôle de cofacteurs de transcription en activant des facteurs de transcription tels que NF- κ B, STAT3, Myc, C/EBP et E2F. La protéine p21^{Cip1/Waf1} n'est pas exprimée dans le polynucléaire neutrophile à l'état basal mais son gène est induit in vivo par une stimulation avec le lipopolysaccharide suggérant fortement que la p21^{Cip1/Waf1} pourrait jouer un rôle régulateur dans la survie du polynucléaire neutrophile dans des conditions inflammatoires (Coldren, Nick et al. 2006).

Des fonctions cytoplasmiques originales de ces protéines sont aussi connues. Les protéines p21^{Cip1/Waf1} et p27^{Kip1} seraient impliquées dans des mécanismes régulant l'apoptose. D'ailleurs, il a été montré que la protéine p21^{Cip1/Waf1} cytoplasmique dans le monocyte formait un complexe avec des protéines kinases (SAP et ASK1), afin d'inhiber leurs activités catalytiques et empêcher l'induction de l'apoptose (Coqueret 2003). En ce qui concerne la protéine p27^{Kip1} cytoplasmique, sa fonction anti-apoptotique n'est pas connue. Il est tout de même admis que l'expression cytoplasmique de p27^{Kip1} est corrélée à un pronostic tumoral. En effet, 40% des cancers mammaires et 35% des cancers du colon présentent la protéine p27^{Kip1} dans le cytoplasme.

Pourtant, la surexpression de p27^{Kip1} dans des cellules humaines leucémiques U937, inhibe la libération du cytochrome c, l'activation de la pro-caspase-3 et permet une stabilité de l'expression de la protéine Bcl-2, anti-apoptotique, Mcl-1 (Eymin, Haugg et al. 1999). Ces données suggèrent qu'une relocalisation de p27^{Kip1} dans le cytoplasme pourrait être à l'origine d'une résistance à l'apoptose. En ce qui concerne la protéine p21^{Cip1/Waf1}, aucune localisation cytoplasmique de cette protéine n'a été associée au cancer.

D'autres fonctions corrélées à la localisation des protéines du cycle cellulaire ont été trouvées, notamment dans le processus de différenciation des cellules. Pour exemple, p21^{Cip1/Waf1} devient cytoplasmique au cours de la différenciation monocyttaire des cellules U937 (Asada, Yamada et al. 1999) mais également au cours de la différenciation neuronale (Tanaka, Yamashita et al. 2002).

De façon générale, ces protéines sont connues pour jouer des fonctions nucléaires dans la prolifération. Or, de nouvelles fonctions cytoplasmiques leur sont attribuées. Plusieurs autres exemples illustrant ce concept sont intéressants et montrent que la localisation intracellulaire d'une protéine dépend de sa fonction et vice versa.

2.3. Expression et localisation de PCNA dans le polynucléaire neutrophile

Dans ce contexte, des résultats du laboratoire ont montré la présence du Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), dans le polynucléaire neutrophile mature. A l'instar des protéines du cycle précédemment décrites, PCNA était jusqu'alors connu pour ses fonctions nucléaires essentielles dans la réplication et la réparation de l'ADN ainsi que la régulation du cycle cellulaire. De façon intéressante, une grande quantité de la protéine PCNA a été mise en évidence dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles matures. Le polynucléaire neutrophile ayant perdu toute capacité de prolifération ou de différenciation, la fonction de PCNA cytosolique était alors inconnue. En effet, à ce jour, seules les fonctions de PCNA nucléaire ont été étudiées.

III. PCNA, une protéine plateforme contrôlant la survie cellulaire

1. PCNA, protéine clé de la réplication et de la réparation de l'ADN : fonctions nucléaires

L'étroite relation de PCNA avec la réplication de l'ADN a été suggérée par des analyses d'expression de PCNA par immunofluorescence indirecte parallèlement à des études d'incorporation de thymidine tritiée.

Par la suite, l'identification de PCNA comme facteur de processivité des ADN polymérases, place cette protéine au cœur du complexe de réplication (replisome). PCNA joue le rôle de chef d'orchestre en interagissant avec les partenaires de la réplication (ADN polymérases, CDKs, cyclines, hélicases, topoisomérases ...) (Maga and Hubscher 2003).

2. PCNA est une protéine plateforme

2.1. PCNA et ses partenaires dans la phase S du cycle de la division cellulaire

Doté de sa structure trimérique, PCNA peut s'ouvrir et se refermer autour de l'ADN nouvellement synthétisé *via* son chargement par le RFC (Replication Factor C) (**Figure 9**) (Kelman 1997). Les mécanismes moléculaires par lesquels PCNA agit comme facteur de processivité de l'ADN polymérase δ proviennent d'études de PCNA et de la sous unité β de l'ADN polymérase III d'*Escherichia coli*.

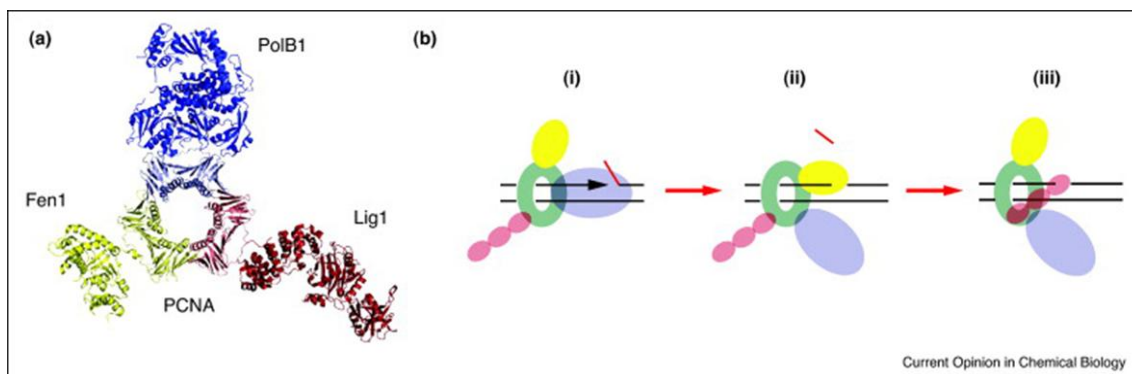


Figure 9: Rôle de la protéines PCNA dans la maturation du fragment d'Okazaki (Beattie and Bell 2011)

(a) Modèle structural du complexe médié par PCNA. PCNA est constitué de trois sous-unités distinctes (jaune, bleu et rouge). (b) La processivité de l'ADN polymérase δ (bleu) est ainsi activée par PCNA (vert) pour pouvoir assurer la réplication de l'ADN. La synthèse des fragments d'Okazaki est achevée quand l'ADN polymérase δ se heurte à l'extrémité 5' de l'amorce d'ARN synthétisé du fragment adjacent. Grâce à leur chargement sur les brins d'ADN *via* PCNA, d'autres protéines (FenI, jaune et la RNase H) éliminent les amorces d'ARN et la ligation des brins d'Okazaki est assurée par la DNA ligase I (Lig1, rouge) rendant continu le brin d'ADN.

Dans le cadre de son activité de réplication de l'ADN, PCNA s'associe successivement à différentes protéines partenaires et a été appelé "*the Maestro of the replication*" (Moldovan, Pfander et al. 2007) car il a véritablement un rôle dans l'orchestration de ce phénomène. L'analyse par des techniques de GST pull down de mutants de délétions de la partie amino-terminale (2-64) et/ou de la partie carboxy-terminale (197-228) de PCNA, a révélé que ces deux régions étaient nécessaires à son interaction avec des protéines régulatrices du cycle cellulaire comme les cyclines de type D. La protéine p21^{Cip1/Waf1} compte parmi les partenaires importants de PCNA nucléaire car cette protéine a la capacité d'inhiber les fonctions de PCNA en se fixant sur un site bien particulier de PCNA appelé "*Interdomain Connecting Loop*". L'étude cristallographique de PCNA associé à p21^{Cip1/Waf1} a permis de déterminer les acides aminés engagés dans cette interaction. Le domaine appelé *Interdomain Connecting Loop* (ICL) de PCNA de la méthionine 119 à la glycine 217 interagit avec la partie carboxy-terminale de p21^{Cip1/Waf1} de l'histidine 152 à la sérine 160 (Gulbis, Kelman et al. 1996).

p21^{Cip1/Waf1} possède un motif conservé appelé *PCNA Interaction Protein Box* (PIP-Box). Ce motif se caractérise par la séquence QXX(h)XX(a)(a), où X est un acide aminé quelconque, (h) un acide aminé hydrophobe (leucine, isoleucine ou méthionine) et (a) indique un acide aminé très hydrophobe avec généralement un cycle aromatique tel que la phénylalanine ou la tyrosine (Warbrick, Heatherington et al. 1998).

2.2. PCNA et ses partenaires de la réparation de l'ADN

L'importance de PCNA dans la réparation de l'ADN a émergé de plusieurs observations. La première observation découle d'études immunocytochimiques par l'utilisation d'anticorps anti-PCNA. Bien que les cellules (cellules de la membrane amniotique) ne soient pas en phase S, la distribution de PCNA restait fortement nucléaire après irradiation par rayonnements ultraviolets. L'étude de mutants chez la levure ou chez la drosophile de PCNA convergent vers la même observation à savoir une forte sensibilité aux dommages d'ADN. Il existe quatre mécanismes de réparation de l'ADN : les mécanismes de réparation d'excision/réparation comme celui de nucléotides « *Nucleotide Excision Repair* », (NER), le mécanisme de réparation d'excision de bases « *Base Excision Repair* », (BER), le mécanisme de réparation des mésappariements « *Mismatch Repair* », (MMR) et enfin la réparation des doubles brins « *Double Strand Breaks* », (DSBR). Le mécanisme de réparation/excision permet de repérer le brin d'ADN endommagé et de l'exciser puis de le remplacer en utilisant le brin intact comme matrice. Le mécanisme de réparation des doubles brins fait appel à une recombinaison homologue, qui est le processus le plus privilégié, quand la disponibilité de chromatide homologue le permet (fin de S, G2). Tous ces mécanismes de réparation nécessitent la coordination d'ADN polymérases spécialisées comme l'ADN polymérase ϵ , l'ADN polymérase δ et de PCNA (Hubscher, Maga et al. 2002).

PCNA interagit avec des protéines de ces quatre types de réparations d'ADN: elle interagit avec l'endonucléase XPG impliquée dans le NER, également avec les protéines impliquées dans la réparation de mésappariements comme les protéines MSH2, MSH3 et MSH6.

PCNA a un rôle dans la réparation de la synthèse translésionnelle (TLS) en tant que co-facteur des enzymes de réparation. Elle permet de remplacer l'ADN polymérase δ de la réplication par des ADN polymérases spécialisées dans la réparation post-réplivative telles que l'ADN polymérase η , κ , ou λ (Maga and Hubscher 2003).

3. Autres fonctions de PCNA

3.1. Rôle de PCNA dans les cellules qui ne prolifèrent pas

Plusieurs études ont montré que l'expression nucléaire de PCNA était essentielle à la progression dans le cycle de division cellulaire. Cependant, quelques études ont suggéré une implication indépendante du cycle cellulaire. Ainsi, dans des fibroblastes embryonnaires de souris NIH3T3 privés de sérum (en phase G0), PCNA est relocalisé dans le cytoplasme laissant penser qu'une fonction de PCNA cytoplasmique pourrait exister (Vriz, Lemaitre et al. 1992).

L'expression de PCNA a également été observée dans le noyau de cellules engagées dans la différenciation notamment dans des myocytes d'origine humaine et des neurones post-mitotiques de souris. Compte tenu de leur état de différenciation avancé, il a été suggéré que PCNA aurait un rôle dans la réparation de l'ADN.

3.2. PCNA et apoptose

Les premières études qui indiquent que le gène codant la protéine PCNA est un gène essentiel impliqué dans la survie cellulaire portent sur l'étude du phénotype de souris wst (wasted). Ces souris présentent une augmentation de la sensibilité aux radiations ionisantes. L'analyse par électrophorèse bidimensionnelle de protéines issues de thymus de souris contrôle et wst a révélé une perte d'expression de la protéine PCNA chez les souris wst. Ces données ont été confortées par une étude de l'ARNm de PCNA faiblement exprimé chez ces souris. Enfin, l'analyse du gène codant la protéine PCNA par Southern-Blot ne présentait aucune altération.

Cependant, un défaut de régulation du gène dans le thymus de ces souris a été suggéré, et serait l'origine probablement d'une sensibilité aux radiations et un défaut de régulation du cycle cellulaire. D'autres études ont souligné la fonction vitale en utilisant des oligonucléotides antisens complémentaires de l'ARNm de PCNA. Ce traitement empêche les cellules d'entrer en phase S et induit une mort cellulaire (Morita, Kashihara et al. 1997). Très récemment, il a été montré que l'extinction de l'expression du gène PCNA par interférence ARN (siRNA) dans des lignées leucémiques myéloïdes chroniques inhibe la prolifération des cellules indépendamment de la voie de BCR-ABL.

De plus, cette extinction du gène de PCNA induit la surexpression d'une part, de gènes du cycle cellulaire (p21^{Cip1/Waf1}, CDK1), et d'autre part, de gènes pro-apoptotiques tandis que

l'expression de gènes anti-apoptotiques (survivine, Mdm2 (*murine double minute 2*), Daxx (*death domain-associated protein 6*), est diminuée (Merkerova, Bruchova et al. 2007).

PCNA peut s'associer avec des protéines inhibitrices de la croissance cellulaire ou activatrices de l'apoptose telles que Gadd45 et MyD118. Des peptides issus de la séquence de Gadd45 ou de MyD188 peuvent jouer le rôle de compétiteurs avec les protéines entières pour l'interaction avec PCNA. De plus, des mutants Gadd45 ou MyD188 à qui il manque le domaine d'interaction avec PCNA induisent l'apoptose de façon plus efficace. L'interaction de PCNA avec ces deux protéines aurait un effet anti-apoptotique et pro-prolifératif (Vairapandi, Azam et al. 2000).

PROJET DE RECHERCHE

Notre laboratoire est focalisé depuis de nombreuses années sur les polynucléaires neutrophiles dans les mécanismes de l'inflammation (Witko-Sarsat, Rieu et al. 2000). En effet, outre son rôle essentiel dans la défense infectieuse, le polynucléaire neutrophile possède un fort potentiel pro-inflammatoire, en raison des médiateurs hautement toxiques qu'il peut libérer lorsqu'il est stimulé. Ainsi, la résolution de l'inflammation dépend de son élimination rapide, sans effet délétère, sur les tissus environnants: pour cela, le polynucléaire neutrophile doit apoptoser pour être phagocyté par les macrophages. En revanche, un retard d'apoptose du polynucléaire neutrophile et/ou sa mort par nécrose, amplifient le phénomène inflammatoire. Il est important de noter que le polynucléaire neutrophile est une cellule en fin de différenciation, qui a perdu toute capacité de proliférer: sa seule possibilité est la survie ou la mort. Ainsi, l'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximine déclenche immédiatement l'apoptose du polynucléaire neutrophile car il doit synthétiser en permanence des protéines de survie. Il représente donc un modèle assez unique pour étudier les mécanismes régulant la balance survie/apoptose indépendamment du cycle cellulaire. Dans le laboratoire, PCNA a été identifié dans une étude protéomique visant à caractériser des protéines cytosoliques qui variaient au cours de l'apoptose du polynucléaire neutrophile. Par ailleurs, la protéine p21 appartient à la famille des inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CDKI) et représente une protéine partenaire de PCNA qui a été largement étudiée dans d'autres modèles cellulaires. Son expression est ubiquitaire. Dans le laboratoire, il a été montré que p21 était présente dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles et qu'elle pouvait être clivée par la protéinase 3, dans certaines conditions inflammatoires (Witko-Sarsat, Canteloup et al. 2002). P21 a été, en outre, décrite dans le cytosol d'un autre type de cellules phagocytaires, les monocytes, où elle avait un rôle anti-apoptotique (Asada, Yamada et al. 1999).

Il apparaît donc pertinent de comprendre le rôle des protéines PCNA et p21 dans la régulation de l'apoptose du polynucléaire neutrophile afin de pouvoir la moduler pharmacologiquement: contrôler l'apoptose du polynucléaire neutrophile représenterait une possible cible thérapeutique pour moduler l'inflammation (Ward, Chilvers et al. 1999).

L'objectif principal de mon travail a été d'étudier si PCNA et p21 avaient une fonction particulière dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles.

Pour cela, j'ai réalisé des études sur les polynucléaires neutrophiles isolés :

- Localisation subcellulaire de PCNA dans le polynucléaire neutrophile mature
- Analyse de son expression au cours de l'apoptose spontanée ou modulée des polynucléaires neutrophiles

- Analyse de l'effet d'un peptide compétiteur de p21 sur la modulation de l'apoptose des polynucléaires neutrophiles
- Identifier des partenaires de PCNA dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles

Etant donné que le polynucléaire neutrophile est une cellule à courte durée de vie et en fin de différenciation, de nombreuses limitations techniques nous empêchent de les cultiver, de les transfecter afin de moduler leurs fonctions. Ainsi, pour définir plus précisément le rôle moléculaire de PCNA dans le cytosol de polynucléaires neutrophiles, il était nécessaire d'utiliser un modèle cellulaire. Ma contribution principale à cette étude a donc été de mettre au point un modèle fiable de polynucléaires neutrophiles en culture afin d'étudier la modulation de protéines d'intérêt comme PCNA et la protéine p21. Après un essai non fructueux avec la lignée NB4, lignée promyélocytaire, j'ai mis au point la différenciation des cellules promyélocytaires PLB-985 en polynucléaires neutrophiles.

Une fois le modèle mis en place, la transfection des cellules PLB-985 a ensuite été optimisée grâce à la technologie Amaxa[®] afin de :

- Etudier l'effet de la surexpression de nos protéines d'intérêt, PCNA et p21, sauvages ou mutées sur la modulation de l'apoptose des cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles
- Etudier l'effet du siRNA de PCNA sur la modulation de l'apoptose des cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles

MATERIELS ET METHODES

A. Le polynucléaire neutrophile humain mature

Comme expliqué dans l'introduction, les polynucléaires neutrophiles sont des cellules différenciées dédiées à la défense de l'hôte qui contiennent de grandes quantités de protéases et d'hydrolases qui peuvent être libérées lors de la lyse nécessaire à certaines méthodes de biochimie. La libération de ces protéases peut provoquer la dégradation de protéines d'intérêt et donc interférer avec nos résultats. Ainsi, de fortes concentrations d'anti-protéases devront être utilisées lors de la lyse de ces cellules, bien supérieures à celles utilisées pour d'autres types de cellules. Un autre aspect de la biologie des polynucléaires neutrophiles important pour notre travail d'évaluation de l'apoptose, est sa courte durée de vie. Ainsi, nos expériences d'isolement de polynucléaires neutrophiles ont toutes été réalisées dans les deux heures qui suivaient le prélèvement sanguin. Afin d'obtenir des données fiables, plusieurs techniques de mesure de l'apoptose ont été développées.

Les différentes techniques utilisées pour ce projet ont donc été adaptées aux cellules particulières que sont les polynucléaires neutrophiles.

I. Obtention d'un cytosol de polynucléaires neutrophiles

1. Isolement des polynucléaires neutrophiles à partir du sang

Les polynucléaires neutrophiles de donneurs sains proviennent de l'Etablissement Français du Sang (EFS). Les cellules sont recueillies à partir de prélèvements sanguins effectués sur tubes EDTA (3 tubes de 7mL). Une première centrifugation (200g, 20 minutes, 20°C) permet de retirer le sérum. Une deuxième centrifugation (1000g, 10 minutes, 20°C) de ce sérum permet l'élimination des plaquettes.

Le sang est ensuite reconstitué sans les plaquettes et déposé sur un gradient d'Histopaque (6 mL de sang sur 3 mL Histopaque 1077, *Sigma 10771*, et 3 mL Histopaque 1119, *Sigma 11191*) selon le schéma suivant (**Figure 10**). Les tubes sont ainsi centrifugés pour obtenir les anneaux de monocytes/lymphocytes et de polynucléaires neutrophiles (700g, 30 minutes, 20°C).

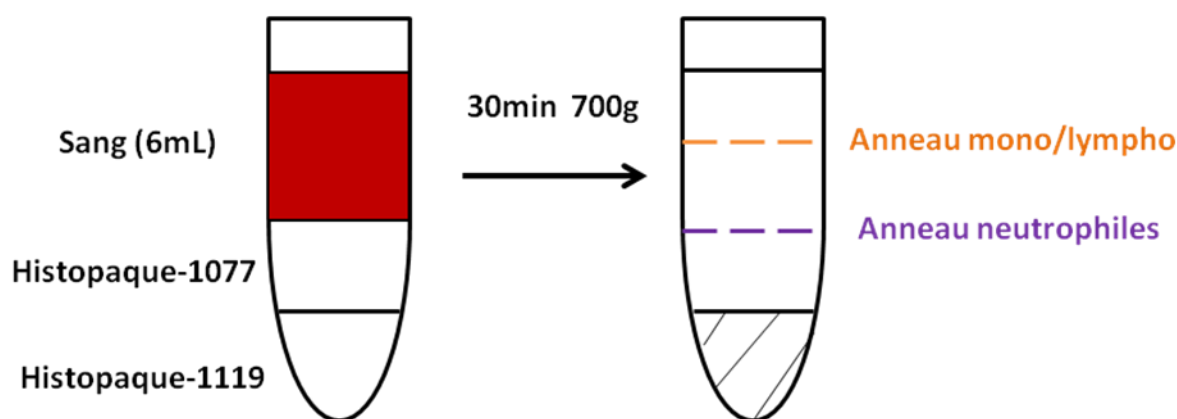


Figure 10 : Technique d'isolement des polynucléaires neutrophiles par le double gradient d'Histopaque

L'anneau de polynucléaires neutrophiles est ensuite lavé et une lyse des globules rouges résiduels est effectuée (ajout de 7 mL de NaCl 0,2%, agitation pendant 1 minutes, ajout de 7mL de NaCl 1.6%). Les polynucléaires neutrophiles sont comptés sur cellule de Malassez (dilution 1/20^{ème} en bleu Türk).

2. Fractionnement subcellulaire des polynucléaires neutrophiles pour l'obtention d'une fraction cytosolique

2.1. La cavitation

C'est la technique la plus fiable pour obtenir une fraction cytosolique dépourvue de protéines issues des organites telles que les granules. Ceci est important car le polynucléaire neutrophile contient de nombreux granules remplis de protéases qui sont susceptibles de dégrader les protéines cytosoliques. Elle nécessite un grand nombre de cellules (de l'ordre de 100 millions).

Les polynucléaires neutrophiles sont ajustés à $25 \cdot 10^6$ cellules par mL en PBS 1X. Après les avoir incubés avec 0,5 µg par mL de diisopropylfluorophosphate (DFP, anti-protéase lipophile liant de façon covalente le site catalytique des sérines protéases) pendant 15 min dans la glace, les polynucléaires neutrophiles sont lavés et réajustés à $20 \cdot 10^6$ cellules par mL en tampon relaxation (100 mM KCl, 3 mM NaCl, 3,5mM MgCl₂, 10 mM PIPES, 1 µM ATP, 400µM leupeptine, 400 µM pepstatine, 4 mM PMSF, 1 mM orthovanadate et 1 mM EDTA). Les polynucléaires neutrophiles sont ensuite enfermés dans la bombe à cavitation où ils subissent une pression de 350 psi pendant 20 min. Lors de la dépression, les cellules explosent et elles sont récupérées dans un tube contenant de l'EGTA (1,25 mM final).

Les cellules entières et les noyaux sont récupérés après 15 minutes de centrifugation à 3000 tours par minute (trs/min). Le surnageant obtenu est centrifugé à 16 000 trs/min dans une ultracentrifugeuse (Sorvall) pendant 45 minutes. Le culot correspond aux granules et est conservé à -80°C. Le surnageant obtenu est centrifugé à 36 000 trs/min dans une ultracentrifugeuse pendant 90 minutes. Le cytosol est ainsi isolé et conservé à -80°C sous forme d'aliquots (**Figure 11**).

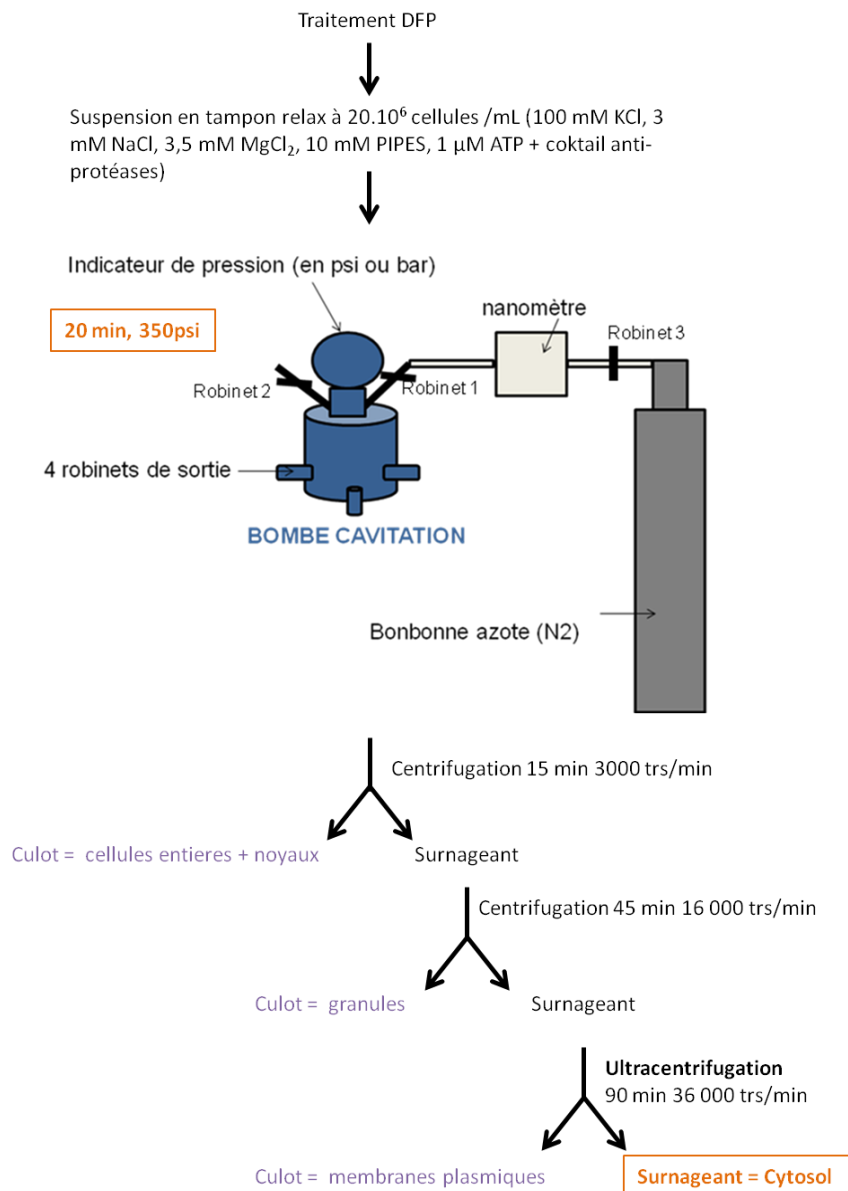


Figure 11 : Fractionnement subcellulaire après cavitation à l'azote

La bombe de désintégration de cellules assure la préparation d'un mélange homogène de cellules par une méthode de décompression à l'azote dans une enceinte en acier inoxydable. L'échantillon ne subit ainsi aucune contrainte physique ou chimique extrême.

Après différentes centrifugations, les fractions du polynucléaire neutrophile peuvent être isolées: le cytosol, les noyaux, les granules et les membranes plasmiques.

2.2. La pottérisation

C'est également une technique fiable qui nécessite également un grand nombre de cellules (environ $100 \cdot 10^6$ cellules).

Les cellules sont resuspendues à $100 \cdot 10^6$ cellules par mL dans du tampon d'homogénéisation (0,34 M sucrose, 10 mM Hepes, 0,3 mM EDTA) puis pottérisées 30 fois. Les broyats sont centrifugés 10 min à 2500 trs/min à 4°C. Le surnageant est lui-même centrifugé 35 min à 33 600 trs/min et le cytosol est ainsi obtenu. Ce dernier est conservé à -80°C (**Figure 12**). Les organites restent intacts avec cette technique.

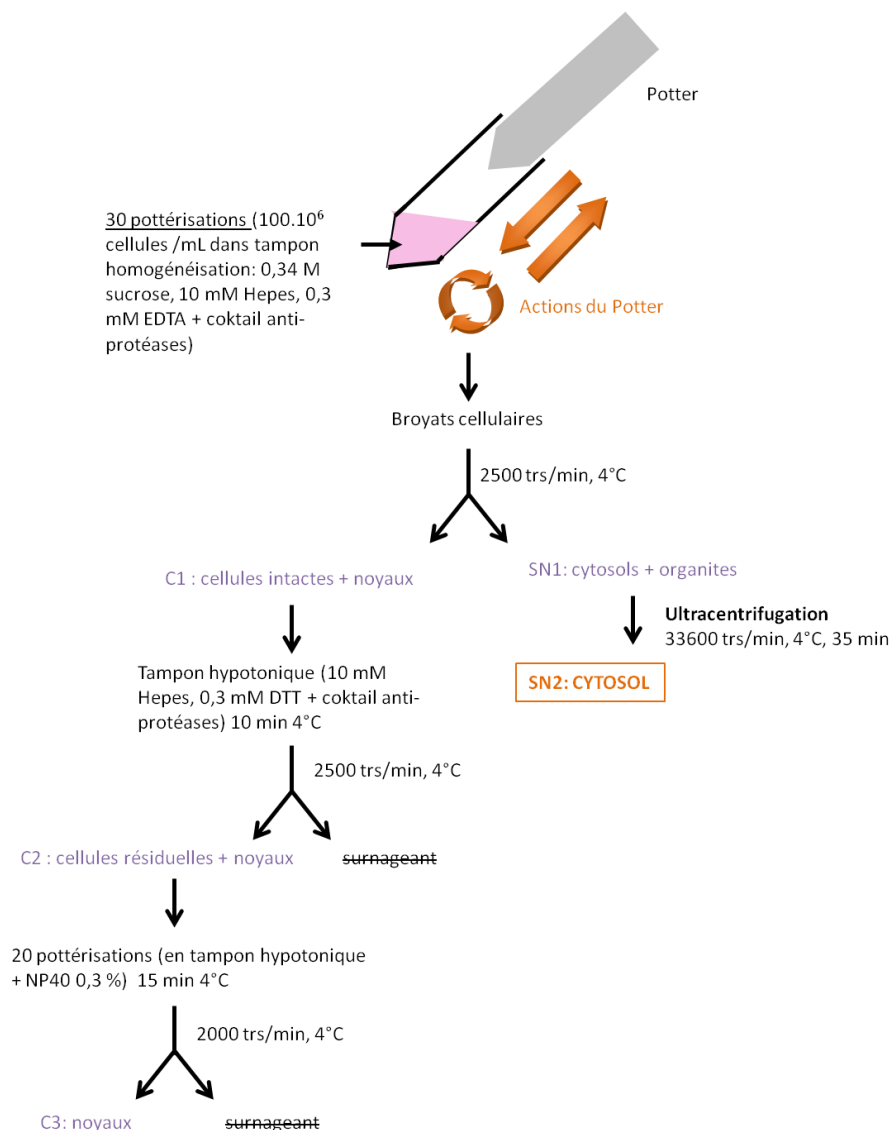


Figure 12: Fractionnement subcellulaire par pottérisation

Le potter est enfoncé au fond du tube conique, écrase la suspension cellulaire et est relevé. Cela constitue une pottérisation, qui va permettre de détruire les membranes des cellules. Différentes centrifugations permettent d'isoler le cytosol et les noyaux des polynucléaires neutrophiles.

2.3. La sonication

La sonication correspond à l'utilisation d'ultrasons pour rompre les membranes cellulaires. Dans le laboratoire, une faible sonication a été mise au point pour obtenir une fraction « cytosolique », c'est-à-dire sans casser les membranes des granules du polynucléaire neutrophile. Cette technique bien que moins "fiable" que la cavitation à l'azote permet d'obtenir une fraction cytosolique avec peu de polynucléaires neutrophiles (de l'ordre de $10 \cdot 10^6$ cellules). Afin de contrôler l'intensité de sonication pour éviter la rupture des granules, la concentration en myéloperoxydase (MPO), enzyme abondante des granules azurophiles, a été mesurée comme indice de rupture des granules. Nous avons vérifié que la concentration en MPO dans le cytosol n'était pas supérieure à celle obtenue avec la technique de cavitation à l'azote.

Les cellules sont reprises dans du tampon de sonication additionné d'anti-protéases (50 mM Hepes, 400 μ M leupeptine, 400 μ M pepstatine, 1 mM orthovanadate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA et 1 mM DTT) à $100 \cdot 10^6$ cellules par mL puis soniquées à une intensité de 1 pendant 20 secondes. Le sonicateur Soniprep 150 vendu par la société MSE est utilisé. Après centrifugation 10 min à 14 000 trs/min, le surnageant correspond à la fraction cytosolique conservée à -80°C .

3. Recherche de partenaires de PCNA dans le cytosol de polynucléaires neutrophiles

3.1. Mise au point de L'immunoprécipitation de PCNA

La technologie MACS ® (Miltenyi) est utilisée. Elle est basée sur l'utilisation de billes magnétiques conjuguées à la protéine A ou protéine G, protéines issues de la paroi des bactéries streptocoques des groupes C et G liant spécifiquement les immunoglobulines.

Le mélange (1500 μ g protéines de cytosol, 50 μ L billes magnétiques couplées à la protéine A et 1,5 μ g d'anticorps) est incubé 30 min sous rotation à 4°C . Après hydratation de la colonne avec le tampon I (50 mM Tris pH8, 150 mM NaCl et 1% NP40), le mélange protéineA/cytosol/anticorps est déposé sur la colonne et l'exclusion est récupérée. Quatre lavages de la colonne avec le tampon I puis un lavage hyposalin (20 mM Tris pH7.5) sont réalisés. La dernière étape est l'élution : 20 μ L de sample buffer 5X non réduit bouillant (permettant la destruction des interactions entre la protéine A et l'anticorps) sont déposés dans la colonne et incubés pendant 5 minutes afin d'éliminer le volume mort de la colonne. Enfin,

30 μ L de sample buffer 5X non réduit bouillant sont à nouveau déposés dans la colonne et l'élution est obtenue (volume final de 50 μ L).

Un western blot anti-PCNA est effectué avec l'exclusion, l'élution et un aliquot du cytosol utilisé pour l'immunoprécipitation (IP) afin de valider cette manipulation. Il faut faire une IP en parallèle avec un anticorps contrôle pour vérifier si la protéine d'intérêt ne colle pas aux billes non spécifiquement. Lors de la révélation, il s'avère que la protéine PCNA est détectée dans l'élution de l'IP anti-PCNA mais également dans l'IP contrôle.

Après plusieurs protocoles différents visant à augmenter la "stringence" du tampon de lavage ou modifier la quantité de protéines cytosoliques, le protocole mis au point est défini et validé (**Figure 13**).

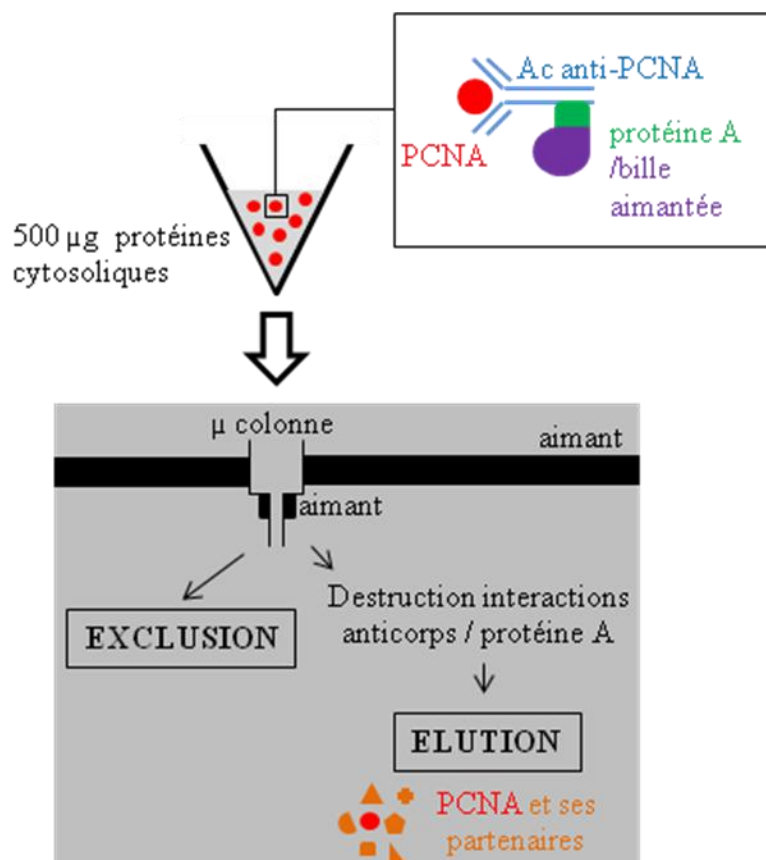


Figure 13 : Schéma de l'immunoprécipitation de PCNA par la technologie MACS®

Le mélange (500 μ g protéines de cytosol, 50 μ L billes magnétiques couplées à la protéine A et 1,5 μ g d'anticorps) est incubé 30 min sous rotation à 4°C. Après hydratation de la colonne avec le tampon I (50 mM Tris pH8, 500 mM NaCl, 1% NP40 et 0,5% Triton X100), le mélange protéineA/cytosol/anticorps est déposé sur la colonne et l'exclusion est ainsi récupérée. Deux lavages de la colonne avec le tampon I, deux lavages avec le tampon II (50 mM Tris pH8, 300 mM NaCl, 1% NP40 et 0,5% Triton X100) puis cinq lavages hyposalins (20 mM Tris pH7.5) sont réalisés. L'élution est effectuée dans les mêmes conditions que précédemment.

3.2. Co-immunoprécipitation de PCNA (Co-IP)

La co-IP consiste en la révélation du western blot avec des anticorps reconnaissant spécifiquement des protéines candidates dites "partenaires". Si la protéine révélée apparaît dans l'élution, elle peut donc être considérée comme "partenaires" de la protéine immunoprécipitée, ici PCNA. Cette technique ne permet pas de déterminer si la protéine partenaire lie de façon directe ou indirecte PCNA.

II. Détection de l'apoptose dans les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles apoptosent spontanément après incubation pendant 16 heures à 37°C. Cette apoptose peut être accélérée par un agent pharmacologique comme la gliotoxine (0,1 µg/mL), qui lie directement la protéine mitochondriale Bak et inhibe NFκB (Fujihara, Ward et al. 2002). La stimulation de la voie des récepteurs de mort par la ligation de l'anti-Fas (10ng/mL) permet également d'accélérer l'apoptose du polynucléaire neutrophile (Yeretssian, Labbe et al. 2008).

La cytométrie en flux est utilisée pour quantifier l'apoptose des polynucléaires neutrophiles. Elle permet de mesurer différents paramètres sur des cellules en suspension dans un liquide, alors qu'elles défilent une à une, à grande vitesse, devant une source lumineuse. Cette technique rapide et sensible permet de mesurer individuellement et simultanément plusieurs paramètres (taille, granulosité, fluorescences) sur chaque élément en suspension au sein d'une population hétérogène.

La cytométrie en flux est une combinaison de différents éléments (**Figure 14**) :

- fluïdique pour introduire et canaliser les cellules vers la zone d'analyse,
- optique avec une source d'excitation et de récupération des signaux,
- électronique et informatique pour convertir les signaux optiques en signaux électriques proportionnels et les numériser pour que l'ordinateur les analyse.

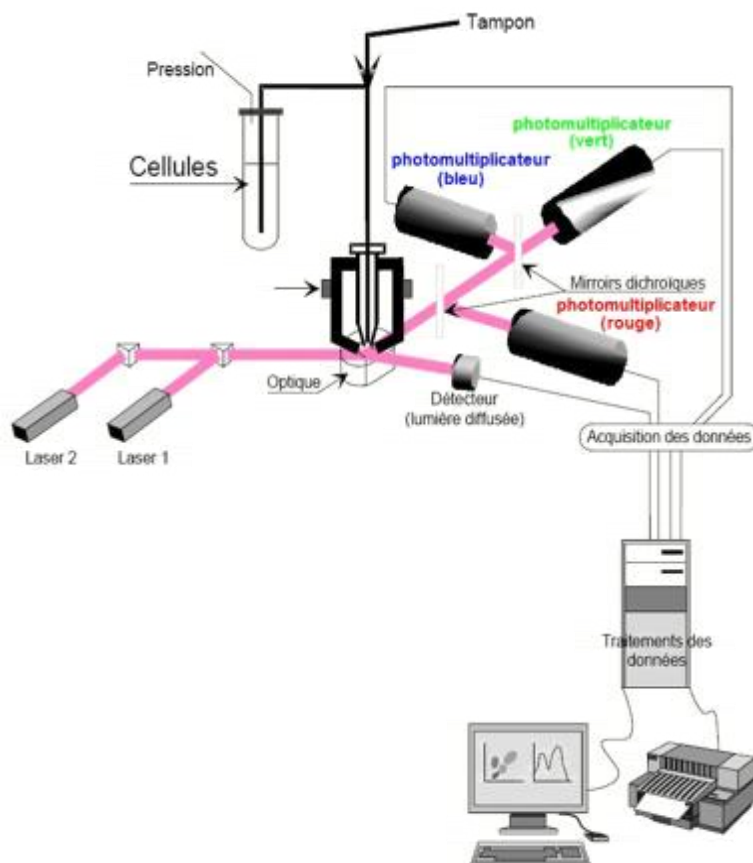


Figure 14 : Principe schématisé de la cytométrie en flux

L'échantillon est injecté dans une cellule d'écoulement dans laquelle les cellules sont alignées les une derrière les autres. Les cellules sont présentées à une source lumineuse et analysées une à une sur des détecteurs en fonction de leur propriétés à diffracter la lumière incidente, et à réémettre de la fluorescence en fonction de fluorochromes spécifiques. Les signaux lumineux sont transformés en énergie électrique, puis subissent un traitement électronique les rendant exploitable par l'informatique.

1. Marquage annexine-V / 7AAD

Principe: L'apoptose est caractérisée par un flip-flop membranaire provoquant l'externalisation de la phosphatidylsérine à la membrane externe (**Figure 15**). L'annexine-V se lie à la phosphatidylsérine. Le 7AAD (7-amino-actinomycin D), agent intercalant de l'ADN, permet de marquer les cellules nécrotiques dont la membrane plasmique est perméabilisée. Le double marquage annexine-V / 7AAD permet de différencier l'apoptose de la nécrose

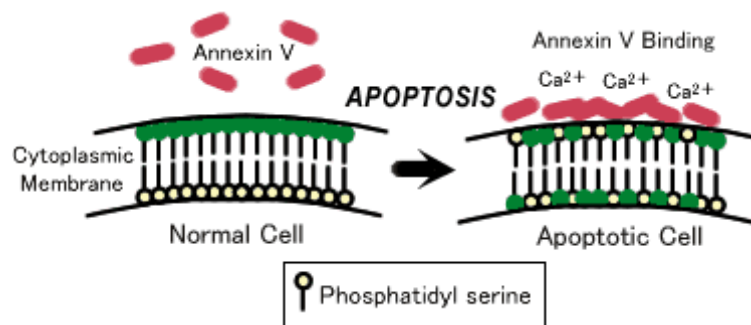


Figure 15 : Flip-flop membranaire caractéristique de l'apoptose

La phosphatidylsérine (PS) est un lipide non exposé à la surface des cellules viables mais elle est externalisée au cours de l'apoptose.

500 000 cellules par condition sont lavées en PBS 1X puis incubés pendant 15 minutes, à l'obscurité, à température ambiante, dans 100 μ L de tampon "annexine" (10 mM hepes, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2), 5 μ L d'annexine-V couplé à la phycoérythrine (canal FL2) et 10 μ L de 7AAD (canal FL3). Après l'incubation, 200 μ L de tampon annexine sont ajoutés et les cellules sont analysées immédiatement en cytométrie en flux (**Figure 16**).

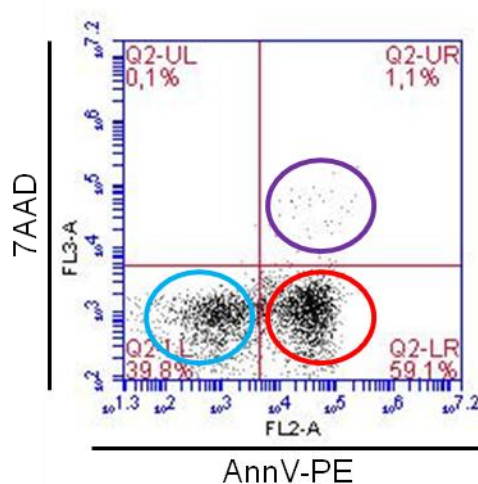


Figure 16 : Résultat type du marquage annexine-V / 7AAD par cytométrie en flux

Cellules négatives: AnnV - / 7AAD - ; Cellules apoptotiques: AnnV + / 7AAD - ; Cellules nécrotiques: AnnV + / 7AAD +

2. Marquage DIOC6

Principe: Ce marquage permet de mesurer la dépolarisation de la membrane mitochondriale, évènement important dans le déroulement de l'apoptose et non observé au cours de la nécrose. Le DioC6 (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide) est un colorant lipophile qui traverse toutes les membranes biologiques. Il est cependant séquestré dans la

mitochondrie grâce au potentiel transmembranaire mitochondrial qui rend la membrane interne de la mitochondrie imperméable. Au cours de l'apoptose, il y a dépolarisation mitochondriale provoquant la perméabilité de la membrane de cette dernière. Une cellule apoptotique a donc une fluorescence qui diminue. L'apoptose est évaluée par le déplacement de la moyenne de fluorescence ou par le pourcentage de cellules ayant une fluorescence diminuée.

500 000 cellules sont lavées en RPMI puis incubées avec 0,1 μ M DioC6 (30 minutes, 37°C). Après un nouveau lavage, les cellules sont reprises dans 300 μ L de RPMI et sont analysées immédiatement en cytométrie en flux (**Figure 17**).

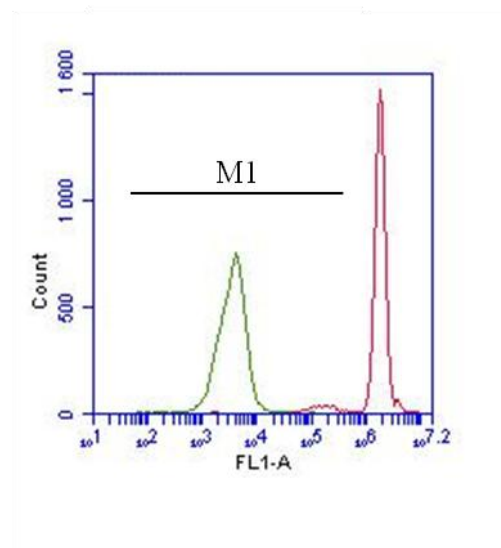


Figure 17 : Résultat type du marquage DIOC6 par cytométrie en flux
Les cellules viables sont en rouge et les cellules apoptotiques en vert (M1).

3. Marquage à l'iodure de propidium (IP)

Principe: L'iodure de propidium est un agent intercalant des acides nucléiques (ADN ou ARN) qui fluoresce dans le rouge. Un marquage avec l'IP après fixation des cellules permet une étude du cycle cellulaire par mesure de l'ADN total des cellules. L'étude de la ploïdie permet d'observer en cytométrie en flux des pics caractéristiques des phases G0/G1 (diploïdie, 2n), S et G2/M (tétraploïdie, 4n) du cycle cellulaire. Lors du processus apoptotique, l'ADN se fragmente et les cellules apoptotiques contiennent une quantité d'ADN inférieure à 2n. Cette hypodiploïdie correspond à un pic précédant celui de la phase G1 : c'est la phase sub-G1, caractéristique des dommages causés sur l'ADN cellulaire.

Un million de cellules sont lavées puis fixées dans de l'éthanol 90% froid pendant 30 minutes dans la glace. Après un nouveau lavage, les cellules sont reprises dans 1 mL solution IP : 20 µg/mL iodure propidium, 0,2 mg RNase A, qsp PBS 1X et incubées 30 minutes à température ambiante à l'obscurité. L'IP peut aussi se lier à l'ARN, d'où le traitement avec la RNase pour dégrader les ARNs et éviter tout faux positif. Les cellules sont ensuite immédiatement analysées en cytométrie en flux (**Figure 18**).

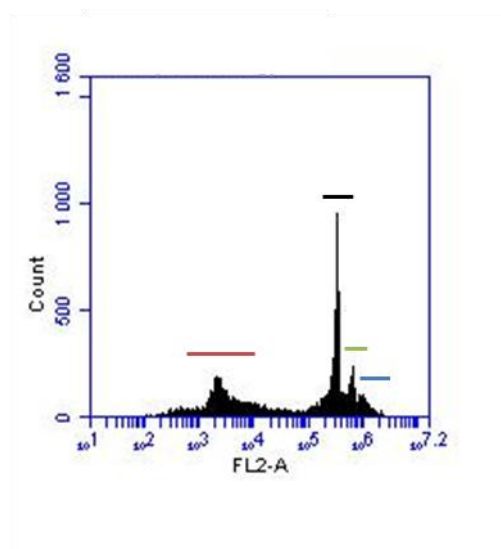


Figure 18 : Résultat type du marquage à l'iodure de propidium par cytométrie en flux
Cellules en phase G1 (2n); Cellules en phase S; Cellules en phase G2/M (4n); Cellules en phase sub-G1 = cellules apoptotiques (< 2n)

Il faut noter que la sélection de la population en taille et granulométrie est très importante. En effet, si les déchets dont la granulométrie et la taille sont très faibles, sont analysés, un pic apparaît en amont du pic sub-G1. Cette population doit être exclue de l'analyse pour ne pas fausser le résultat d'apoptose.

4. Marquage Hoeschst

Principe: Le marquage Hoeschst permet l'observation de corps apoptotiques nucléaires, caractéristiques de l'apoptose. Le bisBenzimide H33342 trihydrochloride (Hoeschst 33342) est un agent intercalant de l'ADN qui permet la visualisation des noyaux car il émet une fluorescence dans le bleu à 470 nm. Cette analyse est effectuée sur des cellules fixées sur lame.

Les cellules (200 000) sont lavées en PBS 1X puis centrifugées (5 minutes 500 rpm accélération LOW) en cytospin. Après fixation par du formaldéhyde 3,7% 20 minutes à 4°C, les noyaux sont marqués à température ambiante par du Hoeschst à 2µg/mL pendant 10 minutes. Après 3 lavages avec du PBS 1X et un lavage avec de l'eau, le montage est réalisé entre lame et lamelle et les lames sont observées au microscope à fluorescence (**Figure 19**).

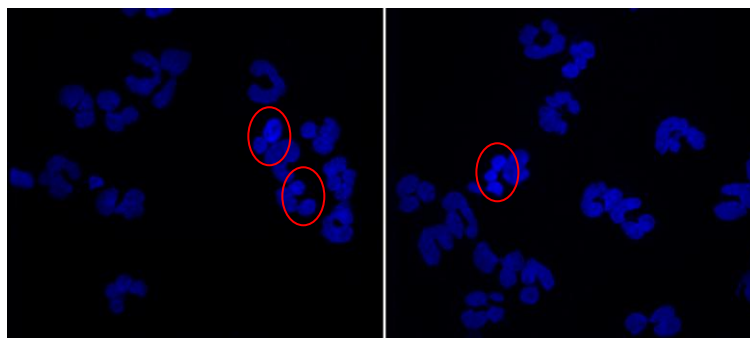


Figure 19 : Marquage Hoeschst, observation des noyaux montrant la condensation de l'ADN (cercles rouges)

5. Mesure de l'activité des caspases par cytométrie en flux

Principe: Afin de mesurer l'activité des caspases -3, -8 et -9, nous utilisons les kits Caspase-Glo[®] 3/7 Assay, Caspase-Glo[®] 8 Assay et Caspase-Glo[®] 9 Assay (Promega). Le principe de ces kits est de bloquer de façon covalente le site actif de la caspase activée par un inhibiteur fluorescent, spécifique de chaque caspase. Ainsi, la fluorescence est proportionnelle à la quantité de caspase activée.

500 000 cellules sont requises par condition auxquelles on ajoute soit 1 µL de substrat FITC-DEVD-FMK (caspase-3) soit 1 µL de substrat FITC-IETD-FMK (caspase-8) soit 1 µL de substrat FITC-LEHD-FMK (caspase-9). Les cellules sont ensuite incubées entre 30 minutes et 1 heure à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂ (5%). Elles sont centrifugées 5 minutes à 3000 tours/min puis lavées deux fois avec le tampon Wash buffer (composition non donnée par le fournisseur) fourni avec le kit. Elles sont enfin reprises dans 300 µL Wash buffer et analysées en cytométrie en flux. La fluorescence est observée dans le canal FL1.

6. Mesure de l'activité des caspases par colorimétrie

Principe: L'activité des caspases -3, -8 et -9 est mesurée par colorimétrie (Kit Biovision). Le kit d'essai colorimétrique est une technique simple pour mesurer l'activité des caspases qui reconnaissent la séquence DEVD (caspase-3), la séquence IETD (caspase-8) ou la séquence LEHD (caspase-9). L'essai est basé sur la détection spectrophotométrique du chromophore p-nitroaniline (pNA) après le clivage du substrat étiqueté DEVD-pNA, ou IETD-pNA ou LEHD-pNA. L'absorbance de pNA est quantifiée à 400 ou 405 nanomètres. La comparaison de l'absorbance de pNA d'un échantillon apoptotique avec un échantillon

contrôle permet de déterminer l'augmentation de l'activité de la caspase d'intérêt. Le kit comprend un tampon de lyse spécifique à chaque caspase ainsi que le substrat spécifique.

Les polynucléaires neutrophiles (10×10^6) soumis à différentes conditions expérimentales et à différents temps d'incubation sont centrifugés puis lysés dans 60 μ L de tampon de lyse correspondant à la caspase d'intérêt. Ils sont incubés 10 minutes dans la glace puis centrifugés 10 minutes à 1300 tours/min. Le surnageant récupéré correspond au lysat dont les protéines sont dosées par la méthode du Biuret. 100 μ g de protéines du lysat, ajustés au volume de 50 μ L avec le tampon de lyse adéquate, sont prélevés et mixés avec 50 μ L 2X réaction buffer – 10 mM DTT. 200 μ M du substrat spécifique de la caspase sont ajoutés. L'ensemble est déposé dans une plaque 96 puits et incubé à 37°C. La lecture de l'absorbance s'effectue à 405 nm après 2 heures d'incubation ou une nuit d'incubation à 37°C.

III. Mise au point de la transduction de la protéine PCNA

Les polynucléaires neutrophiles sont des cellules en fin de différenciation et subissent une apoptose spontanée au bout de quelques heures de culture. Ainsi, il est difficile de travailler sur ces cellules et techniquement impossible de les transfecter afin d'observer la conséquence de la surexpression d'une protéine, dans notre cas PCNA.

ChariotTM est un nouveau réactif capable de faire pénétrer des protéines, des peptides ou des anticorps dans des cellules dans des temps très courts (moins de deux heures).

Chariot est un peptide de 2843 daltons qui forme un complexe non-covalent avec la protéine, le peptide ou l'anticorps d'intérêt. Le complexe chariot/macromolécule stabilise la macromolécule et empêche la dégradation durant le processus de "transduction". Suite à l'internalisation, le complexe se dissocie et la macromolécule est libre et peut ainsi rejoindre sa cible. De plus, ce phénomène est observé à 4°C, ce qui suggère un mécanisme indépendant de la voie endosomale. La macromolécule ne serait donc pas soumise aux conditions de cette voie, qui pourrait modifier la structure de la macromolécule durant l'internalisation.

En pratique, le chariot est reconstitué en eau stérile (0,3 mg dans 150 μ L d'eau). En accord avec les consignes du fabricant, les cellules doivent être en phase exponentielle (dans une plaque 6 puits dont la surface est de 962 mm², concentration des cellules à 300 000 cellules par mL). Le polynucléaire neutrophile étant une cellule de petite taille, nous prenons l'initiative de mettre un million de polynucléaires neutrophiles par puits dans une plaque 6 puits. La dilution de la macromolécule est réalisée en PBS dans un volume adapté à la taille

de la plaque de culture (100 μ L pour une plaque 6 puits). Il est conseillé d'utiliser entre 0,5 et 1 μ g de protéine par réaction. Notre protéine d'intérêt est PCNA. Elle a été exprimée sous forme recombinante dans *Escherichia coli* et purifiée dans le laboratoire selon un protocole publié (EllisonV et al. 2003). Sa concentration est de 1 mg/mL. Nous testons deux concentrations : 1 μ g et 2 μ g dilués dans 100 μ L PBS. La dilution du chariot est de 6 μ L dans 150 μ L PBS.

Dans un premier temps, nous préparons le complexe Chariot-macromolécule en mixant le "chariot" et le PCNA et en incubant le mélange 30 minutes à température ambiante. Ensuite, un million de polynucléaires neutrophiles sont lavés en PBS puis repris par le complexe Chariot-PCNA. 400 μ L de milieu RPMI sans SVF sont ajoutés et l'ensemble est transféré dans un puits d'une plaque 6 puits. Après 1 heure d'incubation à 37°C et 5% CO₂, 1 mL de milieu RPMI complet supplémenté de 10% SVF est ajouté délicatement dans le puits.

Les polynucléaires neutrophiles sont incubés durant 6 heures à 37°C et 5% CO₂ et l'apoptose est ensuite analysée par cytométrie en flux (marquages DIOC6 et annexine-V / 7AAD).

IV. Le western blot

Le PAGE (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) est une technique de biochimie qui permet de séparer des protéines selon leur taille dans un gel de polyacrylamide grâce à un champ électrique. Cette séparation s'effectue en conditions dénaturantes (SDS) ; les protéines sont ainsi toutes chargées négativement et migrent vers le pôle positif. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane et peuvent être détectées spécifiquement par des anticorps.

En pratique, les échantillons sont d'abord dosés par la méthode du Biuret. Ainsi, la même quantité de protéines sera déposée dans chaque puits du gel. Les échantillons sont ensuite dilués dans du *sample buffer* 5X réduit ou non réduit (SDS 10 %, TRIS 0.5M pH6.5, une pointe de spatule de bleu de bromophénol et 10% β -Mercaptoéthanol ou non) et portés à ébullition pendant 10 minutes. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide peut s'effectuer avec des différences de pourcentage de polyacrylamide selon la taille de la protéine étudiée: plus le pourcentage est élevé, plus les mailles du gel sont serrées et plus les protéines de faible poids moléculaire pourront être détectées. Les protéines se séparent selon leur masse moléculaire sous un voltage de 160 V dans un tampon de migration (Tris-Glycine-SDS). Les protéines sont transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) grâce à un champ électrique (**Figure 20**) dans du tampon de transfert (Tris-Glycine-Ethanol pH8.3). Le

transfert s'effectue dans la glace car la réaction est exothermique à 400mA pendant 90 minutes.

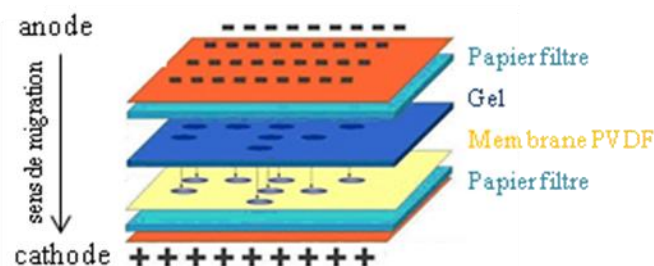


Figure 20 : Transfert des protéines sur membrane par la méthode « sandwich »

Les protéines sont chargées négativement par le SDS et migrent du pôle - (anode) vers le pôle + (cathode).

Après saturation de la membrane 15 min dans du PBS 1X-Tween 0.05%- Lait 5%, la membrane est incubée 1 heure à température ambiante (ou la nuit à 4°C) sous agitation en présence de l'anticorps d'intérêt. La dilution la plus courante de l'anticorps primaire est au 1/1000^{ème}. La membrane subit 3 lavages de 5 min en PBS 1X –Tween 0.05 % puis est incubée 40 minutes avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (dilution au 1/2000^{ème} pour l'anti-souris et 1/5000^{ème} pour l'anti-lapin). Trois lavages en PBS 1X-Tween 0.05 % sont à nouveau effectués toujours sous agitation. La dernière étape est la révélation à la chimioluminescence (**Figure 21**). Pour cela, la membrane est incubée avec 2 mL de solution A (H₂O₂) et 2 mL de solution B (luminol) durant 5 min sous agitation. La révélation s'effectue en chambre noire sur des films autoradiographiques.

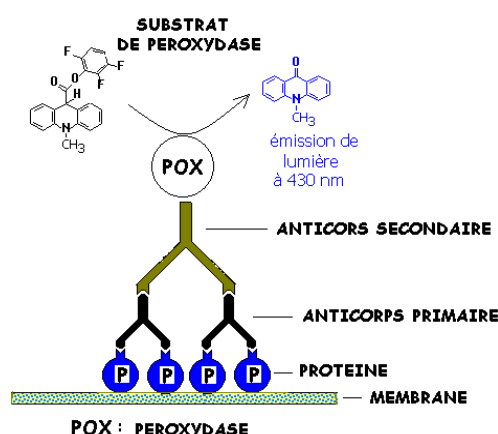


Figure 21 : Représentation schématique de la révélation d'une protéine immobilisée sur membrane

La protéine d'intérêt est reconnue par un anticorps spécifique (anticorps primaire). Une fois le complexe antigène-anticorps formé, il est détecté grâce à un deuxième anticorps (anticorps secondaire) conjugué de manière covalente à une peroxydase (POX, comme l'enzyme HorseRadish Peroxydase HRP). L'activité enzymatique est détectée par une méthode de chimioluminescence.

B. Mise au point de la transfection de la lignée promyélocytaire PLB-985 et de la différenciation granulocytaire

Les cellules PLB-985 sont cultivées dans le milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL streptomycine.

I. Transfection des cellules PLB-985

Les polynucléaires neutrophiles sont des cellules qui ne prolifèrent pas et qui ne se transfectent pas. Afin de disposer d'un "modèle" cellulaire se rapprochant du polynucléaire neutrophile, nous avons mis au point des méthodes de transfection dans la lignée PLB-985, précurseurs des polynucléaires neutrophiles. Ce modèle de "polynucléaires neutrophiles" devrait nous permettre d'étudier les modifications induites par la surexpression ou l'inhibition (siRNA) d'une protéine d'intérêt. Les siRNA (*small interfering RNA*) sont des petits ARN double brin de 21 à 24 nucléotides. Ils interfèrent à l'état de double brin et sont reconnus dans le cytoplasme de la cellule par un complexe RISC (*RNA induce silencing complex*) (**Figure 22**). Ce dernier s'active en libérant le brin complémentaire de l'ARN. Ce complexe activé va reconnaître son transcrite cible, un ARN messenger, par complémentarité des bases nucléiques. Ce système de reconnaissance assure la haute spécificité de ce mécanisme. Une fois la cible liée, la protéine Argonaute, endonucléase, faisant partie du complexe RISC, va couper le transcrite au niveau du site de reconnaissance. Les deux morceaux du transcrite clivé vont être rapidement dégradés *via* leurs extrémités par des exonucléases. La transfection de petits ARN interférents dans les cellules a donc pour conséquence la destruction spécifique des ARN messagers ciblés, empêchant toute nouvelle traduction de la protéine codée par ces ARN messagers.

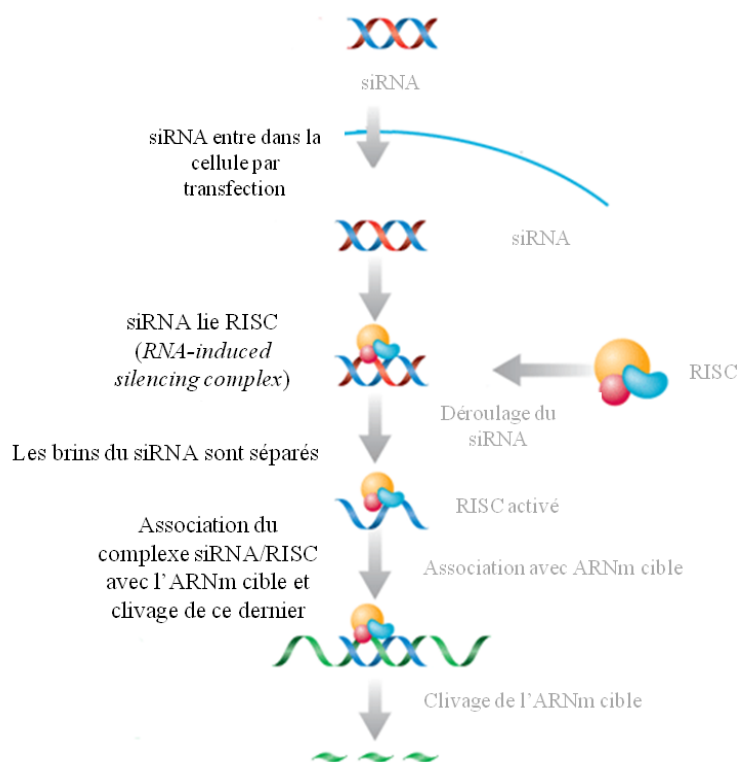


Figure 22 : Principe des petits ARNs interférents

Les petits ARNs interférents (siRNA), pénétrant dans la cellule par transfection, permettent de diminuer l'expression d'une protéine cible en clivant ses ARN messagers.

La technologie Amaxa[®] est basée sur une électroporation nucléosomale. Des tampons de transfection adaptés à chaque lignée, dont la composition est inconnue, sont vendus par le fournisseur. La transfection des cellules s'effectue lorsqu'elles sont en phase exponentielle (4 à 5×10^5 cellules par mL).

Pour les PLB-985, chaque échantillon de transfection nécessite 1×10^6 cellules, 1 μ g d'ADN plasmidique ou 1 μ M de siRNA et 100 μ L de nucleofactor. Le nucleofactor est la solution dans laquelle vont baigner les cellules durant leur électroporation, elle est fournie par le kit.

Le million de cellules est centrifugé à 1300 rpm pendant 10 min. Le culot cellulaire obtenu est lavé deux fois en PBS 1X puis repris dans 100 μ L de nucleofactor. Le plasmide ou le siRNA est ensuite ajouté. Ce mélange est disposé dans une cuvette, également fournie dans le kit, puis dans la machine à électroporation. Un programme est ensuite sélectionné, ce dernier étant préconisé par le fournisseur en fonction du type cellulaire (C-023 pour les PLB-985). Immédiatement après la fin du programme, 500 μ L de milieu RPMI SVF 10 %, préalablement placé à 37°C, sont déposés sur les cellules. Les cellules sont placées dans une plaque de douze

puits contenant 1mL de RPMI SVF 10 % puis dans l'incubateur à 37°C dans une atmosphère humide enrichie en 5 % de CO₂.

Le lendemain, l'antibiotique de sélection est ajouté pour les transfections plasmidiques. En effet, le plasmide contient dans sa séquence le gène de résistance à un antibiotique de sélection, ici la néomycine. Lorsque les cellules ont intégré le plasmide, elles deviennent donc résistantes à cet antibiotique. La mort des cellules contrôles, ayant subi l'électroporation sans ajout de plasmide, détermine la fin de la sélection.

II. Différenciation des PLB-985 en polynucléaires neutrophiles

Les PLB-985 sontensemencées à 200 000 cellules par mL dans du milieu RPMI SVF 10% + 0,5% diméthylformamide (DMF) pendant 6 jours à 37°C, 5 % CO₂ en atmosphère humide. Le DMF est un composé toxique à forte concentration pour les cellules. A la concentration utilisée, supposée non toxique, qui a pour but de déclencher la différenciation, il est cependant observé un pourcentage de 20 % de cellules apoptotiques. Trois techniques sont utilisées pour valider cette différenciation : la coloration au *May Grünwald Giemsa*, le marquage membranaire de CD11b et la mesure de l'explosion oxydative.

1. Coloration au May Grünwald Giemsa

Cette coloration permet l'étude morphologique des cellules. Dans notre situation, elle permet d'observer les noyaux polylobés, caractéristiques des polynucléaires neutrophiles matures. Elle est rapide, simple et se réalise sur des cytopins. Les cytopins sont des lames sur lesquelles sont fixées des cellules par centrifugation. En général, 200 000 cellules sont disposées sur une lame. La première étape consiste en la fixation des cellules dans l'alcool (5 bains de méthanol). La lame est ensuite colorée dans l'éosine (5 bains) qui est un colorant rouge et acide permettant de colorer les éléments basiques. Puis, la lame est colorée dans le bleu de méthylène (5 bains) colorant bleu et basique, qui permet de colorer les éléments acides. Avant le montage entre lame et lamelle, la lame est abondamment rincée.

Après coloration, le cytosol des polynucléaires neutrophiles est coloré en rouge/rosé (basique), les granulations en violet (mélange de granulations acides et basiques) et le noyau en violet également (protéines basiques, ADN et ARN acides) (**Figure 23**).

De façon intéressante, cette coloration permet également d'évaluer l'apoptose en mettant en évidence le changement de morphologie nucléaire (**Figure 23**).

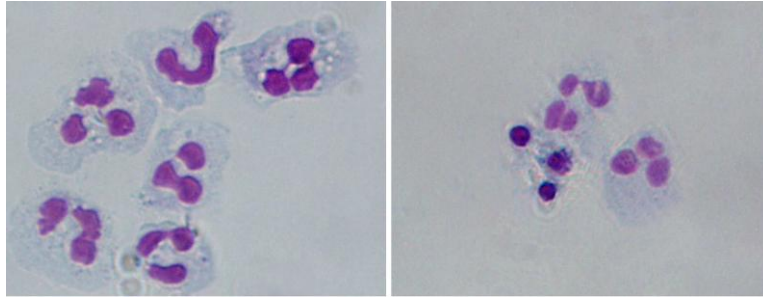


Figure 23 : Coloration au May Grünwald Giemsa de polynucléaires neutrophiles

A gauche, photo montrant des polynucléaires neutrophiles à l'état basal avec leurs noyaux polylobés. A droite, photo montrant des polynucléaires neutrophiles apoptotiques (cercle orange) avec observation d'un noyau condensé, caractéristique de l'apoptose.

2. Marquage CD11b par cytométrie en flux

Principe: Le CD11b est une sous-unité de l'intégrine Mac-1 qui est une molécule d'adhérence importante dans le polynucléaire neutrophile. C'est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 165 ou 170 kDa. Elle est exprimée à la surface des monocytes mais également à la surface des granulocytes, dont les polynucléaires neutrophiles. Son expression apparaît au cours de la différenciation.

Nous utilisons un anticorps anti-CD11b couplé à la fluorescéine (FITC), qui est détectable par cytométrie en flux, reconnaissant le CD11b présent à la membrane cellulaire. En parallèle, les cellules sont également marquées avec un contrôle isotypique, de même isotype que l'anticorps d'intérêt. Ici, c'est l'anticorps IgG1 couplé FITC. Ce contrôle permet de déterminer le marquage non spécifique de l'anticorps monoclonal, CD11b-FITC.

500 000 cellules sont lavées en PBS 1X puis incubées dans 10 µL IgG de chèvre 5% SVF + 10 µL PBS 1X- BSA 1%- azide 0,1%) afin de saturer les sites non spécifiques pendant 15 min à 4°C. 20 µL d'anticorps couplé FITC (CD11b ou IgG1) sont ajoutés pendant 30 min à 4°C à l'obscurité. Après un lavage au PBS 1X, les cellules sont reprises dans 300 µL de PBS 1X et sont passées immédiatement en cytométrie en flux.

3. Mesure de l'explosion oxydative par chimioluminescence

Principe: Cette technique permet de vérifier si les PLB-985 différenciées ont acquis les caractéristiques fonctionnelles propres au polynucléaire neutrophile mature, et en particulier la capacité de générer des formes réactives de l'oxygène *via* l'activation de la NADPH oxydase.

Après stimulation par divers agonistes, les polynucléaires neutrophiles augmentent de façon considérable leur métabolisme oxydatif, afin de générer des dérivés de l'oxygène hautement réactifs et toxiques pour les micro-organismes. Leur production peut être détectée à l'aide de molécules particulières tel que le luminol. Les espèces réactives de l'oxygène ainsi produites oxydent le luminol qui émet des flashes lumineux mesurés par chimioluminescence à 37°C. Deux agonistes bien établis chez le polynucléaire neutrophile sont le Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) et le zymosan opsonisé par le sérum humain. Le PMA appartient à la famille des esters de phorbol. C'est un activateur artificiel des polynucléaires neutrophiles. Hautement lipophile, il est capable de pénétrer dans la cellule et d'induire l'explosion oxydative indépendamment des récepteurs membranaires. Il agit directement au niveau intracellulaire en stimulant la protéine kinase C (PKC) qui permet l'activation de la NADPH oxydase et la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Le zymosan opsonisé est un stimulus particulière qui agit via les récepteurs membranaires et est donc plus physiologique que le PMA. Il est entouré d'opsonines qui sont reconnus par des récepteurs spécifiques localisés sur le polynucléaire neutrophile (IgG et fragments du complément), ce qui permet la phagocytose par ce dernier et déclenche ainsi l'explosion oxydative.

100 000 cellules dans 100 µL HBSS 1X sont disposées dans un tube adapté à la chimioluminescence. Sont ajoutés : 50 µL de stimulus (PMA ou Zymosan) et 100 µL de sonde chimioluminescente (luminol, permettant la mesure de l'activité intra et extracellulaire de la NADPH oxydase et de la myéloperoxydase ou lucigénine, permettant de mesurer l'activité extracellulaire de la NADPH oxydase). Les tubes contenant les cellules et l'agoniste sont rapidement mis dans le luminomètre (Berthold Autolumat LB953). La mesure est réalisée pendant 40 minutes et les résultats sont exprimés en coups par minutes (intégrale de la courbe ou pic maximum de la courbe).

III. Induction et mesure de l'apoptose dans les PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles

Les cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles sont traitées par des agents pro-apoptotiques, la gliotoxine (1 µg/mL) ou TRAIL (10 ng/mL) ou TNFα (10ng/mL) pendant 16 heures. Leur apoptose est analysée par la dépolarisation de la membrane mitochondriale (marquage DIOC6), par la fragmentation de l'ADN (marquage à l'iodure de propidium), par l'activité de la caspase-8 par cytométrie en flux (caspase-Glo® 8 Assay) et par

l'observation de corps apoptotiques (marquage immunofluorescent Hoeschst) (voir protocoles détaillés pages 32-36). Les cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles n'externalisent pas la phosphatidylsérine d'où l'absence de marquage annexine-V / 7AAD.

RESULTATS

I. Le polynucléaire neutrophile humain mature

1. Mise en évidence de la présence de PCNA dans le cytosol de polynucléaire neutrophile mature

Le polynucléaire neutrophile est une cellule en fin de différenciation qui ne prolifère pas. La protéine PCNA étant une protéine clé pour la réplication et la réparation de l'ADN, nous n'imaginions pas sa présence dans le polynucléaire neutrophile.

Dans un premier temps, par fractionnement subcellulaire, nous avons séparé le cytosol, les granules et le noyau des polynucléaires neutrophiles (**Figure 24**). La technique de fractionnement par cavitation à l'azote est validée par la détection de protéines spécifiques de ces fractions: l'actine pour le cytosol, l'élastase pour les granules et la lamine B pour le noyau. Nous avons détecté la présence de PCNA uniquement dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles.

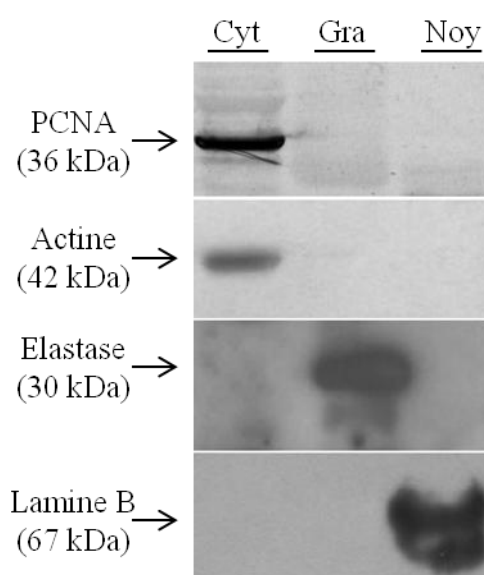


Figure 24 : Mise en évidence de la protéine PCNA dans le cytosol du polynucléaire neutrophile

Les polynucléaires neutrophiles sont repris dans un tampon de relaxation additionné d'ATP et d'anti protéases puis "désintégrés" dans une bombe à cavitation de cellules (20 minutes à 350 psi). Différentes centrifugations permettent d'obtenir les fractions cytosolique, granulaire et nucléaire. 50 µg de protéines de chaque fraction est déposé sur un gel de 12,5 % polyacrylamide. Le fractionnement est validé par la révélation de l'actine (Sigma, A2066) dans le cytosol, de l'élastase (Dako, M0752) dans les granules et de la lamine B (Santa Cruz, sc-20682) dans le noyau. La révélation avec l'anti-PCNA pc10 (Santa Cruz, sc-20682) montre la présence de PCNA uniquement dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles.

Dans un second temps, nous avons validé une autre méthode de fractionnement par pottérisation. Nous avons ainsi séparé le cytosol et le noyau des polynucléaires neutrophiles et des cellules HeLa (modèle de cellules proliférantes) (**Figure 25**). Les cellules HeLa expriment majoritairement la protéine PCNA dans leur noyau, mais également en moindre quantité dans leur cytosol. Par contre, les polynucléaires neutrophiles présente une exclusion nucléaire de PCNA.

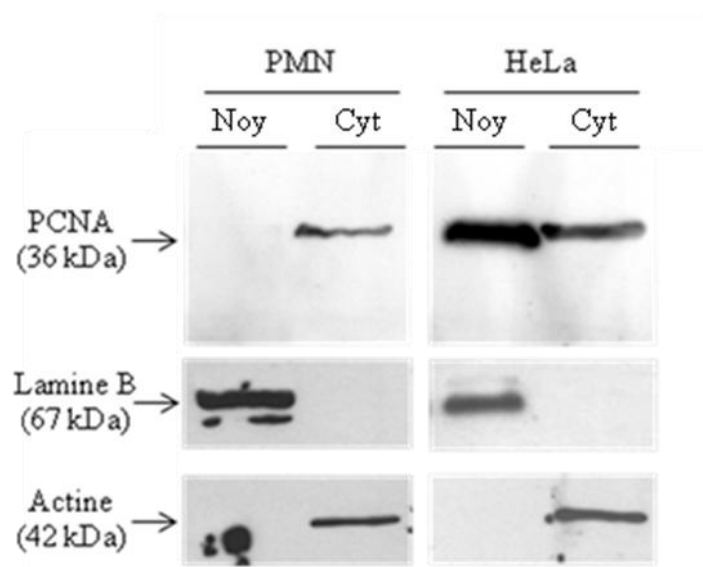


Figure 25 : Comparaison de l'expression de PCNA dans les polynucléaires neutrophiles et les cellules HeLa

Les polynucléaires neutrophiles et les cellules HeLa sont repris dans un tampon d'homogénéisation puis pottérisés. Différentes centrifugations du broyat obtenu permettent de séparer les fractions cytosolique et nucléaire. 50µg de protéines de chaque fraction est déposé sur un gel de 12,5% acrylamide. Le fractionnement est validé par la révélation de l'actine (Sigma, A2066) dans le cytosol et de la lamine B1 (Santa Cruz, sc-20682) dans le noyau.

La révélation avec l'anti-PCNA pc10 (Santa Cruz, sc-56) montre la présence de PCNA uniquement dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles alors que dans les cellules qui prolifèrent comme les cellules HeLa, PCNA est présent dans les deux compartiments mais majoritairement dans le noyau.

2. Modulation de l'expression de PCNA au cours de l'apoptose du polynucléaire neutrophile

Le polynucléaire neutrophile est une cellule qui apoptose spontanément et la régulation de son apoptose est indispensable dans les mécanismes de résolution de l'inflammation. Le laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années aux mécanismes régulant l'apoptose du polynucléaire neutrophile. Nous allons donc explorer le rôle de cette protéine PCNA, connue pour ses fonctions essentiellement nucléaires, et étonnamment retrouvée dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles.

Pour cela, les polynucléaires neutrophiles sont incubés 0, 1, 3 et 15 heures à 37°C en présence ou non d'anti-Fas ou de gliotoxine. L'apoptose induite par des drogues est dite pharmacologique, celle induite par l'anti-Fas mime une apoptose passant par les récepteurs de mort tandis que la gliotoxine simule une apoptose touchant la voie mitochondriale en inhibant la voie NFκB. Les doses utilisées pour l'anti-Fas et la gliotoxine sont respectivement 1 µg/mL et 0,1 µg/mL. L'apoptose est analysée par cytométrie en flux (marquages annexine-V / 7AAD et DIOC6) (**Figure 26 A, B et D**) et par dosage colorimétrique de l'activité des caspases-3 et -8 et -9 (**Figure 26 C**). L'anti-Fas ou le CD95 et la gliotoxine potentialisent l'apoptose du polynucléaire neutrophile en augmentant l'externalisation de la phosphatidylsérine, la dépolarisation de la membrane mitochondriale et l'activité des caspases-3 et -8. Cet effet augmente en fonction du temps quelle que soit l'apoptose induite, physiologique ou pharmacologique. L'activité de la caspase-9 n'est pas réellement modulée au cours du temps ni en fonction de l'apoptose induite. Notons également que l'échelle est beaucoup plus faible que pour l'absorbance des caspases -3 et -8.

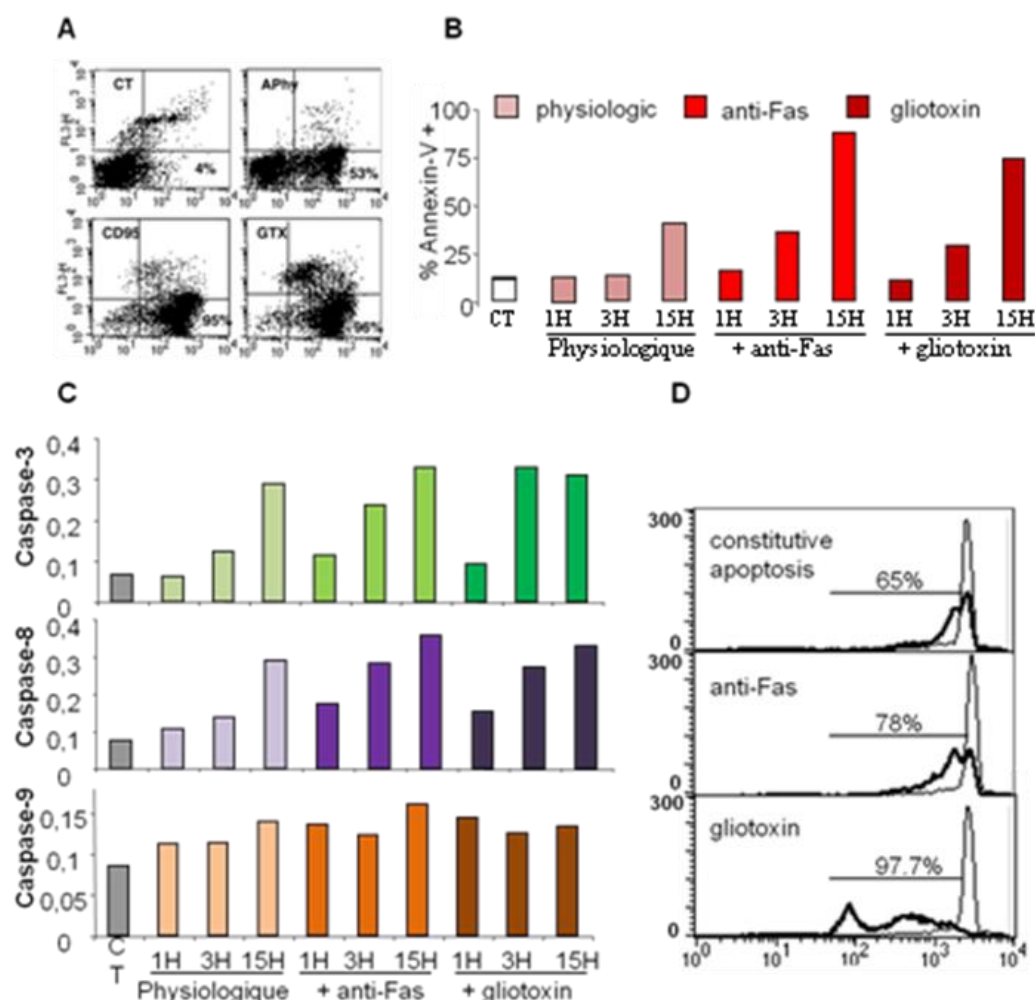


Figure 26 : Modulation de l'apoptose des polynucléaires neutrophiles par l'anti-Fas et la gliotoxine

Les polynucléaires neutrophiles incubés 15 heures à 37°C en présence ou non d'anti-Fas ou de gliotoxine sont passés en cytométrie en flux après un marquage annexine-V / 7AAD (A) et un marquage DIOC6 (D). Une cinétique 1, 3 et 15 heures à 37°C est ensuite réalisée. Les histogrammes représentant les pourcentages de cellules annexine-V positive (B) et les absorbances reflétant l'activité des caspases -3, -8 et -9 (C) montrent une potentialisation de l'apoptose par l'anti-Fas et la gliotoxine. Ces expériences ont été réalisées trois fois.

Nous avons ensuite étudié l'expression de la protéine PCNA au cours de ces différentes apoptoses (Figure 27). Pour cela, dans les mêmes conditions que précédemment, nous réalisons des culots secs de polynucléaires neutrophiles. La fraction cytosolique est obtenue par sonication car le nombre de polynucléaires neutrophiles par condition ne nous permet pas d'utiliser la méthode de la cavitation à l'azote. Les protéines sont dosées par la méthode du Biuret. La révélation du Western blot montre une diminution de l'expression de PCNA au cours de l'apoptose du polynucléaire neutrophile. Plus l'apoptose est importante, plus PCNA disparaît.

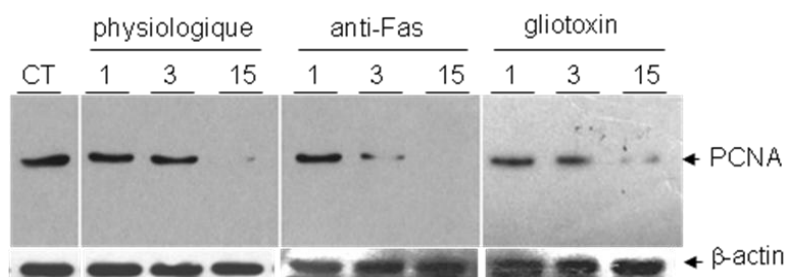


Figure 27 : Expression de PCNA au cours de l'apoptose du polynucléaire neutrophile

Les polynucléaires neutrophiles à l'état basal (CT) et incubés 1, 3 ou 15 heures à 37°C avec ou sans 1 µg/mL d'anti-Fas ou 0,1 µg/mL de gliotoxine sont soniqués puis la fraction soluble est analysée. 50 µg de protéines sont déposées sur un gel de polyacrylamide (12,5 %). La révélation est faite avec l'anti-PCNA pc10 dilué au 1/1000.

Afin de valider la charge déposée sur le gel, une révélation avec l'anti-actine (Sigma, A2066) est effectuée. Elle montre une quantité similaire dans chaque puits.

PCNA est donc dégradé au cours de l'apoptose du polynucléaire neutrophile. Afin de comprendre les mécanismes de cette dégradation, nous avons étudié l'effet des inhibiteurs suivants : le zVAD (inhibiteur des caspases), le Pefabloc (PF, inhibiteur des sérines protéases), le PD150606 (inhibiteur des calpaïnes) et le ps341 (inhibiteur du protéasome). Nous utilisons les mêmes techniques que précédemment : les polynucléaires neutrophiles sont incubés avec ou sans zVAD (50 µM), Pefabloc (50 µM), PD150606 (1, 5 ou 10 µM) ou ps341 (0,1 ou 1 µM) pendant 16 heures à 37°C. Le lendemain, un marquage annexine-V / 7AAD est réalisé pour évaluer l'apoptose ainsi que des culots secs pour chaque condition (**Figure 28 A et B**). Ces derniers sont soniqués et la fraction soluble est analysée sur gel d'acrylamide. Le contrôle (CT) correspond à des polynucléaires neutrophiles fraîchement isolés du sang.

Les résultats pour l'apoptose sont exprimés en pourcentage de cellules en survie, donc annexine-V négative. Le Pefabloc diminue significativement la survie des polynucléaires neutrophiles. En revanche, le zVAD et le ps341 augmentent cette survie par rapport à l'apoptose physiologique. L'inhibiteur des calpaïnes ne module pas l'apoptose des polynucléaires neutrophiles (donnée non montrée). Lorsque nous étudions l'expression de PCNA par western blot, la corrélation existe : PCNA est stabilisé avec zVAD et ps341, complètement dégradé avec Pefabloc et non modulé avec PD150606. PCNA est donc dégradé par le protéasome durant l'apoptose physiologique du polynucléaire neutrophile.

Nous avons voulu savoir ce qu'il en était pour les apoptoses induites par l'anti-Fas et la gliotoxine (**Figure 28 C**). PCNA est également dégradé par le protéasome au cours de ces deux apoptoses pharmacologiques.

Le *Granulocyte Colony Stimulating Factor* (G-CSF) est un facteur puissant capable d'induire la survie des polynucléaires neutrophiles. C'est un facteur de croissance qui permet d'augmenter spécifiquement le taux de polynucléaires neutrophiles. Nous traitons les polynucléaires neutrophiles avec 10 ou 25 ng/mL de G-CSF pendant 16 heures à 37°C et une protection de l'apoptose est observée (**Figure 28 E**). L'expression de PCNA est alors stabilisée par western blot (**Figure 28 D**). L'analyse des ARN messager dans les polynucléaires neutrophiles de patients traités par le G-CSF réalisé par nos collaborateurs ont ensuite montré qu'aucune synthèse d'ARN de PCNA n'était observée au cours du traitement par G-CSF contrairement à d'autres protéines dont l'ARN est fortement induit (comme l'Interleukine 1, IL-1) (données non montrées).

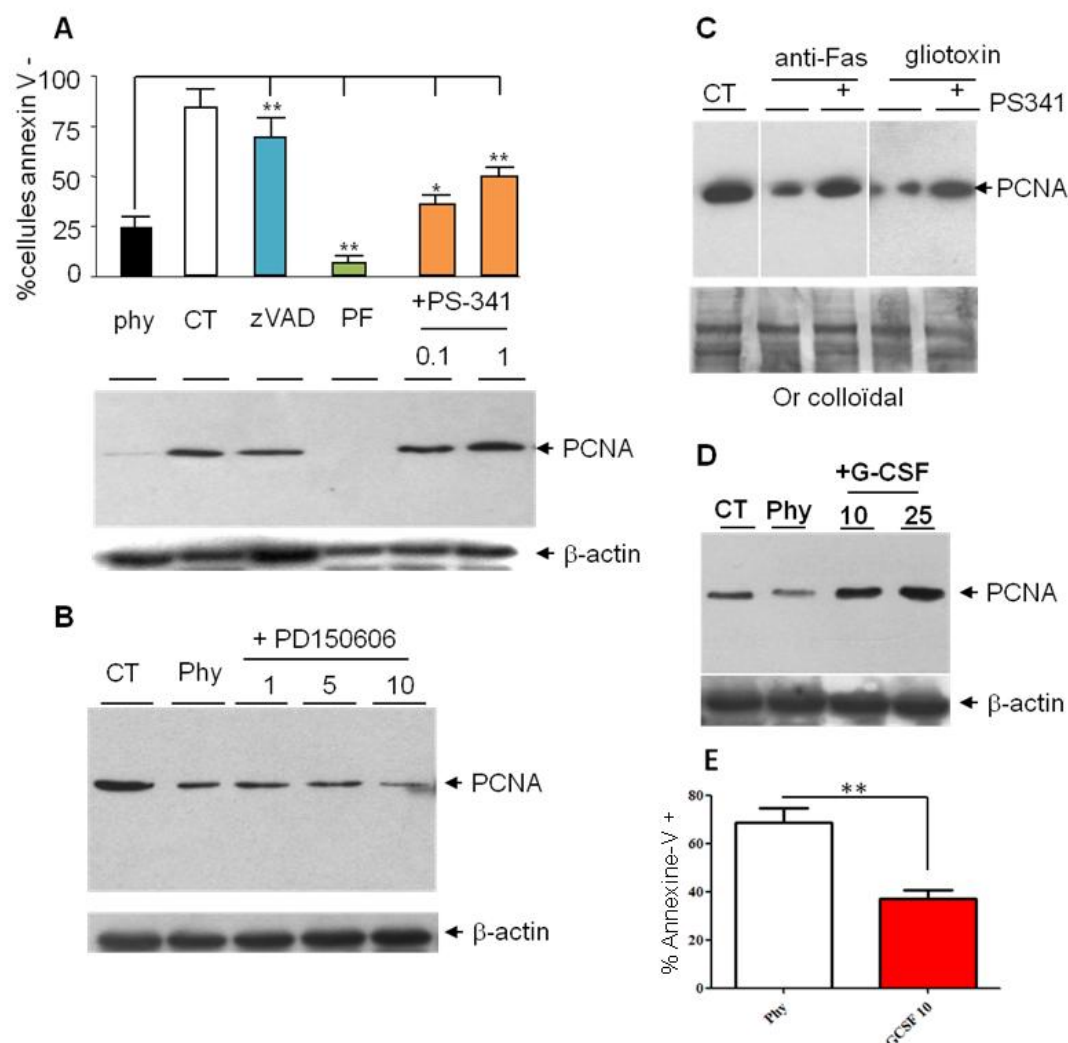


Figure 28 : Modulation de l'expression de PCNA

(A) Les polynucléaires neutrophiles traités avec zVAD, Pefabloc ou ps341 sont marqués avec l'annexine-V / 7AAD et l'apoptose est analysée par cytométrie en flux. 50 µg de protéines cytosoliques de polynucléaires neutrophiles plus ou moins traités ont été séparés selon leur poids moléculaire dans un gel SDS de 12,5%. Phy = apoptose physiologique (incubation 18 heures à 37°C). Résultats significatifs obtenus sur 5 expériences indépendantes (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$).

(B) 50 µg de protéines cytosoliques de polynucléaires neutrophiles plus ou moins traités avec l'inhibiteur des calpaïnes PD150606 ont été analysés par Western blot.

(C) 50 µg de protéines de polynucléaires neutrophiles apoptotiques (par anti-Fas ou gliotoxine) traités ou non avec ps341 ont été analysés par Western blot. Les révélations ont été faites avec un anticorps anti-PCNA pc10. Une coloration à l'or colloïdal est également réalisée pour vérifier la quantité de protéine chargée par puits.

(D) 50 µg de protéines cytosoliques de polynucléaires neutrophiles plus ou moins traités avec G-CSF ont été analysés par Western blot.

Les révélations ont été faites avec un anticorps anti-PCNA pc10 et un anti-actine (Sigma, A2066).

(E) Les polynucléaires neutrophiles traités avec G-CSF (10ng/mL) sont marqués avec l'annexine-V / 7AAD et l'apoptose est analysée par cytométrie en flux. Résultats significatifs obtenus sur 6 expériences indépendantes (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$).

3. Mise au point de la transduction de la protéine PCNA par « Chariot™ »

Nos résultats précédents nous ont montré que la présence de PCNA est associée à la survie du polynucléaire neutrophile et sa disparition est liée à l'apoptose. Cependant, il serait important de démontrer que PCNA peut, par lui-même, induire la survie du polynucléaire neutrophile. Or, comme il a été expliqué (page 36), il est techniquement impossible de transfecter les polynucléaires neutrophiles matures. Nous avons testé s'il était possible de faire pénétrer la protéine PCNA dans le polynucléaire neutrophile par la technique Chariot™, qui permet de faire entrer une protéine dans une cellule.

Dans un premier temps, des polynucléaires neutrophiles ont été isolés du sang de donneur sain. Pendant l'isolement, le complexe Chariot-PCNA est réalisé selon les préconisations du kit (6 µL de chariot dilué dans 100 µL PBS + 1µg PCNA purifié dilué dans 100 µL PBS) mais également une condition doublée (12 µL de chariot dilué dans 100 µL PBS + 2 µg PCNA purifié dilué dans 100 µL PBS) car nous augmentons la quantité de cellules. Ce mélange est ensuite incubé en présence d'un million de polynucléaires neutrophiles placés dans un puits de plaque 6 puits et incubé 30 minutes à 37°C 5% CO₂. Après 6 heures d'incubation à 37°C 5% CO₂, ce qui simule une apoptose physiologique des polynucléaires neutrophiles, l'apoptose est analysée par cytométrie en flux par marquage de l'externalisation de la phosphatidylsérine (annexine-V / 7AAD, **Figure 29 A**) et de la dépolarisation mitochondriale (DIOC6, **Figure 29 B**). Concernant l'analyse du double marquage annexine-V / 7AAD, les pourcentages de cellules positives en annexine-V sont mesurés et pour le DIOC6, l'analyse est faite sur la MFI des pics de fluorescence. Les résultats montrent que l'intégration *via* le Chariot dans le polynucléaire neutrophile n'a pas d'effet sur l'externalisation de la phosphatidylsérine induite par apoptose physiologique. Cependant, une augmentation de la MFI est notée en présence de PCNA signifiant une absence de dépolarisation de la membrane mitochondriale.

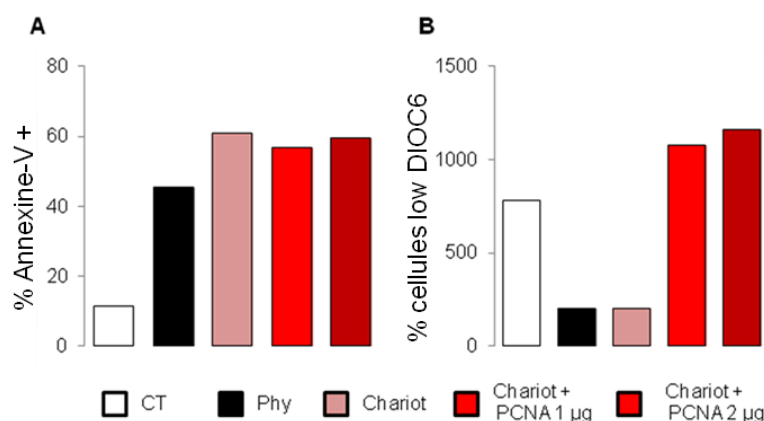


Figure 29 : Mise au point de la transduction de PCNA par le Chariot™ dans le polynucléaire neutrophile

Les polynucléaires neutrophiles sont fraîchement isolés (CT), incubés 6h à 37°C (Phy) mimant une apoptose spontanée ou physiologique, et incubés en présence du Chariot seul (Chariot) afin de tester la toxicité ou avec le complexe Chariot-PCNA 1 µg ou Chariot-PCNA 2µg pendant 6h à 37°C.

Les polynucléaires neutrophiles des différentes conditions sont ensuite marqués par l'annexine-V / 7AAD (A) ou par le DIOC6 (B).

Il semblerait que le Chariot ne soit pas trop toxique pour les polynucléaires neutrophiles. Nous décidons de réaliser une gamme dose de PCNA pour déterminer la concentration idéale (Figure 30). Nous optons pour la condition de dilution du Chariot proposée par le kit, à savoir 6 µL de Chariot dans 100 µL PBS.

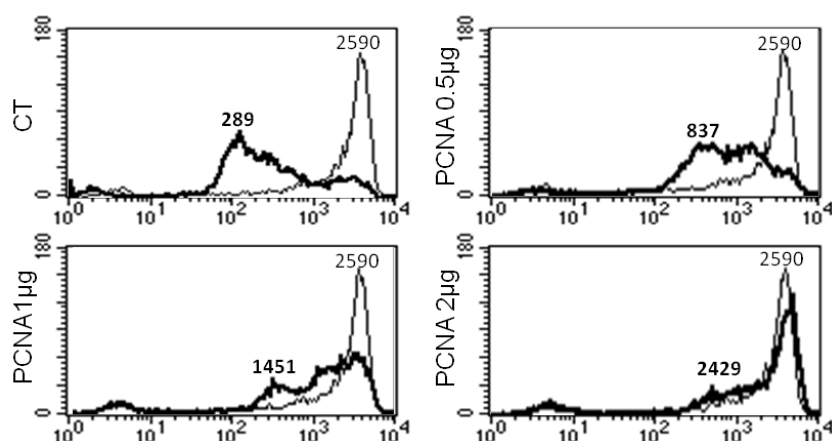


Figure 30 : Gamme dose du complexe Chariot-PCNA sur les polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles incubés avec le complexe Chariot-PCNA (quantité de PCNA de 0,5 à 2 µg) sont marqués par le DIOC6 et l'apoptose est mesurée par cytométrie en flux.

Nous sélectionnons la quantité 1 µg de PCNA et nous dupliquons les manipulations (n=3) pour les marquages annexine-V / 7AAD et DIOC6 (Figures 31 A et B). Cette dose est choisie car elle fonctionne correctement et permet d'économiser le PCNA recombinant. Ces expériences montrent que l'intégration de PCNA par le Chariot dans les polynucléaires

neutrophiles diminue significativement la dépolarisation mitochondriale par rapport au contrôle (Chariot seul, induisant de l'apoptose par rapport à l'apoptose physiologique). PCNA induit également une diminution de l'externalisation de la phosphatidylsérine mais de façon non significative.

Afin de valider ce résultat, une expérience avec des protéines contrôles est faite. Nous choisissons l'ovalbumine (protéine de 38 kDa, similaire à PCNA, 36 kDa) et des IgG purifiés. Nous incubons les polynucléaires neutrophiles en présence de complexe Chariot-protéine en quantité égale à celle de PCNA (1 µg) et un marquage annexine-V / 7AAD est réalisé (**Figure 29 C**). L'ovalbumine (OVA) et les IgG semblent avoir un effet protecteur de l'apoptose similaire à PCNA. Nous ne trouvons pas de contrôle négatif donc cette technique ne peut être validée et il est difficile de conclure sur l'effet protecteur de PCNA. D'autres protéines devraient être testées.

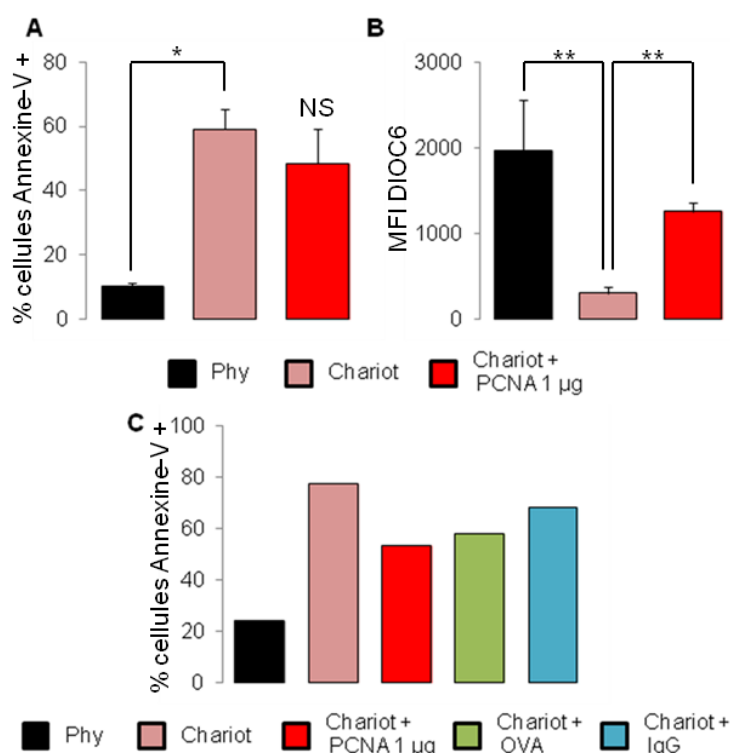


Figure 31 : Effet de la transduction de PCNA par le Chariot™ sur l'apoptose des polynucléaires neutrophiles

(A) Histogramme représentant la moyenne de l'apoptose des polynucléaires neutrophiles après marquage de l'annexine-V / 7AAD. Résultats significatifs obtenus sur 3 expériences indépendantes (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$, NS = Non Significatif). (B) Histogramme représentant la moyenne de fluorescence (MFI) des polynucléaires neutrophiles après marquage DIOC6. Résultats significatifs obtenus sur 6 expériences indépendantes (** = $p < 0.005$). (C) Histogramme représentant l'apoptose des polynucléaires neutrophiles après marquage de l'annexine-V / 7AAD.

4. Modulation de l'apoptose du polynucléaire neutrophile par un peptide compétiteur de p21

PCNA a de nombreux partenaires connus dans le noyau des cellules prolifératives. Une étude (Warbrick, Heatherington et al. 1998) a montré l'effet de différents peptides issus de ses partenaires sur la fonction de PCNA. Nous nous sommes intéressés à un peptide dérivant de la protéine p21, dont la séquence est KRRQTSMTDFYHSRRLIFS. Ce peptide est un peptide compétiteur correspondant à la partie 141-160 des acides aminés de la séquence de p21, qui va déplacer l'interaction entre les protéines PCNA et p21. Cette interaction est connue et est située sur le site *Interconnecting Loop* (ICL) de la séquence de PCNA. Le peptide est synthétisé par la société Genecust, avec en C-terminal, un tag –RYIRS, qui va lui permettre de pénétrer dans le cytosol des cellules. Un peptide contrôle est construit en mutant les acides aminés chargés indispensables pour la liaison à PCNA par modélisation, dont la séquence est KRRQTGETDFDHAKAALIFS (**Figure 32**).

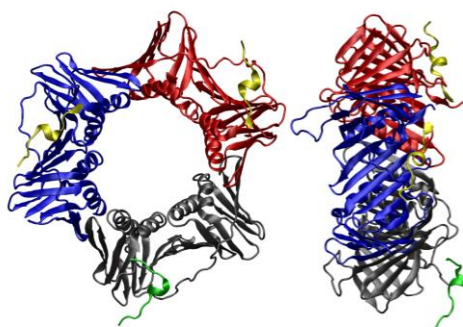


Figure 32 : Structure de PCNA

Les 3 monomères de PCNA sont distingués en bleu, rouge et gris. Nous observons la liaison de deux peptides p21 (jaune) et un peptide p21 muté (vert) sur le domaine *Interconnecting Loop* de PCNA.

Nous décidons donc d'étudier l'effet de ce peptide sur l'apoptose des polynucléaires neutrophiles. Pour cela, les polynucléaires neutrophiles fraîchement isolés du sang sont incubés 16 heures à 37°C en présence ou non d'une gamme dose des deux peptides (p21 et p21 muté) (**Figure 33 A**). Ensuite, l'apoptose est analysée par marquages annexine-V / 7AAD (**Figure 33 B**) et DIOC6 (**Figure 33 C**). Les résultats montrent que le peptide carboxy-terminal de p21 potentialise l'apoptose du polynucléaire neutrophile à une dose de 50µM. Le peptide muté ne modifie pas l'apoptose des polynucléaires neutrophiles. Nous en déduisons que l'effet est spécifique à la séquence du peptide p21 et non pas seulement à l'intégration d'un peptide par les polynucléaires neutrophiles.

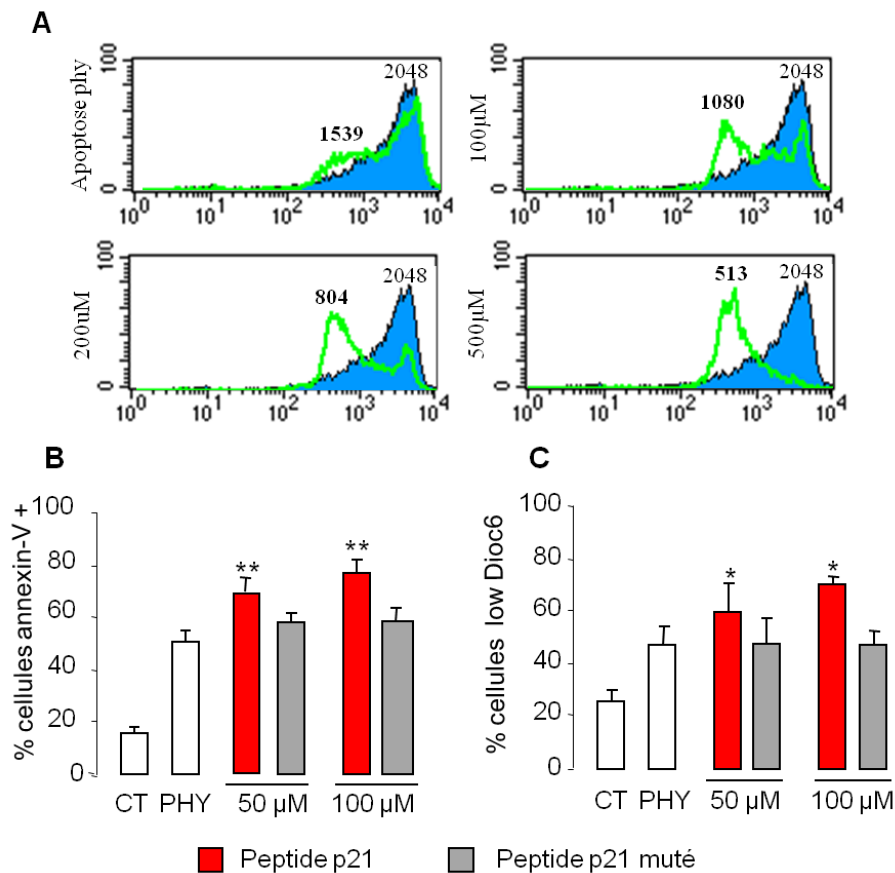


Figure 33 : Modulation de l'apoptose du polynucléaire neutrophile par le peptide C-terminal de p21

Nous réalisons une gamme dose du peptide p21 (100, 200 et 500 μM) sur les polynucléaires neutrophiles. Les profils obtenus en cytométrie en flux après marquage DIOC6 sont montrés en **(A)**. Les expériences sont répétées 4 fois afin d'obtenir les histogrammes représentant le pourcentage de cellules annexine-V positive **(B)** et le pourcentage de cellules ayant un DIOC6 diminué **(C)** (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$).

5. Recherche des partenaires de PCNA dans le cytosol de polynucléaires neutrophiles

Nous décidons de rechercher des partenaires de la protéine PCNA dans le cytosol de polynucléaires neutrophiles. Pour cela, nous utilisons la technique de billes magnétiques (Miltenyi) et travaillons sur des cytosols de cavitation de polynucléaires neutrophiles obtenus à partir de poche de sang (environ 400 mL).

Dans un premier temps, l'immunoprécipitation (IP) de PCNA a été validée. En effet, sur l'IP contrôle (avec un anticorps anti-IgG) **(Figure 34 A)**, PCNA est absent de l'élution. PCNA ne colle donc pas aux billes. Par contre, l'IP PCNA (avec l'anticorps anti-PCNA ab5) **(Figure 34 B)**, PCNA est présent dans l'élution donc il a correctement été immunoprécipité. Il faut noter

la présence de PCNA dans l'exclusion. Cette technique ne nous permet pas d'immunoprécipiter la totalité de la protéine.

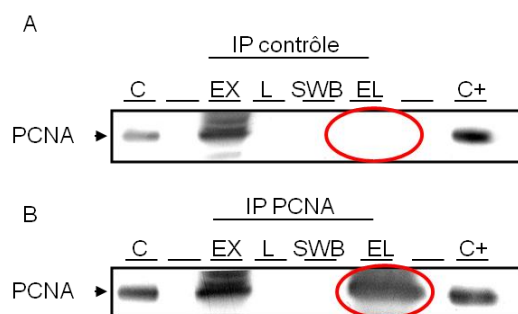


Figure 34 : Validation de l'immunoprécipitation de PCNA

(A) Immunoprécipitation avec l'anticorps isotypique IgG1 (Immunotech, IM0571) ; Révélation avec l'anticorps anti-PCNA pc10 (Santa Cruz, sc-56)

(B) Immunoprécipitation avec l'anticorps anti-PCNA ab5; Révélation avec l'anticorps anti-PCNA pc10 (Santa Cruz, sc-56)

C : Cytosol de cavitation de polynucléaires neutrophiles, 50 µg protéines – EX : Exclusion – L : Lavages – SWB : Salt Wash Buffer, lavage hyposalin – EL : Elution – C+= Cytosol de cavitation de polynucléaires neutrophiles connu, 50 µg protéines

Séparation des protéines selon leur poids moléculaire dans un gel poly-acrylamide de 12,5%.

Nous avons plusieurs hypothèses permettant d'expliquer l'effet anti-apoptotique de PCNA dans les polynucléaires neutrophiles. PCNA étant une plateforme protéique, l'implication de partenaires pourrait être indispensable à cet effet. Notre première idée a été que PCNA avait, dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles, des partenaires appartenant à la famille des homologues de Bcl-2. Ainsi, PCNA pourrait stabiliser des protéines anti-apoptotiques comme Mcl-1 ou inhiber des molécules pro-apoptotiques comme Bax, Bid, Bak, Bik etc.

Nous avons donc réalisé des co-immunoprécipitations (co-IP) avec ces différents partenaires potentiels. Le résultat a été décevant, aucune protéine testée (Mcl-1, Bax et Bid) n'a été retrouvée dans l'élution de l'IP PCNA (**Figure 35 A, C et D**). Concernant Mcl-1, l'IP reverse (**Figure 35 B**) a également été réalisée afin de confirmer notre résultat négatif.

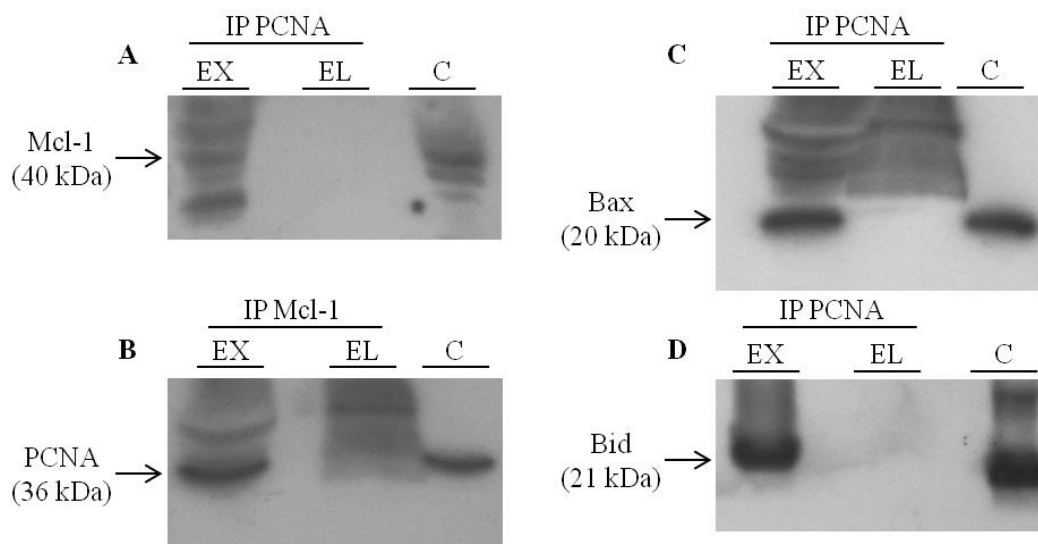


Figure 35 : PCNA n'est pas associé avec MCl-1, Bax et Bid dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles

Ex : Exclusion - EL : Elution - C : Cytosol de cavitation de polynucléaires neutrophiles, 200 µg de protéines

(A) Immunoprécipitation avec l'anticorps anti-PCNA ab5 (Calbiochem, PC474); Révélation avec l'anticorps anti-MCl-1(BD, 559027). **(B)** Immunoprécipitation réverse avec l'anticorps anti-MCl-1 (BD, 559027); Révélation avec l'anticorps anti-PCNA ab5 (Calbiochem, PC474). **(C)** Immunoprécipitation avec l'anticorps anti-PCNA ab5 (Calbiochem, PC474); Révélation avec l'anticorps anti-Bax ab2 (Calbiochem, AM13). **(D)** Immunoprécipitation avec l'anticorps anti-PCNA ab5 (Calbiochem, PC474); Révélation avec l'anticorps anti-Bid C20 (Santa Cruz, sc-6538).

Nous nous sommes ensuite intéressés aux caspases. Les caspases sont des acteurs clés de l'apoptose qu'elles soient activatrices ou effectrices. Nous avons donc recherché par des expériences de co-IP la présence de pro-caspases et de PCNA dans un même complexe protéique. Nous avons ainsi montré que les pro-caspases -3, -8, -9 et -10 étaient présentes dans un complexe protéique qui contenait PCNA (**Figures 36 A, B, C et D**) et inversement (données non montrées).

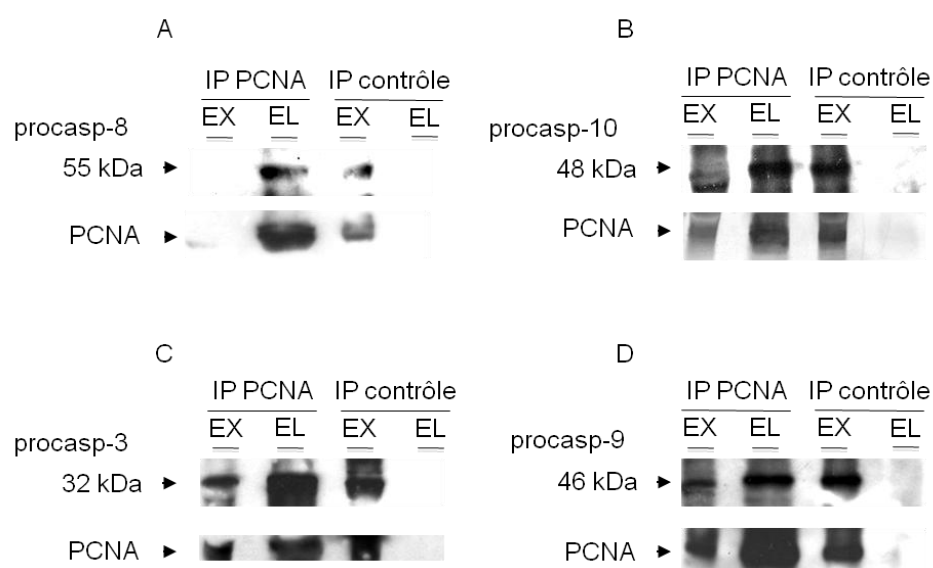


Figure 36 : Association de PCNA avec les pro-caspases -3, -8, -9 et -10.

IP PCNA : Immunoprécipitation avec l'anticorps anti-PCNA ab5 (Calbiochem, PC474)

IP contrôle : Immunoprécipitation avec l'anticorps isotypique IgG1 (Immunotech, IM0571)

EX= exclusion - EL = Elution

Séparation des protéines selon leur poids moléculaire dans un gel poly-acrylamide 12,5%.

(A) Révélation avec l'anticorps anti-Caspase-8 clone 12F5 (Axxora, ALX-804-242).

(B) Révélation avec l'anticorps anti-Caspase-10/a (R&D, MAB834).

(C) Révélation avec l'anticorps anti-Caspase-3 clone 3F9 (Santa Cruz, sc-56048).

(D) Révélation avec l'anticorps anti-Caspase-9 p10 (Santa Cruz, sc-17784).

PCNA et p21 sont des partenaires connus dans le noyau des cellules. Ils interagissent *via* le domaine ICL de PCNA. Il est très difficile de détecter la protéine p21 dans le polynucléaire neutrophile mature, elle est très sensible à la dégradation par la protéinase 3 par exemple. Cependant, nous savons qu'après stimulation avec les cytokines TNF α , G-CSF et l'interféron δ (IFN δ), l'ARN messager de p21 est fortement induit dans le polynucléaire neutrophile mature. Dans un premier temps, nous avons essayé de détecter la protéine p21 dans des cytosols de cavitation de polynucléaires neutrophiles par western blot. Nous avons ainsi détecté de la protéine p21 dans différents cytosol de polynucléaires neutrophiles (**Figure 37**). L'intensité de la bande étant faible compte tenu de la quantité importante de protéines déposées (100 μ g), cela reflète certainement une faible quantité de p21 dans le cytosol de polynucléaire neutrophile.

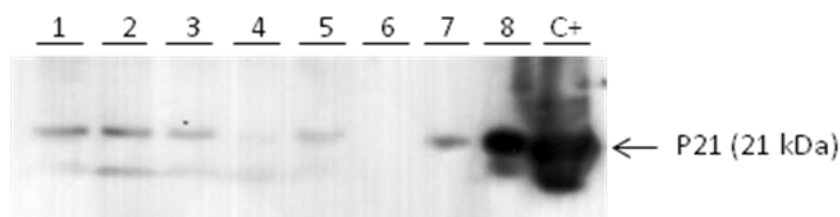


Figure 37: Détection de p21 dans différents cytosols de polynucléaires neutrophiles par Western blot

100 µg de protéines de différents cytosols de cavitation (de 1 à 8) ont été séparés selon leur poids moléculaire dans un gel poly-acrylamide 12,5%. La révélation a été faite avec un anticorps anti- p21 (Becton Dickinson, référence 556430, dilution 1/1000^{ème}). Le contrôle positif (C+) correspond à 5 µL de p21 recombinante purifiée.

Cependant, il a été impossible de répéter ce résultat. Il semble que la protéine p21 soit dégradée rapidement dans les échantillons. Ainsi, des étapes de congélation-décongélation font disparaître la protéine des échantillons. La présence de p21 dans le cytosol de polynucléaires neutrophiles a tout de même été validée par immunofluorescence dans le laboratoire (donnée non montrée).

De ce fait, nous n'avons pas pu déterminer si PCNA et p21 étaient partenaires dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles.

II. Les PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles, modèle cellulaire

Dans un premier temps, nous avons travaillé avec la lignée cellulaire NB4. Ce sont des cellules promyélocyaires qui se différencient en polynucléaires neutrophiles après un traitement de 4 jours avec l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA).

Les cellules NB4 sont transfectées avec le plasmide contenant l'ADN complémentaire de PCNA: pcDNA3/PCNA. Il s'est avéré que la différenciation des cellules NB4 surexprimant PCNA en polynucléaires neutrophiles est altérée; en effet, elle est largement diminuée par rapport à celle des cellules NB4 natives (**Figure 38**). Suite à une recherche bibliographique, ce phénomène est expliqué par une interaction directe entre PCNA et le récepteur à l'ATRA (Martin, Lardeux et al. 2005), ce qui engendre une diminution de la différenciation. Les cellules NB4 ne se différenciant qu'avec des acides rétinoïques (Chen, Licht et al. 1994), il a fallu trouver une autre lignée. Nous nous sommes ainsi intéressés aux cellules PLB-985.

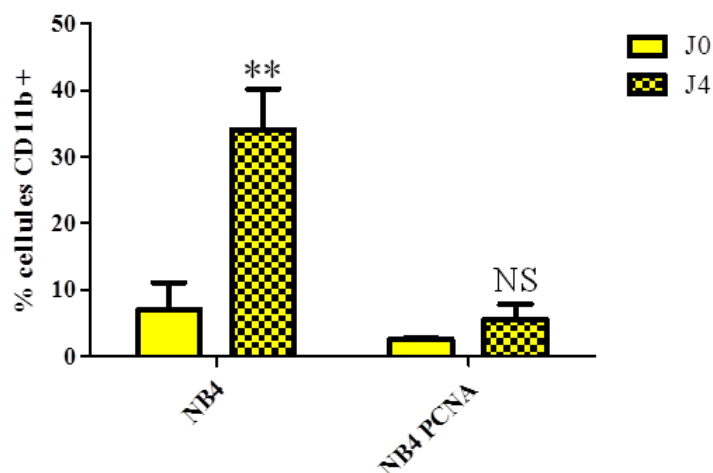


Figure 38 : Expression du marqueur CD11b à la membrane des cellules NB4 surexprimant PCNA différenciées en polynucléaires neutrophiles

Les cellules NB4 sont différenciées en polynucléaires neutrophiles suite à un traitement par l'ATRA pendant 4 jours.

Analyse par cytométrie en flux du marquage membranaire CD11b des NB4 natives et des NB4 PCNA avant (J0) et après leur différenciation (J4). Le résultat est exprimé en % de cellules exprimant les CD11b à leur membrane. Résultats significatifs obtenus sur 4 expériences indépendantes (** = $p < 0.005$, NS = Non Significatif).

1. Influence de PCNA sur l'apoptose des PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles

1.1. Surexpression de PCNA dans une lignée promyélocytaire

Les expériences de ChariotTM n'étant pas concluantes, nous avons opté pour un autre type d'expérience afin de prouver le rôle direct anti-apoptotique de PCNA. Nous avons surexprimé PCNA dans des cellules promyélocytaires, les PLB-985, facilement différenciables en polynucléaires neutrophiles. Les PLB-985 ont été transfectées avec le plasmide vide pcDNA3 (PLB-CT) et avec le plasmide pcDNA3-PCNA (PLB-PCNA) grâce à la technologie Amaxa[®].

Les PLB-985 sont des cellules qui prolifèrent et qui contiennent du PCNA nucléaire et cytoplasmique. Il est donc très difficile d'observer l'augmentation d'expression induite par la transfection. Cependant, nous observons une petite augmentation de la bande à 36 kDA, caractéristique de PCNA, dans les PLB-PCNA versus les PLB-CT par Western blot (**Figure 39**). Cette surexpression a également été validée par immunofluorescence.

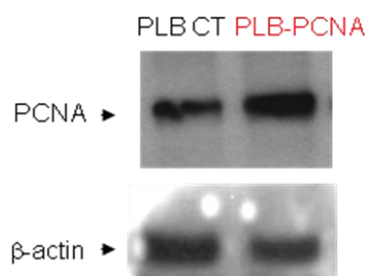


Figure 39 : Surexpression de PCNA dans les PLB-985

20 µg de protéines de PLB-CT et PLB-PCNA ont été analysés par Western blot. Les révélations ont été faites avec un anticorps anti-PCNA pc10 et un anti-actine (Sigma, A2066).

1.2. Différenciation des PLB-985 en polynucléaires neutrophiles

Les PLB-985 sont différenciées en polynucléaires neutrophiles après un traitement de 5 jours avec diméthylformamide (DMF) (Pedruzzi, Fay et al. 2002). Nous avons validé cette différenciation par différentes techniques. La première est une validation morphologique par coloration au *May Grünwald Giemsa* (**Figure 40 A**). Les PLB-CT différenciées acquièrent des noyaux plurilobés, caractéristiques du polynucléaire neutrophile. Le même résultat est obtenu pour les PLB-PCNA (données non montrées).

La seconde technique permet de vérifier l'apparition du marqueur CD11b présent à la membrane du polynucléaire neutrophile (**Figure 40 B**). Pour cela, les PLB-CT et les PLB-PCNA sont analysées par cytométrie en flux après un marquage membranaire du CD11b. Les cellules non différenciées (J0) ont un faible pourcentage de CD11b à leur membrane tandis qu'environ 50-60 % des cellules différenciées possèdent ce marqueur à leur membrane. Ce résultat est similaire pour les 2 lignées. Le pourcentage de CD11b à la membrane des cellules différenciées peut varier d'une manipulation à une autre, mais en moyenne il y a 50 % de cellules différenciées quelle que soit la lignée.

Le polynucléaire neutrophile mature a la capacité de générer des formes réactives de l'oxygène via l'activation de la NADPH oxydase. L'activation de la NADPH oxydase peut se mesurer par chimioluminescence. Pour valider la différenciation des PLB-985, nous avons donc mesuré leur explosion respiratoire. Cette technique va nous permettre, par comparaison à l'explosion respiratoire de polynucléaires neutrophiles fraîchement isolés, de déterminer si les cellules sont différenciées en polynucléaires neutrophiles après traitement au DMF. Ce test mesure la production globale de formes réactives de l'oxygène par les polynucléaires neutrophiles en réponse au phorbol myristate acétate (PMA).

A J0, la mesure de ces espèces réactives de l'oxygène est nulle ce qui constitue un bon contrôle négatif interne de la manipulation. A J3, la production commence pour les deux

lignées. Nous avons observé que les cellules différenciées à J5 avaient la capacité de générer des espèces réactives de l'oxygène comme les polynucléaires neutrophiles (**figure 40 C**). Nous remarquons que les cellules surexprimant PCNA ont une capacité similaire de produire des espèces réactives de l'oxygène que les cellules transfectées avec le plasmide vide.

Pour conclure, la surexpression de PCNA ne modifie pas la différenciation des PLB-985 en polynucléaires neutrophiles tant au niveau de l'apparition du marqueur de membrane CD11b, la modification morphologique des cellules avec l'apparition de noyaux polylobés ou encore la capacité de générer des espèces réactives de l'oxygène en réponse au PMA.

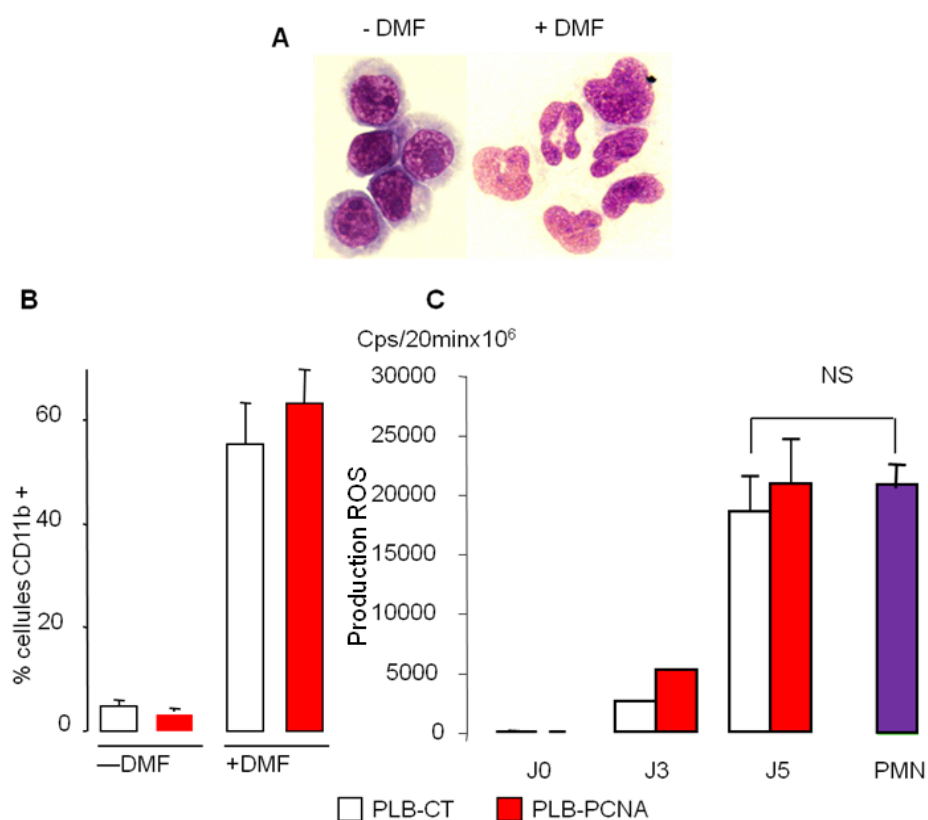


Figure 40 : Analyses morphologiques et fonctionnelles de la différenciation des PLB-985 en polynucléaires neutrophiles

(A) Coloration au May Grünwald Giemsa des PLB-CT avant (- DMF) et après différenciation (+ DMF). (B) Analyse par cytométrie en flux du marquage membranaire CD11b des PLB-CT et PLB-PCNA avant et après différenciation. Le résultat est exprimé en % de cellules exprimant le CD11b à leur membrane. (C) Mesure de l'explosion respiratoire après induction par le PMA des PLB-CT et PLB-PCNA au cours de leur différenciation par traitement avec le DMF (J0, J3 et J5) comparé à l'explosion respiratoire de polynucléaires neutrophiles fraîchement isolés (PMN). Le résultat est exprimé en coups par minute.

Résultats significatifs obtenus sur 6 expériences indépendantes (NS = Non Significatif).

1.3. Analyse de l'apoptose des PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles surexprimant PCNA

Afin d'explorer l'apoptose le plus largement possible, nous décidons d'induire l'apoptose avec différents stimuli. La gliotoxine (1 $\mu\text{g/mL}$), inhibiteur de la voie NF κ B et ligand de la protéine pro-apoptotique Bak, est utilisée pour étudier la voie intrinsèque tandis que le TNF α (10 ng/mL) ou TRAIL (10ng/mL) permet l'étude de la voie extrinsèque *via* les récepteurs de mort (**Figure 41**). Ces drogues sont incubées avec les cellules PLB-CT et PLB-PCNA, toutes deux différenciées en polynucléaires neutrophiles (J5), pendant 16 heures à 37°C. L'analyse de l'apoptose est donc effectuée à J6.

L'analyse de l'apoptose est réalisée *via* différentes techniques : analyse morphologique des noyaux par un marquage immunofluorescent Hoeschst ou des analyses de cytométrie en flux (fragmentation de l'ADN avec le marquage à l'iodure de propidium, dépolarisation mitochondriale avec le marquage DIOC6 et activité de la caspase-8).

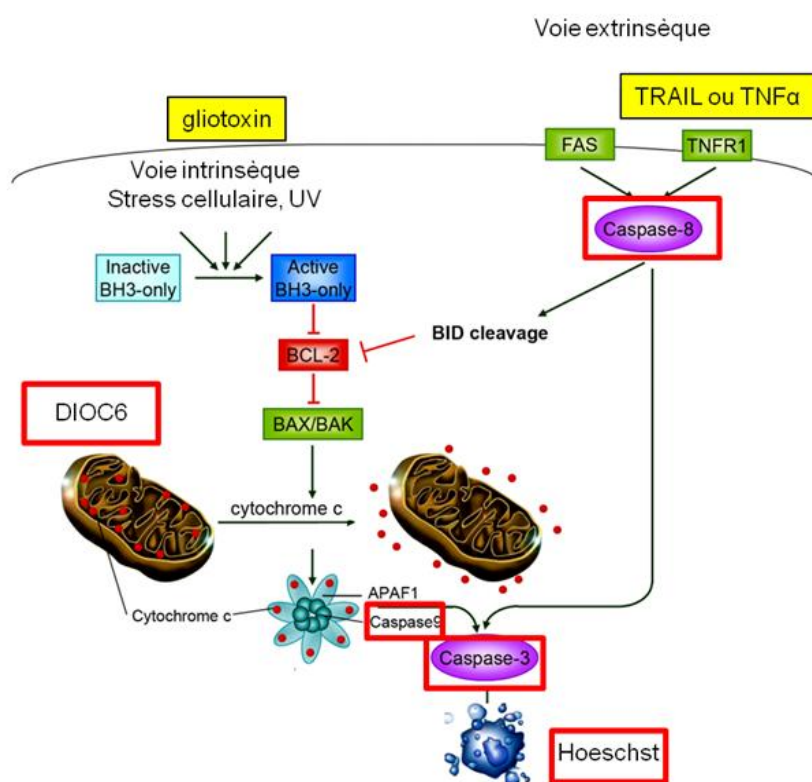


Figure 41 : Analyse de l'apoptose

Les deux voies de l'apoptose les plus connues: la voie intrinsèque passant par la mitochondrie (induite par la gliotoxine) et la voie extrinsèque via les récepteurs de mort (induite par TRAIL ou TNF α). Le marquage DIOC6 permet d'analyser la dépolarisation de la membrane mitochondriale au cours du phénomène apoptotique. Le marquage Hoeschst et le marquage à l'iodure de propidium permettent d'évaluer la fragmentation de l'ADN. L'activité des caspases (la caspase-8 pour son action sur le clivage de Bid et son activation de la caspase-3; la caspase-9 dans la formation de l'apoptosome puis l'activation de la caspase-3) est mesurée par cytométrie en flux.

Dans un premier temps, nous avons voulu visualiser la morphologie des noyaux après traitement par le $\text{TNF}\alpha$ ou la gliotoxine grâce au marquage immunofluorescent Hoeschst. La condition basale reflète l'effet du DMF sur les cellules car aucun agent apoptotique n'a été ajouté. Il semble que le DMF soit un peu toxique pour les cellules surtout pour les PLB-CT. A J6 + $\text{TNF}\alpha$, nous observons clairement que la majorité des cellules surexprimant PCNA ont des noyaux intacts. A l'inverse beaucoup de corps apoptotiques sont visualisés sur la lame des PLB-CT. Un résultat similaire est obtenu pour les cellules à J6 + gliotoxine. Il semblerait que la surexpression de PCNA dans les PLB-985 différenciées protège de la formation de corps apoptotiques, donc de l'apoptose (**Figure 42**).

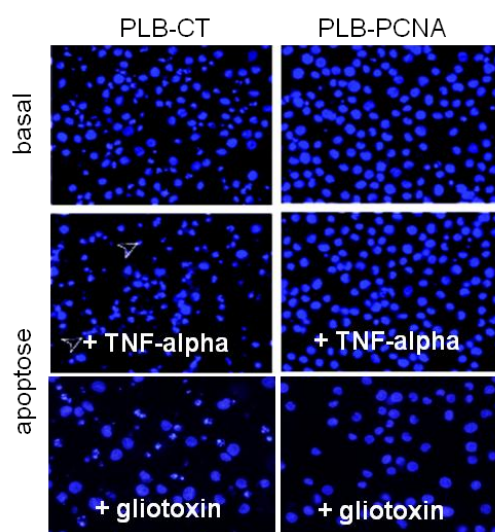


Figure 42 : Analyse morphologique de l'apoptose

Les PLB-CT et PLB-PCNA sont traités avec le DMF pendant 5 jours puis 16 heures avec 10 ng/mL de $\text{TNF}\alpha$ ou 1 $\mu\text{g/mL}$ de gliotoxine. Les cellules sont ensuite cytopspinées et marquées avec le Hoeschst, colorant des noyaux.

Après ces premières observations, nous voulons quantifier cette apoptose par cytométrie en flux. Les PLB-CT et PLB-PCNA différenciées sont donc traitées 16 heures avec la gliotoxine, le $\text{TNF}\alpha$ ou le TRAIL. Le marquage à l'iodure de propidium (**Figure 43 A**) montre que le DMF induit de l'apoptose sur les PLB-CT (environ 20 %). Après traitement à la gliotoxine, les PLB-PCNA semblent être protégées de l'apoptose. En effet, le pourcentage de PLB-PCNA en sub-G1 est plus faible que celui des PLB-CT, respectivement 15 % et 35 %. Ce résultat est confirmé par le marquage DIOC6 (**Figures 43 B et C**). Les PLB-CT apoptosent à environ 60 % avec la gliotoxine, environ 50 % avec TRAIL et environ 40 % avec $\text{TNF}\alpha$ tandis que les pourcentages de cellules apoptotiques pour les PLB-PCNA sont aux alentours de 35 % avec la gliotoxine, 25 % avec TRAIL et 25 % avec $\text{TNF}\alpha$.

Nous avons également mesuré l'activation de la caspase-8 par cytométrie en flux (**Figure 43 D**). Cette activation est moindre pour les PLB-PCNA (40 % avec TRAIL et 50 % avec la gliotoxine) en comparaison aux PLB-CT (70 % avec TRAIL et 80 % avec la gliotoxine). Il peut paraître étonnant que la gliotoxine induise une activité de la caspase-8 car elle promeut une apoptose *via* la voie intrinsèque. Pourtant, l'équipe de HU Simon a publié des résultats expliquant ce phénomène (Conus, Perozzo et al. 2008). Le neutrophile libère la cathepsine D contenue dans ses granules et ainsi, cette dernière active directement la caspase-8.

Quelque soit la méthode utilisée, il a été observé que les PLB-985 surexprimant PCNA présentaient une résistance à l'apoptose déclenchée par TRAIL ou TNF α *via* la voie des récepteurs de mort ou par la gliotoxine, *via* la voie mitochondriale.

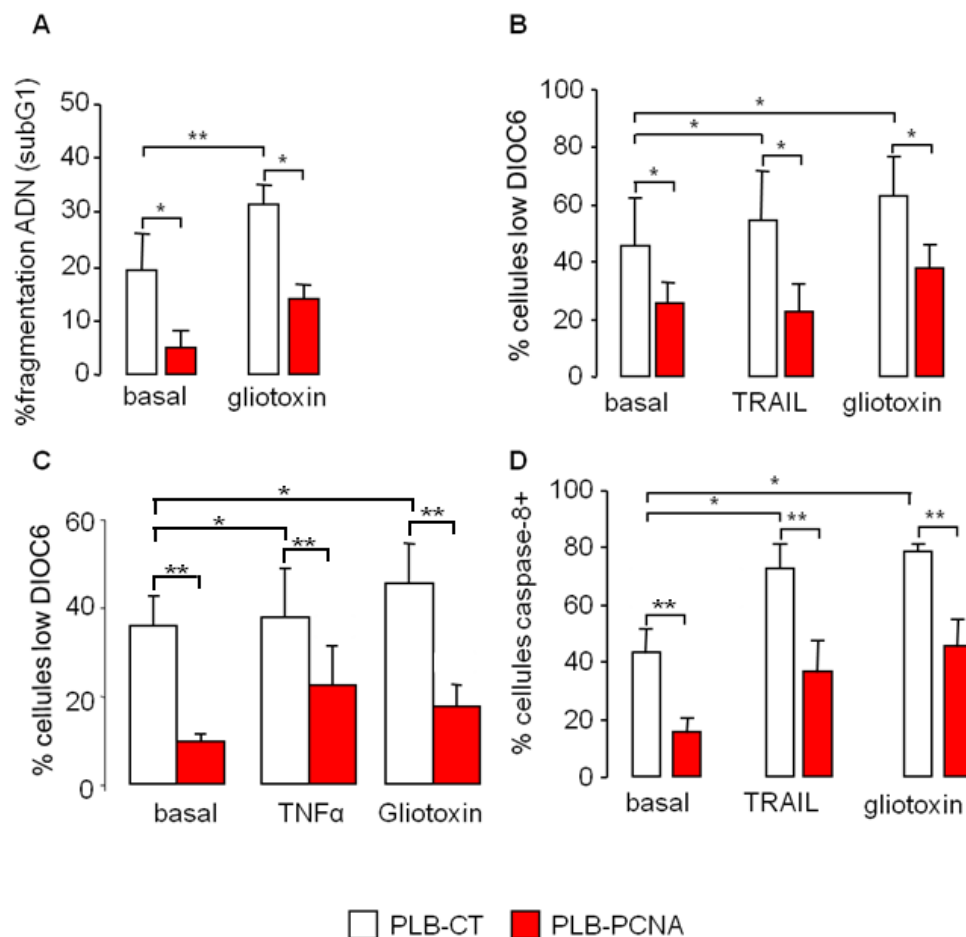


Figure 43 : Etude de l'apoptose des PLB-CT et des PLB-PCNA différenciées en polynucléaires neutrophiles

(A) Les cellules sont marquées à l'iodure de propidium puis analysées par cytométrie en flux.
 (B) et (C) Les cellules sont marquées par le DIOC6 et l'apoptose est mesurée par cytométrie en flux.
 (D) Les cellules sont marquées avec le substrat FITC-IETD-FMK afin d'évaluer l'activité de la caspase-8 par cytométrie en flux. Les histogrammes expriment des pourcentages de cellules positives (apoptotiques). Résultats significatifs obtenus sur 4 expériences indépendantes (** = $p < 0.005$, * = $p < 0.05$, NS = Non Significatif).

Afin de comprendre les bases moléculaires de l'activité anti-apoptotique, des mutants de PCNA dans le domaine ICL (compris entre le résidu 121 et le résidu 133) ont été générés afin d'identifier les sites d'interaction potentiels impliqués dans son activité anti-apoptotique. Le domaine ICL est le site majeur de fixation des partenaires protéiques de PCNA dont fait partie la protéine p21. Il présente des acides aminés chargés négativement qui interagissent avec les acides aminés chargés positivement des partenaires. Le mutant généré est PCNA D120A ;D122A ;E124A ;E130A ;E132A et perd 5 acides aminés chargés négativement pour être remplacés par 5 alanines, acides aminés neutres. Ce mutant a été transfecté dans les cellules PLB-985 (PLB-PCNA muté). Après différenciation de ces cellules en polynucléaires neutrophiles, aucune modulation de l'apparition du marqueur de différenciation CD11b (données non montrées) n'a été observée. En revanche, ce mutant augmentait l'apoptose par rapport aux cellules PLB-985 surexprimant le PCNA sauvage, mesurée par le marquage DIOC6 (**Figure 44 A**) et par l'activité de la caspase-8 (**Figure 44 B**). Ceci suggère que la fixation de partenaires protéiques sur ce domaine d'interaction pourrait être responsable de l'activité anti-apoptotique de PCNA.

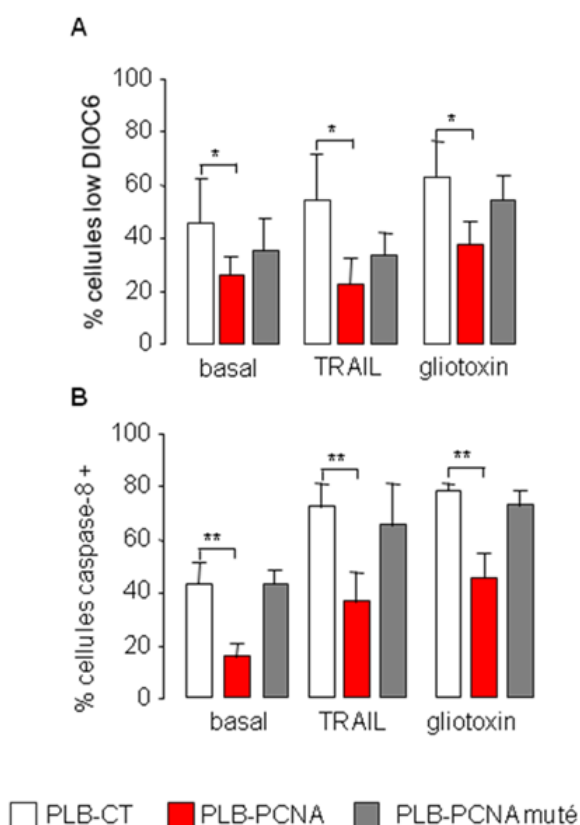


Figure 44 : Analyse de l'apoptose des PLB-PCNA muté dans son domaine ICL différenciées en polynucléaires neutrophiles

(A) Les cellules sont marquées par le DIOC6 et l'apoptose est mesurée par cytométrie en flux.
 (B) Les cellules sont marquées avec le substrat FITC-IETD-FMK afin de regarder l'activité de la caspase-8 par cytométrie en flux.

1.4. Inhibition de PCNA dans une lignée promyélocytaire

PCNA surexprimé dans les cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles inhibe l'apoptose. Nous avons voulu tester l'effet inverse, c'est-à-dire inhiber la protéine PCNA par la technique des petits ARNs interférents et observer une potentialisation de l'apoptose.

Nous avons commandé un siRNA dirigé contre PCNA commercialisé par la société Qiagen. La séquence cible est AAG CAC CAA ACC AGG AGA AAG. Nous avons également commandé un siRNA contrôle, testé pour n'inhiber aucune protéine. Ce siRNA contrôle peut être couplé à l'Alexa 488 afin de valider la pénétration dans la cellule.

Les PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles et transfectées deux fois (à J3 puis à J4) avec 1 μ M de siRNA-PCNA ou siRNA-CT ou siRNA-CT-Alexa488 par la méthode Amaxa[®]. L'efficacité de transfection et l'effet sur l'apoptose est meilleure après une double transfection (tests réalisés préalablement mais non montrés).

L'efficacité de transfection est mesurée par cytométrie en flux à J5 grâce à la transfection du siRNA-CT-Alexa 488. Elle montre que 90 % des cellules en moyenne ont intégré ce siRNA. Nous avons validé l'inhibition de l'expression de la protéine PCNA par Western Blot (**Figure 45**).

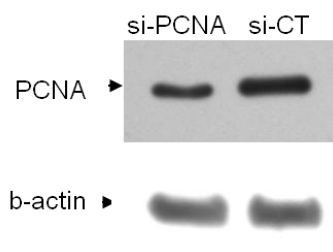


Figure 45 : Validation du siRNA-PCNA dans les cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles par Western Blot

50 μ g de protéines de PLB-CT et PLB-PCNA ont été analysés par Western blot. La détection des protéines a été faite avec un anticorps anti-PCNA pc10 et un anti-actine (Sigma, A2066).

A J5, l'apoptose des cellules différenciées et transfectées est analysée, après 16 heures d'incubation avec 1 μ g/mL de gliotoxine ou 10 ng/mL de TRAIL, par un marquage DIOC6. Les résultats montrent que quelle que soit l'apoptose induite (physiologique = basale, gliotoxine ou TRAIL), les PLB-985 transfectées avec le siRNA-PCNA ont une apoptose augmentée par rapport aux PLB-985 transfectées avec le siCT (**Figure 46**). En effet, le pourcentage d'apoptose des cellules PLB-985 transfectées avec le siPCNA est d'environ 50 % suite au traitement par la gliotoxine ou TRAIL tandis que celui des PLB-985 transfectées avec le siCT est d'environ 25 %.

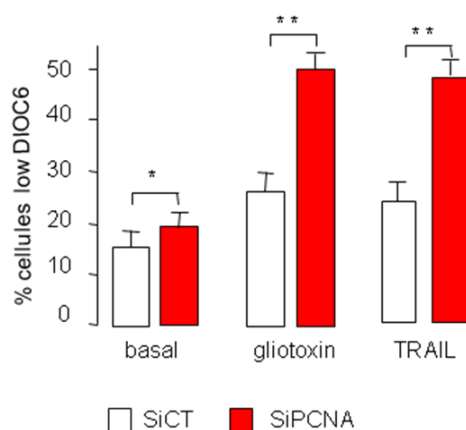


Figure 46 : Effet du siRNA-PCNA sur l'apoptose des cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles

Les cellules sont marquées par le DIOC6 et l'apoptose est mesurée par cytométrie en flux. Résultats significatifs obtenus sur 4 expériences indépendantes (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.005$).

2. Influence de p21 sur l'apoptose des PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles

Les expériences avec le peptide mimétique de p21 sur le polynucléaire neutrophile mature ont montré une activité pro-apoptotique de ce dernier. La protéine p21 pourrait jouer un rôle important dans l'activité anti-apoptotique de PCNA en raison de leur interaction. Nous décidons donc d'étudier l'effet de la surexpression de p21 sur l'apoptose des cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles afin de comprendre l'effet potentiel de l'expression de p21 dans le polynucléaire neutrophile mature.

2.1. Surexpression de p21 dans une lignée promyélocytaire

Les cellules PLB-985 sont transfectées avec le plasmide prc/RSV (PLB CT) et avec le plasmide prc/RSV-p21 (PLB-p21) grâce à la technologie Amaxa®. Les suspensions cellulaires sont centrifugées et les culots obtenus sont ensuite faiblement soniqués (afin de mimer un extrait cytosolique). Le western blot anti-p21 sur ces extraits révèle une augmentation de la bande à 21 kDa correspondant à la protéine p21 dans les PLB-p21 par rapport au PLB CT (**Figure 47**). L'intensité de la surexpression de p21 n'est pas importante.

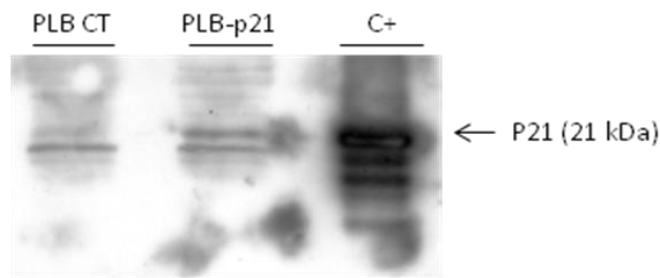


Figure 47 : Surexpression de p21 dans les PLB-985

100 µg de protéines de PLB-CT et PLB-p21 ont été analysés par Western Blot. La révélation a été faite avec un anticorps anti- p21 (Becton Dickinson, référence 556430, dilution 1/1000^{ème}). Le contrôle positif (C+) correspond à 5 µL de p21 humaine recombinante purifiée (Dublet, Ruello et al. 2005).

Dans le laboratoire, il a été montré que la protéine p21 était clivée par la protéinase 3 (PR3) (Dublet, Ruello et al. 2005). Nous avons donc décidé de transfecter également la forme résistante de p21 à la PR3 : p21 A45R dans les cellules PLB-985 (PLB-p21A45R).

2.2. Effet de la surexpression de p21 sur la différenciation des PLB-985

De la même façon que pour les PLB-PCNA, nous étudions l'influence de p21 sur la différenciation des PLB-985 en polynucléaires neutrophiles par le marquage membranaire de CD11b par cytométrie en flux (**Figure 48 A**) et par mesure de l'explosion respiratoire par chimioluminescence (**Figures 48 B et C**). Les résultats obtenus montrent que l'expression à la membrane du marqueur CD11b n'est pas modulée avec la surexpression de p21 ou p21A45R dans les PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles. Par contre, la surexpression de p21 induit une augmentation de l'explosion oxydative des cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles par rapport aux cellules transfectées avec le plasmide vide que ce soit avec le luminol (**Figure 48 B**) ou avec la lucigénine (**Figure 48 C**).

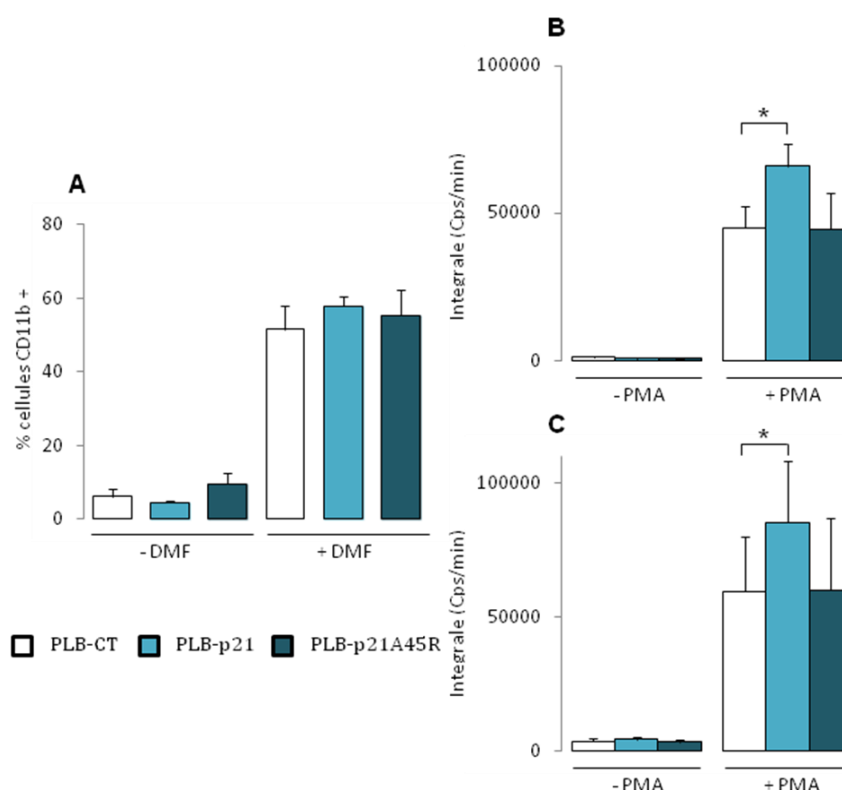


Figure 48 : Effet de la surexpression de p21 sur la différenciation des PLB-985 en polynucléaires neutrophiles

(A) Analyse par cytométrie en flux du marquage membranaire CD11b des PLB-CT, PLB-p21 et PLB-p2145R avant (-DMF) et après différenciation (+DMF). Le résultat est exprimé en % de cellules exprimant le CD11b à leur membrane. (B)(C) Mesure de l'explosion oxydative après stimulation par le PMA des PLB-CT, PLB-p21 et PLB-p2145R avant et après le traitement avec le DMF (J0 et J5). Le résultat est exprimé en coups par minute. Le résultat est identique quelque soit la sonde utilisée: le luminol (B) ou la lucigénine (C).

Résultats significatifs obtenus sur 3 expériences indépendantes (* = $p < 0.05$).

2.3. Analyse de l'apoptose des PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles surexprimant p21

Afin d'étudier l'influence de p21 sur l'apoptose des PLB-985 différenciées, l'apoptose est induite avec la gliotoxine (1 $\mu\text{g/mL}$ toute la nuit) et un marquage DIOC6 est réalisé (Figure 49).

La surexpression de p21 n'induit pas de différence du pourcentage de cellules ayant dépolarisé leur membrane mitochondriale (environ 50 % de cellules avec le DIOC6 diminué). Par contre, la protéine p21A45R, résistante au clivage par la protéinase 3, a un effet pro-apoptotique sur ces cellules différenciées (environ 70 %).

Ces résultats semblent montrer que p21 a une activité pro-apoptotique dans le polynucléaire neutrophile, ce qui confirme les résultats obtenus avec le peptide p21 dans le polynucléaire neutrophile mature.

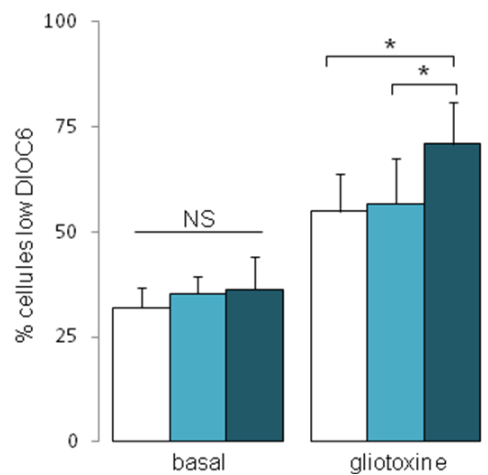


Figure 49 : Etude de l'apoptose des PLB-CT, des PLB-p21 et des PLB-p21A45R différenciées en polynucléaires neutrophiles

Les cellules sont marquées par le DIOC6 et l'apoptose est mesurée par cytométrie en flux.

Les histogrammes expriment des pourcentages de cellules apoptotiques. Les expériences ont été répétées quatre fois et sont statistiquement ($p < 0,05$, *) significatives.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Le polynucléaire neutrophile est une cellule en fin de différenciation et ne prolifère pas. La présence de PCNA dans le cytosol de polynucléaire neutrophile pourrait avoir un rôle dans la modulation de l'apoptose du polynucléaire neutrophile. En effet, nous savons que l'expression de PCNA est modulée au cours du cycle cellulaire dans des cellules qui prolifèrent.

Suite à l'observation originale de la présence de PCNA dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles, nous avons cherché à comprendre sa fonction éventuelle. Nous avons ainsi réalisé un ensemble de travaux sur des polynucléaires neutrophiles isolés à partir de sang humain et en particulier sur la fraction cytosolique de ces polynucléaires neutrophiles. Pour fractionner les polynucléaires neutrophiles, nous avons utilisé la technique particulière de cavitation à l'azote (**Figure 11**) permettant de conserver l'intégrité des granules, évitant que leur contenu riche en protéases ne soit libéré dans le cytosol et ne dégrade les protéines cytosoliques.

Nous avons ainsi montré que PCNA était abondamment présent dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles et totalement absent du compartiment nucléaire par Western Blot (**Figure 24**), en comparaison à des cellules proliférantes, les cellules HeLa, où PCNA était majoritairement présent dans le noyau (**Figure 25**). Deux anticorps, un anticorps monoclonal de souris (pc10) et un anticorps polyclonal de lapin (ab5) ont été utilisés pour valider la spécificité de reconnaissance de la protéine d'intérêt. Cette reconnaissance anticorps-antigène a été confirmée par des expériences de compétition de fixation de l'anticorps ab5 à PCNA en présence d'une protéine PCNA recombinante purifiée. Cette localisation exclusivement cytosolique dans le polynucléaire neutrophile a également été observée après marquage par immunofluorescence, technique que je n'ai pas réalisée mais dont les résultats figurent dans la publication.

Nous avons montré par Western Blot que l'expression de PCNA était diminuée au cours de l'apoptose du polynucléaire neutrophile (**Figure 27**). L'apoptose spontanée des polynucléaires neutrophiles peut être augmentée par des composés chimiques comme la gliotoxine, inhibiteur de la voie NFκB, ou des ligands de Fas, agissant par la voie des récepteurs de mort (**Figure 26**). L'évaluation de l'apoptose est mesurée par différents paramètres : l'externalisation de la phosphatidylsérine, la dépolarisation de la membrane mitochondriale et la mesure colorimétrique de l'activité des caspases -3, -8 et -9. La diminution de l'expression de PCNA semble être associée au degré d'apoptose induit.

L'inhibiteur du protéasome, ps341, stabilise PCNA et inhibe l'apoptose du polynucléaire neutrophile (**Figure 28**). Le protéasome semble également être impliqué dans la dégradation de PCNA au cours de l'apoptose induite par la gliotoxine ou Fas.

PCNA est également sensible à l'inhibiteur des caspases, le ZVAD. Ce dernier, en inhibant l'apoptose du polynucléaire neutrophile, stabilise l'expression de PCNA (**Figure 28**).

Les polynucléaires neutrophiles peuvent être maintenus *in vitro* en survie par un traitement par la cytokine G-CSF. Cette cytokine stimule la production de cellules souches myéloïdes dans la moelle et dans le sang. La diminution de l'expression de PCNA dans des polynucléaires neutrophiles apoptotiques (apoptose spontanée) est inhibée *in vitro* par un traitement des polynucléaires neutrophiles par G-CSF (**Figure 28**).

Le niveau d'expression de PCNA est donc associé à la survie : l'absence ou la diminution de son expression est associée à l'apoptose du polynucléaire neutrophile.

Ces premiers résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse que PCNA intervenait dans la balance apoptose/survie des polynucléaires neutrophiles.

Nous avons essayé de transduire la protéine PCNA dans le polynucléaire neutrophile (technologie ChariotTM). Malheureusement, malgré des résultats validant notre hypothèse à savoir que la transduction de PCNA protégeait les polynucléaires neutrophiles de l'apoptose, nous ne pouvons pas prendre en compte ces résultats car nous n'avons pas pu valider de contrôle négatif (**Figure 31**).

PCNA aurait donc une fonction anti-apoptotique dans le polynucléaire neutrophile. PCNA ne possédant pas d'activité intrinsèque, sa fonction anti-apoptotique est fort probablement régulée par des interactions protéiques. Le PCNA interagit majoritairement avec ses partenaires protéiques par une boucle hydrophobe exposée à la surface de la structure de PCNA, formée par l'*Interdomain connecting loop* (ICL). Ces interactions sont régulées au travers de motifs communs, dont le motif PIP box (*PCNA interacting protein*) identifié notamment dans la protéine p21. Des études d'interactions protéiques ont permis d'identifier un peptide p21 carboxy-terminal qui correspond au site d'interaction de p21 (de l'acide aminé 141 à l'acide aminé 160) avec le domaine d'interaction ICL de PCNA. Nous avons utilisé ce peptide dans le but de savoir si les fonctions de PCNA dans le polynucléaire neutrophile sont régulées par ce domaine ICL. Le peptide p21 induit l'apoptose dans le polynucléaire neutrophile, l'apoptose étant mesurée par l'externalisation de la phosphatidylsérine et la

dépolarisation de la membrane mitochondriale (**Figure 33**). Le peptide p21 muté (mutation des acides aminés chargés indispensables à la liaison à PCNA) n'induit aucune modulation de l'apoptose du polynucléaire neutrophile.

Le peptide p21 est donc capable d'induire l'apoptose du polynucléaire neutrophile *via* des mécanismes indépendant du cycle cellulaire probablement par compétition avec des partenaires cytoplasmiques de PCNA qui interagiraient sur le même site à savoir le domaine ICL.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux partenaires potentiels de PCNA dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles. Dans un premier temps, nous avons mis au point l'immunoprécipitation de PCNA, qui n'a pas été facile car PCNA est une protéine qui lie les billes d'agarose nécessaires pour cette technique (**Figure 34**).

Nous avons donc validé un protocole, faisant intervenir des billes magnétiques (technologie Miltényi). Il faut noter que l'immunoprécipitation est réalisée dans des conditions de lavage très stringentes afin qu'elle soit spécifique, mais certains partenaires ont certainement été perdus à cause de cela.

Notre hypothèse est que PCNA est anti-apoptotique *via* un mécanisme de séquestration de protéines pro- ou anti-apoptotique. Nous n'avons pas trouvé de partenaires appartenant à la famille BCL-2, qu'ils soient anti-apoptotiques ou pro-apoptotiques (**Figure 35**).

En revanche, nous avons identifié par co-immunoprécipitation les pro-caspases -3, -8, -9 et -10, acteurs clés du mécanisme apoptotique, comme partenaires protéiques de PCNA dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles matures (**Figure 36**). La séquestration de ces pro-caspases avant leur activation semble être un élément important associé à l'activité anti-apoptotique de PCNA.

Il est impossible de transfecter les polynucléaires neutrophiles. Nous avons donc utilisé une lignée promyélocytaire, les PLB-985, dans laquelle nous avons pu surexprimer la protéine PCNA sauvage ou la protéine PCNA mutée dans son domaine ICL. Les cellules contrôles sont transfectées avec le plasmide vide, pcDNA3.

La surexpression de PCNA dans les cellules PLB-PCNA (**Figure 39**) n'induit pas de modulation de différenciation (**Figure 40**). Ceci a été validé par analyse morphologique, avec apparition des noyaux plurilobés après coloration au *May Grünwald Giemsa*, par analyse de cytométrie en flux avec l'apparition du marqueur de membrane CD11b spécifique des

polynucléaires neutrophiles, et par analyse fonctionnelle avec la mesure de l'explosion respiratoire par chimioluminescence.

Les PLB-985 surexprimant PCNA différenciées en polynucléaires neutrophiles, PLB-PCNA, présentent une résistance à l'apoptose déclenchée par TRAIL ou la gliotoxine, par rapport aux cellules transfectées avec le plasmide pcDNA3, PLB-CT (**Figures 42 et 43**). L'apoptose a été étudiée par un marquage immunofluorescent des noyaux avec le Hoeschst et par cytométrie en flux après mesure de la fragmentation de l'ADN, mesure de la dépolarisation de la membrane mitochondriale et mesure de l'activité de la caspase-8.

L'analyse de l'apoptose du mutant de PCNA dans son domaine ICL a montré une inhibition de cette résistance à l'apoptose induite par la surexpression de PCNA dans les cellules PLB-985 différenciées (**Figure 44**). Ces résultats suggèrent donc que la fixation de partenaires protéiques sur ce domaine d'interaction ICL pourrait être responsable de l'activité anti-apoptotique de PCNA.

En parallèle, des expériences utilisant des ARNs interférents ont été effectuées sur des cellules PLB-985 non transfectées différenciées en polynucléaires neutrophiles par le DMF. L'efficacité du siRNA-PCNA dans ces cellules a été validée par Western Blot (**Figure 45**). Les cellules PLB-985 différenciées ayant intégré le siRNA-PCNA subissent une augmentation de l'apoptose par rapport aux cellules avec le siRNA contrôle (**Figure 46**). L'apoptose a été quantifiée par le marquage DIOC6, montrant les cellules ayant leur membrane mitochondriale dépolarisée. Ce résultat conforte l'activité anti-apoptotique de PCNA.

Des analyses similaires ont été réalisées sur les cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles et surexprimant la protéine p21. Le peptide p21, mimant la protéine entière, est pro-apoptotique lorsqu'il est introduit dans le polynucléaire neutrophile. Nous savons qu'il est difficile de détecter p21 dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles (**Figure 37**). Cette disparition de la protéine est certainement due en partie à son clivage par la protéinase 3, très abondante dans le polynucléaire neutrophile. Ainsi, une forme de p21 résistante au clivage par la protéinase 3, a été réalisée : p21A45R. Nous avons donc obtenu des PLB-CT, transfectées avec le plasmide vide, des PLB-p21, surexprimant la protéine p21 sauvage (**Figure 47**) et des PLB-p21A45R, surexprimant la protéine p21 résistante au clivage par la protéinase 3.

La surexpression de p21 et de p21A45R n'induit pas de modulation de l'apparition du marqueur de membrane CD11b (**Figure 48**). Par contre, la protéine p21 entière induit une légère augmentation, toutefois significative, de l'explosion respiratoire mesurée par chimioluminescence (**Figure 48**). Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour comprendre ce phénomène.

Il faut que la protéine p21 soit résistante au clivage par la protéinase 3 pour avoir une activité pro-apoptotique dans les cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles. En effet, seules les cellules PLB-p21A45R différenciées en polynucléaires neutrophiles, montrent une augmentation de cellules ayant dépolarisé leur membrane mitochondriale après traitement à la gliotoxine (**Figure 49**).

Une partie de ces résultats a été publiée dans le *Journal of Experimental Medicine* (**Cf. Annexe 1**). Les résultats concernant la transfection de la protéine p21 vont être intégrés dans un article en préparation qui a déjà été présenté sous forme de poster à l'ESCI (*European Journal of Clinical Investigation*) (**Cf. Annexe 2**):

Ces résultats ont montré une corrélation parfaite entre la survie du polynucléaire neutrophile et l'expression de PCNA. Dans le laboratoire, nous avons accès à des prélèvements sanguins précieux de patients atteints de maladies inflammatoires comme la mucoviscidose, la granulomatose de Wegener, la polyarthrite ou encore l'inflammation systémique. Les polynucléaires neutrophiles de patients atteints de ces différentes pathologies inflammatoires ont été isolés et ont montré par Western blot une surexpression de PCNA en comparaison à des polynucléaires neutrophiles de témoins sains. Cette information confirme la relation entre la survie du polynucléaire neutrophile et l'expression accrue de PCNA.

Dans la littérature, les fonctions nucléaires de PCNA impliquent deux caractéristiques :

- Sa capacité à servir de plateforme protéique à de nombreux partenaires (Warbrick 2000)
- Sa structure homotrimérique qui joue un rôle important dans de nombreux processus biologiques (réplication, réparation, apoptose...) (Naryzhny and Lee 2003)

Dans le laboratoire, il a été montré que PCNA devenait cytosolique au cours de la différenciation granulocytaire. En effet, l'exclusion nucléaire n'est observée qu'au stade de polynucléaire neutrophile mature. Un récent travail du laboratoire publié dans *Journal of Biological Chemistry* en 2012 et auquel j'ai participé a démontré que l'export nucléaire de PCNA lors de la différenciation était sous la dépendance d'une séquence de localisation nucléaire ou *Nuclear Localisation Sequence* (NLS) (**Cf. Annexe 3**).

Les perspectives de ce travail sont d'étudier :

- l'effet des modifications post-traductionnelles (phosphorylation, ubiquitination, acétylation...) sur la fonction anti-apoptotique de PCNA
- la relation entre états monomérique, dimérique, trimérique et fonction anti-apoptotique de PCNA dans le cytosol des neutrophiles

PCNA peut subir des modifications post-traductionnelles différentes: il a été décrit que PCNA nucléaire pouvait être acétylé ou phosphorylé (Ulrich and Takahashi 2013) ou encore monoubiquitiné (Stelter and Ulrich 2003). Aucune information n'est connue pour PCNA cytosolique dans le polynucléaire neutrophile et il est possible que sa fonction anti-apoptotique soit dépendante de modifications post-traductionnelles particulières.

De même, PCNA pourrait exister sous différentes formes, monomérique, dimérique ou trimérique. Dans le laboratoire, des expériences utilisant des techniques de filtration sur gel ou de cross-linking chimiques ont montré que PCNA était présent sous la forme trimérique mais également sous la forme monomérique dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles. Il serait intéressant de savoir si la protéine PCNA a besoin d'être trimérique pour avoir son activité anti-apoptotique. Pour cela, une forme monomérique de PCNA a été générée par la mutation de la tyrosine 114 (Y) en alanine (A) et j'ai participé à l'analyse de cette lignée PLB-985 surexprimant PCNA monomérique. Ce travail a montré que PCNA monomérique avait également une activité anti-apoptotique (Publication en 2013 dans le *Journal Of Leukocytes*

Biology, Characterization of cytosolic proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in neutrophils: antiapoptotic role of the monomer).

Dans la littérature, des protéines du cycle cellulaire, autre que PCNA, sont décrites pour relocaliser dans le cytosol du polynucléaire neutrophile et exercer d'autres fonctions. Par exemple, une étude montre qu'après avoir inhibé les CDK avec la roscovitine, inhibiteur synthétique, l'apoptose du neutrophile est déclenchée et la résolution de l'inflammation est favorisée *in vivo* (Rossi, Sawatzky et al. 2006). La roscovitine peut également reverser l'apoptose tardive des polynucléaires neutrophiles atteints de mucoviscidose (Moriceau, Lenoir et al. 2010). D'autres exemples comme CDK2 qui est fortement exprimée dans le polynucléaire neutrophile (Klausen, Bjerregaard et al. 2004), la survivine, membre de la famille des IAPs, dont l'expression est augmentée durant l'inflammation (Altnauer, Martinelli et al. 2004), sont démontrés. L'ensemble de ces études suggèrent une nouvelle façon de penser concernant l'implication des polynucléaires neutrophiles dans un contexte inflammatoire.

Ces résultats montrent l'implication de PCNA dans la balance survie / apoptose du polynucléaire neutrophile. Cette protéine pourrait donc être un acteur clé de la modulation de l'inflammation *via* son activité anti-apoptotique.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." *Science* 281(5381): 1322-1326.
- Altnauer, F., S. Martinelli, et al. (2004). "Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils." *J Exp Med* 199(10): 1343-1354.
- Asada, M., T. Yamada, et al. (1999). "Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation." *EMBO J* 18(5): 1223-1234.
- Bach JF, Chatenoud L., *Immunologie*, 5ed. Médecine-Sciences Flammarion, 2008, 400 p.
- Beattie, T. R. and S. D. Bell (2011). "Molecular machines in archaeal DNA replication." *Curr Opin Chem Biol* 15(5): 614-619.
- Cassatella, M. A. (2013). "L33. Neutrophil in immunity: a key modulator." *Presse Med* 42(4 Pt 2): 594-595.
- Chen, A., J. D. Licht, et al. (1994). "Retinoic acid is required for and potentiates differentiation of acute promyelocytic leukemia cells by nonretinoid agents." *Blood* 84(7): 2122-2129.
- Chipuk, J. E., T. Moldoveanu, et al. (2010). "The BCL-2 family reunion." *Mol Cell* 37(3): 299-310.
- Coldren, C. D., J. A. Nick, et al. (2006). "Functional and genomic changes induced by alveolar transmigration in human neutrophils." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291(6): L1267-1276.
- Conus, S., R. Perozzo, et al. (2008). "Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation." *J Exp Med* 205(3): 685-698.
- Coqueret, O. (2003). "New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?" *Trends Cell Biol* 13(2): 65-70.
- Crompton, M. (2000). "Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis." *Curr Opin Cell Biol* 12(4): 414-419.
- DeLeo, F. R. (2004). "Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens." *Apoptosis* 9(4): 399-413.
- Dragon, S., A. S. Saffar, et al. (2008). "IL-17 attenuates the anti-apoptotic effects of GM-CSF in human neutrophils." *Mol Immunol* 45(1): 160-168.
- Dublet, B., A. Ruello, et al. (2005). "Cleavage of p21/WAF1/CIP1 by proteinase 3 modulates differentiation of a monocytic cell line. Molecular analysis of the cleavage site." *J Biol Chem* 280(34): 30242-30253.
- Edwards, S. W., M. Derouet, et al. (2004). "Regulation of neutrophil apoptosis by Mcl-1." *Biochem Soc Trans* 32(Pt3): 489-492.

El-Benna, J., P. M. Dang, et al. (2008). "Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane." *Semin Immunopathol* 30(3): 279-289.

Eymin, B., M. Haugg, et al. (1999). "p27Kip1 induces drug resistance by preventing apoptosis upstream of cytochrome c release and procaspase-3 activation in leukemic cells." *Oncogene* 18(7): 1411-1418.

Fujihara, S., C. Ward, et al. (2002). "Inhibition of nuclear factor-kappaB activation un-masks the ability of TNF-alpha to induce human eosinophil apoptosis." *Eur J Immunol* 32(2): 457-466.

Glasser, L. and R. L. Fiederlein (1987). "Functional differentiation of normal human neutrophils." *Blood* 69(3): 937-944.

Gulbis, J. M., Z. Kelman, et al. (1996). "Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA." *Cell* 87(2): 297-306.

Hubscher, U., G. Maga, et al. (2002). "Eukaryotic DNA polymerases." *Annu Rev Biochem* 71: 133-163.

Kelman, Z. (1997). "PCNA: structure, functions and interactions." *Oncogene* 14(6): 629-640.

Klausen, P., M. D. Bjerregaard, et al. (2004). "End-stage differentiation of neutrophil granulocytes in vivo is accompanied by up-regulation of p27kip1 and down-regulation of CDK2, CDK4, and CDK6." *J Leukoc Biol* 75(3): 569-578.

Ley, K., C. Laudanna, et al. (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." *Nat Rev Immunol* 7(9): 678-689.

Los, M., S. Wesselborg, et al. (1999). "The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice." *Immunity* 10(6): 629-639.

Maga, G. and U. Hubscher (2003). "Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners." *J Cell Sci* 116(Pt 15): 3051-3060.

Maianski, N. A., J. Geissler, et al. (2004). "Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis." *Cell Death Differ* 11(2): 143-153.

Maianski, N. A., F. P. Mul, et al. (2002). "Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils." *Blood* 99(2): 672-679.

Martin, P. J., V. Lardeux, et al. (2005). "The proliferating cell nuclear antigen regulates retinoic acid receptor transcriptional activity through direct protein-protein interaction." *Nucleic Acids Res* 33(13): 4311-4321.

Merkerova, M., H. Bruchova, et al. (2007). "Expression analysis of PCNA gene in chronic myelogenous leukemia--combined application of siRNA silencing and expression arrays." *Leuk Res* 31(5): 661-672.

- Moldovan, G. L., B. Pfander, et al. (2007). "PCNA, the maestro of the replication fork." *Cell* 129(4): 665-679.
- Moriceau, S., G. Lenoir, et al. (2010). "In cystic fibrosis homozygotes and heterozygotes, neutrophil apoptosis is delayed and modulated by diamide or roscovitine: evidence for an innate neutrophil disturbance." *J Innate Immun* 2(3): 260-266.
- Morita, Y., N. Kashiwara, et al. (1997). "Inhibition of rheumatoid synovial fibroblast proliferation by antisense oligonucleotides targeting proliferating cell nuclear antigen messenger RNA." *Arthritis Rheum* 40(7): 1292-1297.
- Murphy, B. M., A. J. O'Neill, et al. (2003). "The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C." *J Exp Med* 197(5): 625-632.
- Naryzhny, S. N. and H. Lee (2003). "Observation of multiple isoforms and specific proteolysis patterns of proliferating cell nuclear antigen in the context of cell cycle compartments and sample preparations." *Proteomics* 3(6): 930-936.
- Pedruzzi, E., M. Fay, et al. (2002). "Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *Br J Haematol* 117(3): 719-726.
- Rossi, A. G., D. A. Sawatzky, et al. (2006). "Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis." *Nat Med* 12(9): 1056-1064.
- Schultz, D. R. and W. J. Harrington, Jr. (2003). "Apoptosis: programmed cell death at a molecular level." *Semin Arthritis Rheum* 32(6): 345-369.
- Stelter, P. and H. D. Ulrich (2003). "Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation." *Nature* 425(6954): 188-191.
- Tanaka, H., T. Yamashita, et al. (2002). "Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity." *J Cell Biol* 158(2): 321-329.
- Ulrich, H. D. and T. Takahashi (2013). "Readers of PCNA modifications." *Chromosoma*.
- Vairapandi, M., N. Azam, et al. (2000). "Characterization of MyD118, Gadd45, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interacting domains. PCNA impedes MyD118 AND Gadd45-mediated negative growth control." *J Biol Chem* 275(22): 16810-16819.
- Vriz, S., J. M. Lemaître, et al. (1992). "Comparative analysis of the intracellular localization of c-Myc, c-Fos, and replicative proteins during cell cycle progression." *Mol Cell Biol* 12(8): 3548-3555.
- Walker, N. I., B. V. Harmon, et al. (1988). "Patterns of cell death." *Methods Achiev Exp Pathol* 13: 18-54.
- Warbrick, E. (2000). "The puzzle of PCNA's many partners." *Bioessays* 22(11): 997-1006.

Warbrick, E., W. Heatherington, et al. (1998). "PCNA binding proteins in *Drosophila melanogaster* : the analysis of a conserved PCNA binding domain." *Nucleic Acids Res* 26(17): 3925-3932.

Ward, C., E. R. Chilvers, et al. (1999). "NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro." *J Biol Chem* 274(7): 4309-4318.

Witko-Sarsat, V., S. Canteloup, et al. (2002). "Cleavage of p21waf1 by proteinase-3, a myeloid-specific serine protease, potentiates cell proliferation." *J Biol Chem* 277(49): 47338-47347.

Witko-Sarsat, V., P. Rieu, et al. (2000). "Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects." *Lab Invest* 80(5): 617-653.

Yan, N. and Y. Shi (2005). "Mechanisms of apoptosis through structural biology." *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 35-56.

Yeretssian, G., K. Labbe, et al. (2008). "Molecular regulation of inflammation and cell death." *Cytokine* 43(3): 380-390.

Zha, H. and J. C. Reed (1997). "Heterodimerization-independent functions of cell death regulatory proteins Bax and Bcl-2 in yeast and mammalian cells." *J Biol Chem* 272(50): 31482-31488.

ANNEXES

Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival

Véronique Witko-Sarsat,^{1,2} Julie Mocek,^{1,2} Dikra Bouayad,^{1,2} Nicola Tamassia,³ Jean-Antoine Ribeil,^{4,5} Céline Candalh,^{1,2} Noélie Davezac,⁷ Nathalie Reuter,^{8,9} Luc Mouthon,^{1,2,10} Olivier Hermine,^{5,6} Magali Pederzoli-Ribeil,^{1,2} and Marco A. Cassatella³

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1016, 75014 Paris, France

²Institut Cochin, Université Paris Descartes, 75014 Paris, France

³Department of Pathology and Diagnostics, Section of General Pathology, University of Verona, 37134 Verona, Italy

⁴Service de Biothérapie, ⁵Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8147, and ⁶Service d'Hématologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université Paris Descartes, 75014 Paris, France

⁷Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5241, Université Paul Sabatier, 31000 Toulouse, France

⁸Computational Biology Unit, Bergen Center for Computational Science and ⁹Department of Molecular Biology, University of Bergen, NO-5020 Bergen, Norway

¹⁰Service de Médecine Interne, Hôpital Cochin, 75014 Paris, France

Neutrophil apoptosis is a highly regulated process essential for inflammation resolution, the molecular mechanisms of which are only partially elucidated. In this study, we describe a survival pathway controlled by proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a nuclear factor involved in DNA replication and repairing of proliferating cells. We show that mature neutrophils, despite their inability to proliferate, express high levels of PCNA exclusively in their cytosol and constitutively associated with procaspases, presumably to prevent their activation. Notably, cytosolic PCNA abundance decreased during apoptosis, and increased during in vitro and in vivo exposure to the survival factor granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). Peptides derived from the cyclin-dependent kinase inhibitor p21, which compete with procaspases to bind PCNA, triggered neutrophil apoptosis thus demonstrating that specific modification of PCNA protein interactions affects neutrophil survival. Furthermore, PCNA overexpression rendered neutrophil-differentiated PLB985 myeloid cells significantly more resistant to TNF-related apoptosis-inducing ligand- or gliotoxin-induced apoptosis. Conversely, a decrease in PCNA expression after PCNA small interfering RNA transfection sensitized these cells to apoptosis. Finally, a mutation in the PCNA interdomain-connecting loop, the binding site for many partners, significantly decreased the PCNA-mediated antiapoptotic effect. These results identify PCNA as a regulator of neutrophil lifespan, thereby highlighting a novel target to potentially modulate pathological inflammation.

CORRESPONDENCE

Véronique Witko-Sarsat:
veronique.witko@inserm.fr

Abbreviations used: 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; ATRA, all-trans retinoic acid; B2m, β_2 -microglobulin; CDK, cyclin-dependent kinase; DiOC₆, 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide; DMF, dimethylformamide; IP, immunoprecipitation; MD, molecular dynamic; MGG, May-Grünwald Giemsa; MPO, myeloperoxidase; mRNA, messenger RNA; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; siRNA, small interfering RNA; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand.

Neutrophils are terminally differentiated effector cells, whose principal function is to migrate to sites of inflammation, where they exert anti-infectious and proinflammatory effects (Witko-Sarsat et al., 2000; Henson, 2005; Theilgaard-Mönch et al., 2006). However, a growing body of evidence shows that neutrophils can modulate the inflammatory process (Nathan, 2006). Notably, they can synthesize a wide variety of cytokines involved in immunoregulation (Cassatella, 1999). However, once

their effector role is terminated, their temporally regulated apoptosis, followed by phagocytosis by tissue macrophages, is necessary for successful inflammation resolution (Serhan and Savill, 2005; Fox et al., 2010). Thus, neutrophil apoptosis is pivotal in inflammation resolution,

© 2010 Witko-Sarsat et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

although the molecular mechanisms are not completely understood (Simon, 2003). Unlike macrophages or dendritic cells, neutrophils do not proliferate and have a short lifespan. Mcl-1 has been shown to be the main Bcl-2 homologue controlling neutrophil apoptosis (Derouet et al., 2004). Yet, they express several cell cycle regulatory proteins, such as CDK2, p27 (Klausen et al., 2004), and survivin (Altnauer et al., 2004), which, in view of the close relationships between proliferation and apoptosis, neutrophils might use to regulate their own survival.

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a crucial factor in DNA synthesis and repair, initially characterized as the auxiliary protein of DNA polymerases δ and ϵ (Moldovan et al., 2007). Although all of the PCNA functions described to date exclusively reflect its nuclear localization, within the last few years, many proteins have been found to interact with PCNA, including various enzymes and regulatory proteins such as cyclin-dependent kinases (CDKs; Koundrioukoff et al., 2000) or the CDK inhibitor p21/waf1 (Waga et al., 1994). As a corollary, PCNA has been accorded roles in cellular pathways other than replication, e.g., nucleotide-excision repair, mismatch repair, the cell cycle, and apoptosis, thus acting as a cellular communicator connecting all of these important cellular processes. In the search for additional cell cycle regulatory proteins expressed in neutrophils, we have identified an unexpected antiapoptotic role for PCNA in neutrophils, which, interestingly, express PCNA exclusively in their cytosol. Based on the knowledge that PCNA functions within the nuclei of proliferating cells as a platform for protein interaction, we sought to characterize the molecular interactions between cytosolic PCNA and potential partners in neutrophils. Our findings reveal that procaspases are novel PCNA-associated proteins and, as a result, identify PCNA as a new key player that positively regulates neutrophil survival.

RESULTS

Mature human neutrophils express PCNA exclusively in their cytoplasm

Western blot analysis of neutrophil lysates readily detected PCNA in amounts comparable with those in lymphocytes but less than those in the PLB985 promyelocytic cell line (Fig. 1 A). PCNA could be detected as a single 36-kD band in neutrophils and HeLa cells, using either the anti-PCNA rabbit pAb Ab5 or the mouse mAb PC10 (Fig. S1 A). PCNA specificity was confirmed using purified recombinant PCNA as an antibody competitor (Fig. S1 A). Surprisingly, subcellular fractionation of neutrophils showed high PCNA contents only in the cytosol and not in the nucleus or granules (Fig. 1 B). The quality of our fractionation procedure was validated by the detection of specific markers: β -actin, elastase, and lamin B for cytosol, granules, and nuclei, respectively. Furthermore, the exclusive cytoplasmic localization of PCNA in neutrophils and its nuclear localization in HeLa cells were also illustrated by immunofluorescence labeling (Fig. S1 B). Finally, Western blot and confocal microscopy analysis showed that

in monocytes and lymphocytes, PCNA was located in both the nuclear and cytoplasmic compartments (Fig. S1, C and D), thus indicating that neutrophils are peculiar leukocytes in which PCNA is exclusively cytoplasmic.

Nuclear to cytoplasmic PCNA relocation occurs during granulocyte differentiation

PCNA subcellular localization was also studied by confocal microscopy after PCNA immunolabeling during the course of *in vitro* granulocyte differentiation of human CD34⁺ cells, isolated from umbilical cord blood and cultured with IL-3 and G-CSF. Complete granulocyte maturation was evaluated by morphological analysis after May-Grünwald Giemsa (MGG) staining (unpublished data). Before inducing differentiation, PCNA was detectable almost exclusively in the nucleus of CD34⁺ cells, whereas 7 d after IL-3–G-CSF treatment, the protein exhibited a mixed cytoplasmic and nuclear distribution (Fig. 1 C). On day 13, most cells had multilobular nuclei with PCNA located in the cytoplasm, similar to that observed in mature peripheral neutrophils. Quantitative analysis (Fig. 1 C, histograms), consisting of counting the cells with nuclear, cytoplasmic, or mixed nuclear–cytoplasmic localization, confirmed this redistribution of PCNA from the nucleus to the cytoplasm of differentiated neutrophils. This relocation during granulocyte differentiation was also seen in NB4 promyelocytic cells after all-trans retinoic acid (ATRA)–induced differentiation into granulocytes (Fig. S2). Finally, we examined PCNA localization in myeloid cells isolated from human BM aspirates, more specifically in both promyelocytes (identified by myeloperoxidase [MPO] immunolabeling) and mature neutrophils (identified by CD35 immunolabeling; Fig. 1 D). Similarly to that observed in granulocyte-differentiated CD34⁺ cells, PCNA was nuclear in BM granulocytic progenitors but became exclusively cytoplasmic upon differentiation to mature neutrophils (Fig. 1 D).

PCNA is targeted to proteasomal degradation during neutrophil apoptosis while it is stabilized by G-CSF

As indicated by its name, the level of PCNA is modulated during the cell cycle and is particularly high during the S phase of proliferating cells (Moldovan et al., 2007). We show in this study that PCNA expression also seems to be modulated in nonproliferating neutrophils but as a function of their survival status. Indeed, PCNA expression decreased in apoptotic neutrophils, independently of the death pathway, as it could be observed during constitutive and, more markedly, after anti-Fas- or gliotoxin-potentiated apoptosis (Fig. 2 A). The apoptotic process was evaluated by the degree of phosphatidylserine externalization (Fig. 2 B), which, as expected, confirmed a significant increase in annexin-V⁺ and 7-aminoactinomycin D (7-AAD)⁺ cells after 15-h incubation at 37°C (Fig. S3 A), the increase being further enhanced by an anti-Fas mAb or gliotoxin. Similarly, time-dependent increases in caspase-8 (Fig. 2 C) and caspase-3 (Fig. 2 D) activities were observed in neutrophils during constitutive

apoptosis, which was again further enhanced after anti-Fas or gliotoxin exposure. Finally, neutrophil apoptosis was also demonstrated by mitochondrial depolarization after 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC₆) labeling (Fig. S3 B). Thus, the decreased PCNA expression (Fig. 2 A) was related to the degree of apoptosis, regardless of the test or experimental

conditions used. Notably, the proteasome inhibitors PS-341 (Fig. 2 E) and MG132 (Fig. S4 A) reversed the apoptosis-induced PCNA degradation and, consequently, significantly inhibited neutrophil death. Interestingly, PS-341 also reversed the PCNA degradation taking place after 6-h neutrophil incubation with anti-Fas mAb or gliotoxin (Fig. 2 F), implying

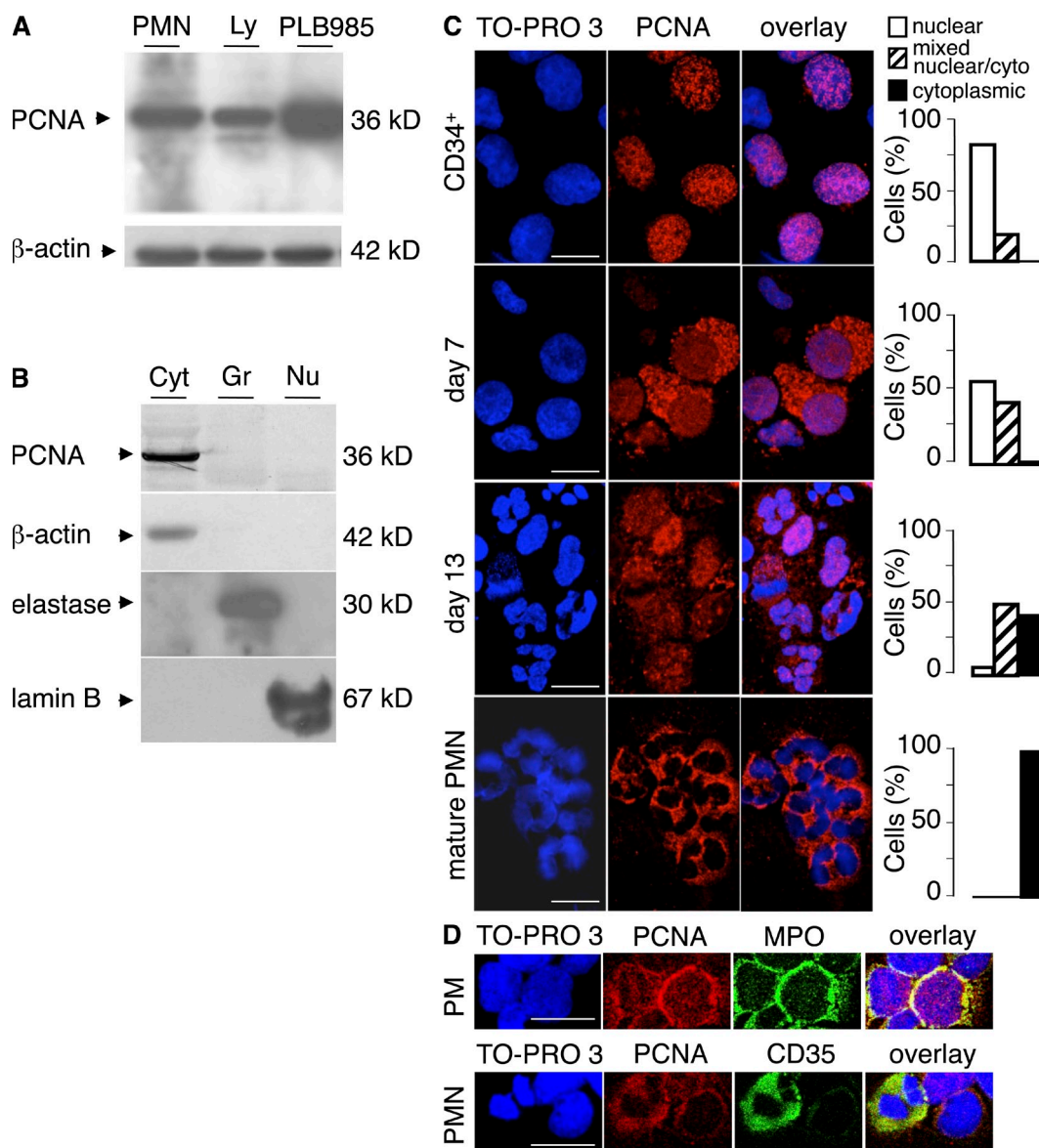


Figure 1. PCNA is expressed exclusively in the cytosol of mature neutrophils. (A) PCNA immunodetection in neutrophils (PMN), lymphocytes (Ly), or PLB985 promyelocytic cells. 50,000 cells/lane were analyzed using PC10 mAb as the primary antibody; anti- β -actin served as the loading control. (B) PCNA expression in different neutrophil subcellular compartments with β -actin, human neutrophil elastase, or lamin B serving as control markers for the cytosolic (Cyt), granular (Gr), and nuclear (Nu) fractions, respectively. The SDS-PAGE gel was run using 50 μ g protein/lane, and PCNA was detected with the PC10 mAb. (C) Immunofluorescence analysis by confocal microscopy of PCNA localization in human CD34⁺ cells before (CD34⁺) and at different times (7 or 13 d) during granulocyte differentiation and in mature neutrophils using the rabbit pAb Ab5 and TO-PRO 3 iodide for nuclear labeling. Bar graphs show percentages of cells exhibiting nuclear, mixed nuclear–cytoplasmic, or cytoplasmic PCNA localization, as determined by counting the cells under the microscope. (D) Immunofluorescence analysis by confocal microscopy of PCNA localization in human BM cells after sorting on a Percoll gradient. Cells from band 3, containing myeloblasts and promyelocytes (PM; top), were labeled with MPO. In contrast, cells from band 1, containing the mature neutrophils as shown by their typical nuclear morphology (PMN; bottom), were labeled with anti-CD35. A–D show representative experiments of three yielding the same results. Bars, 10 μ m.

that proteasome-mediated PCNA degradation occurs in both the death receptor and mitochondrial apoptotic pathways. Accordingly, PCNA is ubiquitinated in neutrophil cytosol after 1-h incubation at 37°C, as indicated by PCNA detection after immunoprecipitation (IP) using an antiubiquitin mAb (Fig. S4 B). Furthermore, chymostatin, a cathepsin inhibitor, had no effect on the decrease in PCNA occurring during constitutive neutrophil apoptosis (Fig. S4 C). The observation that PCNA levels were closely linked with neutrophil survival was corroborated by the stable PCNA levels maintained by G-CSF, which has been described as extending neutrophil longevity (Maiani et al., 2004). In fact, analysis of PCNA expression kinetics revealed that the decrease

observed after 6-h incubation at 37°C was totally prevented by G-CSF, as PCNA protein levels remained elevated until 15 h (Fig. 3 A). Such G-CSF-induced PCNA level stabilization was dose dependent and clearly associated with prolonged neutrophil survival (Fig. 3 B). Incubating neutrophils with G-CSF for up to 21 h did not modify PCNA messenger RNA (mRNA) expression or transcription, as assessed by real-time RT-PCR and primary transcript real-time RT-PCR, respectively, but up-regulated *BLyS* gene expression (Fig. 3 C; Scapini et al., 2003). These results were confirmed using different pairs of PCNA gene-specific primers, together with one of the four different housekeeping genes: *B2m* (β_2 -microglobulin), *GAPDH*, *PP1B* (peptidyl-propyl isomerase B),

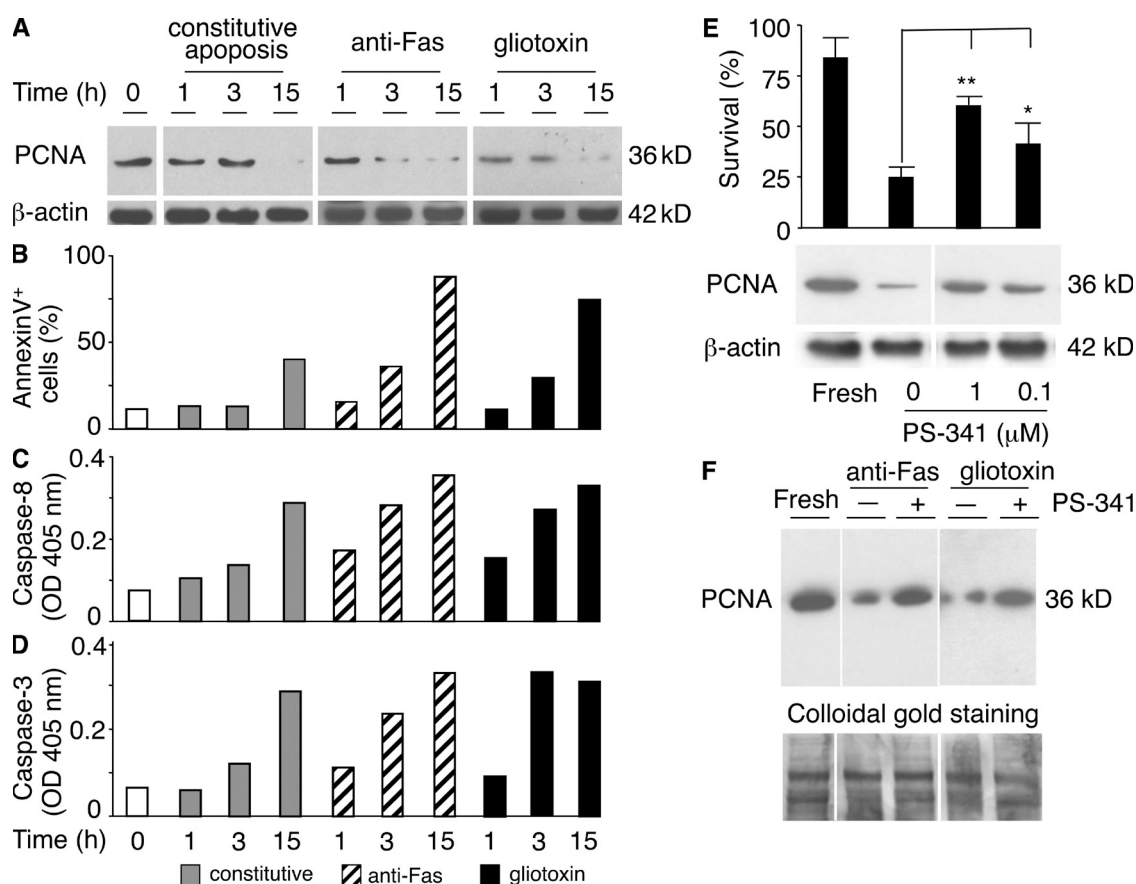


Figure 2. PCNA is degraded by the proteasome during neutrophil apoptosis. (A) PCNA expression kinetics in neutrophils incubated at 37°C for 1, 3, or 15 h alone (constitutive apoptosis), with 10 ng/ml anti-Fas mAb, or with 0.1 μg/ml gliotoxin. Western blot analysis of neutrophil cytosolic fractions (50 μg/lane) using the anti-PCNA PC10 mAb. β-Actin immunoblotting served as a loading control on the same membrane. (B) Flow cytometric measurement of phosphatidylserine externalization on neutrophils cultured as in A and labeled with annexin-V-FITC and 7-AAD to assess apoptosis and necrosis, respectively. (C and D) Spectrophotometric determination of caspase-8 (C) and caspase-3 (D) activities in neutrophil lysates using their respective specific chromogenic IETD-pNA and DEVD-pNA substrates. (E) Effect of the proteasome inhibitor PS-341 at the indicated concentrations on survival (top) and on PCNA expression in neutrophils (bottom) cultured as in A. Apoptosis was obtained by incubating neutrophils at 37°C for 15 h, and neutrophil survival was evaluated as the percentage of annexin-V⁺ 7-AAD[−] neutrophils, to exclude cell apoptosis and necrosis, and compared with freshly isolated neutrophils (fresh). Values are means ± SEM of eight independent experiments performed in duplicate (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; Student's t test). A representative PCNA immunoblot obtained under the same experimental conditions is shown on the bottom. (F) Effect of 1 μM PS-341 on PCNA expression in neutrophils incubated for 6 h at 37°C with anti-Fas or gliotoxin and compared with freshly isolated neutrophils. The percentages of annexin-V⁺ 7-AAD[−] neutrophils used to evaluate neutrophil survival were 60 and 85% in anti-Fas-treated neutrophils (without and with PS-341) and 55 and 80% in the gliotoxin-treated neutrophils (without and with PS-341), compared with 99% in untreated neutrophils. The bottom panel shows colloidal gold staining of the membrane used as a loading control. A–D and F show results from representative experiments that were performed at least four times and yielded identical results.

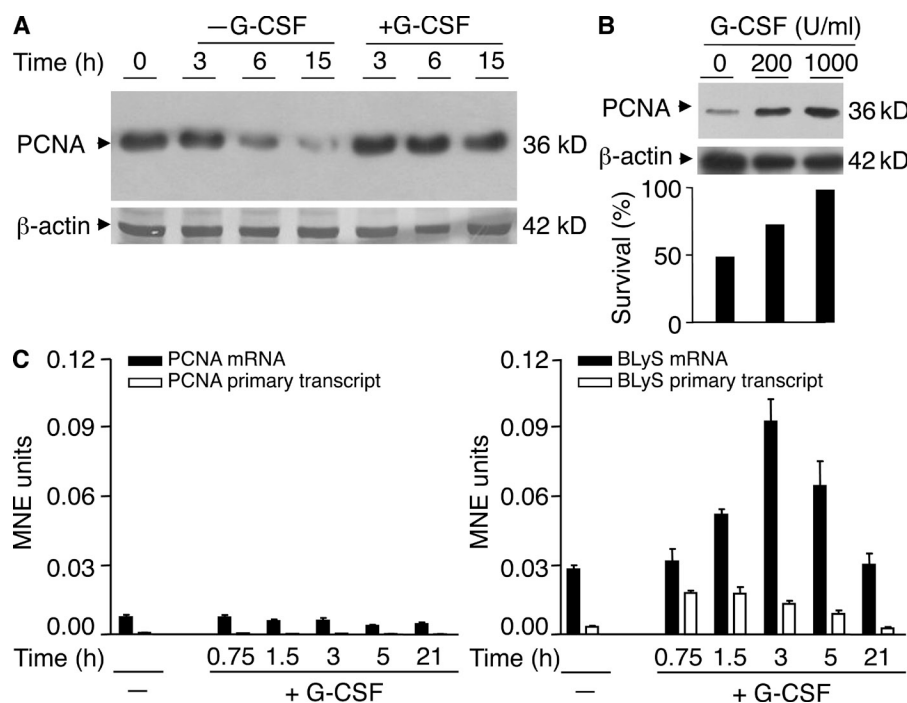


Figure 3. Stable PCNA protein levels are maintained in neutrophils exposed to G-CSF in vitro without transcriptional regulation. (A) Neutrophils were cultured with and without 1,000 U/ml G-CSF at 37°C. After 0, 3, 6, or 15 h of incubation, cells were lysed, and Western blot analysis was performed with the PC10 mAb, and anti- β -actin served as the loading control. (B) Neutrophils were incubated for 15 h at 37°C in the absence (0) or in the presence of 200 or 1,000 U/ml G-CSF and analyzed as described in A. The percentages of viable neutrophils, i.e., annexin-V⁻ 7-AAD⁻ cells under the same conditions, are shown in the histogram below the blot. (C) Total RNA was extracted from neutrophils cultured with and without 1,000 U/ml G-CSF for the times indicated, and PCNA, BlyS, and β 2m mRNA expression was measured by real-time RT-PCR and primary transcript real-time RT-PCR. Their expression is given as mean normalized expression (MNE) after normalization to β 2m in triplicate reactions for each sample. Error bars represent SEM. The data presented in A–C are from one representative experiment of three.

and *GNB2L1* (guanine nucleotide-binding protein, β polypeptide 2-like 1; unpublished data). These observations were also confirmed by Northern blotting experiments (unpublished data).

PCNA involvement in positively regulating neutrophil survival was further confirmed by examining neutrophils isolated from the blood of healthy donors treated with G-CSF for 5 d. Indeed, the PCNA content in these neutrophils, assessed by immunoblotting, was markedly higher than that before G-CSF treatment (Fig. 4 A). This higher neutrophil cytoplasmic PCNA expression in G-CSF-treated donors, also confirmed by confocal microscopy analysis (Fig. 4 B), was unequivocally associated with a decrease in the ability of these neutrophils to undergo constitutive apoptosis (Fig. 4 A). In keeping with the in vitro data, no PCNA mRNA induction was observed in neutrophils from G-CSF-treated patients, unlike what was observed for IL-1ra mRNA (Fig. 4 C).

To test whether PCNA could be also up-regulated during systemic inflammation, neutrophils were isolated from patients with either Wegener's granulomatosis, a necrotizing vasculitis associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies at the time of a disease flare, or with sepsis. Remarkably, PCNA protein levels were increased in neutrophils isolated from both types of patients compared with controls (Fig. 4, D and E) without, however, any increase in the corresponding mRNA transcripts (Fig. 4 F). Finally, we also observed that mouse neutrophils isolated from either BM or peripheral blood expressed PCNA exclusively within their cytoplasm (Fig. S5 A). In addition, BM neutrophils displayed decreased levels of both PCNA and procaspase-3 upon apoptosis triggered by gliotoxin (Fig. S5 B), indicating

that PCNA is associated with neutrophil survival not only in humans but also in mice.

A p21 peptide known to interfere with PCNA partners counteracts PCNA-mediated neutrophil antiapoptotic effects

PCNA has no intrinsic enzymatic activity as its biological role relies on its ability to mediate associations with different partners (for reviews see Warbrick, 2000; Maga and Hubscher, 2003). Most PCNA interactions occur at the interdomain-connecting loop. The protein with the highest currently known affinity for PCNA is the CDK inhibitor p21/waf1, which blocks the binding pocket, which explains its dominant role in inhibiting cell replication and other PCNA-regulated functions. Therefore, we tested the effect of an RYIRS-tagged p21 peptide corresponding to the residues 141–160 (so-called carboxyp21), which was previously demonstrated to be able to penetrate inside the cells (Dong et al., 2003) and interfere with PCNA partners in proliferating cells (Warbrick, 2006). In mature neutrophils, p21/waf1 is barely detectable under basal conditions (Klausen et al., 2004; unpublished data), thereby excluding its involvement in the regulation of cytosolic PCNA antiapoptotic activity. A modified carboxyp21 peptide that does not bind PCNA was also designed using molecular dynamic (MD) simulations (not depicted) and used as a control (Fig. 5 A). Immunofluorescence analysis of FITC-conjugated carboxyp21 peptide-treated neutrophils showed a strong cytoplasmic pattern of fluorescence (Fig. 5 B), thus confirming the efficiency of the cytoplasmic peptide delivery (Dong et al., 2003). Accordingly, carboxyp21, which is supposed to bind to PCNA and compete with PCNA partners, triggered neutrophil apoptosis, as

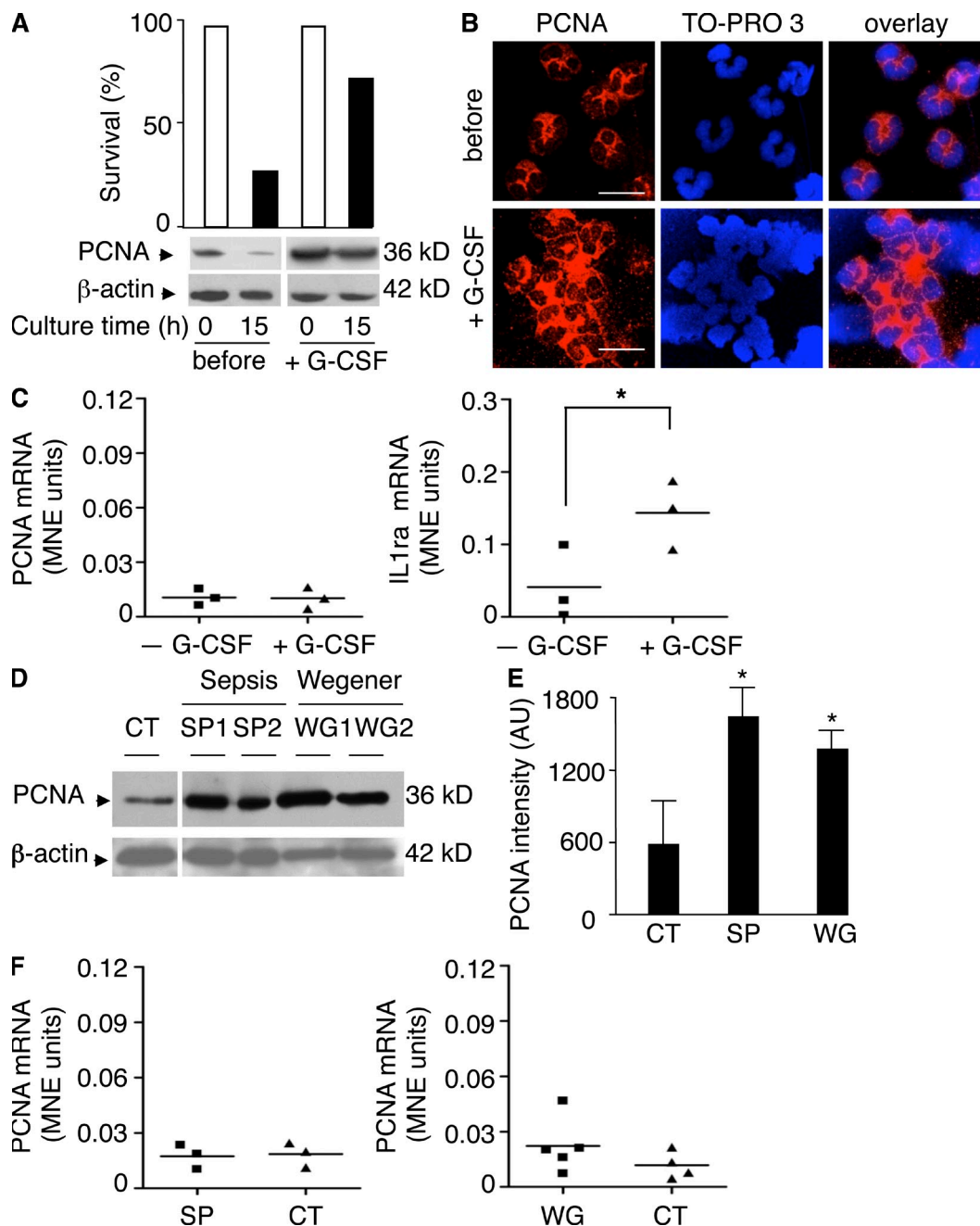
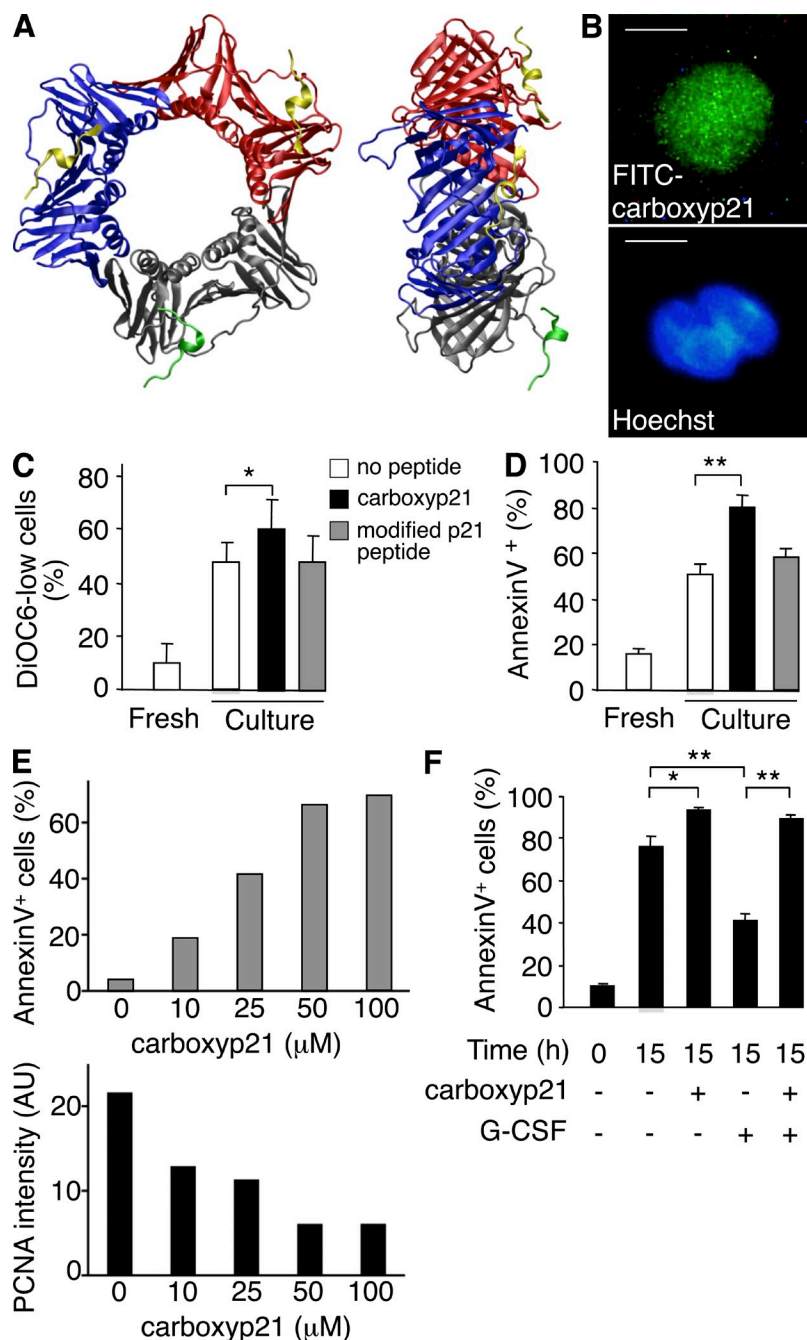


Figure 4. High PCNA protein levels in neutrophils isolated from G-CSF-treated donors and from patients with systemic inflammation.

(A) Neutrophils from a representative G-CSF-treated donor were analyzed either before or during (+G-CSF) cytokine exposure, with PCNA immunodetected in lysates from either freshly isolated (0) or 15-h cultured cells. The percentages of viable neutrophils after culture as in Fig. 3 B are shown in the histogram above the blot. (B) Immunofluorescence analysis by confocal microscopy of neutrophil PCNA detected with the Ab5 pAb. Neutrophils were isolated from a donor before or during (+G-CSF) in vivo G-CSF treatment. Data in A and B are from one G-CSF-treated donor, representative of four different donors. Bars, 10 μ m. (C) Total RNA was extracted from neutrophils isolated from healthy donors or G-CSF-treated patients and assayed in triplicates. PCNA and IL-1ra mRNA was normalized to β 2m expression and expressed as mean normalized expression (MNE) units. mRNA analysis was performed in three donors before and during G-CSF treatment (*, $P < 0.05$). (D) Representative Western blots showing neutrophil lysates prepared just after cell isolation from a control subject (CT) or from two patients with sepsis (SP1 and SP2) or Wegener's granulomatosis (WG1 and WG2). (E) Densitometric analysis of PCNA expression in healthy subjects (CT; $n = 7$), patients with sepsis (SP; $n = 5$), and patients with Wegener's granulomatosis (WG; $n = 8$). Data are expressed as arbitrary units (AU; means $\pm$ SEM; *, $P < 0.05$; Student's t test). (F) Analysis of PCNA mRNA expression in neutrophils isolated from sepsis ($n = 3$) and Wegener's granulomatosis ($n = 5$) patients or healthy donors (CT; $n = 7$). (C and F) Horizontal bars represent the mean value.



indicated by higher percentages of cells with depolarized mitochondria after DiOC₆ labeling, whereas no such activity was observed with the modified carboxyp21 peptide (Fig. 5 C). The proapoptotic effect of carboxyp21 was also demonstrated by a significantly increased percentage of cells with externalized phosphatidylserine after annexin-V labeling (Fig. 5 D). Note that carboxyp21-triggered apoptosis paralleled a dose-dependent decrease in PCNA expression (Fig. 5 E). This decreased PCNA cytoplasmic expression after treatment with the carboxyp21 was further confirmed using immunofluorescence labeling. Indeed, nuclear morphological

Figure 5. Potentiation of neutrophil apoptosis by carboxyp21, a PCNA-competing peptide. The synthetic carboxyp21 and a control modified p21 peptide (whose charged amino acids, identified as crucial for binding to PCNA, were modified to prevent its binding to PCNA) were incubated with neutrophils to evaluate their effect on apoptosis. (A) Structure of PCNA (blue, red, and gray are used to distinguish the three monomers) bound to two carboxyp21 (yellow) and one modified p21 peptide (green). The structure represented was obtained at the end of the MD simulation. The secondary structure elements are highlighted by a ribbon representation, and two different views are presented: from above the ring (left) and from the side (right). (B) Neutrophils were incubated with 50 μM FITC-conjugated carboxyp21 peptide for 1 h and then analyzed by fluorescence microscopy. The nucleus was visualized by Hoechst staining. The panels show one representative experiment of four. Bars, 5 μm. (C and D) Neutrophils were cultured for 6 h at 37°C alone or with 50 μM carboxyp21 or modified carboxyp21. The percentages of apoptotic neutrophils were assessed as depolarized mitochondria after DiOC₆ labeling (C) or phosphatidylserine externalization after annexin-V labeling (D). Basal apoptosis was assessed before incubation (fresh). Data are means ± SEM of five independent experiments (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; Student's t test). (E) Neutrophils were exposed to increasing carboxyp21 concentrations for 3 h, and apoptosis was measured by annexin-V labeling. The PCNA expression in the same samples was evaluated by Western blot analysis, and the bands were quantified by densitometric scanning. Data are from one representative experiment of four. AU, arbitrary unit. (F) Neutrophils were incubated with or without 1,000 U/ml G-CSF in the presence or absence of 50 μM carboxyp21 for 15 h before determining the percentage of apoptotic cells by annexin-V labeling. Data are means ± SEM of five independent experiments (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; Student's t test).

changes, typical of neutrophil apoptosis, were associated with a decreased cytoplasmic PCNA expression (Fig. S6). Moreover, carboxyp21 significantly inhibited G-CSF-induced neutrophil survival (Fig. 5 F), once again strongly suggesting that PCNA has a regulatory role in neutrophil survival. Based on these findings, we concluded that carboxyp21 triggers neutrophil apoptosis via a cell cycle-independent mechanism, probably by competing with cytoplasmic PCNA partners.

PCNA overexpression delays the apoptosis induction in differentiated PLB985, a cellular model of neutrophils

Neutrophils are short-lived, nonproliferating primary cells that are not suitable for transfection experiments. Therefore, promyelocytic cell lines, such as PLB985, which can differentiate into neutrophils upon dimethyl-formamide (DMF) treatment, constitute valuable cell models mimicking mature neutrophils (Pedruzzi et al., 2002). As observed in NB4 cells

(Fig. S2), PCNA displays a nuclear to cytoplasmic relocalization after granulocytic differentiation (Fig. S7 A). Accordingly, PLB985 cells were stably transfected with pcDNA3PCNA (PLB985-PCNA), as confirmed by Western blot analysis (Fig. 6, A and B). After DMF treatment, no differences were observed in the expression of CD11b (Fig. S7 B) or in nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase activity (Fig. S7 C). As expected, no superoxide was produced before differentiation, whereas significant chemiluminescence was triggered by PMA both in control and PCNA-overexpressing PLB985. Thus, PCNA overexpression did not affect granulocyte differentiation or responsiveness. As previously described, apoptosis could be triggered in PLB985 cells either via the death receptor pathway using TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) or via the mitochondrial pathway using gliotoxin (Moriceau et al., 2009). After DMF-induced differentiation, PLB985 cells overexpressing PCNA were protected against TRAIL- or gliotoxin-induced apoptosis compared with differentiated PLB985 transfected with the control plasmid, as judged by DNA fragmentation (Fig. 6 C), caspase-3 activation (Fig. 6 D), or chromatin condensation (Fig. 6 E). In Fig. 6 D, the pro-caspase-3 band at 32 kD was still present in PCNA-transfected

PBL985, whereas it was hardly detectable in control PLB985. Likewise, the cleaved caspase-3 at 17 kD was more pronounced in controls as compared with PCNA-transfected cells showing both the 23- and 17-kD fragment. In addition, either mitochondrial depolarization (Fig. 6 F) or caspase-8 activity (Fig. 6 G) was significantly lower in PLB985-PCNA after constitutive TRAIL- or gliotoxin-induced apoptosis compared with controls.

Charge mutations in the PCNA interdomain-connecting loop, which is also the p21-interacting domain corresponding to residues 120–132 in the PCNA sequence, were then used to determine whether this PCNA domain was involved in its antiapoptotic activity. PLB985 cells expressing an interdomain-connecting loop-mutated PCNA were therefore generated. PCNA antiapoptotic activity assessed by mitochondrial depolarization was significantly reduced in PLB985 expressing the interdomain-connecting loop-mutated PCNA compared with PLB985-PCNA (Fig. 6 F). Likewise, PLB985 stably transfected with this mutant PCNA also exhibited increased caspase-8 activity compared with PLB985-PCNA after TRAIL- or gliotoxin-induced apoptosis (Fig. 6 G). In the absence of apoptotic stimulus, PCNA offered protection against differentiation-induced apoptosis, which might

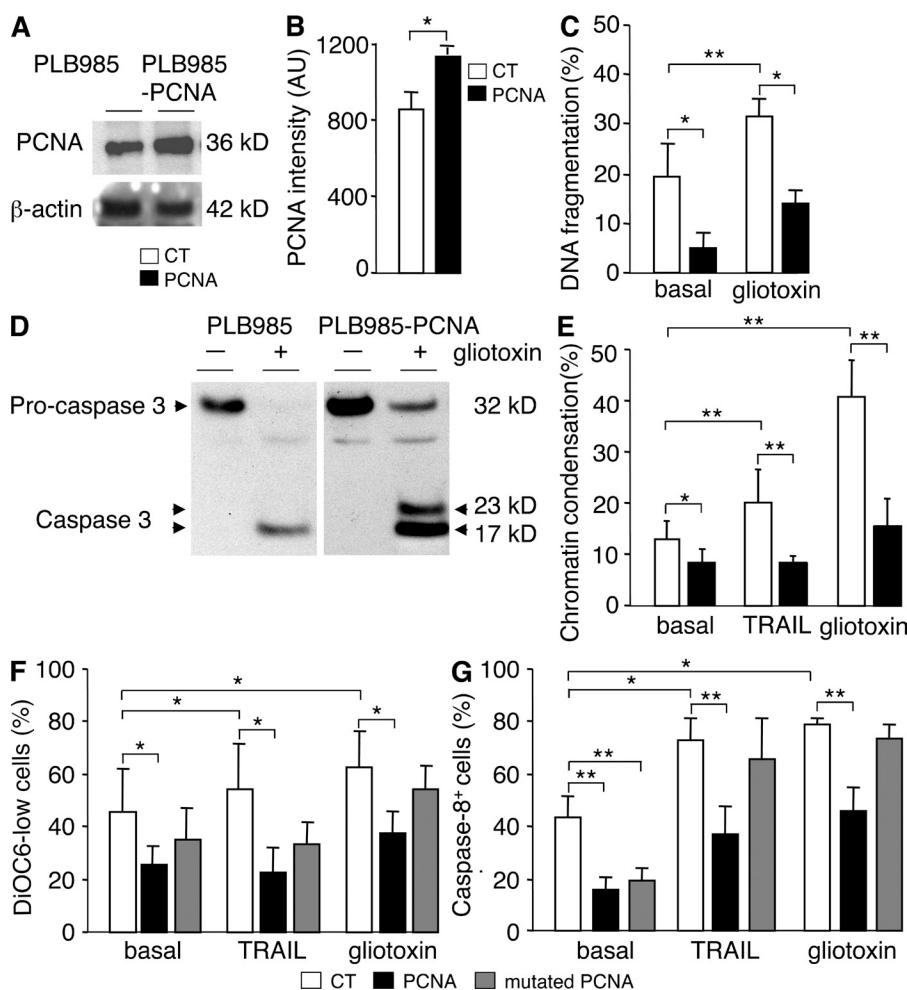


Figure 6. Stable PCNA transfection protects neutrophil-differentiated PLB985 myeloid cells from apoptosis. (A) Cytosolic PCNA expression in control (CT; pcDNA3-transfected cells) and pcDNA3PCNA-transfected PLB985 cells, as detected by Western blot analysis using the Ab5 pAbs and β -actin as loading control. (B) Quantification of PCNA expression after densitometry scanning and analysis by ImageJ software. Data are means $\pm$ SEM of six independent experiments (*, $P < 0.05$; Student's t test). AU, arbitrary unit. (C–G) DMF-differentiated control or PCNA- or mutated PCNA-transfected PLB985 cells were incubated with or without 2 μ g/ml gliotoxin or 10 ng/ml TRAIL for 15 h to induce apoptosis. (C) Percentage of cells in the sub-G1 phase showing DNA fragmentation after propidium iodide labeling. (D) Caspase-3 expression by Western blot analysis in DMF-differentiated PLB985 cells after gliotoxin-induced apoptosis. Data are from one representative experiment that was performed four times, yielding identical results. (E) Percentage of cells showing chromatin condensation after Hoechst labeling. (F) Percentage of cells with mitochondrial depolarization after DiOC₆ labeling. (G) Percentage of cells with caspase-8 activation using a fluorescent IETD-based substrate. Data from C and E–G are means $\pm$ SEM of at least four independent experiments (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; Student's t test).

reflect physiological neutrophil apoptosis. However, the mutated PCNA had roughly the same antiapoptotic effect, thus suggesting that in this case, PCNA domains other than that of the interdomain-connecting loop might also be important in the PCNA antiapoptotic effect. Collectively, these findings strongly suggest that some PCNA protein partners could bind to the PCNA interdomain-connecting loop to mediate the observed antiapoptotic effect. These observations also corroborate the results showing that carboxyp21 triggered neutrophil apoptosis by binding specifically to this PCNA site.

PCNA small interfering RNA (siRNA) sensitized DMF-differentiated PLB985 to apoptosis

In a final series of experiments, PLB985 cells were stably transfected with PCNA siRNA to knock down PCNA gene expression, as confirmed by Western blot analysis (Fig. 7, A and B). Notably, the siRNA procedure was performed on days 3 and 4 after DMF treatment, before analysis of the apoptosis rate on day 5. At this time point, all PCNA was cytoplasmic in DMF-differentiated PLB985 cells (Fig. S7 A). No effect of PCNA siRNA was observed on CD11b expression ($66.5 \pm 7.7\%$ vs. $60.9 \pm 6.3\%$ CD11b-expressing PLB985 cells for scrambled and PCNA siRNA, respectively), thus suggesting that it did not affect the differentiation process. PCNA siRNA but not scrambled siRNA slightly but significantly enhanced the constitutive apoptosis that PLB985 cells undergo after differentiation, as assessed by mitochondria depolarization (Fig. 7 C). Moreover, PCNA siRNA also dramatically potentiated the gliotoxin- or TRAIL-induced apoptosis of PLB985 cells (Fig. 7 C), further supporting the antiapoptotic activity of PCNA.

PCNA associates with procaspase-3, procaspase-8, procaspase-10, and procaspase-9 and interferes with activation of the latter

Finally, we performed co-IP experiments using neutrophil cytosols to identify potential cytosolic PCNA partners, which could contribute to its antiapoptotic activity. Mcl-1 is one of the most important Bcl-2 homologues expressed in neutrophils

(Derouet et al., 2004), the expression of which decreases during apoptosis. Because it was previously described as a PCNA partner in proliferating cells (Fujise et al., 2000), we investigated whether PCNA could bind Mcl-1. Although Mcl-1 could be successfully immunoprecipitated, no physical association was detected between PCNA and Mcl-1 or other Bcl-2 homologues, e.g., the proapoptotic proteins Bax or Bid (unpublished data). In contrast, using the same PCNA co-IP protocol, procaspase-3 (Fig. 8 A), procaspase-8 (Fig. 8 B), procaspase-9 (Fig. 8 C), and procaspase-10 (Fig. 8 D) could be detected using specific mAbs. In addition, the interaction was confirmed in the reciprocal IP experiments using anti-procaspase IP and anti-PCNA for the Western blot analysis (Fig. S8, A–D). Moreover, results from double immunolabeling with anti-PCNA and anti-procaspase performed on neutrophils strongly suggest that PCNA colocalizes with procaspase-3, procaspase-8, procaspase-9, and procaspase-10 (Fig. S8, A–D, right). Notably, the amount of procaspase-9 coimmunoprecipitated by an anti-PCNA mAb decreased when neutrophil cytosolic fractions were preincubated with the p21 peptide compared with the mutated p21 peptide (Fig. 8 E). The latter finding indicates that the p21 peptide displaces the procaspase-9–PCNA interaction, which in turn suggests that the interconnecting loop domain is involved in the interaction between PCNA and procaspase-9. To further validate such a hypothesis, caspase-9 activation was investigated in PLB985 cells overexpressing PCNA or the interdomain-connecting loop-deficient PCNA mutant. After 5 d of DMF exposure, the caspase-9 activity was elevated in contrast to undifferentiated cells. This caspase-9 activity corresponds to physiological apoptosis of aged neutrophils. Notably, this differentiation-induced caspase-9 activation was significantly lower in PLB985-PCNA than in control PLB985 cells, thus confirming the antiapoptotic effect of PCNA. In contrast, no protective effect against differentiation-induced apoptosis was observed in PLB985 cells expressing the mutant PCNA (Fig. 8 F). Collectively, our findings strongly suggest that the interdomain-connecting loop is involved in the PCNA–procaspase-9 interaction. Therefore, we hypothesized that the cytosolic PCNA–procaspase

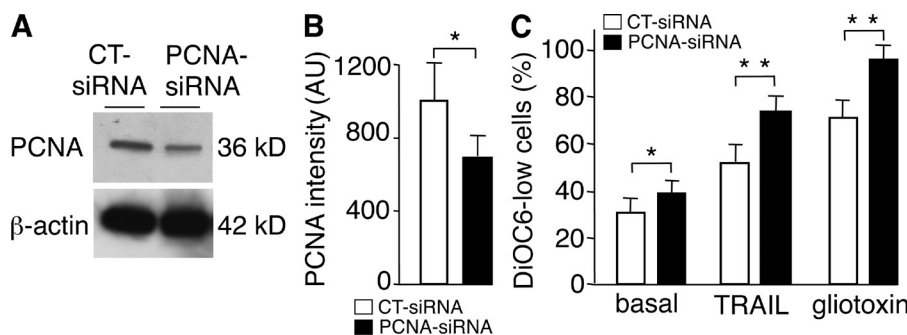


Figure 7. Knocking down PCNA expression by siRNA sensitizes DMF-differentiated PLB985 cells to apoptosis. DMF-differentiated PLB985 cells were transfected twice with control (CT) siRNA or with PCNA siRNA on days 3 and 4 after DMF. (A) Cytosolic PCNA expression was evaluated by Western blot analysis using the Ab5 pAb (β -actin expression was used as loading control). (B) Quantification of PCNA expression by densitometric scanning using ImageJ software. Data are means $\pm$ SEM of six independent experiments (*, $P < 0.05$; Student's t test). (C) Effect of

PCNA siRNA on the percentage of apoptotic PLB985 cells as measured by mitochondrial depolarization after DiOC₆ labeling. PLB985 cells were incubated with 2 μ g/ml gliotoxin ($n = 6$), 10 ng/ml TRAIL ($n = 5$), or in basal conditions ($n = 10$) for 15 h. Data are means $\pm$ SEM of n independent experiments (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; Student's t test).

interaction might prevent their activation. This was tested by evaluating procaspase-9 cleavage in an *in vitro* assay, using neutrophil cytosol containing the apoptosome components, i.e., procaspase-9 and Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor 1), as previously described (McStay et al., 2008). The addition of exogenous purified cytochrome *c* and dATP triggered procaspase-9 cleavage (37 kD) in a time-dependent manner, as indicated by Western blot analysis of caspase-9 (Fig. 9 A). However, when purified recombinant PCNA was added to the mixture, procaspase-9 cleavage was delayed, with maintained levels of the 46-kD fragment of procaspase-9 but reduced 37-kD fragment detection, thus demonstrating that purified PCNA impairs procaspase-9 activation. Ovalbumin tested at the same concentration did not affect procaspase-9 activation and thus served as a control (unpublished data). Notably, PCNA was also cleaved in parallel with the activation of caspase-9 (Fig. 9 B), thus explaining why the inhibitory effect on procaspase-9 activation by PCNA decreases with the time. Finally, cytosols from neutrophils isolated from G-CSF-treated donors that contained high PCNA

levels (Fig. 9 C, right) showed an impaired capacity to activate procaspase-9 *in vitro* as compared with cytosols from control neutrophils (Fig. 9 C, left).

DISCUSSION

Regulation of the neutrophil lifespan provides a fine balance between their function as host defense effector cells and a safe turnover of these potentially harmful cells. Neutrophil apoptosis is essential for the resolution of inflammation, and delayed apoptosis and compromised neutrophil clearance are, in fact, hallmarks of chronic inflammation (Simon, 2003; Fox et al., 2010). Therefore, the neutrophil has a carefully orchestrated lifespan, which requires the intervention of a pre-established intracellular clock with successive steps and key control points, which are still undefined.

In this study, we have discovered that PCNA, a well-known nuclear protein involved in DNA replication and repair and considered one of the central molecules responsible for the life or death decision in proliferating cells only (Moldovan et al., 2007), displays all of the features of a master

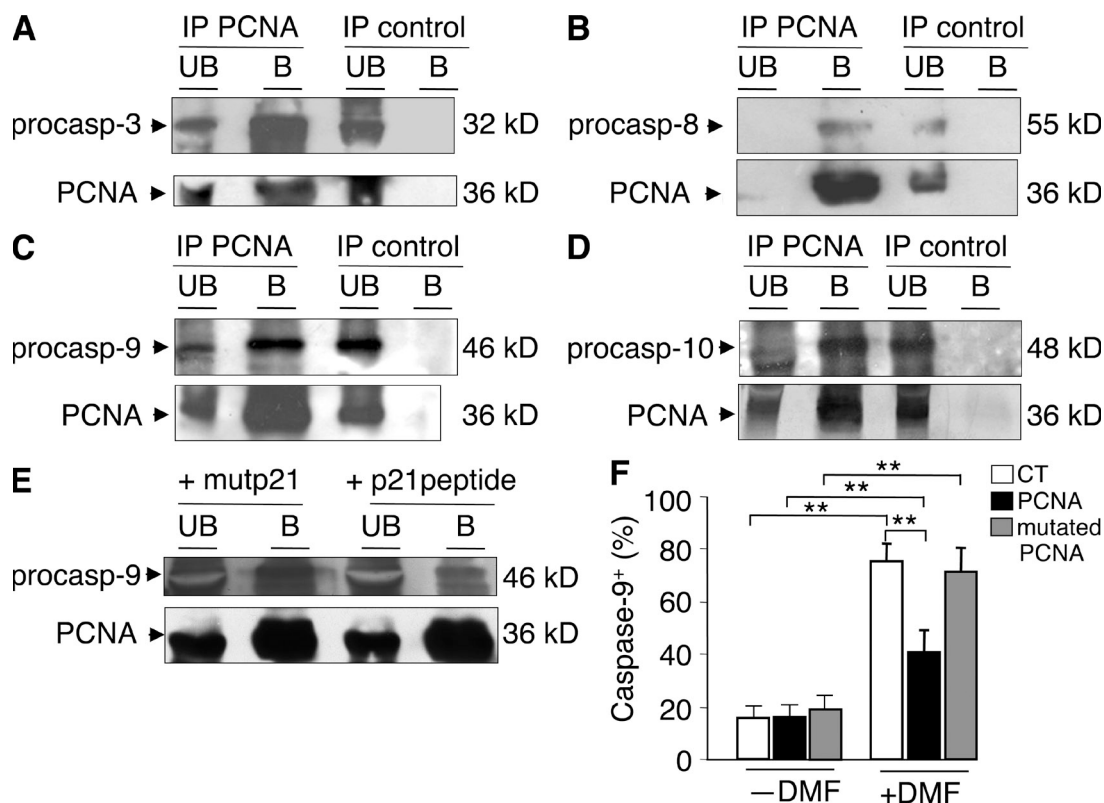


Figure 8. Co-IP experiments identify procaspase-3, procaspase-8, procaspase-9, and procaspase-10 as PCNA partners. Co-IP experiments were performed using neutrophil cytosol. Unbound material (UB) and bound (B) immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blot analysis. (A–D) In IP, PCNA pAb (IP PCNA) or empty beads (IP control) were used, whereas in Western blot analysis, PC10 anti-PCNA was used (to ascertain the presence of PCNA) together with one of the following: anti-procaspase-3 mAb (A), anti-procaspase-8 mAb (B), anti-procaspase-9 mAb (C), or anti-procaspase-10 mAb (D). (E) Co-IP experiments performed as in C using PCNA containing neutrophil cytosol incubated with 100 μ M carboxyp21 or the mutated p21 peptide (used as a control). Both unbound material and bound immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blot analysis using anti-procaspase-9 and anti-PCNA (PC10). A–E show data from representative experiments that were performed at least four times, yielding identical results. (F) Caspase-9 activity in PLB985 cells overexpressing wild-type or mutated PCNA compared with controls (CT). CD11b⁺-caspase-9⁺ cells were measured by flow cytometry before and after DMF-induced differentiation. Data are means $\pm$ SEM of four independent experiments (**, $P < 0.01$; Student's *t* test).

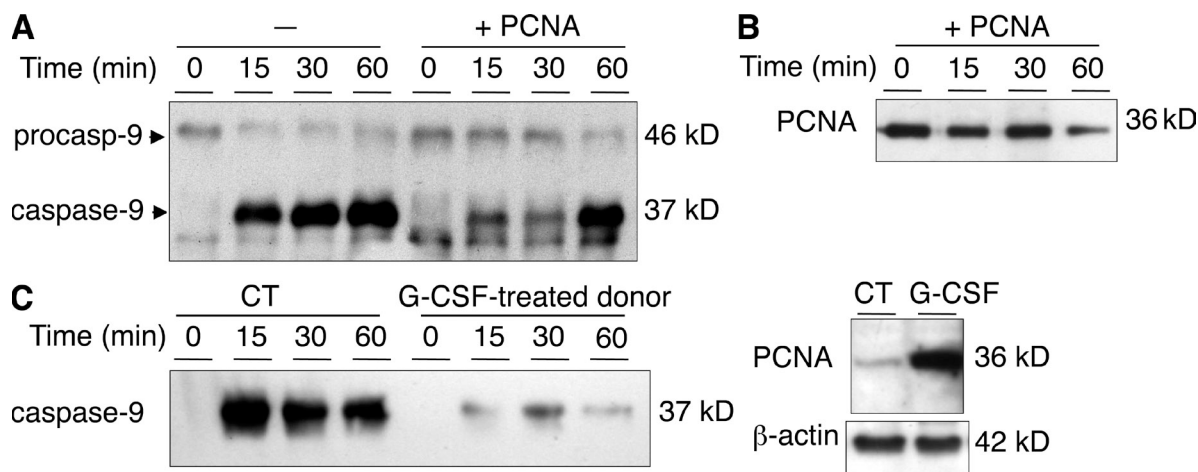


Figure 9. PCNA impaired pro-caspase-9 activation in vitro. (A) Kinetics of immunodetection of cleaved caspase-9 after an in vitro procaspase-9 activation assay performed using neutrophil cytosol, 50 μ M cytochrome c, and 1 mM ATP, without and with 50 μ M recombinant PCNA. (B) Kinetics of PCNA immunodetection using PCNA pAb performed in the same in vitro assay as in A in the absence of exogenous recombinant PCNA to detect only endogenous PCNA. (C) Kinetics of cleaved caspase-9 immunodetection as in A in cytosol of neutrophils isolated from G-CSF-treated donors or controls (CT). PCNA Western blot analysis confirmed higher PCNA levels in the G-CSF-treated donors (right). A–C show data from representative experiments that were performed at least four times, yielding identical results.

regulator of neutrophil survival. Indeed, we observed that although circulating mature neutrophils contain elevated amounts of PCNA, their PCNA contents change as a function of their viability status. In neutrophils undergoing apoptosis, PCNA was subjected to proteasome-mediated degradation, regardless of whether the trigger signaling cascade passed through the extrinsic (death receptors) or the intrinsic pathway (mitochondria). Although the proteasome seems to play a pivotal role in PCNA degradation, other proteolytic pathways might be involved to modulate PCNA levels during apoptosis.

In contrast, PCNA levels are stably maintained by factors that prolong neutrophil survival, e.g., G-CSF. Notably, modulation of PCNA contents, at least in human neutrophils, appears to involve only posttranscriptional events because variations in PCNA mRNA expression were not detected during in vitro or in vivo G-CSF treatment. In addition, neutrophils isolated from G-CSF-treated donors exhibited both prolonged survival, as previously described (Basu et al., 2002), and also high PCNA contents, in keeping with the major role of PCNA in neutrophil survival. PCNA gene induction has not been reported to occur in neutrophils isolated from donors treated with G-CSF in vivo (Drewniak et al., 2009), which is consistent with our findings. Furthermore, PCNA levels in neutrophils isolated from patients with sepsis or necrotizing vasculitis were much higher than those isolated from healthy individuals, and no PCNA mRNA up-regulation was observed. These findings support the notion that neutrophil PCNA levels vary during systemic inflammation related (sepsis) or not (Wegener's granulomatosis) to an infection. Whether or not cytoplasmic PCNA is absolutely required for neutrophil survival cannot, at present, be explored because of the lack of viable PCNA knockout animals

(Roa et al., 2008). Similarly, it is currently unknown whether or not cytoplasmic PCNA is associated with the survival of differentiated cells from nonmyeloid origin.

According to numerous studies, PCNA functions in the nucleus as a remarkable adaptor molecule that binds to numerous proteins (for review see Warbrick, 2000). Indeed, several authors have established that trimeric PCNA plays a central role as a moving platform along the DNA molecule (for review see Maga and Hubscher, 2003), which acts as a communication center for a variety of cell nuclear processes, such as DNA replication, nucleotide excision repair, postreplication mismatch repair and apoptosis. Therefore, it is clear that one key to understanding the molecular mechanisms whereby PCNA exerts its antiapoptotic activity in neutrophils is to identify its partners. However, in noncycling cells such as neutrophils, PCNA antiapoptotic activity should theoretically proceed via mechanisms not involving any nuclear function. Indeed, one salient feature revealed in our study was the exclusive localization of PCNA in the neutrophil cytosol, and we documented its nucleus to cytosol relocalization in the later stages of neutrophil maturation. The underlying mechanisms, either in terms of nucleocytoplasmic transport or sequestration mechanisms to retain PCNA within the cytoplasm compartment, remain to be deciphered. Notably, we have clearly demonstrated that in primary neutrophils, PCNA is constitutively associated with procaspase-3, procaspase-8, procaspase-9, and procaspase-10, presumably sequestering them within the cytosol to prevent their activation. How such interactions occur at the molecular level remains to be elucidated, but it can be foreseen that posttranslational modifications of PCNA, e.g., acetylation, phosphorylation (Naryzhny and Lee, 2004), or sumoylation (Moldovan et al., 2007), already described in other cell types could regulate PCNA association with its neutrophil

partners. Notably, neutrophils contain extremely low amounts of cytochrome *c* but exhibit high Apaf-1 levels and very high caspase-9 activity during physiological apoptosis (Murphy et al., 2003). Thus, procaspase-9 sequestration by PCNA seems to be a very efficient way to inhibit apoptosis. Accordingly, *in vitro* procaspase-9 activation was delayed either by adding exogenous recombinant PCNA or in neutrophil cytosol from G-CSF-treated donors containing high PCNA levels. However, we cannot exclude that association with other cytoplasmic proteins might mediate the antiapoptotic effect of PCNA in neutrophils.

In proliferating cells, PCNA is strongly controlled by the tumor suppressor protein p21/waf1, which was initially identified as a potent CDK inhibitor (Waga et al., 1994). Structural experiments indicated that p21/waf1 directly blocks the surface region required for polymerase binding (Waga et al., 1994). Biochemical experiments broadened that concept by showing that p21/waf1 is an effective competitor for other PCNA partners (Warbrick, 2006). Indeed, synthetic peptides carrying the consensus sequence for binding to the PCNA interdomain-connecting loop, such as the carboxyp21 peptide (residues 120–132 on the PCNA sequence) used in our study, stop progression through the cell cycle and induce apoptosis when transfected into proliferating cells (Dong et al., 2003). We have shown that carboxyp21 (a) directly triggers neutrophil apoptosis and concomitant PCNA degradation and (b) impairs the capacity of G-CSF to prolong neutrophil survival, thus clearly proving that PCNA is absolutely essential for the G-CSF antiapoptotic effect in neutrophils. Previous *in vitro* studies have shown that the C-terminal region of p21, which contains the PCNA-interacting domain, can competitively block the reassociation of the polymerase complex with PCNA in proliferating cells (Mattock et al., 2001b; Warbrick, 2006). However, the carboxyp21 peptide also contains 4 aa at the C terminus that function as a site for CDK association, thus suggesting that its effect might be caused by CDK inhibition (Mattock et al., 2001a). However, in this study, we show that a p21 peptide mutated at the PCNA-interacting domain, with an intact CDK-interacting domain at the C terminus, does not display the same degree of apoptosis potentiation observed with the wild-type p21 peptide. Therefore, even if the p21 peptide might theoretically promote apoptosis via CDK inhibition at higher concentrations, we concluded that in neutrophils, the effect of the p21 peptide, at least at the concentrations that we have tested, is mainly caused by its binding to PCNA.

Interestingly, inhibition of CDK by the synthetic inhibitor roscovitine triggers neutrophil apoptosis and, consequentially, promotes inflammation resolution *in vivo* (Rossi et al., 2006). Thus, these authors have provided evidence that CDK activities, so far restricted to cell cycle regulation, can control apoptosis in nonproliferating cells like neutrophils. Roscovitine has also been shown to improve the resolution of the inflammation after pneumococcal infection and accelerated recovery (Koedel et al., 2009) and to reverse the late apoptosis observed in neutrophils from cystic fibrosis patients (Moriceau et al., 2010). Furthermore, although several cell cycle proteins are down-regulated during neutrophil differentiation, mature neutrophils expressed

high levels of CDK2 and the CDK inhibitor p27 (Klausen et al., 2004). Indeed, during inflammation, neutrophils are able to up-regulate survivin, a member of the IAP (inhibitor of apoptosis protein) family, which acts as a link between apoptosis and control of mitogenic progression in proliferating cells (Altzner et al., 2004). Thus, it becomes increasingly apparent that cell cycle regulatory proteins other than PCNA might be implicated in controlling neutrophil lifespan.

Most studies on neutrophils, viewed as potential cellular targets in inflammation, attempted to block their migration and influx. However, another aspect of neutrophil biology that could be targeted, albeit often underestimated, is the modulation of neutrophil survival (Hallett et al., 2008). In this regard, an in-depth understanding of the specific and highly regulated molecular mechanisms controlling neutrophil survival/death is required to intervene efficiently and effectively. The results reported in this paper are notable, not only because they demonstrate that PCNA acts as a cytoplasmic platform pulling the strings of neutrophil survival, but also because they reveal new ways of thinking about neutrophils and their intracellular pathways in the context of inflammation or neutropenia.

MATERIALS AND METHODS

Blood and BM cell isolation, differentiation of CD34⁺ precursors, and cell culture.

Blood or BM donors gave their written informed consent to participate in this study, which was approved by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Institutional Review Board and the Ethics Committee of Hôpital Necker-Enfants Malades and Hôpital Cochin (Paris, France). Human neutrophils from healthy (Etablissement Français du Sang, Paris, France) or G-CSF-treated healthy donors (10 µg/kg for 5 d to induce hematopoietic stem cell mobilization; Service de Biothérapie, Hôpital Necker-Enfants Malades) were isolated from EDTA-anticoagulated blood, using density-gradient centrifugation through Polymorphprep (Nycomed). Neutrophils were isolated from the blood of vasculitis and septic patients hospitalized in the Service de Médecine Interne, Hôpital Cochin. Patients with sepsis (*n* = 5) had documented gram-positive or -negative infection, body temperature >38.5°C, and C-reactive protein >100 mg/ml. Patients with antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis (*n* = 8) fulfilled the criteria for Wegener's granulomatosis (Leavitt et al., 1990). They had anti-proteinase 3 antibodies and active disease, as assessed by a Birmingham vasculitis activity score of ≥3 (Luqmani et al., 1994). Neutrophil subcellular fractionation was performed to obtain separate cytosolic, granular, and nuclear fractions, as previously described (Borregaard et al., 1983). BM cell separation was performed by Percoll gradient centrifugation as previously described (Cowland and Borregaard, 1999). Monocytes and lymphocytes were isolated on Ficoll gradient as previously described (Kantari et al., 2007). Differentiation of CD34⁺ cells into granulocytes was induced as previously described (Hino et al., 2000), with some minor modifications. In brief, CD34⁺ cells were isolated from cord blood and then cultured with 10 ng/ml stem cell factor, 10 ng/ml IL-3, and 100 ng/ml IL-6 for 7 d. CD36⁺ cells were isolated and then incubated with 10 ng/ml G-CSF, 100 ng/ml stem cell factor, and 10 ng/ml IL-3 for 13 d to promote granulocyte differentiation. MGG staining was used at different times to monitor differentiation. Peripheral blood neutrophils and mature neutrophils from femur BM were isolated using a Percoll density gradient as previously described (Mócsai et al., 2002).

HeLa, PLB985, and NB4 promyelocytic cell lines were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum. NB4 cells were induced to differentiate with 1 µM ATRA (Sigma-Aldrich) for 5 d, and granulocyte differentiation was validated by CD11b expression and by morphological

analysis after MGG staining. PLB985 cell granulocyte differentiation was induced by exposure to 0.5% DMF for 5 d and validated as for NB4. Functional analysis of NADPH-oxidase activity was performed with lucigenin-amplified chemiluminescence in a single-photon luminometer (AutoLumat LB953; Berthold Technologies). The chemiluminogenic substrate, lucigenin (10,10-dimethyl-9,9-biacridium dinitrate), was used to selectively measure NADPH-oxidase-dependent extracellular superoxide anion formation. In brief, 100 μ l containing 5×10^5 cells, neutrophils, or PLB985 cells was placed in polystyrene tubes containing 100 μ l of 0.2 mM lucigenin and 50 μ l of stimulus, either HBSS or PMA (16 μ M final concentration). The luminescence was measured in duplicate and expressed as integrated total counts in 40 min.

Immunofluorescence labeling and confocal microscopy analysis. Immunolabeling of neutrophils, HeLa, CD34⁺, PLB985, or NB4 cells to study PCNA subcellular localization was performed as previously described (Kantari et al., 2007). Cells were fixed in PBS containing 3.7% formaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min on ice and permeabilized with 0.25% Triton X-100 for 5 min at room temperature, followed by ice-cold methanol for 10 min, incubated with rabbit pAb diluted 1:25 (Ab5; EMD) for 45 min, followed by biotinylated rabbit IgG diluted 1:100 (Dako) for 30 min, and then by streptavidin-coupled Alexa Fluor 555 diluted 1:200 (Invitrogen) for 30 min. The nuclei were stained with TO-PRO 3 iodide (10 μ M solution; Invitrogen) or with 5 μ g/ml Hoechst (Sigma-Aldrich) for 30 min. For colocalization with PCNA, anti-CD35 (mouse IgG1; clone J3D3; diluted 1:50; Beckman Coulter) or anti-MPO (mouse IgG2a; clone MPO-7.17; dilution 1:200; PeliCluster; Red Cross; diluted 1:100) or anti-procaspase-8 (EMD), anti-procaspase-3, or anti-procaspase-9 or anti-procaspase-10 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) mAbs were used as primary antibodies, followed by an Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse mAb (diluted 1:100; Invitrogen). Slides were analyzed by confocal microscopy with a confocal scanning laser microscope (LSM-5 version 3.2 SP2; Carl Zeiss, Inc.) equipped with an argon laser and helium-neon lasers using a Plan-Apochromat 63 $\times$ NA 1.40 oil immersion objective lens at room temperature. Green fluorescence was observed with a 505–530-nm band-pass emission filter under 488-nm laser illumination, and red fluorescence was observed with a 488–560-nm-long-pass emission filter under 543-nm laser illumination. Pinhole diameters were set to get 0.8- μ m-thick optical slices, and images were collected every 0.4 μ m along the z axis. Imaging of Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 555, Hoechst, and TO-PRO 3 iodide fluorescence was obtained using the multitrack mode. The fluorescence was analyzed using ImageJ software version 1.42d (National Institutes of Health).

Analysis of apoptosis. Neutrophil apoptosis was triggered by incubating neutrophils at 37°C alone (constitutive apoptosis) or with 10 ng/ml anti-Fas mAbs (Beckman Coulter) or 0.1 μ g/ml gliotoxin (Sigma-Aldrich; Ward et al., 1999) for the indicated times. Neutrophil apoptosis was evaluated using phosphatidylserine externalization after annexin-V and 7-AAD labeling (Kantari et al., 2007), mitochondrial depolarization after DiOC₆ labeling (Moriceau et al., 2009), and by caspase-3 and caspase-8 activities measured by spectrophotometry (BioVision) in neutrophil lysates. In DMF-differentiated PLB985 cells, apoptosis was triggered by 2 μ g/ml gliotoxin or by 10 ng/ml recombinant TRAIL (R&D Systems; Yin et al., 2005), and caspase-8 and caspase-9 activities were determined after gating on CD11b⁺ cells using the Caspase-Glow assay (Promega). Apoptosis-induced chromatin condensation and DNA fragmentation were assessed after DNA staining with 5 μ g/ml of the blue fluorescent dye Hoechst and propidium-iodide staining, respectively (Goepel et al., 2004). Carboxyp21 (KRRQTSMTDFYHSKRRLIF-SRYIRS) corresponding to the p21/waf1 C terminus sequence (residues 141–160) and containing a RYIRS C-terminal extension to facilitate its cell entry, as previously demonstrated (Dong et al., 2003), was synthesized and purified (GeneCust). A modified peptide, in which the charged amino acids responsible for its binding to PCNA have been changed according to dynamic simulation experiments (KRRQTGETDFDHAKAALIFSRYS), served as control. An FITC-conjugated carboxyp21 peptide was used to

study its subcellular localization. Neutrophils were incubated for 1 h with the fluorescent peptide (at the indicated concentrations) and were induced to adhere on poly-L-lysine-precoated coverslips as previously described (Kantari et al., 2007). Fluorescence microscopy was performed with a microscope (DMRD; Leica) and a camera (model DP11P; Olympus). The effects of PS-341 (LC Laboratories) and MG132 were tested on neutrophil apoptosis and PCNA expression.

Real-time RT-PCR and primary transcript real-time RT-PCR.

Real-time RT-PCR and primary transcript real-time RT-PCR were performed as described by Tamassia et al. (2008) using gene-specific primer pairs (Invitrogen) available in the public database RPrimerDB under the following entry codes: human PCNA (7839), PT-PCNA (7840), BLYS/TNFSF13B (7841), PT-BLYS (7842), IL-1ra (3544), GAPDH (3539), PPIB (7786), GNB2L1 (8211), and β 2m (3534). The reaction conditions were identical for all primer sets, as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 2 min, and then 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. β 2m was chosen as a normalizing gene because of its stable expression levels in leukocytes. The data were analyzed with QGene software and are expressed as mean expression units after β 2m normalization. The same RNA samples were processed in the absence of RT and served as controls for genomic DNA contamination. Northern blot analysis was conducted as previously described (Rossato et al., 2007).

Plasmid vector construction and recombinant PCNA expression.

Recombinant PCNA was produced in *Escherichia coli* using the plasmid PETPCNA containing the human PCNA cDNA (gift from B. Stillman, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) and purified as previously described (Waga et al., 1994). To obtain PCNA overexpression in PLB985 cells, PCNA cDNA was subcloned into the expression vector pCDNA3/neo (Invitrogen) between the HindIII and NotI restriction sites. Site-directed mutagenesis was performed using the QuikChange method (Agilent Technologies) to obtain PCNA mutated on charged amino acids within the known p21-interacting sequence located at the interdomain-connecting loop (PCNA-D120A–D122A–E124A–E130A–E132A). All cDNA sequences were confirmed by direct sequencing. PLB985 cells were transfected using the Amaxa system (Lonza), according to the manufacturer's instructions. In brief, 2×10^6 cells were resuspended in 100 μ l of cell line solution with 1 μ g of plasmid (control pcDNA3-neomycin, pcDNA3-PCNA, or pcDNA3-mutated PCNA). The cells were then electroporated and transferred to culture plates. Transfected cells were cloned and selected based on their resistance to 1 mg/ml neomycin.

For PCNA siRNA experiments, PLB985 cells were treated with DMF to induce granulocytic differentiation and transfected with 1 μ M siRNA (Applied Biosystems) twice at a 24-h interval (day 3 and day 4 after DMF treatment) using the Amaxa system as described in the previous paragraph. FITC-conjugated control siRNA, used to detect intracellular siRNA by flow cytometry and to monitor transfection efficiency, showed that the fluorescent siRNA was taken up in >90% of the PLB985 cells. Constitutive, gliotoxin- and TRAIL-induced apoptosis was evaluated by mitochondrial depolarization after DiOC₆ labeling after gating on CD11b⁺ cells after control scrambled siRNA and PCNA siRNA transfection. PLB985 cells transfected with specific PCNA siRNA or control siRNA were also lysed to analyze PCNA expression by Western blotting using the rabbit anti-PCNA pAb.

Western blot analysis and co-IP experiments. Neutrophils were sonicated, and cytosolic proteins were analyzed using either the PC10 mAb or the Ab5 pAb anti-PCNA, according to standard immunoblot procedures (Moriceau et al., 2009). Co-IP experiments were performed using neutrophil cytosols obtained by cavitation (Borregaard et al., 1983). 500 μ g cytosol was mixed with 50 μ l protein G and Ab5 pAb and incubated for 30 min at 4°C under shaking. The sample was loaded onto a column containing Sepharose-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec) and washed with a stringent washing buffer (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 1% NP-40, and

0.5% Triton X-100). The column was washed twice with this buffer, twice with a similar buffer containing 300 mM NaCl and, finally, five times with a hyposaline buffer (20 mM Tris, pH 7.5). The sample was eluted from the column with 30 μ l of 5 $\times$ sample buffer and analyzed by Western blotting using different mAbs to potential partners. PCNA was detected on the Western blot with the PC10 mAb, and procaspases were detected with anti-procaspase-8 mAb, mouse anti-procaspase-10, anti-procaspase-9, or anti-procaspase-3 mAbs, followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (diluted 1:5,000; Nordic Immunology), using the SuperSignal West Pico detection kit (Thermo Fisher Scientific). For the reciprocal co-IPs, procaspase-3, procaspase-8, procaspase-9, and procaspase-10 were immunoprecipitated with their corresponding mAbs, and PCNA was detected by Western blotting using the rabbit pAb anti-PCNA (Ab5). An antiubiquitin mAb (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) was used for immunoprecipitating ubiquitinated proteins, and detection of PCNA was performed using the rabbit pAb anti-PCNA (Ab5). Mouse anti-lamin B (EMD) mAb as well as rabbit anti- β -actin (EMD) and antielastase (EMD) pAbs were also used.

In silico design of the modified p21 peptide using dynamic simulations. To design a modified p21 peptide that does not bind to PCNA and could be used as a control peptide, we first inventoried the PCNA-p21 interactions at the atomic level of detail based on the trajectory obtained from 20-ns-long MD simulations of PCNA complexed with three carboxyp21 peptides (RQTSMITDFYHSKR). We then identified the p21 peptide amino acids forming strong interactions with PCNA and subsequently ran new MD simulations of PCNA complexed with the modified p21 peptides (RQTGETDFDHAKA). The initial set of coordinates used for the MD simulations was determined from the x-ray structure of PCNA complexed to the peptide SAVLQKKITDYFHPKK (Protein Data Bank ID 1VYJ). Three simulations of the PCNA trimer were run as follows: (1) MD1, PCNA trimer with a p21 peptide (RQTSMITDFYHSKR) interacting with each of the three monomers (labeled A, C, and E in the x-ray file); (2) MD2, PCNA with three modified peptides (RQTGETDFDHAKA); and (3) MD3, PCNA with two p21 peptides (on PCNA monomers A and C) and one modified peptide (on PCNA monomer E). The simulation was performed as previously described (Hajjar et al., 2006), except that the production runs lasted for 20 ns. The systems contain $\sim$ 100,000 atoms, including explicit water molecules, proteins, and counter-ions. Analysis of the trajectories obtained, performed as previously described (Hajjar et al., 2006), revealed the loss of strategic interactions between PCNA and the modified p21 peptide, providing evidence that it could barely bind PCNA (Fig. 5 A). Interactions between the carboxyp21 and PCNA remained stable during the 20 ns of the simulations.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the StatView (SAS Institute Inc.) software package. Comparisons were made using the Student's *t* test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Similar results were obtained when using the nonparametric Mann-Whitney test.

Online supplemental material. Fig. S1 shows the specificity of the anti-PCNA antibodies (Ab5 and PC10) and that PCNA has a nuclear and a cytosolic localization in circulating lymphocytes and monocytes. Fig. S2 shows the nuclear to cytosolic PCNA relocalization during ATRA-induced granulocytic differentiation in the NB4 cell line. Fig. S3 shows apoptosis assessment using annexin-V-FITC and 7-AAD labeling and using DiOC₆ staining. Fig. S4 shows the effect of proteasome and cathepsin inhibitors on PCNA expression. Fig. S5 shows that mouse neutrophils express cytosolic PCNA that decreases during apoptosis. Fig. S6 shows that cytosolic PCNA can be detected by immunofluorescence in fresh but not in apoptotic neutrophils. Fig. S7 shows that the nuclear to cytosolic PCNA relocalization also occurs during DMF-induced granulocytic differentiation in PLB985 cells. Fig. S8 shows the reverse IP between PCNA and procaspase-3, procaspase-8, procaspase-9, and procaspase-10, as well as colocalization studies between PCNA and these procaspases using immunofluorescence. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20092241/DC1>.

We thank Drs. Yaël Zermati, Joëlle Sobczak-Thépot, and Soizic Daniel for stimulating discussions. We also thank Sandrine Canteloup, Valérie Dorey, Sandra Moriceau, and Joyce Benchrir for excellent technical assistance and Meriem Garfa-Traoré (Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France) and Pierre Bourdoncle of the Cochin Imaging Facility (Université Paris Descartes, Paris, France) for technical assistance in confocal microscopy.

The following organizations supported this work: Mucoviscidose ABCF2, Legs Poix, Fondation pour la Recherche Médicale, and NEUPROCF European Grant to V. Witko-Sarsat; Arthritis Fondation Courtin to M. Pederzoli-Ribeil; National Program for Research in Functional Genomics in Norway in the Research Council of Norway to N. Reuter; and Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (PRIN 2007H9AWXY), Fondazione Cariverona, and Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC 5839) to M.A. Cassatella.

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 16 October 2009

Accepted: 22 September 2010

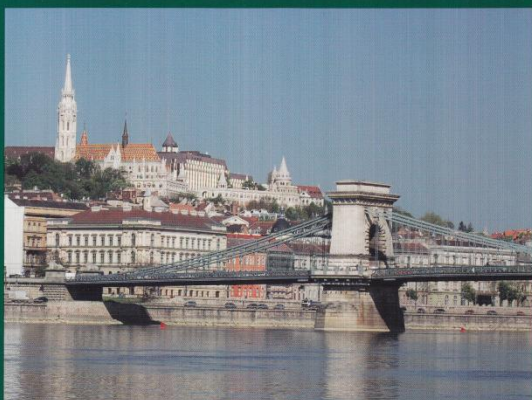
REFERENCES

- Altznauer, F., S. Martinelli, S. Yousefi, C. Thürig, I. Schmid, E.M. Conway, M.H. Schöni, P. Vogt, C. Mueller, M.F. Fey, et al. 2004. Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by survivin in terminally differentiated neutrophils. *J. Exp. Med.* 199:1343–1354. doi:10.1084/jem.20032033
- Basu, S., G. Hodgson, M. Katz, and A.R. Dunn. 2002. Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood*. 100:854–861. doi:10.1182/blood.V100.3.854
- Borregaard, N., J.M. Heiple, E.R. Simons, and R.A. Clark. 1983. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell Biol.* 97:52–61. doi:10.1083/jcb.97.1.52
- Cassatella, M.A. 1999. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* 73:369–509. doi:10.1016/S0065-2776(08)60791-9
- Cowland, J.B., and N. Borregaard. 1999. Isolation of neutrophil precursors from bone marrow for biochemical and transcriptional analysis. *J. Immunol. Methods*. 232:191–200. doi:10.1016/S0022-1759(99)00176-3
- Derouet, M., L. Thomas, A. Cross, R.J. Moots, and S.W. Edwards. 2004. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J. Biol. Chem.* 279:26915–26921. doi:10.1074/jbc.M313875200
- Dong, C., S.C. Lyu, A.M. Krensky, and C. Clayberger. 2003. DQ 65–79, a peptide derived from HLA class II, mimics p21 to block T cell proliferation. *J. Immunol.* 171:5064–5070.
- Drewniak, A., B.J. van Raam, J. Geissler, A.T. Tool, O.R. Mook, T.K. van den Berg, F. Baas, and T.W. Kuijpers. 2009. Changes in gene expression of granulocytes during in vivo granulocyte colony-stimulating factor/dexamethasone mobilization for transfusion purposes. *Blood*. 113:5979–5988. doi:10.1182/blood-2008-10-182147
- Fox, S., A.E. Leitch, R. Duffin, C. Haslett, and A.G. Rossi. 2010. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J. Innate Immun.* 2:216–227. doi:10.1159/000284367
- Fujise, K., D. Zhang, J. Liu, and E.T. Yeh. 2000. Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 275:39458–39465. doi:10.1074/jbc.M006626200
- Goepel, F., P. Weinmann, J. Schymeinsky, and B. Walzog. 2004. Identification of caspase-10 in human neutrophils and its role in spontaneous apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* 75:836–843. doi:10.1189/jlb.0703317
- Hajjar, E., B. Korkmaz, F. Gauthier, B.O. Brandsdal, V. Witko-Sarsat, and N. Reuter. 2006. Inspection of the binding sites of proteinase3 for the design of a highly specific substrate. *J. Med. Chem.* 49:1248–1260. doi:10.1021/jm051018t
- Hallett, J.M., A.E. Leitch, N.A. Riley, R. Duffin, C. Haslett, and A.G. Rossi. 2008. Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation. *Trends Pharmacol. Sci.* 29:250–257. doi:10.1016/j.tips.2008.03.002
- Henson, P.M. 2005. Dampening inflammation. *Nat. Immunol.* 6:1179–1181. doi:10.1038/ni1205-1179

- Hino, M., K. Suzuki, T. Yamane, N. Sakai, H. Kubota, K.R. Koh, K. Ohta, F. Hato, S. Kitagawa, and N. Tatsumi. 2000. Ex vivo expansion of mature human neutrophils with normal functions from purified peripheral blood CD34⁺ haematopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.* 109:314–321. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02054.x
- Kantari, C., M. Pederzoli-Ribeil, O. Amir-Moazami, V. Gausson-Dorey, I.C. Moura, M.C. Lecomte, M. Benhamou, and V. Witko-Sarsat. 2007. Proteinase 3, the Wegener autoantigen, is externalized during neutrophil apoptosis: evidence for a functional association with phospholipid scramblase 1 and interference with macrophage phagocytosis. *Blood.* 110:4086–4095. doi:10.1182/blood-2007-03-080457
- Klausen, P., M.D. Bjerregaard, N. Borregaard, and J.B. Cowland. 2004. End-stage differentiation of neutrophil granulocytes in vivo is accompanied by up-regulation of p27kip1 and down-regulation of CDK2, CDK4, and CDK6. *J. Leukoc. Biol.* 75:569–578. doi:10.1189/jlb.1003474
- Koedel, U., T. Frankenberg, S. Kirschnek, B. Obermaier, H. Häcker, R. Paul, and G. Häcker. 2009. Apoptosis is essential for neutrophil functional shutdown and determines tissue damage in experimental pneumococcal meningitis. *PLoS Pathog.* 5:e1000461. doi:10.1371/journal.ppat.1000461
- Koundrioukoff, S., Z.O. Jónsson, S. Hasan, R.N. de Jong, P.C. van der Vliet, M.O. Hottiger, and U. Hübscher. 2000. A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 275:22882–22887. doi:10.1074/jbc.M001850200
- Leavitt, R.Y., A.S. Fauci, D.A. Bloch, B.A. Michel, G.G. Hunder, W.P. Arend, L.H. Calabrese, J.F. Fries, J.T. Lie, R.W. Lightfoot Jr., et al. 1990. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.* 33:1101–1107. doi:10.1002/art.1780330807
- Luqmani, R.A., P.A. Bacon, R.J. Moots, B.A. Janssen, A. Pall, P. Emery, C. Savage, and D. Adu. 1994. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM.* 87:671–678.
- Maga, G., and U. Hübscher. 2003. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* 116:3051–3060. doi:10.1242/jcs.00653
- Maiani, N.A., D. Roos, and T.W. Kuijpers. 2004. Bid truncation, bid/bax targeting to the mitochondria, and caspase activation associated with neutrophil apoptosis are inhibited by granulocyte colony-stimulating factor. *J. Immunol.* 172:7024–7030.
- Mattock, H., P. Jares, D.I. Zheleva, D.P. Lane, E. Warbrick, and J.J. Blow. 2001a. Use of peptides from p21 (Waf1/Cip1) to investigate PCNA function in *Xenopus* egg extracts. *Exp. Cell Res.* 265:242–251. doi:10.1006/excr.2001.5181
- Mattock, H., D.P. Lane, and E. Warbrick. 2001b. Inhibition of cell proliferation by the PCNA-binding region of p21 expressed as a GFP mini-protein. *Exp. Cell Res.* 265:234–241. doi:10.1006/excr.2001.5160
- McStay, G.P., G.S. Salvesen, and D.R. Green. 2008. Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways. *Cell Death Differ.* 15:322–331. doi:10.1038/sj.cdd.4402260
- Mócsai, A., M. Zhou, F. Meng, V.L. Tybulewicz, and C.A. Lowell. 2002. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity.* 16:547–558. doi:10.1016/S1074-7613(02)00303-5
- Moldovan, G.L., B. Pfander, and S. Jentsch. 2007. PCNA, the maestro of the replication fork. *Cell.* 129:665–679. doi:10.1016/j.cell.2007.05.003
- Moriceau, S., C. Kantari, J. Mocek, N. Davezac, J. Gabillet, I.C. Guerrero, F. Brouillard, D. Tondelier, I. Sermet-Gaudelus, C. Danel, et al. 2009. Coronin-1 is associated with neutrophil survival and is cleaved during apoptosis: potential implication in neutrophils from cystic fibrosis patients. *J. Immunol.* 182:7254–7263. doi:10.4049/jimmunol.0803312
- Moriceau, S., G. Lenoir, and V. Witko-Sarsat. 2010. In cystic fibrosis homozygotes and heterozygotes, neutrophil apoptosis is delayed and modulated by diamide or roscovitine: evidence for an innate neutrophil disturbance. *J. Innate Immun.* 2:260–266. doi:10.1159/000295791
- Murphy, B.M., A.J. O'Neill, C. Adrain, R.W. Watson, and S.J. Martin. 2003. The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome c. *J. Exp. Med.* 197:625–632. doi:10.1084/jem.20021862
- Naryzhny, S.N., and H. Lee. 2004. The post-translational modifications of proliferating cell nuclear antigen: acetylation, not phosphorylation, plays an important role in the regulation of its function. *J. Biol. Chem.* 279:20194–20199. doi:10.1074/jbc.M312850200
- Nathan, C. 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6:173–182. doi:10.1038/nri1785
- Pedruzzi, E., M. Fay, C. Elbim, M. Gaudry, and M.A. Gougerot-Pocidalo. 2002. Differentiation of PLB-985 myeloid cells into mature neutrophils, shown by degranulation of terminally differentiated compartments in response to N-formyl peptide and priming of superoxide anion production by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Br. J. Haematol.* 117:719–726. doi:10.1046/j.1365-2141.2002.03521.x
- Roa, S., E. Avdievich, J.U. Peled, T. Maccarthy, U. Werling, F.L. Kuang, R. Kan, C. Zhao, A. Bergman, P.E. Cohen, et al. 2008. Ubiquitinated PCNA plays a role in somatic hypermutation and class-switch recombination and is required for meiotic progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105:16248–16253. doi:10.1073/pnas.0808182105
- Rossato, M., S. Cencig, S. Gasperini, M.A. Cassatella, and F. Bazzoni. 2007. IL-10 modulates cytokine gene transcription by protein synthesis-independent and dependent mechanisms in lipopolysaccharide-treated neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 37:3176–3189. doi:10.1002/eji.200737625
- Rossi, A.G., D.A. Sawatzky, A. Walker, C. Ward, T.A. Sheldrake, N.A. Riley, A. Caldicott, M. Martinez-Losa, T.R. Walker, R. Duffin, et al. 2006. Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat. Med.* 12:1056–1064. doi:10.1038/nm1468
- Scapini, P., B. Nardelli, G. Nadali, F. Calzetti, G. Pizzolo, C. Montecucco, and M.A. Cassatella. 2003. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BlyS. *J. Exp. Med.* 197:297–302. doi:10.1084/jem.20021343
- Serhan, C.N., and J. Savill. 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6:1191–1197. doi:10.1038/ni1276
- Simon, H.U. 2003. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol. Rev.* 193:101–110. doi:10.1034/j.1600-065X.2003.00038.x
- Tamassia, N., V. Le Moigne, M. Rossato, M. Donini, S. McCartney, F. Calzetti, M. Colonna, F. Bazzoni, and M.A. Cassatella. 2008. Activation of an immunoregulatory and antiviral gene expression program in poly(I:C)-transfected human neutrophils. *J. Immunol.* 181:6563–6573.
- Theilgaard-Mönch, K., B.T. Porse, and N. Borregaard. 2006. Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr. Opin. Immunol.* 18:54–60. doi:10.1016/j.coi.2005.11.010
- Waga, S., G.J. Hannon, D. Beach, and B. Stillman. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature.* 369:574–578. doi:10.1038/369574a0
- Warbrick, E. 2000. The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays.* 22:997–1006. doi:10.1002/1521-1878(200011)22:11<997::AID-BIES6>3.0.CO;2-#
- Warbrick, E. 2006. A functional analysis of PCNA-binding peptides derived from protein sequence, interaction screening and rational design. *Oncogene.* 25:2850–2859. doi:10.1038/sj.onc.1209320
- Ward, C., E.R. Chilvers, M.F. Lawson, J.G. Pryde, S. Fujihara, S.N. Farrow, C. Haslett, and A.G. Rossi. 1999. NF-kappaB activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *J. Biol. Chem.* 274:4309–4318. doi:10.1074/jbc.274.7.4309
- Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2000. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* 80:617–653.
- Yin, W., W. Raffelsberger, and H. Gronemeyer. 2005. Retinoic acid determines life span of leukemic cells by inducing antagonistic apoptosis-regulatory programs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37:1696–1708. doi:10.1016/j.biocel.2005.03.003

European Journal of Clinical Investigation

46th Annual Scientific Meeting of the European
Society for Clinical Investigation



Budapest Hungary
22-24 March 2012

ABSTRACT BOOK

■ ESCI

Official journal of the European Society for Clinical Investigation

WILEY-
BLACKWELL

192

P21/waf1 potentiates neutrophil apoptosis and favor the resolution of inflammation

M. Pederzoli-Ribeil, C. Martin, A. Da Chiara, J. Mocek, C. Richard, N. Tamassia, G. Thevenot, M.A. Cassatella, P.R. Burgel & V. Witko-Sarsat
Cochin Institute, Paris, France

Background: We previously showed that i) cytoplasmic proliferating cell nuclear antigen (PCNA) controls neutrophil survival and ii) neutrophil apoptosis was enhanced by a peptide derived from p21/waf1, a PCNA partner. However, P21/waf1 is hardly detectable in mature neutrophils probably because P21/waf1 was sensitive to proteolytic cleavage. Yet, p21/waf1 mRNA is strongly upregulated in human alveolar neutrophils after *in vivo* LPS challenge, suggesting that P21/waf1 was inducible under inflammatory conditions.

Aim is to examine the role of P21 in neutrophil apoptosis and in the resolution of inflammation.

Materials and methods: The DMF-differentiated PLB985 were transfected with different plasmids (empty pCDNA3, pcDNA3/p21 and pcDNA3-p21A45R). Zymosan-induced peritonitis and bronchial infection with *Pseudomonas aeruginosa* were performed in p21 knock-out (KO) mice as compared with their wild type (WT) littermates to evaluate the role of p21 in the resolution of inflammation.

Results: After stimulations with either TNF-alpha, INF-gamma or G-CSF, p21 mRNA could be induced *in vitro* in mature human neutrophils. In DMF-differentiated PLB985 cells overexpression of the p21A45R mutant that is resistant to proteinase 3 cleavage, resulted in a potentiation of gliotoxin-induced apoptosis (evaluated using DIOC6 labelling) as compared to p21 or controls, thus suggesting a proapoptotic role of p21 in neutrophils. *In vivo*, an increase in inflammatory neutrophils isolated from the peritoneal cavity after zymosan-induced peritonitis were observed in p21 KO as compared with WT at 48 h but not at 24 h post-zymosan injection. In the model of bronchial infection with *Pseudomonas aeruginosa*, macroscopic analysis showed that the pneumopathy was more extended in p21 KO mice with more neutrophils as compared with WT.

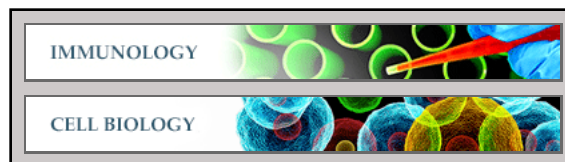
Conclusion: Our results suggest that P21/waf1 is involved in the regulation of neutrophil survival *in vivo* under inflammatory conditions.

Immunology:

Nuclear-to-cytoplasmic Relocalization of the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) during Differentiation Involves a Chromosome Region Maintenance 1 (CRM1)-dependent Export and Is a Prerequisite for PCNA Antiapoptotic Activity in Mature Neutrophils

Dikra Bouayad, Magali Pederzoli-Ribeil, Julie Mocek, Céline Candalh, Jean-Benoît Arlet, Olivier Hermine, Nathalie Reuter, Noémie Davezac and Véronique Witko-Sarsat
J. Biol. Chem. 2012, 287:33812-33825.

doi: 10.1074/jbc.M112.367839 originally published online July 30, 2012



Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M112.367839](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.367839)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 41 references, 20 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/287/40/33812.full.html#ref-list-1>

Nuclear-to-cytoplasmic Relocalization of the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) during Differentiation Involves a Chromosome Region Maintenance 1 (CRM1)-dependent Export and Is a Prerequisite for PCNA Antiapoptotic Activity in Mature Neutrophils*

Received for publication, March 30, 2012, and in revised form, July 24, 2012. Published, JBC Papers in Press, July 30, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.367839

Dikra Bouayad^{‡§¶}, Magali Pederzoli-Ribeil^{‡§¶}, Julie Mocek^{‡§¶}, Céline Candalh^{‡§¶}, Jean-Benoît Arlet^{||}, Olivier Hermine^{||**}, Nathalie Reuter^{‡‡}, Noémie Davezac^{§§1}, and Véronique Witko-Sarsat^{‡§¶1,2}

From the [‡]INSERM U1016, 75014 Paris, France, the [§]Institut Cochin, Université Paris Descartes, Cochin Hospital, 75015 Paris, France, the [¶]CNRS UMR8104, 75014 Paris, France, the ^{||}CNRS UMR8147 and ^{**}Hematology Department, Université Paris Descartes, Necker Hospital, 75015 Paris, France, the ^{‡‡}Computational Biology Unit, University of Bergen, N-5008 Bergen, Norway, and ^{§§}CNRS UMR5547, Université Toulouse III, 31400 Toulouse, France

Background: PCNA is exclusively cytoplasmic in neutrophils and inhibits their apoptosis.

Results: Nuclear export of PCNA is mediated by a CRM1-dependent nuclear export sequence (NES) and is pivotal for its antiapoptotic activity in mature neutrophils.

Conclusion: Cytoplasmic relocalization of PCNA is part of the terminal differentiation of neutrophils.

Significance: This process might be relevant to modulate neutrophil survival in inflammation or neutropenia.

Neutrophils are deprived of proliferative capacity and have a tightly controlled lifespan to avoid their persistence at the site of injury. We have recently described that the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a nuclear factor involved in DNA replication and repair of proliferating cells, is a key regulator of neutrophil survival. In neutrophils, PCNA was localized exclusively in the cytoplasm due to its nuclear-to-cytoplasmic relocalization during granulocytic differentiation. We showed here that leptomycin B, an inhibitor of the chromosome region maintenance 1 (CRM1) exportin, inhibited PCNA relocalization during granulocytic differentiation of HL-60 and NB4 promyelocytic cell lines and of human CD34⁺ primary cells. Using enhanced green fluorescent protein fusion constructs, we have demonstrated that PCNA relocalization involved a nuclear export signal (NES) located from Ile-11 to Ile-23 in the PCNA sequence. However, this NES, located at the inner face of the PCNA trimer, was not functional in wild-type PCNA, but instead, was fully active and leptomycin B-sensitive in the monomeric PCNAY114A mutant. To test whether a defect in PCNA cytoplasmic relocalization would affect its antiapoptotic activity in mature neutrophils, a chimeric PCNA fused with the SV40 nuclear localization sequence (NLS) was generated to preclude its cytoplasmic localization. As expected, neutrophil-differentiated PLB985 cells expressing ectopic SV40NLS-PCNA had an increased nuclear PCNA as compared with cells express-

ing wild-type PCNA. Accordingly, the nuclear PCNA mutant did not show any antiapoptotic activity as compared with wild-type PCNA. Nuclear-to-cytoplasmic relocalization that occurred during myeloid differentiation is essential for PCNA antiapoptotic activity in mature neutrophils and is dependent on the newly identified monomerization-dependent PCNA NES.

Neutrophils, the most abundant leukocyte in the circulation, are key actors in the first line of defense against bacterial and fungal infections. Their principal function is to migrate toward inflammation sites where they exert antimicrobial effects through the production and secretion of proteases, reactive oxygen species, antibiotic proteins, and proinflammatory mediators (1, 2). Neutrophils are terminally differentiated cells deprived of any proliferative capacity and have a very short lifespan (1). Recent *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that neutrophil apoptosis and phagocytosis by macrophages is a highly regulated process that is pivotal for the inflammation resolution (3). Hence, controlling the fate of neutrophils obviously has numerous potential therapeutic applications, not only in the field of chronic inflammation, but also in immune modulation (4). Remarkably, neutrophils, which are nonproliferating cells, appear to use unusual pathways implicating cell cycle regulatory proteins such as cyclin-dependent kinases (5) to control their survival/apoptosis balance (6). We have recently reported that neutrophils express high amounts of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA)³ (7). PCNA,

* This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm), the association ABCF Mucoviscidose, Société Française d'Hématologie (SFH, fellowship to D.B.), and National Program for Research in Functional Genomics (FUGE) in Norway (to N. R.).

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: INSERM U1016, Cochin Institute, 27bis rue du Faubourg Saint Jacques, 75014 Paris, France. Tel.: 33-01-40-51-65-33; Fax: 33-01-40-51-65-35; E-mail: veronique.witko@inserm.fr.

³ The abbreviations used are: PCNA, proliferating cell nuclear antigen(s); CRM1, chromosome region maintenance 1; EGFP, enhanced green fluorescent protein; NLS, nuclear localization sequence; NES, nuclear export signal(s); SCF, stem cell factor; LMB, leptomycin B; ATRA, all-*trans*-retinoic acid; DMF, dimethylformamide; ANOVA, analysis of variance.

which belongs to the family of DNA sliding clamps, is ideally suited to function as a moving platform for factors that act concomitantly with replication, but also with other cellular processes, such as DNA repair, cell cycle control, apoptosis, chromatin remodeling, and sister chromatid cohesion (8). PCNA is currently believed to have functions in proliferating cells only. Contrary to the dogma that PCNA functions are nuclear, we have discovered that in neutrophils, PCNA localizes exclusively in the cytoplasm and controls their survival (7). Notably, cytosolic PCNA levels changed with neutrophil survival rate. Moreover, PCNA overexpression rendered neutrophil-differentiated PLB985 cells significantly more resistant to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)- or gliotoxin-induced apoptosis, and conversely, PCNA siRNA sensitized them to apoptosis (7). These results identify cytoplasmic PCNA as a key regulator of neutrophil lifespan, in a manner independent of the cell cycle, exerting its antiapoptotic activity by associating to procaspases to prevent their activation (7).

One of our salient observations was that PCNA nuclear-to-cytoplasmic relocation occurred at the end of granulocyte differentiation. For instance, in CD34⁺ cells and in myeloblasts isolated from human bone marrow, PCNA was mainly detectable in the nucleus, whereas mature neutrophils were found to express PCNA exclusively within their cytoplasm. As little is known about PCNA shuttling during granulocytic differentiation, we first examined the molecular basis of PCNA nuclear-to-cytoplasm relocation in an effort to understand whether the exclusive cytoplasmic localization observed in neutrophils could result from either decreased import to, or increased export from, the nucleus, or both. Concerning import, the PCNA sequence does not contain a classical nuclear localization signal (NLS) recognized by the importin- α -importin- β heterodimer. However, a nonclassical import signal localized to amino acids 101–120 recognized by importin- β only, whose deletion induced PCNA accumulation in the cytoplasm, has recently been identified (9, 10). Moreover, PCNA could use its cognate partners possessing an NLS as cargo proteins for active import. This is the case in p21^{Cip1/Waf1}, which has its own NLS and whose expression is down-regulated during granulocytic differentiation (11). As no mechanisms governing the active export of PCNA have been described so far, we investigated whether PCNA contains a functional CRM1 (chromosomal region maintenance 1)-dependent nuclear export signal (NES). We then investigated whether modulation of PCNA nuclear-to-cytoplasmic relocation would directly affect granulocytic differentiation or its antiapoptotic activity in mature neutrophils.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Line Culture and Transfection Procedure—Human neutrophils from healthy donors (Etablissement Français du Sang, Paris, France) were isolated from EDTA-anticoagulated blood, using density gradient centrifugation and PolymorphprepTM (Nycomed) as described previously (7). Blood donors gave their written informed consent to participate in this study, which was approved by the INSERM Institutional Review Board and the Ethics Committee of Necker-Enfants Malades and Cochin Hospitals (Paris, France). Differentiation of CD34⁺ cells into granulocytes was induced as described previously (7, 12) with

some modifications. Briefly, peripheral blood mononuclear cells from G-CSF-treated healthy donors (10 mg/kg for 5 days to induce hematopoietic stem cell mobilization) were collected after cytopheresis (Hematology Department, Necker Hospital, Paris, France). CD34⁺ cells were next isolated using the CD34 progenitor cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) and were cultured with stem cell factor (SCF, 100 ng/ml), IL-3 (10 ng/ml), and IL-6 (100 ng/ml) in Iscove's medium Dulbecco's modified (Invitrogen) supplemented with 15% BIT 9500 (BSA-insulin-transferrin, Stem Cell Technologies), antibiotics (penicillin 100 units/ml, streptomycin 100 μ g/ml), and L-glutamine 2 mM for 7 days. CD36⁺ cells were next negatively selected by incubation with monoclonal IgG1 anti-CD36 antibody (BD Biosciences) followed by anti-mouse IgG1 antibody coupled to magnetic beads (Miltenyi Biotec). The remaining cells were incubated with G-CSF (10 ng/ml), SCF (100 ng/ml), and IL-3 (10 ng/ml) in the same medium for 13 days to induce granulocytic differentiation. May Grunwald Giemsa staining was used at day 7 and at day 13 after G-CSF/SCF/IL-3 treatment to monitor differentiation (data not shown). When indicated, cells were treated with LMB (10 ng/ml for 6 h) to inhibit the CRM1-dependent nuclear export.

PLB985, HL60, and NB4 promyelocytic cell lines were cultured at 37 °C in 5% CO₂ in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (penicillin 100 units/ml and streptomycin at 100 μ g/ml). NB4 or HL60 cells were induced to differentiate with all-trans-retinoic acid (ATRA) (1 μ M, Sigma) for 5 days (13), and granulocyte differentiation was validated by CD11b expression, as described previously (14). PLB985 cell granulocyte differentiation was induced by exposure to 0.5% dimethylformamide (DMF) for 5 days, as described previously (7, 14). PLB985 cells were transfected using the AMAXA[®] system as indicated by the manufacturer. Briefly, cells (2×10^6) were resuspended in 100 μ l of cell line solution in the presence of 1 μ g of plasmids. Cells were electroporated at the indicated voltage and transferred to culture plates. Transfected cells were selected on the basis of their resistance to neomycin (1 mg/ml).

HeLa cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (penicillin at 100 units/ml and streptomycin at 100 μ g/ml). To generate transient transfectants, HeLa cells were grown on cover glasses (8×10^4 cells/well) and transfected the next day with 1 μ g of DNA using Lipofectamine following the manufacturer's instructions (Invitrogen). When indicated, cells were treated with LMB (Sigma) to inhibit the CRM1-dependent nuclear export.

Western Blot Analysis—PCNA expression in the nucleus and cytosol was assessed in NB4 cells after cell fractionation using nitrogen cavitation to avoid contamination from granule proteases, as originally described (15). Briefly, cells were suspended at 20×10^6 cells/ml in relax buffer (1 mM KCl, 30 mM NaCl, 35 mM MgCl₂, 100 mM PIPES, 1 mM ATP, pH 7.4) supplemented with antiproteases (100 μ M aprotinin, 400 μ M leupeptin, 400 μ M pepstatin, 4 mM PMSF, 1 mM orthovanadate, 1 mM EDTA) and were introduced into a cell disruption bomb (Parr Instrument Co., Moline, IL) with a nitrogen pressure at 350 p.s.i. 20 min at room temperature. Disruption of the cells was triggered

by nitrogen decompression within the cavitation bomb. The lysed sample was collected and centrifuged at 3,000 rpm for 15 min to obtain the post-cavitation supernatant. The pellet containing the unbroken cells and the nuclei was resuspended in a hypotonic buffer (10 mM Hepes, 0.3 mM dithiothreitol, 400 μ M leupeptin, 400 μ M pepstatin, 4 mM PMSF, 1 mM orthovanadate, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA) containing detergent (Nonidet-40 0.3%) and incubated for 15 min on ice to lyse intact cells. Before centrifugation, a microscopic observation with a hemocytometer was necessary to check that there were no intact cells. The suspension of lysed cells was next centrifuged at 13,000 rpm to obtain nuclei within the pellet. Nuclei were resuspended into a lysis buffer (PBS, Triton X-100 1%) to be analyzed by Western blot. The cytosolic fraction was obtained after centrifugation at $100,000 \times g$ of the post-cavitation supernatant. For Western blot analysis, protein concentrations were measured using the BCA assay (Thermo Scientific), and samples were run on a 12.5% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose, as described previously (7). The mouse monoclonal PC10 antibody was used as the primary antibody followed by a horseradish peroxidase-coupled anti-mouse antibody. Western blots were developed using the enhanced chemiluminescence reagent (Thermo Scientific). Lamin and β -actin were used as control proteins for the nuclear and the cytosolic fractions, respectively, to validate the fractionation procedures as described previously (7).

Analysis of Apoptosis—Apoptosis was triggered by incubating PLB985 cells at 37 °C for 16 h with gliotoxin (1 μ g/ml, Sigma) (16, 17) as described previously (7, 14). PLB985 cells were cytospun onto glass slides, and May Grunwald Giemsa staining (Hemacolor, Merck, Darmstadt, Germany) was performed to evaluate apoptotic cell morphology. Apoptosis analysis was also evaluated using flow cytometry as described previously (14). Briefly, mitochondrial depolarization was evaluated from the percentage of cells showing decreased fluorescence after DiOC6 labeling, and DNA fragmentation was measured based on the percentage of cells in the subG1 phase after propidium iodide labeling (7).

Plasmid Constructs—The 5'-3' sequences of the oligonucleotides used to generate pNES1-EGFP were: GACGGTACCGATGATCCTCAAGAAGGTGTTGGAGGCACTCAAGGACCTCATCCGGATCCACCG (forward) and CGGTGGATCCCGGATGAGGTCCTTGAGTGCCTCCAACACCTTCTTGAGGATCATCGGTACCGTC (reverse), and for pNES2-EGFP: GACGGTACCGATGTTGATGGATTTAGATGTTGAACAACCTTGAATTCGGGATCCACCG (forward) and CGGTGGATCCCGAATTCCAAGTTGTTCAACATCTAATCCATCAACATCGGTACCGTC (reverse). Oligonucleotides were synthesized with KpnI and BamHI ends. After annealing, the oligonucleotides were ligated into a XhoI-KpnI-digested pEGFP-N1 (Clontech) vector using T4 DNA ligase such that the insert was downstream of the N terminus of the EGFP. The same protocol was used to create pEGFP-NES1 and pEGFP-NES2, and the oligonucleotides were ligated into a XhoI-KpnI-digested pEGFP-C3 (Clontech). Combined point mutations within the PCNA sequence were also generated in NES1-EGFP at leucines 12, 16, 19, and 22 into alanine using the QuikChange mutagenesis kit (Stratagene). A mammalian

expression plasmid encoding HA-PCNA was prepared by subcloning the full-length human PCNA cDNA into the pcDNA3-HA vector encoding an N-terminal HA epitope upstream of the cloning site (18). A fragment containing a human PCNA cDNA was prepared from bacterial expression plasmid PETPCNA (a gift from Dr. Bruce Stillman, Cold Spring Harbor, NY) by double digestion using NdeI and BamHI followed by treatment with the Klenow fragment. The human PCNA cDNA was inserted either into pcDNA3-HA or into pcDNA3.1 at the XbaI restriction site, also followed by treatment with the Klenow fragment. The oligonucleotides used for single mutations, combined point mutations, or deletions of PCNA were also constructed in the HA-PCNA sequence cloned in the pcDNA3 plasmid using the QuikChange mutagenesis kit following the manufacturer's instructions (Stratagene).

The plasmid construct pNLS(SV40)-EGFP-linker-PCNA (kind gift of Prof. Cardoso, Berlin, Germany) has been described previously (19). The subcloning of the EGFP-linker-PCNA cDNA was realized into the pcDNA3.1 mammalian expression plasmid after insertion of the HindIII restriction site in pEGFP-linker-PCNA by mutagenesis with sense (5'-GAAG-AAGCGCAAAGCTTTGGTACCGGTGCGCCACC-3') and antisense (5'-GGTGGCGACCGGTACCAAAGCTTTGCGCTTCTTC-3') oligonucleotides containing the restriction site. The plasmid construct pcDNA3-NLS(SV40)-linker-PCNA had been constructed with pcDNA3-PCNA using the oligonucleotides with the following sequences: 5'GGCCGCGCCATGCCGAAGAAGAAGCGCAAAGTAGGCGAAGGGCAAGGGCAAGGGCAAGGGCCGGGCGCGGCTACGCGTATCGATCCC3' and 5'TCGAGGGATCGATACGCGTAGCCGCGGCCCGGCCCTTGCCCTTGCCCTTGCCCTTCGCTACTTTGCGCTTCTTCTTCGGCATGGCGC3'. The flexible and hydrophilic linker sequence was obtained from the pNLS(SV40)-EGFP-linker-PCNA plasmid (19). The dimerized oligonucleotides were directly ligated with pcDNA3-PCNA digested by NotI and XhoI. The GFP-PCNA Δ 12-16 and Δ 19-22 deletion mutants were obtained using the QuikChange mutagenesis kit. The monomeric PCNAY114A mutant was generated using a mutagenesis protocol with the following oligonucleotides: 5'-CCAGGAGAAAGTTTCAGACGCTGAAATGAAGTTGATGG-3', 5'-CCATCAACTTCATTTTCAGCGTCTGAACTTTCTCCTGG-3'; 5'-CCAGGAGAAAGTTTCAGACAAAGAAATGAAGTTGATGG-3'; and 5'-CCATCAACTTCATTTCTTTGTCTGAACTTTCTCCTGG-3'. All the plasmid sequences were checked by direct sequencing.

Immunofluorescence Analysis of PCNA Localization—PCNA immunofluorescence analysis of HL60, PLB985, and human neutrophils was performed after cytocentrifugation as described previously (7). Briefly, cells were fixed in PBS containing 3.7% formaldehyde (Sigma) for 20 min on ice and permeabilized with Triton X-100 (0.25%) for 5 min at room temperature followed by ice-cold methanol for 10 min, incubated with the rabbit polyclonal anti-PCNA (diluted 1/50, clone Ab5 Calbiochem) for 45 min followed by biotinylated rabbit IgG, diluted 1:100 (Dako Cytomation) for 30 min, and then followed by streptavidin-coupled Alexa Fluor 555, diluted 1:200 (2 μ g/ml, Molecular Probes) for 30 min. For HA or CRM1 detection,

HeLa cells were fixed as described for PCNA labeling and were incubated with a rabbit polyclonal anti-HA (diluted 1:100, Roche Applied Science) or anti-CRM1 (Santa Cruz Biotechnology) antibody, respectively, followed by an Alexa Fluor 555-coupled goat-anti rabbit IgG (diluted 1:100, Molecular Probes). The analysis of the subcellular localization of the NES1-EGFP and NES2-EGFP and EGFP-NES1 and EGFP-NES2 in HeLa cells was performed 24 h after transfection. The HeLa cells were washed with PBS, fixed with 3.7% paraformaldehyde, and then washed again with PBS. Nuclei were stained with Hoechst 33342 staining (Invitrogen) at 2 μ g/ml for 10 min in PBS or with propidium iodide (Sigma) at 300 ng/ml and mounted in Fluoprep mounting medium (Biomerieux). Slides were mounted using Fluoprep medium and analyzed by fluorescence or confocal microscopy with a Leica TCS SP5 AOBs imaging microscope, model X63, with LAS AF version 1.8 software, as indicated. Quantification was carried out using the ImageJ software, version 1.42d (BD Biosciences). Image acquisition and image analysis were performed on the Cochin Institute Imaging Facility (INSERM U1016, Paris, France).

Statistical Analysis—Statistical analysis was performed using the Statview software package (SAS Institute Inc., Cary, NC). Comparisons were made using the Student's *t* or ANOVA test as indicated.

RESULTS

Evidence for a CRM1-dependent Nuclear Export of PCNA during Granulocytic Differentiation—Using immunofluorescence, we previously reported that PCNA relocated from the nucleus to the cytosol in ATRA-induced granulocytic differentiation in the promyelocytic NB4 cells (7). We examined whether LMB, an inhibitor of the CRM1 exportin that requires a leucine-rich sequence referred to as an NES (20), could increase nuclear localization of PCNA during ATRA-induced granulocytic differentiation in the promyelocytic NB4 cells. Western blot analysis on cytosolic and nuclear extracts of NB4 cells showed a prominent cytosolic localization of PCNA in ATRA-differentiated NB4 cells with a low amount of nuclear PCNA, as described previously (7) (Fig. 1A). Notably, LMB treatment affected this PCNA intracellular distribution by decreasing cytosolic and increasing nuclear PCNA in LMB-treated NB4 cells as compared with the controls (Fig. 1A). The effect of LMB was also observed during ATRA-induced HL60 cell differentiation. PCNA immunolabeling showed again that PCNA relocated from nucleus to cytosol during ATRA-induced differentiation (Fig. 1B, *middle row*) and that nuclear staining was significantly enhanced in LMB-treated ATRA-differentiated HL60 cells as compared with untreated cells (Fig. 1B, *lower row*). This was confirmed by nuclear fluorescence quantification (Fig. 1C). We previously reported that redistribution of PCNA from the nucleus to the cytoplasm occurred during granulocytic differentiation of human CD34⁺ primary cells (7). We confirmed here that 7 days after starting granulocytic differentiation with the combination of G-CSF/IL3/SCF treatment, PCNA exhibited a mixed cytoplasmic and nuclear distribution in some cells but was not exclusively cytosolic (Fig. 1D, *upper panel*), whereas on day 13, most cells had multilobular nuclei with PCNA located in the cytoplasm (Fig. 1D, *lower*

panel). Accordingly, LMB treatment did not result in nuclear accumulation at day 7 because there was no functional nuclear export, as evidenced by quantification of nuclear fluorescence (Fig. 1E, *upper panel*). In contrast, at day 13, LMB significantly inhibited cytosolic localization (Fig. 1E, *lower panel*), thereby demonstrating that PCNA nuclear exclusion was involved in cytosolic localization of PCNA during granulocytic differentiation. The hypothesis of an active export in mature neutrophils was next tested. Notably, LMB treatment of neutrophils did not induce nuclear accumulation of PCNA (Fig. 2A), thus strongly suggesting that there was no active PCNA export. In contrast, cIAP1 nuclear accumulation was observed in LMB-treated mature neutrophils (Fig. 2B), thus providing a positive control for an active nuclear export (21). Taken together, these results strongly suggested the presence of an active PCNA nuclear export that occurred only during differentiation.

Identification of a Nuclear Export Signal in the PCNA Sequence—In the search for a putative NES, PCNA sequence analysis revealed two leucine-rich sequences, which constitutes a signature of conventional NES (22, 23) from Ile-11 to Ile-23 and from Leu-121 to Ile-128. They were named NES1 and NES2, respectively. Both sequences presented similarities with other functional NES identified in the cAMP-dependent protein kinase inhibitor (24), HIV-1 Rev (25), p53 (26, 27), BRCA (28), and CDC25B (18, 29) (Table 1), and were found highly conserved in PCNA sequences among vertebrates (Table 2). NES1 and NES2 sequences were fused to the amino terminus of the enhanced green fluorescent protein (EGFP) sequence using the pEGFP-N1 vector (30), leading to NES1-EGFP or NES2-EGFP protein that was expressed in transiently transfected HeLa cells. In the absence of the NES1 or NES2 sequence, the EGFP protein was equally distributed between the cytoplasm and the nucleus of the EGFP-N1-transfected cells (Fig. 3A, *left upper panel*). In contrast, the NES1-EGFP was exported from the nucleus and was almost entirely cytoplasmic (Fig. 3A, *middle upper panel*), whereas NES2-EGFP presented the same repartition as the EGFP protein alone (Fig. 3A, *right upper panel*). Likewise, the NES1 fused to the carboxyl-terminal part of the EGFP using the pEGFP-C3 vector, leading to the EGFP-NES1 protein was, again, mostly cytoplasmic (Fig. 3A, *middle lower panel*), and EGFP-NES2 was pancellular (Fig. 3A, *right lower panel*), as was the control (Fig. 3A, *left lower panel*). These results demonstrated that the NES1 sequence was active when fused to either the amino-terminal or the carboxyl-terminal part of the EGFP and was able to export EGFP from the nucleus to the cytoplasm. NES1-EGFP-transfected HeLa cells were next treated with LMB to prevent the nuclear exit of NES1-EGFP protein. In the absence of LMB, NES1-EGFP protein was cytoplasmic in 75% $\pm$ 3.4 of the cells, whereas after treatment, as expected, NES1-EGFP protein was retained in the nucleus in 53% $\pm$ 4.63 of the cells (Fig. 3, B and C). To identify the specific residues of NES1 involved in the active export, leucines 12, 16, 19, and 22 were mutated into alanine in the NES1-EGFP protein. EGFP fused with the mutated NES1 (MutNES1) showed prominent nuclear localization (Fig. 3, D and E), confirming that leucine residues were essential for NES1 functionality. We conclude that NES1 from the PCNA sequence that is conserved

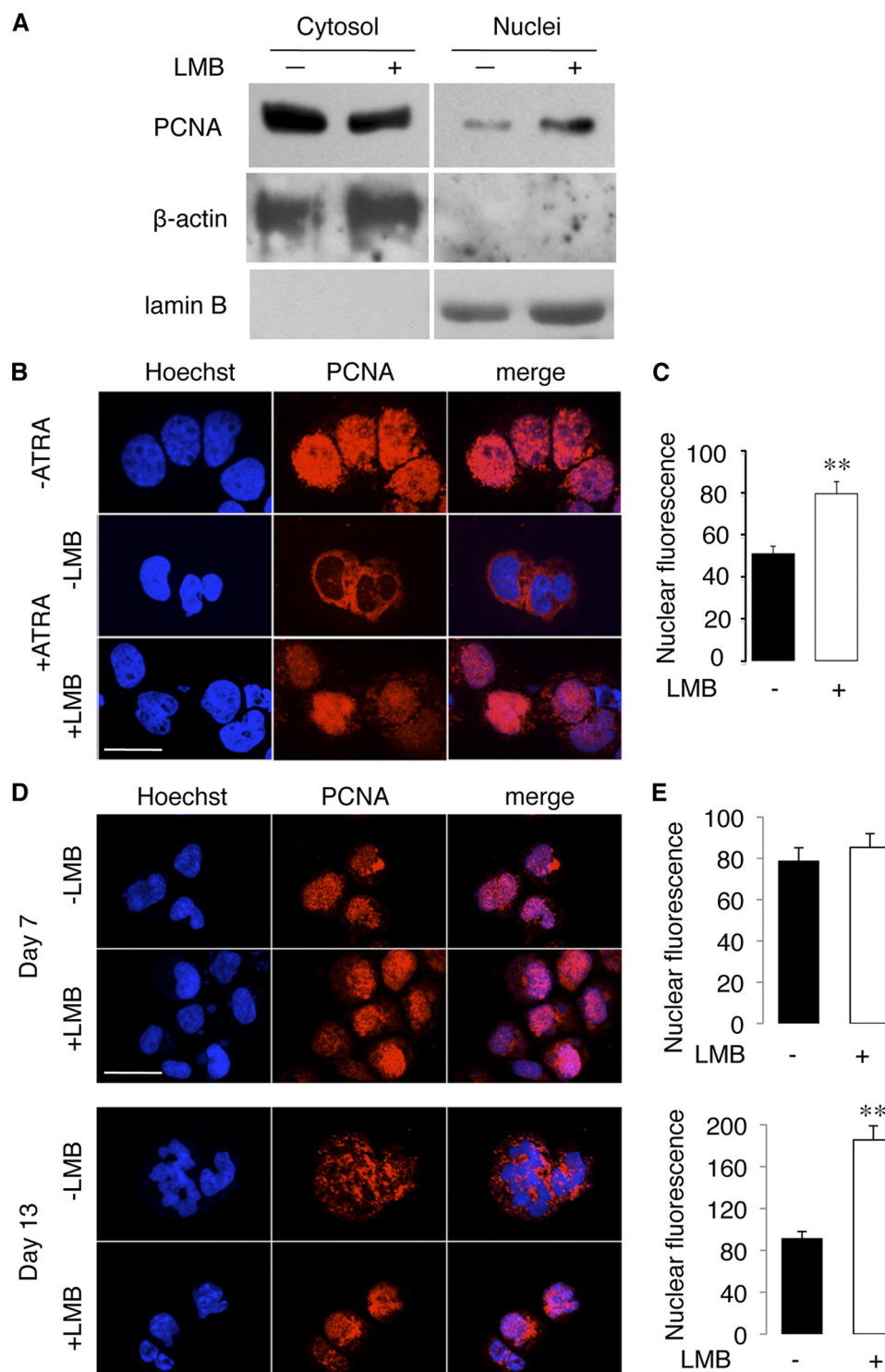


FIGURE 1. PCNA nuclear-to-cytoplasmic relocalization during granulocytic differentiation. *A*, effect of LMB on PCNA in nucleus and cytosol in ATRA-differentiated NB4 cells. Four days after ATRA treatment, NB4 cells were treated with solvent (–) or with 20 ng/ml LMB (+) for 4 h, and PCNA protein was analyzed by Western blot in nuclear and cytosolic fractions (10 and 20 μ g/well, respectively). β -Actin and lamin B were used as specific marker for cytosol and nuclei and as loading controls, respectively. This representative experiment has been performed three times with identical results. *B*, effect of LMB on PCNA relocalization in HL60 cells. Four days after ATRA treatment, HL60 cells were treated with solvent (–) or with 20 ng/ml LMB (+) for 4 h, and PCNA localization was analyzed with confocal microscopy after immunolabeling using the Ab5 rabbit polyclonal anti-PCNA antibody. The nuclei were visualized with Hoechst staining (original magnification $\times 630$, scale bar = 20 μ m). This representative experiment has been performed four times with identical results. *C*, quantification of nuclear fluorescence intensity with the ImageJ 1.42 software in HL60 cells after LMB treatment. Quantification of nuclear PCNA is expressed in arbitrary units, and the means $\pm$ S.E. of four independent experiments in which more than 100 cells in each condition have been counted are given (**, $p < 0.01$, Student's t test). *D*, effect of LMB on PCNA relocalization during granulocytic differentiation of human CD34⁺ cells. CD34⁺/CD36[–] cells were treated with LMB (10 ng/ml or with solvent for 6 h) at day 7 (upper panel) or at day 13 (lower panel) after starting granulocytic differentiation with G-CSF/SCF/IL-3. PCNA localization was analyzed with confocal microscopy as in *B*. The nuclei were visualized with Hoechst staining (original magnification $\times 630$, scale bar = 20 μ m). This representative experiment has been performed three times with identical results. *E*, quantification of nuclear fluorescence intensity in CD34⁺/CD36[–] cells at day 7 (upper panel) or at day 13 (lower panel) in the presence or absence of LMB as in *C*. Data are expressed in arbitrary units, and the means $\pm$ S.E. of three independent experiments are given (**, $p < 0.01$, Student's t test).

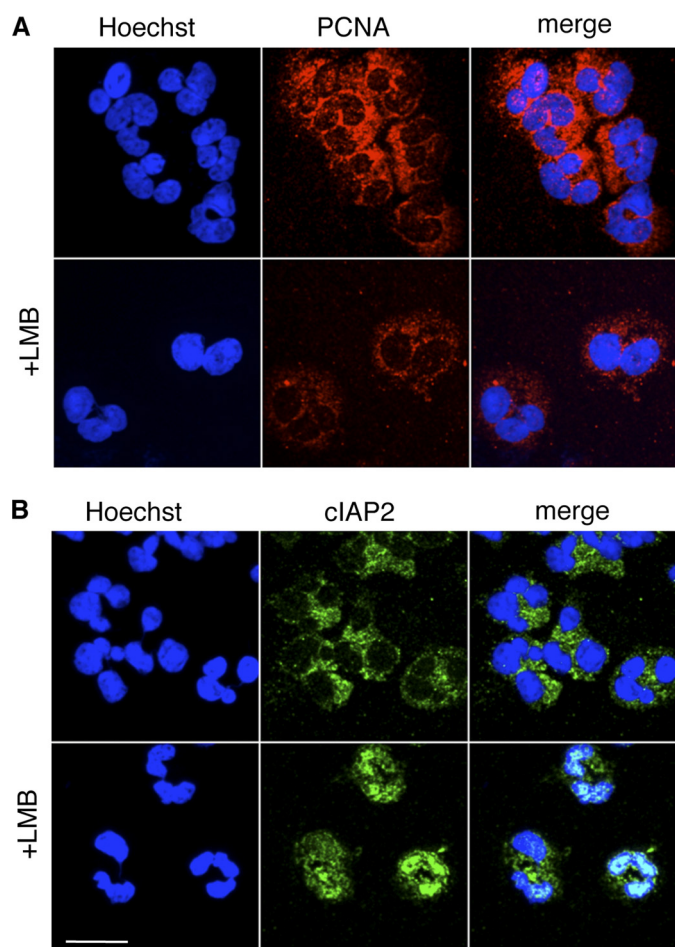


FIGURE 2. Effect of LMB on PCNA and cIAP1 localization in mature neutrophils. Neutrophils were treated with solvent (–) or with 10 ng/ml LMB (+) for 5 h, and PCNA (A) and cIAP1 (B) localization was analyzed with confocal microscopy after immunolabeling. The nuclei were visualized with Hoechst staining (original magnification $\times 630$, scale bar = 20 μm).

TABLE 1

Alignment and comparison of the putative PCNA NES with the consensus sequence for NES and with known NES

The sequences surrounding leucines 12, 16, 19, and 22 of NES1 and leucine 121, 126, valine 123, and isoleucine 128 of NES2 were compared with the consensus sequence for NES and the NES sequence of other tumor suppressors and the Rev protein and the protein kinase inhibitor (PKI) protein. Bold letters represent residues in the core region (LXL).

Consensus	FX(2,3) FX(2,3)–FXF (F = LIVFM)
NES1 PCNA(11–23)	ILKKVLEALKD L IN
NES 2 PCNA(121–128)	LDVEQ L GI
HIV-1 Rev(75–84) (25)	LQ L PPLER L TL
PKI(36–46) (24)	ELALKLAG L DI
p53(11–27) (27)	EPPLSQETFS D LWK L LP
p53(340–351) (26)	MFRELNEALE K LK
BRCA1(81–99) (28)	QLVEEL L KI I CA F Q L DT G L
CDC25B(29–40) (18)	L P G LL L GS H GLL
CDC25B(52–65) (29)	V T TL T Q T M H D L AG L

among species (Table 2) can mediate EGFP nuclear export in a CRM1-dependent manner.

The Export of Monomeric but Not Trimeric PCNA Is Dependent on NES1—To analyze whether NES1 could mediate the active export of the full-length PCNA, point mutations (L12A/L16A; L19A/L22A; L12A/L16A, and L19A/L22A) of leucine into alanine or deletions ($\Delta 12$ –16; $\Delta 19$ –22; $\Delta 12$ –16, and $\Delta 19$ –22) within NES1 were introduced into pcDNA3-HA-PCNA.

TABLE 2

Alignment of the putative PCNA human NES with the PCNA sequence of vertebrate organisms

Human	ILKKVLEALKD L I	LDVEQ L GI
Chimpanzee	ILKKVLEALKD L I	LDVEQ L GI
<i>Xenopus laevis</i>	ILKKVLEALKD L I	LDVEQ L GI
<i>Mus musculus</i>	ILKKVLEALKD L I	LDVEQ L GI

HeLa cells were then transiently transfected with these vectors, and HA-PCNA localization was assessed by indirect immunofluorescence using an anti-HA mouse monoclonal antibody (Fig. 4A). Unexpectedly, a pancellular distribution of all the NES1 mutants was observed, in contrast to the wild-type HA-PCNA (Fig. 4B). These results were the exact opposite to what we had predicted because in the absence of a functional NES, PCNA should be retained within the nucleus.

Molecular modeling analysis showed that NES1 was located within the internal face of the PCNA trimer (Fig. 5A, *left panel*) and within the DNA-interacting domain of PCNA (31), thus strongly suggesting that NES1-deleted PCNA mutant would not be retained within nucleus. In addition, due to its localization within the trimer, NES1 could not bind CRM1 in trimeric PCNA (Fig. 5A). It has previously been reported that PCNAY114A has an inability to trimerize due to a local alteration at the monomer surface (32) (Fig. 5A, *right panel*). To test the hypothesis that NES1 could mediate nuclear export in monomeric PCNA, the monomeric PCNA mutant (PCNAY114A) was generated by mutating the conserved tyrosine 114 into alanine using the pcDNA3GFP-PCNA vector, which allows fluorescent PCNA to be observed directly. HeLa cells were then transfected with pcDNA3GFP-PCNA or pcDNA3GFP-PCNAY114A. As predicted, pGFP-PCNAY114A had a pancellular distribution, in contrast to wild-type GFP-PCNA, whose localization was restricted to the nucleus (Fig. 5B). Pertinently, NES1 deletion ($\Delta 12$ –16 and $\Delta 19$ –22) in GFP-PCNAY114A abrogated PCNA nuclear export, thus confirming that NES1 was essential for monomeric PCNA export. The same results were obtained with an HA-tagged form of PCNA or PCNAY114A (data not shown). These results were in contrast to the pancellular distribution of NES1-deleted-GFP-PCNA (Fig. 5B, *lower row*) already observed with NES1-deleted HA-PCNA (Fig. 4), confirming that NES1 was not functional in the trimeric conformation of PCNA. Accordingly, LMB treatment of HeLa cells expressing the PCNAY114A mutant relocalized the cytoplasmic monomeric PCNA to the nucleus as evidenced by a strong nuclear fluorescence, strongly suggesting that its nuclear export was mediated via the CRM1 exportin (Fig. 6A). Moreover, immunolabeling of CRM1 in HeLa cells expressing either wild-type EGFP-PCNA or EGFP-PCNAY114A provided evidence that CRM1 colocalized only with the monomeric PCNA. In fact, as shown on Fig. 6B, wild-type PCNA and CRM1 are both prominently located within the nucleus, but the merged fluorescence did not result in a total colocalization. It should be noted that some yellow dots can be observed because wild-type PCNA can be either trimeric or monomeric. In contrast, the PCNAY114A that is exclusively monomeric showed a pancellular localization as described (Fig. 6B) but also showed a significant colocalization with CRM1 as evidenced by the yellow fluorescence within nucleus in the merged pictures, strongly suggesting

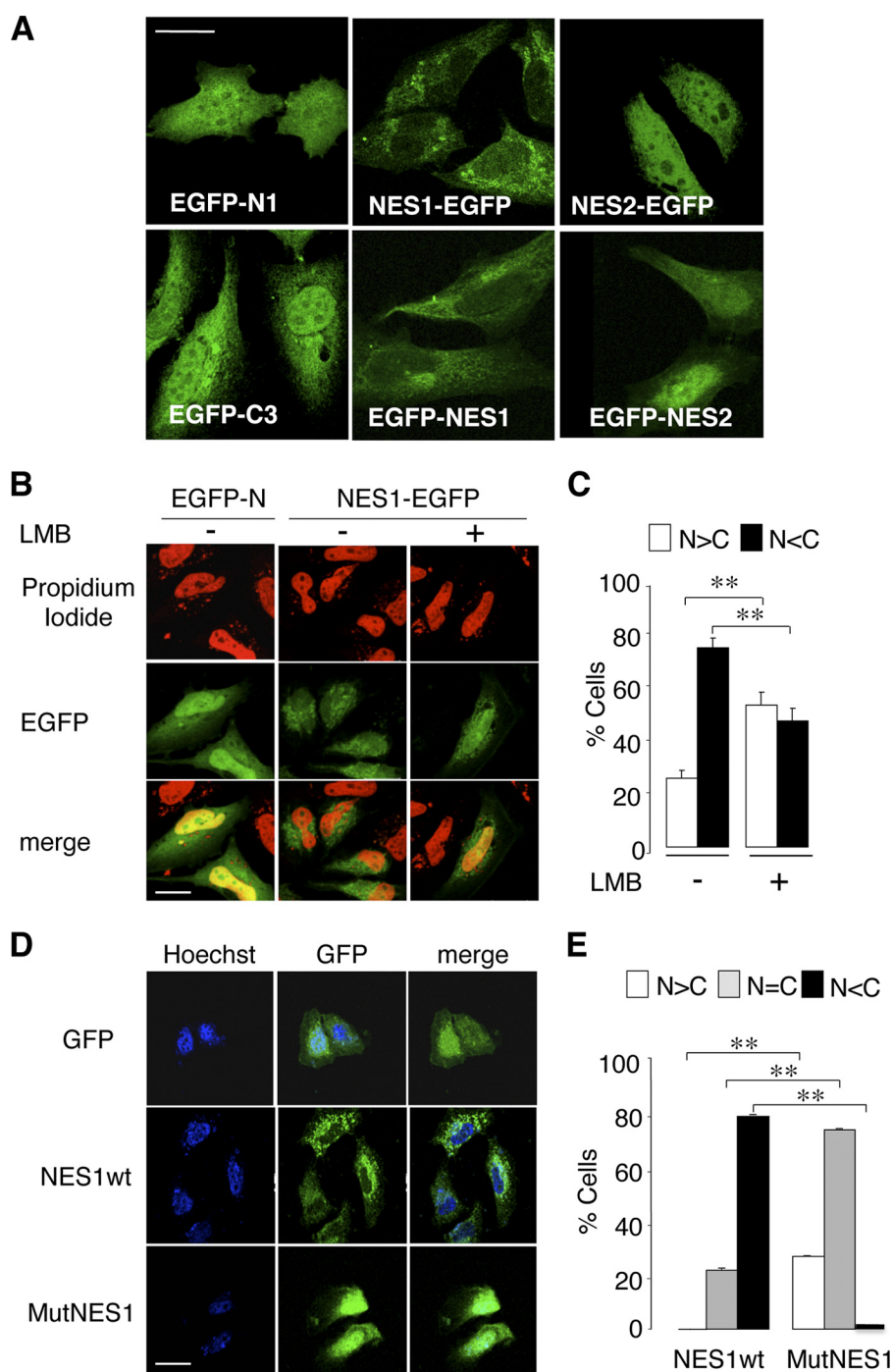


FIGURE 3. Localization and functional characterization of PCNA NES in HeLa cells. A, effect of NES1 and NES2 fusion on EGFP localization using either EGFP-N1 (upper panels) or EGFP-C3 (lower panels) plasmids, allowing us to fuse NES sequence at the amino- or carboxyl-terminal part of EGFP, respectively. HeLa cells were transfected with pEGFP-N1, pEGFP-C3, pNES1-EGFP, pEGFP-NES1, pNES2-EGFP, or pEGFP-NES2, and EGFP was detected by confocal scanning microscopy (original magnification $\times 630$, scale bar = 20 μm). B, effect of LMB on NES1-EGFP localization. HeLa cells transfected with pNES1-EGFP were treated with either ethanol solvent (–) or 20 ng/ml LMB for 6 h prior to fixation and permeabilization. HeLa cells transfected with EGFP-N1 were used as controls. Nuclei were stained with propidium iodide (original magnification $\times 400$, scale bar = 20 μm , left panel). C, the percentage of cells showing either strong nuclear localization (white bars, $N>C$) or strong cytoplasmic localization (black bars, $N<C$) was determined by direct counting. Counting was performed on a minimum of 100 transfected cells per experiment. The data are the means $\pm$ S.E. of three independent experiments, **, $p < 0.001$, ANOVA test. D, effect of leucine into alanine mutations within NES1 on the NES1-EGFP localization. HeLa cells were transfected with pEGFP-N1, pNES1-EGFP, or pMutNES1-EGFP, and EGFP was detected with confocal scanning microscopy. Nuclei were visualized with Hoechst stain (original magnification $\times 400$, scale bar = 20 μm , left panel). E, the percentages of cells showing nuclear and cytoplasmic EGFP localization were determined as in C. The data are the means $\pm$ S.E. of three independent experiments, **, $p < 0.001$, ANOVA test.

that PCNA and CRM1 are associated. Taken together, it can be concluded that NES1 was fully active in monomeric PCNA, thus revealing that PCNA cytoplasmic relocation might be regulated by its monomerization.

The Nuclear-to-cytoplasmic Relocalization during Granulocyte Differentiation Is Pivotal for PCNA Antiapoptotic Activity in Mature Neutrophils—As described previously (7), the DMF-differentiated PLB985 cells considered to be “neutrophil-like

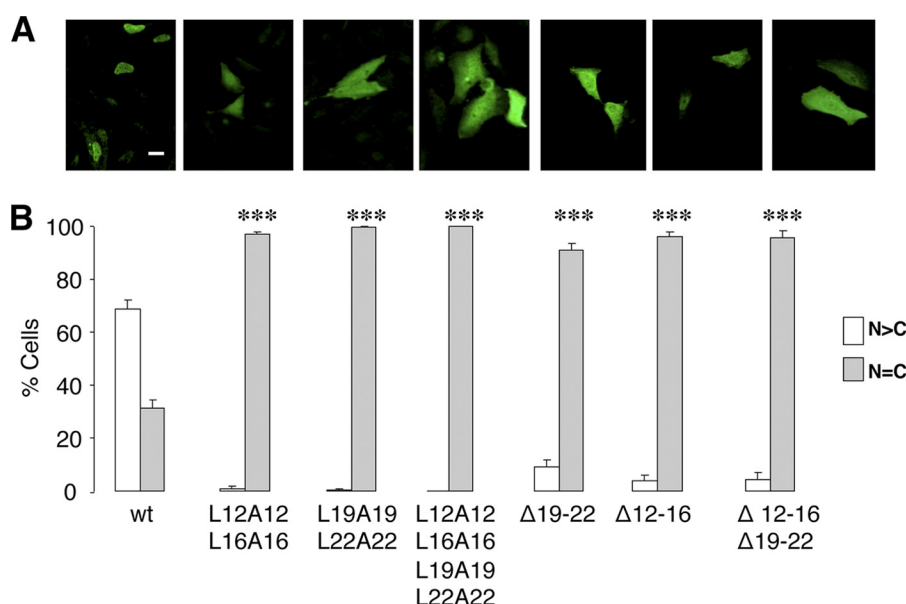


FIGURE 4. Effect of NES1 mutation on PCNA subcellular localization. A, analysis of PCNA localization by indirect immunofluorescence using mouse monoclonal anti-HA antibody in HeLa cells transfected with pcDNA3-HA-PCNA constructs containing different mutations or deletions within the PCNA NES1. The cells were visualized using epifluorescence microscopy (original magnification $\times 400$, scale bar = 20 μm). B, the percentages of cells showing strong nuclear PCNA localization (white bars, $N>C$) and pancellular localization (gray bars, $N=C$) are plotted in histograms. Counting was performed on a minimum of 100 transfected cells per experiment in three independent experiments. The data are the means $\pm$ S.E. of the three independent experiments, ***, $p < 0.001$ (ANOVA test).

cells" were used to study the impact of a modulation of PCNA localization on its antiapoptotic activity. PLB985 cells were stably transfected with a nuclear PCNA mutant referred to as SV40NLS-PCNA; indeed, as described previously, the fusion of PCNA with the SV40NLS resulted in its exclusive nuclear localization (19). As expected, overexpression of the SV40NLS-PCNA mutant resulted in PCNA nuclear localization in undifferentiated PLB985 cells, as evidenced by immunofluorescence after PCNA labeling (Fig. 7A). Likewise, an altered nuclear-to-cytoplasmic relocation was observed in DMF-differentiated PLB985-SV40NLS-PCNA, as evidenced by a residual nuclear fluorescence as compared with PLB985-PCNA due to the inability of the ectopically expressed SV40NLS-PCNA to be retained in the cytoplasm (Fig. 7B). Quantification of the nuclear immunofluorescence confirmed the statistically significant increase in nuclear fluorescence before differentiation observed in PLB985-SV40NLS-PCNA as compared with PLB985-PCNA (Fig. 7C). Although the intensity of PCNA nuclear fluorescence decreased dramatically after neutrophil differentiation in both PLB985-SV40NLS-PCNA and PLB985-PCNA, reflecting the relocation of endogenous wild-type PCNA in both cell lines, the level of nuclear PCNA was higher in PLB985-SV40NLS-PCNA as compared with PLB985-PCNA, thus validating our cellular model showing an altered cytoplasmic localization in PLB985-SV40NLS-PCNA during granulocytic differentiation. Western blot analysis of nuclear and cytosolic extracts obtained after nitrogen cavitation of PLB985-PCNA and PLB985-SV40NLS-PCNA provided evidence of an increased nuclear PCNA and a slight decrease in cytosolic PCNA in DMF-differentiated PLB985-SV40NLS-PCNA as compared with PLB985-PCNA (Fig. 7D). Of note, both cell lines contained a similar amount of PCNA (data not shown). Notably, despite a significant difference in nuclear PCNA after

differentiation in PLB985-SV40NLS-PCNA as compared with PLB985-PCNA, no difference in the CD11b expression after DMF treatment was observed between PLB985-SV40NLS-PCNA and PLB985-PCNA (Fig. 8A). We next studied whether this nuclear SV40NLS-PCNA mutant could still mediate its antiapoptotic activity in neutrophil-differentiated PLB985. Apoptosis was triggered by gliotoxin, a fungal toxin that inhibits NF- κ B (16) and directly binds to Bak to trigger mitochondrial depolarization (17). We confirmed that PLB985 cells overexpressing wild-type PCNA had a decreased gliotoxin-induced apoptosis as compared with PLB985 cells transfected with the control plasmid. This was evidenced by a decreased percentage of cells with apoptotic morphology (Fig. 8B), with mitochondrial depolarization (Fig. 8C), or with DNA fragmentation (Fig. 8D) assessed after May Grunwald Giemsa staining, DIOC6 labeling, or measuring cells in the sub- G_1 phase, respectively. As predicted, neutrophil-differentiated PLB985 cells expressing the nuclear SV40NLS-PCNA mutant failed to display antiapoptotic activity and had apoptosis rates similar to those of controls transfected with the empty plasmid, thus confirming the essential role of PCNA cytoplasmic subcellular localization in its antiapoptotic activity in mature neutrophils.

DISCUSSION

Our results demonstrated that PCNA nuclear-to-cytoplasmic relocation during granulocytic differentiation was pivotal in its antiapoptotic activity in mature neutrophils. This PCNA relocation involves an NES-mediated active export. Although low molecular mass proteins (below 60 kDa) may shuttle between nucleus and cytoplasm by passive diffusion through nuclear pores, regulated nuclear export has been suggested for several essential regulatory proteins (33–35). One of the salient findings is the identification of a novel functional

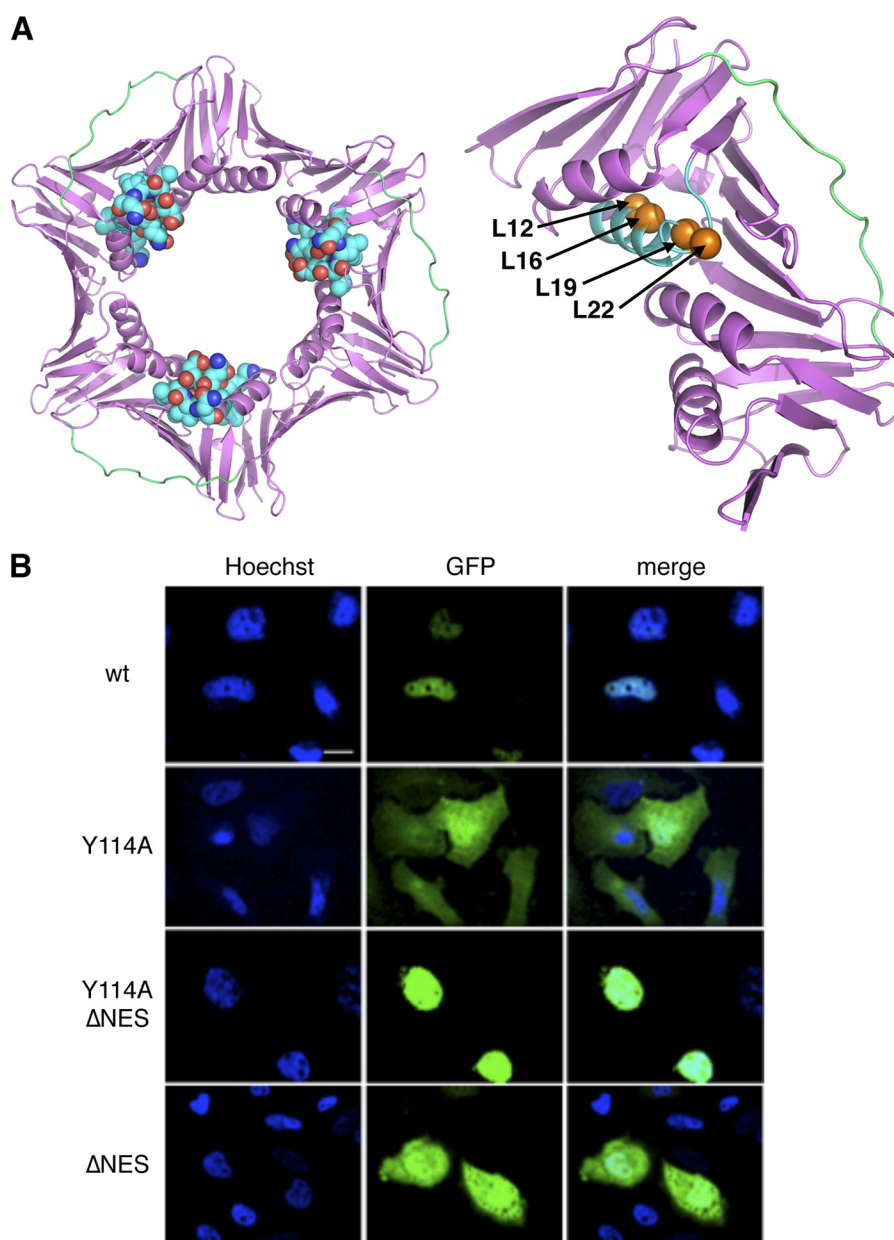


FIGURE 5. Nuclear localization of NES-deleted monomeric PCNA. *A*, tridimensional structure of trimeric and monomeric PCNA. *Left panel*: NES1 localization within the PCNA tridimensional structure (Protein Data Bank (PDB) ID: 1VYM). The interdomain connecting loop of PCNA is shown in *green*. The NES1 sequence is localized in the inner face of the PCNA trimer (*cyan central helix*). The protein is represented with graphics, and the NES1 atoms (Ile-11–Asn-23) are represented with *balls* colored following their type (nitrogen, *blue*; oxygen, *red*; carbon, *cyan*). *Right panel*: the Y114A mutation results in PCNA monomerization. The close-up of the mutated amino acids (*orange balls*) of the NES1 shows the following residues: Leu-12, Leu-16, Leu-19, and Leu-22. Both figures have been generated with PyMOL (42). *B*, analysis of GFP-PCNA localization by confocal scanning microscopy in HeLa cells transfected with pcDNA3-GFP-wtPCNA (wild-type PCNA), pcDNA3-GFP-PCNAY114A, pcDNA3-GFP-PCNAY114AΔ12–16NES1, or pcDNA3-GFP-PCNAΔ12–16NES1. Nuclei were visualized by Hoechst staining (original magnification $\times 630$, scale bar = 20 μm).

NES within the PCNA sequence located between Ile-11 and Ile-23. Indeed, this sequence fused to the EGFP protein triggered the nuclear export of the chimeric EGFP in a CRM1-dependent manner because it was inhibited by LMB. Moreover, point mutations on the critical leucine residues within the sequence totally abolished this export. Unexpectedly, point mutations or deletions of this NES within the PCNA sequence did not result in nuclear retention, but in prominent cytoplasmic localization. The exclusive cytosolic localization of PCNA observed for all the PCNA mutants containing a deletion or a mutation in NES1 was surprising. For instance, it is unlikely

that the two point mutations in the L12A/L16A would affect PCNA conformation or trimerization, as studied by molecular modeling.⁴ This increase in cytoplasmic localization of NES1-mutated PCNA might also suggest that the NES1 sequence is involved in PCNA nuclear import via its association with yet unknown NLS-containing proteins. Notably, molecular modeling analysis revealed that the residues Ile-11 to Ile-23 are buried in the trimer, and it is difficult to conceive how the export

⁴ N. Reuter and V. Witko-Sarsat, unpublished results.

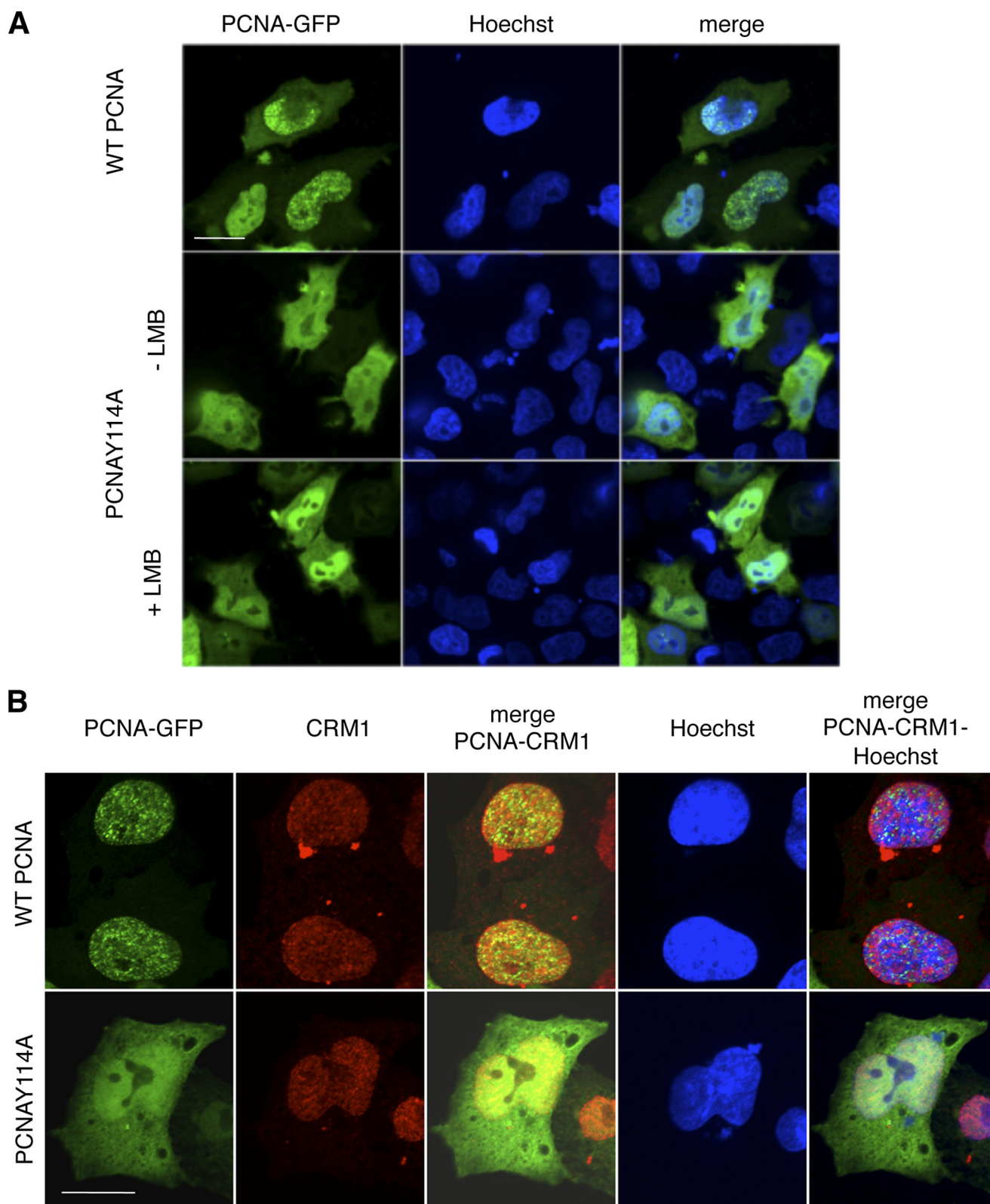
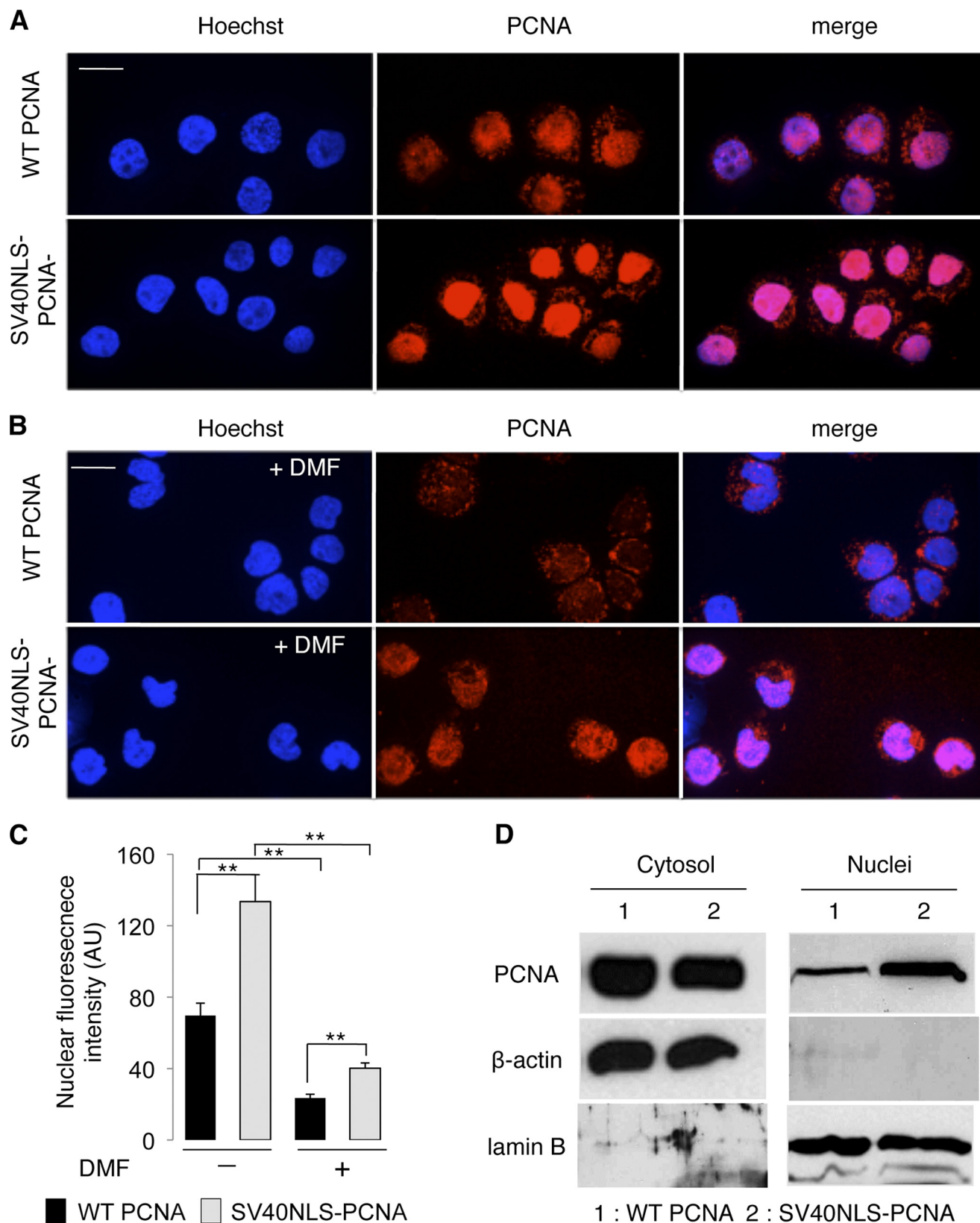


FIGURE 6. NES deletion in monomeric PCNA NES is functional in monomeric PCNA. HeLa cells were transfected with pcDNA3-GFP-wtPCNA (WT PCNA) or pcDNA3-GFP-PCNAY114A (PCNAY114A). **A**, effect of LMB on the monomeric PCNA mutant PCNAY114A. HeLa cells expressing PCNAY114A were treated with either ethanol solvent (–) or 20 ng/ml LMB for 6 h prior to fixation and permeabilization, and cells were analyzed by scanning confocal microscopy. HeLa cells transfected with pcDNA3-GFP-wtPCNA and treated with solvent were used as controls. **B**, colocalization of CRM1 with PCNAY114A but not with WT PCNA in HeLa cells. Immunofluorescence detection of CRM1 was performed using a rabbit polyclonal anti-CRM1 antibody followed by an Alexa Fluor 555-coupled goat anti-rabbit IgG, and cells were analyzed by scanning confocal microscopy. **A** and **B** show representative experiments that have been performed at least three times with similar results. The nuclei were visualized with Hoechst staining (original magnification $\times 630$, scale bar = 20 μm).

PCNA Nuclear Export in Neutrophils

machinery could be accessible in this conformation. In contrast, when PCNA is monomeric, the same residues are exposed and should be accessible to the CRM1. This hypothesis was confirmed by the observation that the PCNAY114A mono-

meric mutant, which can expose NES1, had a preferred cytosolic localization when expressed in HeLa cells. Accordingly, NES mutations in the PCNAY114A monomeric mutant resulted in a relocalization of the cytosolic PCNAY114 to the nuclear com-



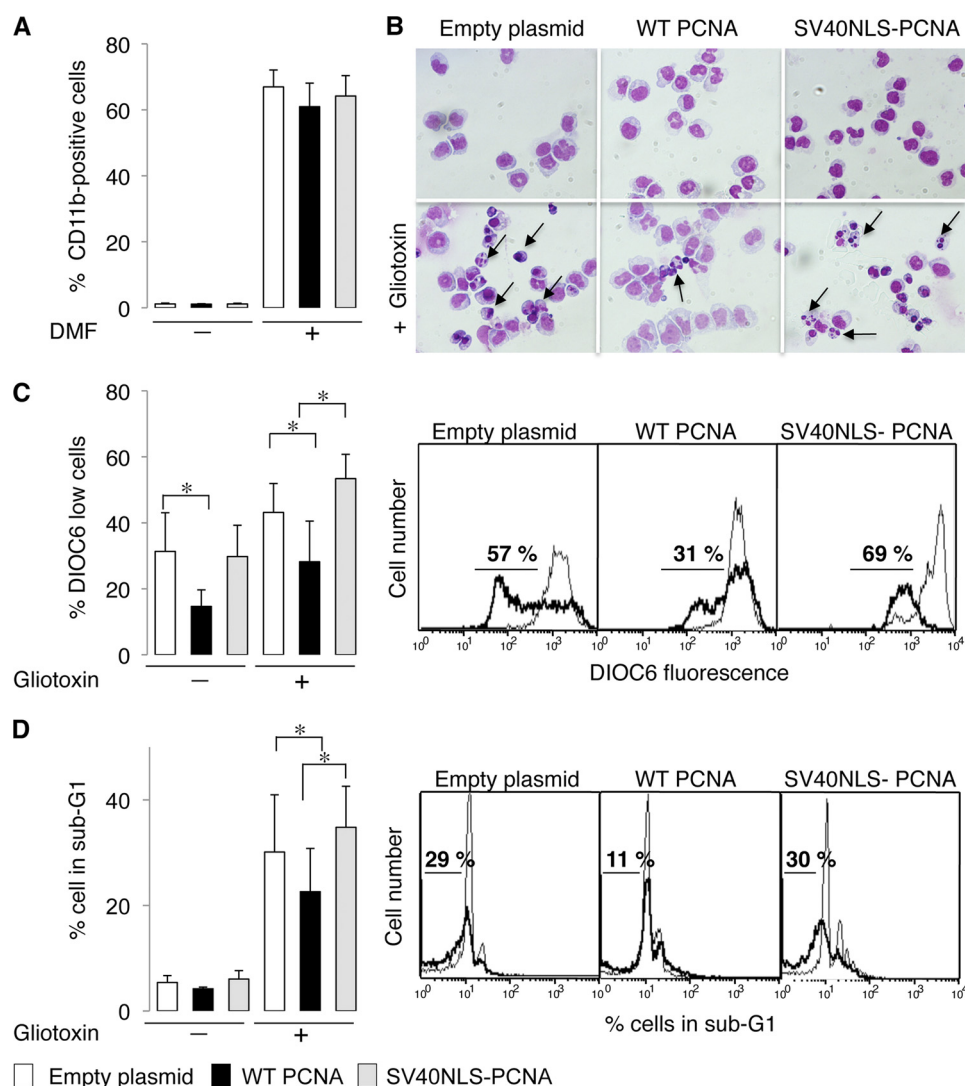


FIGURE 8. Defect in antiapoptotic activity of the nuclear SV40NLS-PCNA mutant in neutrophil-differentiated PLB985 cells. A, CD11b membrane expression in neutrophil-differentiated PLB985 cells stably overexpressing wild-type PCNA or the nuclear SV40NLS-PCNA mutant as compared with control PLB985 cells (empty plasmid). PLB985 cells were treated with DMF for 5 days to induce granulocyte differentiation. CD11b expression was measured by flow cytometry and expressed as the percentage of CD11b-positive cells. B–D, neutrophil-differentiated PLB985 cells stably overexpressing wild-type PCNA or the nuclear SV40NLS-PCNA mutant or the control PLB985 cells were incubated with or without 1 μ g/ml gliotoxin for 16 h to induce apoptosis. B, May Grunwald Giemsa staining showing cells with condensed nuclei indicative of an apoptotic morphology (shown by black arrows) in gliotoxin-treated cells (lower panels) as compared with untreated cells (upper panels). The typical experiment shown in B was representative of four independent experiments. The percentages of cells with an apoptotic morphology after gliotoxin treatment were 41.4 ± 8 , 22.5 ± 7 , and 46.9 ± 10 in PLB985-Empty plasmid, PLB985-PCNA, and PLB985-SV40NLS-PCNA, respectively. Data are means $\pm$ S.E. (more than 100 cells in each condition have been counted for each experiment). C, mitochondrial depolarization analysis after DIOC6 labeling in the neutrophil-differentiated PLB985 cells. The histogram in the left panel represents the percentage of apoptotic cells with decreased mitochondrial potential, and data are expressed as the means $\pm$ S.E. of nine independent experiments (*, $p < 0.05$, ANOVA test). Representative flow cytometry plots showing the percentage of cells with depolarized mitochondria with decreased DIOC6 labeling are depicted in the right panel. D, the percentage of neutrophil-differentiated PLB985 cells in the sub-G₁ phase showing DNA fragmentation after propidium iodide staining. The histogram on the left panel depicts the means $\pm$ S.E. of six independent experiments (*, $p < 0.05$, ANOVA test), and representative flow cytometry plots are shown in the right panel.

partment. Moreover, nuclear export of the monomeric PCNAY114A was reversed by LMB, and finally, colocalization between PCNA and CRM1 was observed only in HeLa express-

ing the monomeric PCNAY114A and not wild-type PCNA. Taken together, our data provided unambiguous evidence that NES1 could mediate monomeric PCNA export via a CRM1-de-

FIGURE 7. Localization of the SV40NLS-PCNA mutant in PLB985 cells before and after DMF-induced granulocytic differentiation. A and B, immunofluorescence analysis of PCNA localization in PLB985 cells transfected with pcDNA3-PCNA (wild-type WT PCNA) and pcDNA3-SV40NLS-PCNA before (– DMF) (A) and after (+ DMF) (B) granulocytic differentiation. Immunofluorescence analysis of PCNA was performed with the Ab5 rabbit polyclonal anti-PCNA antibody, and the cells were analyzed with scanning confocal microscopy. The nuclei were visualized with Hoechst staining (scale bar = 20 μ m). This representative experiment has been performed at least three times with similar results. C, quantification of nuclear fluorescence intensity with the ImageJ 1.42 software. WT-PCNA- and SV40NLS-PCNA-transfected PLB985 cells are represented by black and gray bars, respectively. Fluorescence intensities have been determined in more than 100 cells in each of the four conditions and were expressed in arbitrary units. Data are means $\pm$ S.E. (**, $p < 0.01$, ANOVA test). AU, arbitrary units. D, Western blot analysis of PCNA protein in nuclear (20 μ g/well) and cytosolic (10 μ g/well) fractions. β -Actin and lamin B were used as specific marker for cytosol and nuclei and as loading control, respectively.

pendent mechanism. It is noteworthy that this NES was localized precisely within the PCNA-DNA interaction domain (31) and, as such, should be masked when PCNA is bound to chromatin, therefore precluding its nuclear export. It is notable that two pools of PCNA are present within the nucleus depending its chromatin association (36). Each pool can be differentially assessed by using immunofluorescence in the presence or absence of Nonidet P-40 (37). The chromatin-bound PCNA will be Nonidet P-40-resistant, whereas soluble PCNA will be removed by Nonidet P-40 nuclear permeabilization. Pertinently, in contrast to wild-type EGFP-PCNA, NES1-deleted-EGFP-PCNA could not be detected by immunofluorescence after Nonidet P-40 treatment, thus suggesting that it was not chromatin-bound (data not shown). Taken together, our results show that the NES1, which is highly conserved between species, as shown in Table 2, can mediate chromatin association in trimeric PCNA, whereas it enhances nuclear export in monomeric PCNA. It is generally admitted that PCNA are active only in their trimeric form. For instance, PCNA mutants that were unable to form trimers have been isolated in a genetic screen as lethal mutants of *Saccharomyces pombe* PCNA (38). Likewise, in human, it has been well established that mutation of tyrosine 114 that is located within the intermonomer region is essential for both PCNA trimerization and biologic activity on polymerase- δ (32). Further investigations will thus be required to decipher the molecular events regulating PCNA monomer formation during granulocytic differentiation. Notably, in fibroblast, a selective delocalization of nuclear PCNA to cytosol was observed after serum starvation, whereas no change in subcellular localization was observed for three other nuclear antigens, namely DNA polymerase- α , c-Myc, and c-Fos, in different growth conditions (39), suggesting that PCNA nuclear-to-cytoplasmic relocalization might play a role in cells other than neutrophils.

The next relevant piece of information provided by this study is that PCNA nuclear-to-cytoplasmic relocalization occurring during granulocytic differentiation is an essential step for the antiapoptotic effect of PCNA in mature neutrophils. It has to be noted that it is impossible to transfect mature neutrophils, and the use of differentiated promyelocytic cell lines such as PLB985 has proven to be a useful (although not perfect) cellular model to perform molecular analysis of PCNA function in neutrophils (7). The constitutive nuclear form of PCNA was previously obtained by fusing the SV40NLS to PCNA, and PLB985 cells stably expressing this nuclear mutant showed an increased nuclear PCNA before and after differentiation. Nuclear mutant of PCNA did not act as a dominant negative form because nuclear-to-cytosolic relocalization of endogenous PCNA was observed in PLB985-SV40NLS-PCNA as in PLB985-PCNA. However, ectopically expressed SV40NLS-PCNA was still nuclear even after differentiation. Mechanisms involved in PCNA nuclear-to-cytoplasmic relocalization occurring during granulocytic differentiation might include other pathways than the NES1-mediated export reported here. There are certainly some possibilities that the nuclear-to-cytoplasmic relocalization of PCNA might be influenced by other as yet undetermined interacting partner proteins. Further analysis will be required to solve these issues, and a detailed analysis of the

molecular partners of cytoplasmic PCNA in mature neutrophils might provide some clues. Whatever the mechanisms that are involved, PCNA cytosolic relocalization during differentiation constitutes a pivotal event to achieve its antiapoptotic function, which we have described previously (7).

Hence, this nuclear-to-cytoplasmic PCNA relocalization could be part of the specific features of the terminal neutrophil differentiation program (40), thus allowing the survival of the neutrophils to be finely tuned. It could be foreseen that a disturbance in this PCNA relocalization might severely impair neutrophil survival and might be implicated in neutropenia, in which an increased susceptibility to neutrophil apoptosis has been suggested (41). G-CSF, the main form of treatment of neutropenia, has been found to dramatically increase PCNA levels in neutrophils *in vitro* and *in vivo* (7), thus reinforcing the belief that PCNA plays a major role in neutrophil survival control. In conclusion, similarly to p53, which contains a NES within its tetramerization domain (27), we propose a model in which, during granulocytic differentiation, PCNA subcellular localization is established through a monomerization-regulated exposure of the NES1 to the export machinery. Our work opens new tracks of research on neutrophil survival that might have therapeutical application in neutropenia.

Acknowledgments—We greatly thank Drs. Jean-Antoine Ribeil and Yaël Zermati for help in CD34 differentiation experiments, Pierre Bourdoncle of the Microscopy and Imaging facilities for technical assistance in confocal microscopy, and Laurence Stouvenel from the flow cytometry facilities in Cochin Institute (INSERM U1016).

REFERENCES

1. Borregaard, N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657–670
2. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) Neutrophils: molecules, functions, and pathophysiological aspects. *Lab. Invest.* **80**, 617–653
3. Simon, H. U. (2003) Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol. Rev.* **193**, 101–110
4. Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C., and Rossi, A. G. (2010) Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J. Innate Immun.* **2**, 216–227
5. Rossi, A. G., Sawatzky, D. A., Walker, A., Ward, C., Sheldrake, T. A., Riley, N. A., Caldicott, A., Martinez-Losa, M., Walker, T. R., Duffin, R., Gray, M., Crescenzi, E., Martin, M. C., Brady, H. J., Savill, J. S., Dransfield, I., and Haslett, C. (2006) Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis. *Nat. Med.* **12**, 1056–1064
6. Witko-Sarsat, V., Pederzoli-Ribeil, M., Hirsch, E., Sozzani, S., and Cassatella, M. A. (2011) Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol.* **32**, 117–124
7. Witko-Sarsat, V., Mocek, J., Bouayad, D., Tamassia, N., Ribeil, J. A., Candali, C., Davezac, N., Reuter, N., Mouthon, L., Hermine, O., Pederzoli-Ribeil, M., and Cassatella, M. A. (2010) Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *J. Exp. Med.* **207**, 2631–2645
8. Maga, G., and Hubscher, U. (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J. Cell Sci.* **116**, 3051–3060
9. Kim, B. J., and Lee, H. (2006) Importin- β mediates Cdc7 nuclear import by binding to the kinase insert II domain, which can be antagonized by importin- α . *J. Biol. Chem.* **281**, 12041–12049
10. Kim, B. J., and Lee, H. (2008) Lys-110 is essential for targeting PCNA to replication and repair foci, and the K110A mutant activates apoptosis.

Biol. Cell **100**, 675–686

11. Yaroslavskiy, B., Watkins, S., Donnenberg, A. D., Patton, T. J., and Steinman, R. A. (1999) Subcellular and cell cycle expression profiles of CDK-inhibitors in normal differentiating myeloid cells. *Blood* **93**, 2907–2917
12. Hino, M., Suzuki, K., Yamane, T., Sakai, N., Kubota, H., Koh, K. R., Ohta, K., Hato, F., Kitagawa, S., and Tatsumi, N. (2000) *Ex vivo* expansion of mature human neutrophils with normal functions from purified peripheral blood CD34⁺ hematopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.* **109**, 314–321
13. Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F., and Berger, R. (1991) NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood* **77**, 1080–1086
14. Moriceau, S., Kantari, C., Mocek, J., Davezac, N., Gabillet, J., Guerrero, I. C., Brouillard, F., Tondelier, D., Sermet-Gaudelus, I., Danel, C., Lenoir, G., Daniel, S., Edelman, A., and Witko-Sarsat, V. (2009) Coronin-1 is associated with neutrophil survival and is cleaved during apoptosis: potential implication in neutrophils from cystic fibrosis patients. *J. Immunol.* **182**, 7254–7263
15. Borregaard, N., Heiple, J. M., Simons, E. R., and Clark, R. A. (1983) Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell Biol.* **97**, 52–61
16. Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, Pryde JG, Fujihara S, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG. (1999) NF- κ B activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **274**, 4309–4318
17. Pardo, J., Urban, C., Galvez, E. M., Ekert, P. G., Müller, U., Kwon-Chung, J., Lobigs, M., Müllbacher, A., Wallich, R., Borner, C., and Simon, M. M. (2006) The mitochondrial protein Bak is pivotal for gliotoxin-induced apoptosis and a critical host factor of *Aspergillus fumigatus* virulence in mice. *J. Cell Biol.* **174**, 509–519
18. Davezac, N., Baldin, V., Gabrielli, B., Forrest, A., Theis-Febvre, N., Yashida, M., and Ducommun, B. (2000) Regulation of CDC25B phosphatases subcellular localization. *Oncogene* **19**, 2179–2185
19. Leonhardt, H., Rahn, H. P., Weinzierl, P., Sporbert, A., Cremer, T., Zink, D., and Cardoso, M. C. (2000) Dynamics of DNA replication factories in living cells. *J. Cell Biol.* **149**, 271–280
20. Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994) Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J. Biol. Chem.* **269**, 6320–6324
21. Vischioni, B., Giaccone, G., Span, S. W., Krut, F. A., and Rodriguez, J. A. (2004) Nuclear shuttling and TRAF2-mediated retention in the cytoplasm regulate the subcellular localization of cIAP1 and cIAP2. *Exp. Cell Res.* **298**, 535–548
22. Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J., and Cullen, B. R. (1996) Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel *in vivo* randomization-selection assay. *Mol. Cell Biol.* **16**, 4207–4214
23. la Cour, T., Kierner, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S. (2004) Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 527–536
24. Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y., and Taylor, S. S. (1995) Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463–473
25. Fridell, R. A., Bogerd, H. P., and Cullen, B. R. (1996) Nuclear export of late HIV-1 mRNAs occurs via a cellular protein export pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 4421–4424
26. Stommel, J. M., Marchenko, N. D., Jimenez, G. S., Moll, U. M., Hope, T. J., and Wahl, G. M. (1999) A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* **18**, 1660–1672
27. Zhang, Y., and Xiong, Y. (2001) A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* **292**, 1910–1915
28. Rodriguez, J. A., Schüchner, S., Au, W. W., Fabbro, M., and Henderson, B. R. (2004) Nuclear-cytoplasmic shuttling of BARD1 contributes to its proapoptotic activity and is regulated by dimerization with BRCA1. *Oncogene* **23**, 1809–1820
29. Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagawa, H., Matsunaga, T., Yoshida, M., Ishizaka, Y., and Yamashita, K. (2004) Nuclear export signal in CDC25B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 226–232
30. Alefantis, T., Barmak, K., Harhaj, E. W., Grant, C., and Wigdahl, B. (2003) Characterization of a nuclear export signal within the human T cell leukemia virus type I transactivator protein Tax. *J. Biol. Chem.* **278**, 21814–21822
31. Ivanov, I., Chapados, B. R., McCammon, J. A., and Tainer, J. A. (2006) Proliferating cell nuclear antigen loaded onto double-stranded DNA: dynamics, minor groove interactions, and functional implications. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6023–6033
32. Jönsson, Z. O., Podust, V. N., Podust, L. M., and Hübscher, U. (1995) Tyrosine 114 is essential for the trimeric structure and the functional activities of human proliferating cell nuclear antigen. *EMBO J.* **14**, 5745–5751
33. Xu, L., and Massagué, J. (2004) Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 209–219
34. Knauer, S. K., Moodt, S., Berg, T., Liebel, U., Pepperkok, R., and Stauber, R. H. (2005) Translocation biosensors to study signal-specific nucleo-cytoplasmic transport, protease activity, and protein-protein interactions. *Traffic* **6**, 594–606
35. Knauer, S. K., Mann, W., and Stauber, R. H. (2007) Survivin's dual role: an export's view. *Cell Cycle* **6**, 518–521
36. Prosperi, E. (2006) The fellowship of the rings: distinct pools of proliferating cell nuclear antigen trimer at work. *FASEB J.* **20**, 833–837
37. Scovassi, A. I., and Prosperi, E. (2006) Analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) associated with DNA. *Methods Mol. Biol.* **314**, 457–475
38. Piard, K., Baldacci, G., and Tratner, I. (1998) Single point mutations located outside the intermonomer domains abolish trimerization of *Schizosaccharomyces pombe* PCNA. *Nucleic Acids Res.* **26**, 2598–2605
39. Vríz, S., Lemaitre, J. M., Leibovici, M., Thierry, N., and Méchali, M. (1992) Comparative analysis of the intracellular localization of c-Myc, c-Fos, and replicative proteins during cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3548–3555
40. Theilgaard-Mönch, K., Porse, B. T., and Borregaard, N. (2006) Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 54–60
41. Klein, C. (2011) Genetic defects in severe congenital neutropenia: emerging insights into life and death of human neutrophil granulocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 399–413
42. DeLano, W. L. (2010) *The PyMOL Molecular Graphics System*, version 1.3r1, Schrödinger, LLC, New York

References

This article cites 41 articles, 20 of which you can access for free at:
<http://www.jbc.org/content/287/40/33812#BIBL>

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

**ROLES DU PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN ET DE P21/WAF1, PROTEINES
REGULATRICES DU CYCLE CELLULAIRE DANS L'APOPTOSE DU POLYNUCLEAIRE
NEUTROPHILE:**

INTERET POTENTIEL DANS LA MODULATION DE L'INFLAMMATION

Julie Mocek

Notre laboratoire s'intéresse à la régulation de la balance survie/apoptose du polynucléaire neutrophile, phénomène important dans la résolution de l'inflammation. En effet, le polynucléaire neutrophile a un rôle essentiel dans la défense infectieuse mais il possède également un fort potentiel pro-inflammatoire, à cause des médiateurs hautement toxiques qu'il peut libérer lorsqu'il est stimulé. Le "Proliferating Cell Nuclear Antigen" (PCNA) est une protéine de 36 kDa conservée au cours de l'évolution. C'est une protéine indispensable à la prolifération cellulaire de par son rôle dans la réplication et la réparation de l'ADN. L'implication de PCNA dans la régulation de l'apoptose a également été mise en évidence mais cette propriété de PCNA est jusqu'à présent restreinte aux cellules proliférantes. De manière intéressante, la présence de PCNA dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles, cellules en fin de différenciation et qui ne prolifèrent pas, a été observée au laboratoire. L'objectif de mon travail a porté sur l'étude des fonctions de PCNA dans la balance survie / apoptose du neutrophile ainsi que son mécanisme d'action.

L'analyse *in vitro* des polynucléaires neutrophiles isolés de prélèvements sanguins de sujets sains a permis d'identifier une nouvelle fonction de PCNA: un rôle anti-apoptotique dans le cytosol du polynucléaire neutrophile. En effet, nous avons montré une corrélation entre la survie du polynucléaire neutrophile et l'expression accrue de PCNA dans son cytosol. Cette observation est vraie pour une apoptose constitutive ou pharmacologique (induite par la gliotoxine, inhibiteur de la voie NFκB ou par l'anti-Fas, agissant par la voie des récepteurs de mort). Nous avons ensuite analysé les mécanismes par lesquels PCNA est anti-apoptotique. Le peptide "p21 carboxy-terminal" provenant de l'inhibiteur de kinases cycline-dépendantes p21, augmente l'apoptose du polynucléaire neutrophile en entrant en compétition avec des partenaires de PCNA. Nous avons également identifié de nouveaux partenaires de PCNA dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles par des approches de co-immunoprécipitation, en particulier les pro-caspases-3, -8, -9 et -10. PCNA séquestrerait les pro-caspases et aurait ainsi un rôle dans la survie du polynucléaire neutrophile.

Le rôle anti-apoptotique de PCNA a été confirmé dans des cellules myéloïdes (PLB-985) différenciées en polynucléaires neutrophiles et stablement transfectées avec l'ADN complémentaire de PCNA. Le mutant de PCNA dans le domaine *interdomain-connecting loop* (ICL) a été également transfecté dans les cellules PLB-985. Après différenciation de ces cellules en polynucléaires neutrophiles, ce mutant, contrairement à la protéine sauvage, ne présentait pas l'activité anti-apoptotique. Ces résultats suggèrent que la fixation de partenaires protéiques sur le domaine d'interaction ICL pourrait être responsable de l'activité anti-apoptotique de PCNA. Grâce à la même approche, nous avons montré l'effet pro-apoptotique de la protéine p21 dans les cellules PLB-985 différenciées en polynucléaires neutrophiles.

Mon projet a permis l'identification de nouvelles protéines dont l'expression est modulée au cours de l'apoptose du polynucléaire neutrophile. Nous avons déterminé les fonctions des protéines PCNA et p21 dans le cytosol des polynucléaires neutrophiles, respectivement anti-apoptotique et pro-apoptotique. Ces résultats permettent donc une meilleure compréhension des mécanismes de l'apoptose des polynucléaires neutrophiles et donc, par voie de conséquence, potentiellement de nouvelles voies de recherche à explorer pour des traitements anti-inflammatoires.

Mots clés: polynucléaire neutrophile - apoptose - inflammation - PCNA - p21