



HAL
open science

Étude de l'interaction entre les immunoglobulines A sécrétoires et la cellule épithéliale intestinale humaine

Benoit Clement

► **To cite this version:**

Benoit Clement. Étude de l'interaction entre les immunoglobulines A sécrétoires et la cellule épithéliale intestinale humaine. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB048 . tel-02426225

HAL Id: tel-02426225

<https://theses.hal.science/tel-02426225v1>

Submitted on 2 Jan 2020

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.

Université Paris Descartes

Année universitaire 2017 – 2018

THÈSE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES
Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Benoît CLÉMENT

Le Vendredi 20 Octobre 2017

**Étude de l'interaction entre les immunoglobulines A
sécrétoires et la cellule épithéliale intestinale humaine**

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC)

Inserm UMR 1163 – Institut IMAGINE – Laboratoire d'immunité intestinale

	Jury :
Co-directrices de thèse :	Dr Nadine CERF-BENSUSSAN
	Pr Georgia MALAMUT
Rapporteurs :	Pr Michel COGNÉ
	Dr Blaise CORTHÉSY
Examineurs :	Pr Olivier HERMINE
	Dr Guillaume MONTAGNAC
	Pr Renato MONTEIRO
	Dr Armelle PHALIPON

Remerciements

Ces quatre années de thèse auront été une expérience de vie unique. Outre l'aspect scientifique et les changements opérés sur ma façon de raisonner, la thèse aura été pour moi une période d'intense remise en question et de développement personnel. Face à cette multitude de changements, j'adresse mes remerciements à celles et ceux qui, de par leur amour, leur écoute et leur soutien m'ont permis de ne pas perdre pied et de donner le meilleur de moi-même. À ma femme (Mathilde), mes parents (Laurent et Françoise), mon frère, ma sœur et leur conjoint(e) (Noël, Adeline, Céline & Guillaume) : La famille est une force inouïe et sans limite !

Je tiens aussi à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ces travaux : Pr M. Cogné, Dr B. Corthésy, Pr O. Hermine, Dr G. Montagnac, Pr R. Monteiro et Dr A. Phalipon.

Je souhaite remercier toutes celles et ceux qui m'ont formé et accompagné dans cette aventure scientifique,

Merci à mes deux co-directrices de thèse, Nadine Cerf-Bensussan & Georgia Malamut, de m'avoir permis de rejoindre cette équipe et de m'avoir encadré pendant ces quatre années. Merci à Nadine pour ton exemple de disponibilité, de passion pour ton métier et de rigueur.

Corinne, merci pour ton engagement passionné et ton envie de développer sans cesse de nouvelles approches microscopiques innovantes.

Roman, tu as malheureusement (pour toi !) été celui avec lequel j'ai partagé mon calendrier iCal... Merci pour ton dynamisme, ta bonne humeur et ton aide durant ces deux dernières années. Je te souhaite de tout cœur de concrétiser de belles choses durant ta thèse !

Clément Madru. À la fin de l'été 2016, branle-bas de combat : « Il nous faut absolument un système de chromatographie opérationnel pour séparer nos IgA. » Tu t'es porté volontaire pour nous aider. Merci pour ta disponibilité sans laquelle rien n'aurait été possible !

Les copains du bureau, Marion et Nicolas G pour tous ces moments de culture générale (Les 2 min du peuple, la chanson de Jonathan et autres découvertes culturelles...) et pour l'approvisionnement régulier en glucides simples nécessaires au bon fonctionnement de nos cerveaux.

Le copain d'un lointain bureau, Rémi. On a été obligé de te garder à distance de Roman pour éviter tout conflit footballistique (et aussi pour pouvoir bosser tranquillement). Nos petits cafés du matin en tête à tête resteront à jamais gravés dans mon cœur... ☺

Les deux post-doc' du bocal d'en face, Marianna & Sascha. Que dire à part que c'est un bureau fort agréable où on trouve très souvent quelque chose à manger quand on n'a plus rien dans notre bureau ! (On y trouve aussi de très bons conseils scientifiques !)

Matthias. Vous ne vous y trompez pas, Matthias n'est pas membre du labo mais on pourrait dire qu'on l'a presque adopté ! Rien de tel qu'une petite discussion de bon matin, café à la main ! Merci pour tous tes conseils en biomol.

Sofia, pour la culture musicale que tu auras tenté de me transmettre (en vain)...

Iris, la plus tyrannique d'entre nous. Je suis obligé de te mentionner sinon je risque gros !

Bernadette. Les étudiants passent et repassent, Bernadette, elle, est toujours là. Personne ne connaît vraiment son âge... Des rumeurs courent qu'elle aurait vu l'extinction des dinosaures mais elle n'en a jamais dit mot...

Je n'oublie pas non plus les amis croisés au cours de ma thèse : Bertrand, Nicolas M (avec cette mention, j'espère qu'on aura une ristourne sur notre prochaine commande d'anticorps !), Rute, Ségolène et Julien.

Enfin, je ne peux terminer ces remerciements sans mentionner :



FONDATION
BETTENCOURT
SCHUELLER

L'École de l'Inserm – Liliane Bettencourt (EdILB) qui m'a permis de réaliser cette thèse précoce. Mes remerciements sont particulièrement adressés à J.-C. Chottard, pour son dynamisme sans égal, à J.-C. Thalabard pour son écoute, ainsi qu'à Barro Sow pour sa réactivité et ses réponses à toutes mes questions !

Je n'ai malheureusement pas échappé à la règle qui fait que tout doctorant acquiert la majorité de ses résultats durant sa dernière année de thèse. J'adresse ainsi tous mes remerciements à l'Institut IMAGINE pour l'attribution de cette (indispensable) bourse de 4^{ème} année.

imagine
INSTITUT DES MALADIES GÉNÉTIQUES

Merci à tous de m'avoir permis de donner le meilleur de moi-même !

Table des figures

Figure I.1 : Structure d'une IgA monomérique humaine.	14
Figure I.2 : Structure des différentes sous-classes et allotypes d'IgA humains.....	16
Figure I.3 : Structure d'une IgA1 dimérique humaine.....	17
Figure I.4 : Structure d'une IgA1 sécrétoire humaine.....	18
Figure I.5 : Profil des O-glycosylations des IgA1 sériques humaines.....	20
Figure I.6 : Profil des N-glycosylations des IgA sécrétoires du colostrum.....	21
Figure I.7 : Mécanisme de commutation isotypique d'IgM en IgA1.....	24
Tableau I.1 : Biodistribution des IgA humaines.....	25
Figure I.8 : Le récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR).....	28
Figure I.9 : Le récepteur au Fc des IgA (Fc α RI).....	29
Figure I.10 : Le récepteur au Fc des IgA et des IgM (Fc α / μ R).....	31
Figure I.11 : Le récepteur à la transferrine (CD71).....	33
Figure I.12 : Le récepteur à l'asialoglycoprotéine (ASGPR).	35
Figure I.13 : DC-SIGN.....	36
Figure I.14 : Dectine-1.....	38
Figure I.15 : Siglec-5.	40
Figure I.16 : Le récepteur macrophagique au mannose (MMR).....	41
Figure I.17 : Le récepteur de type récepteur au Fc 4 (CD307d).....	42
Figure I.18 : Les galectines-1, -3 et -8.	43
Figure I.19 : L'enzyme β -1,4-galactosyltransférase 1 (b4Gal-T1).	45
Figure I.20 : La protéine contenant un motif tripartite 21 (TRIM21).	46
Figure I.21 : Le récepteur de type récepteur au Fc A (FcRLA).	48
Tableau I.2 : Synthèse des principales caractéristiques des récepteurs et protéines interagissant avec les IgA	50
Tableau II.1 : Séquences guides CRISPR-Cas9.	64
Tableau II.2 : Anticorps et réactifs utilisés en cytométrie en flux.	66
Tableau II.3 : Anticorps et réactifs utilisés en western-blot.....	68
Tableau II.4 : Anticorps utilisés en immunoprécipitation.....	71
Tableau II.5 : Sondes TaqMan™ utilisées en qPCR.....	75
Tableau II.6 : Anticorps utilisés en microscopie.	79

Figure III.1 : Caractérisation de la lignée Caco-2 TC7 dépourvue de CD71 de manière stable (lignée TFRC_em).	83
Figure III.2 : Étude par cytométrie en flux de la fixation d'IgA sur différentes lignées d'IEC humaines dépourvues ou non de CD71.	86
Figure III.3 : Étude de la fixation des IgA en système d'expression hétérologue de CD71 humain et immunoprécipitations.	88
Figure III.4 : Étude de l'interaction entre CD71 et les IgA sur les cellules Caco-2 TC7 par PLA et FRET-FLIM.	91
Figure III.5 : Étude des paramètres de fixation des SIgA à la surface des cellules Caco-2 TC7.	93
Figure III.6 : Étude de l'expression des gènes codant les protéines capables d'interagir avec les IgA, par RT-qPCR et western-blot.	94
Figure III.7 : Étude de trois protéines candidates capables d'interagir avec les SIgA.	95
Figure III.8 : Identification de(s) récepteur(s) aux SIgA par IP-MS.	97
Figure III.9 : Représentations schématiques des protéines identifiées par IP-MS.	98
Figure III.10 : Étude de l'interaction entre SCAMP3 et les IgA sur les cellules Caco-2 TC7.	100
Figure III.11 : Étude de l'interaction entre BCAP31 et les IgA dans les cellules Caco-2 TC7.	102
Figure III.12 : Étude de l'interaction entre HM13 et les IgA dans les cellules Caco-2 TC7.	104
Figure III.13 : Étude de l'interaction entre SCAMP3 et CD71 dans les cellules Caco-2 TC7.	106
Figure III.14 : Étude de l'interaction entre SCAMP3 et les IgA sur les cellules TFRC_em.	107
Figure III.15 : Étude de l'interaction CD71-IgA sur les cellules SCAMP3^{KO}	109
Figure III.16 : Étude des interactions HM13-IgA et BCAP31-IgA dans les cellules TFRC_em et SCAMP3^{KO}.	111
Figure III.17 : Étude de l'endocytose des IgA par les cellules Caco-2 TC7.	113
Figure IV.1 : Représentation hypothétique des complexes protéiques formés par les pIgA_{1M} et les SIgA à la surface des cellules Caco-2 TC7.	124
Figure supplémentaire 1 : Séparation des différentes formes d'IgA à partir des échantillons commerciaux.	152
Figure supplémentaire 2 : SCAMP3 semble former des dimères stables dans les cellules Caco-2 TC7.	153

Table des matières

Table des figures.....	2
Table des matières.....	4
Résumé.....	7
Liste des abréviations.....	8
Avant-propos.....	11
I. INTRODUCTION.....	13
CHAPITRE 1 : Les immunoglobulines A.....	14
1. Structure biochimique des immunoglobulines A.....	14
1.1. Les IgA monomériques.....	14
1.2. Les IgA polymériques.....	17
1.3. Les IgA sécrétoires.....	18
1.4. Les glycosylations des IgA.....	20
1.4.1. Les O-glycosylations.....	20
1.4.2. Les N-glycosylations.....	21
2. Synthèse et biodistribution des IgA.....	23
CHAPITRE 2 : Les récepteurs et protéines interagissant avec les IgA.....	27
1. Récepteurs au Fc des IgA.....	27
1.1. Le récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR).....	27
1.2. Le récepteur au Fc des IgA (CD89).....	29
1.3. Le récepteur au Fc des IgA et des IgM (CD351).....	31
1.4. Le récepteur à la transferrine (CD71).....	32
2. Récepteurs aux IgA de type lectine.....	34
2.1. Le récepteur à l'asialoglycoprotéine (ASGPR).....	34
2.2. DC-SIGN (CD209).....	36
2.3. Dectine-1 (CD369).....	38
2.4. Siglec-5 (CD170).....	39
2.5. Le récepteur macrophagique au mannose (CD206).....	40
3. Autres récepteurs et protéines solubles.....	42
3.1. Le récepteur de type récepteur au Fc 4 (CD307d).....	42
3.2. Les galectines (Gal-1, Gal-3 et Gal-8).....	43
3.3. La β -1, 4-galactosyltransférase 1 (b4Gal-T1).....	44
4. Récepteurs et protéines intracellulaires.....	46
4.1. La protéine contenant un motif tripartite 21 (TRIM21).....	46
4.2. Le récepteur de type récepteur au Fc A (FcRLA).....	47
5. Les récepteurs aux IgA non identifiés.....	48
5.1. Récepteur(s) aux IgA monomériques.....	48
5.2. Récepteur(s) aux IgA sécrétoires.....	49
CHAPITRE 3 : Les fonctions des IgA intestinales en relation avec l'épithélium.....	51
1. L'exclusion luminale.....	51

1.1.	Exclusion dépendante de la spécificité antigénique.....	51
1.2.	Exclusion indépendante de la spécificité antigénique.....	52
1.3.	Exclusion immune.....	53
1.4.	Effets sur la virulence bactérienne.....	54
2.	La neutralisation intracellulaire.....	55
3.	L'excrétion luminale.....	55
4.	La transcytose inverse.....	56
4.1.	La transcytose inverse physiologique, la cellule M.....	56
4.2.	La transcytose inverse pathologique, l'entérocyte et la maladie cœliaque.....	57
	Justification et objectifs du travail de thèse.....	59
II.	MÉTHODOLOGIE.....	61
1.	Préparations d'immunoglobulines.....	62
2.	Culture cellulaire.....	62
2.1.	Expression hétérologue de CD71 humain.....	63
2.2.	Extinction de gènes par la technologie CRISPR-Cas9.....	63
3.	Cytométrie en flux.....	64
3.1.	Expériences de fixation des IgA et de l'holotransferrine.....	65
3.2.	Expériences d'endocytose des IgA.....	65
3.3.	Anticorps et réactifs utilisés en cytométrie en flux.....	66
4.	Western-blot.....	67
4.1.	Préparation des lysats protéiques.....	67
4.2.	Réalisation du western-blot.....	67
4.3.	Anticorps et réactifs utilisés en western-blot.....	68
5.	Immunoprécipitation.....	69
5.1.	Couplage des anticorps aux billes magnétiques.....	69
5.2.	Biotinylation de surface.....	69
5.3.	Immunoprécipitation en lysat total.....	69
5.4.	Co-immunoprécipitation sur cellules adhérentes ou en suspension.....	70
5.5.	Quantification protéique.....	71
6.	Identification de protéines par spectrométrie de masse.....	71
6.1.	Préparation des échantillons.....	72
6.1.1.	Digestion tryptique sur gel.....	72
6.1.2.	Digestion tryptique sur filtre (FASP).....	72
6.2.	Analyse des échantillons par spectrométrie de masse.....	73
6.2.1.	Sélection des candidats identifiés par spectrométrie de masse.....	74
7.	PCR quantitative en temps réel (qPCR).....	74
7.1.	Extraction des ARN cellulaires.....	74
7.2.	Synthèse des ADN complémentaires par transcription inverse.....	75
7.3.	PCR quantitative en temps réel.....	75
8.	Microscopie.....	76
8.1.	Culture cellulaire.....	76
8.2.	FRET par FLIM.....	76
8.3.	Expériences de ligation de proximité (PLA).....	77
8.4.	Microscopie confocale par déplétion par émission stimulée (STED).....	78
8.5.	Anticorps utilisés en microscopie.....	79

9. Mise en forme des données et statistiques.....	79
III. RÉSULTATS	81
1. Réévaluation de l'interaction entre CD71 et les IgA.....	82
1.1. Établissement d'une lignée cellulaire stable dépourvue de CD71.....	82
1.2. Étude de la capacité de fixation de différentes formes d'IgA par les cellules dépourvues de CD71.....	84
1.3. Réévaluation de l'interaction entre les SIgA et CD71.....	87
2. Caractérisation des paramètres de fixation des SIgA et identification de partenaires du complexe protéique.....	92
2.1. Paramètres de fixation des SIgA à la surface des cellules Caco-2 TC7.....	92
2.2. Criblage d'expression des récepteurs et protéines interagissant avec les IgA décrits dans la littérature.....	93
2.3. Les galectines-3, -8 et l'enzyme b4Gal-T1, trois candidates potentielles.....	95
2.4. Recherche de candidat(s) récepteur(s) aux SIgA par IP-MS.....	96
3. Confirmation des candidats obtenus par IP-MS.....	99
3.1. Secretory carrier-associated membrane protein 3 (SCAMP3).....	99
3.2. B-cell receptor-associated protein 31 (BCAP31).....	101
3.3. Histocompatibility minor 13 (HM13).....	103
4. Organisation du complexe de fixation des SIgA.....	105
4.1. Dynamique de l'interaction entre SCAMP3, CD71 et les IgA.....	105
4.2. Dynamique de l'interaction entre HM13, BCAP31 et les IgA.....	110
5. Rôle fonctionnel des membres du complexe de fixation des SIgA.....	112
IV. DISCUSSION & PERSPECTIVES.....	115
1. Interaction directe entre CD71 et les pIgA.....	116
2. Interaction indirecte entre CD71 et les SIgA.....	117
3. Recherche du(des) protéine(s) responsable(s) de la fixation des SIgA.....	118
4. Modèle d'organisation du complexe de fixation des SIgA.....	120
5. Transport du complexe protéique à travers l'IEC.....	126
6. Existence et conséquences fonctionnelles de cette interaction <i>in vivo</i>	127
V. CONCLUSION	131
VI. BIBLIOGRAPHIE	133
VII. ANNEXES	151

Résumé

Parmi les cinq isotypes d'anticorps présents chez l'Homme, les immunoglobulines A (IgA) prédominent dans les muqueuses. Les IgA sont produites dans le chorion sous forme majoritairement polymérique (pIgA) et sécrétées dans la lumière des muqueuses. Leur transport trans-épithélial est assuré par le récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR), exprimé au pôle basal des épithéliums. Les pIgA ainsi sécrétées conservent le domaine extracellulaire du pIgR et sont appelées IgA sécrétoires (SIgA).

Une fonction essentielle des SIgA intestinales est de maintenir microorganismes et antigènes alimentaires dans la lumière des muqueuses afin d'empêcher leur pénétration dans l'organisme. Néanmoins, la transcytose inverse des SIgA couplées à des bactéries a été décrite dans les plaques de Peyer où elle participe à la génération de la réponse immune contre ces bactéries. En outre, les travaux passés du laboratoire ont suggéré que le récepteur de la transferrine (CD71), surexprimé au pôle apical des entérocytes chez les patients cœliaques, interagit avec les SIgA couplées à des peptides de gliadines et permet leur transcytose inverse à travers l'épithélium intestinal.

Ce travail de thèse a eu pour objectif de mieux caractériser l'interaction SIgA-CD71 dans les entérocytes humains.

Dans un premier temps, nous avons utilisé la technologie CRISPR-Cas9 pour générer une lignée cellulaire intestinale humaine (Caco-2 TC7) dépourvue du récepteur CD71 (CD71^{KO}). De manière inattendue, nous n'avons observé aucune altération de la fixation des SIgA sur les cellules Caco-2 CD71^{KO}. Ce résultat nous a amenés à réévaluer le rôle de CD71 comme récepteur aux SIgA.

Dans un second temps, nous avons vérifié et confirmé que les SIgA interagissent avec CD71, mais nous avons montré que cette interaction est indirecte. Nous avons ensuite criblé les récepteurs aux IgA déjà décrits dans la littérature et montré qu'aucun n'est responsable de la fixation des SIgA à la surface des cellules Caco-2 TC7. Ces résultats nous ont amenés à chercher le(s) autre(s) partenaire(s) du complexe SIgA-CD71. Par immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse, nous avons identifié les protéines Secretory Carrier Membrane Protein 3 (SCAMP3), B-Cell Receptor-Associated Protein 31 (BCAP31) et Histocompatibility minor 13 (HM13) comme membres du complexe SIgA-CD71. En nous appuyant à nouveau sur la technologie CRISPR-Cas9, nous avons montré qu'aucun de ses partenaires n'interagit directement avec les SIgA. Néanmoins, nos résultats suggèrent que SCAMP3 est nécessaire à l'oligomérisation de surface des complexes de fixation des SIgA. Enfin, l'internalisation des SIgA n'est pas altérée par l'absence de chacun des partenaires du complexe, suggérant que leur rôle advient durant le transport trans-épithélial des SIgA.

L'ensemble de nos travaux montre que les SIgA interagissent avec l'épithélium intestinal via un complexe protéique composé d'au moins cinq membres : CD71, SCAMP3, BCAP31, HM13 et le(s) récepteur(s) inconnu(s) aux SIgA. Ces résultats complètent les travaux antérieurs sur le rôle physiopathologique des SIgA dans la maladie cœliaque et contribuent à souligner la complexité des interactions entre IgA et entérocytes. Une question importante sera d'identifier le(s) récepteur(s) aux SIgA et de déterminer le rôle des partenaires identifiés dans la transcytose inverse des SIgA par l'entérocyte.

Mots clés : Immunoglobuline A sécrétoire, SIgA, CD71, SCAMP3, BCAP31, HM13, entérocyte

Liste des abréviations

aa : Acide aminé	CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
ABC : bicarbonate d'ammonium	CRD : Domaine de reconnaissance des sucres
ACN : Acétonitrile	CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
ADIN : Neutralisation intracellulaire dépendante des anticorps	CSR : Commutation isotypique
ADN : Acide désoxyribonucléique	C _{ter} : C-terminal
ADNc : ADN complémentaire	CX3CR1 : C-X3-C motif chemokine receptor 1
AID : Cytidine désaminase induite par activation	CXCL12 : C-X-C motif chemokine ligand 12
Ala : Alanine (A)	CXCR4 : C-X-C motif chemokine receptor 4
APC : Allophycocyanine	Cys : Cystéine (C)
APRIL : A proliferation-inducing ligand	DAMP : Motif moléculaire associé à un signal de danger
Arg : Arginine (R)	DAPI : 4',6-diaminido-2-phénylindole
ARN : Acide ribonucléique	DC : Cellule dendritique
ASC : Cellule sécrétrice d'anticorps	DC-SIGN : Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin 1
ASGPR : Récepteur à l'asialoglycoprotéine	Dectine-1 : Dendritic cell-associated C-type lectin 1
Asn : Asparagine (N)	dIgA : IgA dimérique
B30.2/SPRY : B30-2, after splA and the ryanodine receptor domain	dNTP : désoxynucléotide triphosphate
b4Gal-T1 : béta-1,4-galactosyltransférase 1	EC1 : Domaine extracellulaire conservé 1
BAFF : B-cell activating factor of the TNF family	EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique acide édétique
BAFF-R : Récepteur de BAFF	EEA1 : Early endosome antigen 1
BCAP31 : B-cell receptor-associated protein 31	EGF : Epidermal growth factor
BCMA : B-cell maturation antigen	EGFR : Récepteur à l'EGF
BCR : B-cell receptor	ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
BSA : Albumine bovine sérique	EPO : Érythropoïétine
Ca ²⁺ : ion calcique	ERAD : Voie de dégradation associée au RE
CCD : Caméra à dispositif à transfert de charges	ESCRT : Endosomal sorting complexes required for transport
CCL25 : C-C motif chemokine ligand 25	Fab : Fragment de fixation à l'antigène
CCR9 : C-C motif chemokine receptor 9	FAE : Épithélium associé aux follicules
CD40L : CD40 ligand	FASP : Filter-aided sample preparation
CD71 : Cluster de différenciation CD71	Fc : Fragment cristallisable
CeD : Maladie cœliaque	FcRL4 : Récepteur de type récepteur au Fc 4
Cellule M : Cellule microfold	Fcγ : Sous-unité gamma de récepteur au Fc
CFTR : Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	FCS : Fluorescence correlation microscopy
CFU : Unité de formation de colonies	Fcα/μR : Récepteur au Fc des IgA et des IgM
C _H : Domaine constant de la chaîne lourde d'immunoglobuline	FcαRI : Récepteur au Fc des IgA
chaîne J : Chaîne de jonction	FLIM : Fluorescence lifetime imaging microscopy
CHAPS : 3-((3-cholamidopropyl)diméthylammonio)-1-propanesulfonate	FRET : Transfert d'énergie de fluorescence par résonance
C _L : Domaine constant de la chaîne légère d'immunoglobuline	Gal : Galactose

Gal-1 : Galectine 1
GalNAc : N-acétylgalactosamine
GALT : Tissu lymphoïde associé à l'intestin
GAP : Passage associé aux cellules caliciformes
GAPDH : Glycéraldéhyde phosphodéshydrogénase
GFP : Green fluorescent protein
Glc : Glucose
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GM1 : Monosialohexatetrahexosylganglioside 1
hCD71 : CD71 humain
hESC : Cellule souche embryonnaire humaine
HFE : Protéine de l'hémochromatose humaine
HLA : Human leukocyte antigen
HM13 : Histocompatibility minor 13
HMC : Cellule mésangiale humaine
ICAM : Molécule d'adhésion intercellulaire
IEC : Cellule épithéliale intestinale
IFN- β : Interféron beta
Ig : Immunoglobuline
IgA : Immunoglobuline A
IGIP : IgA-inducing protein
IgM : Immunoglobuline M
IL : Interleukine
IP : Immunoprécipitation
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITAMi : ITAM inhibiteur
ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
 K_a : Constante d'affinité
 K_d : Constante de dissociation
LB : Lymphocyte B
Leu : Leucine (L)
LPS : Lipopolysaccharide
LSM : Microscope confocal à balayage laser
LT : Lymphocyte T
Mac-1 : Macrophage antigen 1
MadCAM-1 : Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
MAMP : Motif moléculaire associé au microbe
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MFI : Intensité médiane/moyenne de fluorescence
mIgA : IgA monomérique
MMR : Récepteur macrophagique au mannose
MS : Spectrométrie de masse
Neu5Ac : Acide sialique
NF- κ B : Nuclear factor kappa B
 N_{ter} : N-terminal
OVA : Ovalbumine
PBS : Tampon phosphate salin
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PE-Cy7 : Phycoérythrine-cyanine 7
pIgA : IgA polymérique
pIgA_{1M} : IgA1 polymériques issues de myélome
pIgR : Récepteur aux Ig polymériques
PLA : Proximity ligation assay
PM : Poids moléculaire
PMSF : Fluorure de phénylméthylsulfonyle
PNE : Polynucléaire éosinophile
PNN : Polynucléaire neutrophile
Pro : Proline (P)
PRR : Récepteur de motifs moléculaires
PVDF : Polyfluorure de vinylidène
qPCR : PCR quantitative en temps réel
RE : Réticulum endoplasmique
RING : Really interesting new gene
RIPA : Radioimmunoprecipitation buffer
RT : Transcription inverse
S-S : Pont disulfure
SC : Pièce sécrétoire
SCAMP3 : Secretory carrier membrane protein 3
sCD71 : CD71 soluble
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Ser : Sérine (S)
SIgA : IgA sécrétoire
Siglec-5 : Sialic acid binding Ig like lectin 5
sMMR : MMR soluble
SPAD : Single-photon avalanche diode
SPP : Signal peptide peptidase
SPPL2b : Signal peptide peptidase-like 2b
STED : Déplétion par émission stimulée
SVF : Sérum de veau fœtal
T1L : Type 1 Lang
TAC1 : Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor
TBS : Tris buffered saline
TCSPC : Time-correlated single photon counting
TFA : Acide trifluoroacétique
TfR2 : Récepteur à la transferrine 2
TGF- β : Transforming growth factor beta

Thr : Thréonine (T)
TNF : Tumor necrosis factor
TRIM21 : Tripartite motif-containing protein
21
Tyr : Tyrosine (Y)
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule 1
V_H : Domaine variable de la chaîne lourde
d'immunoglobuline
VIH : Virus de l'immunodéficience acquise
V_L : Domaine variable de la chaîne légère
d'immunoglobuline
VP6 : Protéine virale 6
WB : Western-blot

Avant-propos.

Parmi les cinq isotypes d'anticorps présents chez l'Homme, les immunoglobulines A (IgA) prédominent dans les muqueuses. La production d'IgA est estimée à plusieurs grammes par jour, ce qui en fait l'isotype le plus abondamment produit. Les muqueuses représentent plusieurs centaines de mètres carrés d'interface entre l'organisme et l'environnement extérieur et font l'objet d'un étroit contrôle par le système immunitaire. Dans cet environnement, les IgA produites dans le chorion et sécrétées sous forme d'IgA sécrétoires (SIgA) dans la lumière constituent la première ligne de défense de l'immunité adaptative de l'hôte. Alors que les anticorps sont généralement étudiés pour leur spécificité antigénique et les fonctions liées à leur fragment cristallisable, les études récentes ne cessent de nous étonner quant à l'originalité et à la diversité des mécanismes d'action des SIgA. L'immunologie des muqueuses étant actuellement en plein essor, les SIgA ne sauraient tarder à nous surprendre davantage.

Ma thèse s'inscrit dans la continuité des travaux du laboratoire portant sur l'étude de l'interaction entre les SIgA humaines et le récepteur à la transferrine (CD71) à la surface de l'entérocyte, dans la maladie cœliaque. Les travaux antérieurs ont montré que CD71, surexprimé au pôle apical des entérocytes chez les patients cœliaques, interagit avec les SIgA couplées à des peptides de gliadines et permet leur transcytose inverse à travers l'épithélium intestinal. L'objectif initial de ma thèse était d'étudier les voies de signalisation entérocytaires induites par cette interaction afin d'expliquer les dommages épithéliaux caractéristiques de la maladie cœliaque. Après plus d'un an et demi passé à faire face à d'importantes difficultés de reproductibilité dans ces expériences de signalisation, j'ai voulu, dans notre système actuel, réévaluer notre hypothèse initiale qui était que la signalisation intracellulaire recherchée était induite par l'interaction directe des SIgA avec CD71. Pour ce faire, j'ai passé une année à générer plusieurs lignées épithéliales intestinales stables dépourvues du récepteur CD71. À notre grande surprise, la fixation des SIgA sur ces cellules ne s'est pas retrouvée altérée. Après confirmation par des expériences complémentaires, nous en sommes venus à la conclusion que CD71, bien que présent au site de fixation des SIgA sur l'entérocyte, n'est pas le récepteur direct.

J'ai d'abord vérifié que la fixation des SIgA ne s'expliquait pas par la présence d'un récepteur déjà décrit dans la littérature. Et c'est en fin de troisième année de thèse que j'ai entrepris la recherche du(des) récepteur(s) aux SIgA présent(s) sur les cellules Caco-2 TC7.

À l'heure où j'écris cette thèse, nous n'avons pas encore identifié ce(s) récepteur(s) mais avons néanmoins identifié et confirmé la présence de trois nouveaux membres du complexe protéique. Dans un souci de cohérence, mon manuscrit de thèse ne portera pas sur l'étude de la signalisation et des dommages épithéliaux initiée en début de thèse mais se focalisera sur la réévaluation de notre hypothèse initiale, la recherche du(des) récepteur(s) aux SIgA et la description des trois nouveaux partenaires de ce complexe protéique.

Dans le premier chapitre de cette introduction, nous nous attacherons à décrire la structure polymorphique des IgA ainsi que l'origine de leur synthèse et leur biodistribution.

Dans un second chapitre, nous chercherons à mieux comprendre les paramètres qui régissent l'interaction des IgA avec leurs (nombreux) récepteurs afin de tenter d'esquisser le profil requis à un nouveau candidat.

Le troisième chapitre intégrera les IgA dans l'environnement de notre étude et sera ainsi consacré aux fonctions exercées par les IgA en relation avec l'épithélium intestinal.

I. Introduction

CHAPITRE 1 : Les immunoglobulines A.

Les immunoglobulines A sont hautement polymorphiques et retrouvées sous différents degrés d'oligomérisation. Dans le sérum, les IgA ($\sim 3,3 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont le deuxième isotype le plus abondant après les IgG. Elles y sont majoritairement monomériques (mIgA) tandis que les polymères (pIgA) prédominent dans le chorion des muqueuses. Une fois sécrétées dans la lumière intestinale, les pIgA conservent le domaine extracellulaire du récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR) et sont dites sécrétoires (SIgA). Cette première partie s'attachera d'abord à décrire la structure biochimique des différentes formes d'IgA afin de mettre en évidence les similarités et caractéristiques propres à chacune. Une seconde partie détaillera l'origine et la distribution des IgA dans l'organisme.

1. Structure biochimique des immunoglobulines A.

1.1. Les IgA monomériques.

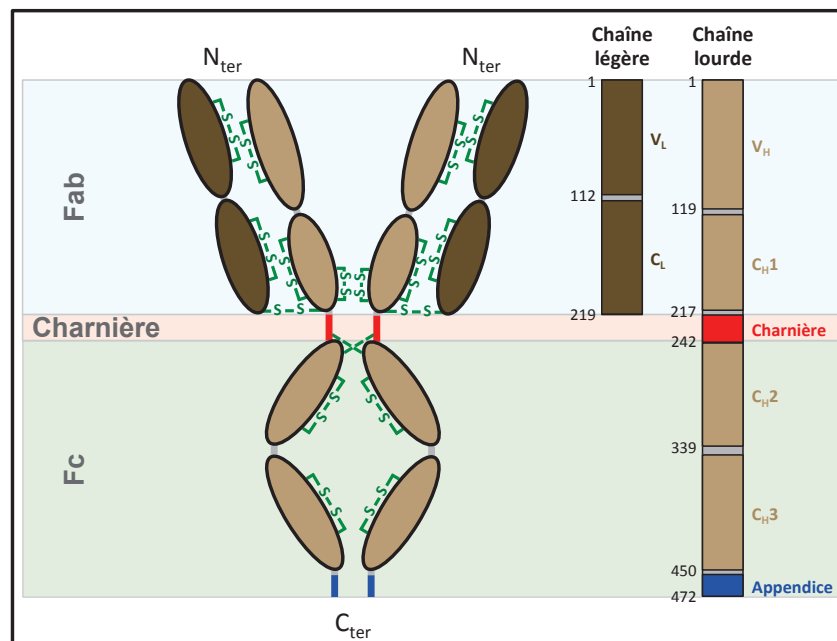


Figure I.1 : Structure d'une IgA monomérique humaine. À gauche, structure bidimensionnelle détaillée d'une IgA1 monomérique humaine. Les deux chaînes légères et les domaines V_H et C_{H1} des deux chaînes lourdes forment le fragment de fixation à l'antigène (Fab, fond bleu ciel), tandis que les domaines C_{H2} et C_{H3} des deux chaînes lourdes constituent le fragment cristallisable (Fc, fond vert). La région charnière (en rouge) relie le Fab au Fc et un appendice (en bleu) de 18 acides aminés est présent en C_{ter} des chaînes lourdes. Les ponts disulfures sont indiqués en vert par la mention « S-S ». Les domaines des chaînes lourdes et légères (à gauche) sont colorisés de manière identique aux séquences protéiques correspondantes (à droite). N_{ter} : N-terminal ; C_{ter} : C-terminal ; V_L : Domaine variable de la chaîne légère ; C_L : Domaine constant de la chaîne légère ; V_H : Domaine variable de la chaîne lourde ; C_H : Domaine constant de la chaîne lourde.

Les mIgA sont au sens strict du terme des hétérotétramères d'environ 160 kDa, constitués de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères, identiques entre elles (figure I.1). Les chaînes légères (~25 kDa) sont communes à tous les isotypes et sont de deux types, kappa (κ) ou lambda (λ). Chaque chaîne légère est composée, de N-terminal (N_{ter}) vers C-terminal (C_{ter}), d'un domaine variable (V_L) et d'un domaine constant (C_L). La chaîne lourde des IgA humaines (C_H , ~60 kDa) est codée par deux gènes distincts, *IGHA1* et *IGHA2*, définissant deux sous-classes d'IgA, les IgA1 et les IgA2 (Putnam et al., 1979). On distingue trois allotypes d'IgA2, les IgA2m(1), les IgA2m(2) et les IgA2(n) (Chintalacharuvu et al., 1994; Torano and Putnam, 1978; Tsuzukida et al., 1979). Chaque chaîne lourde est constituée, de N_{ter} vers C_{ter} , d'un domaine variable (V_H) et de trois domaines constants (C_{H1} , C_{H2} et C_{H3}). L'ensemble des domaines des chaînes lourdes et légères (~110 acides aminés chacun) est de type globulaire et s'organise en un sandwich β stabilisé par au moins un pont disulfure interne (figure I.1). Des ponts disulfures entre chaînes lourdes stabilisent aussi l'ensemble de la structure. Les IgA1, IgA2m(2) et IgA2(n) établissent des ponts disulfures entre les domaines C_{H1} et C_L tandis que les IgA2m(1) n'établissent un pont disulfure qu'entre leurs domaines C_L . De ce fait, les IgA2m(1) sont séparées en dimères de chaînes lourdes et de chaînes légères en conditions dénaturantes (Grey et al., 1968).

IgA1 et IgA2 contiennent un site de N-glycosylation au sein du domaine C_{H2} (Asn²⁶³ sur les IgA1, Asn²⁵⁰ sur les IgA2) et un à leur extrémité C_{ter} (Asn⁴⁵⁹ sur les IgA1, Asn⁴⁴⁶ sur les IgA2). Les IgA2 contiennent deux sites de N-glycosylations supplémentaires, un sur le domaine C_{H1} (Asn¹⁶⁶), l'autre sur le domaine C_{H2} (Asn³²⁴). Enfin, les IgA2m(2) et les IgA2(n) possèdent un cinquième site de glycosylation dans le domaine C_{H1} (Asn²¹¹) (figure I.2).

Entre les domaines C_{H1} et C_{H2} , la région charnière riche en prolines et peu flexible, concentre la majorité des différences entre IgA1 et IgA2. La région charnière des IgA1 est constituée d'une séquence de 21 acides aminés (aa) hautement répétée contenant six sites potentiels de O-glycosylations. Les IgA2 en revanche, sont dépourvues de O-glycosylation, conséquence d'une délétion de 13 aa (Kerr, 1990). Cette différence majeure entre IgA1 et IgA2 est à l'origine de certaines particularités propres à chacune des sous-classes. La majorité des protéases à IgA bactériennes (*N. gonorrhoeae*, *H. influenzae* et *N. meningitidis*) clive spécifiquement la région charnière des IgA1, absente sur les IgA2 (Pohlner et al., 1987; Qiu et al., 1996). En outre, les O-glycosylations des IgA1 leur permettent d'interagir spécifiquement avec certains récepteurs et ligands dont la jacaline, une lectine végétale spécifique des résidus D-galactoses, utilisée pour la purification différentielle des IgA1 et IgA2 (Moura et al., 2004; Roque-Barreira and Campos-Neto, 1985; Rudd et al., 1994). Enfin,

la plus longue charnière des IgA1 leur confère une conformation moins compacte et une flexibilité légèrement supérieure aux IgA2 (Furtado et al., 2004).

À la différence des autres isotopes dont la conformation a été décrite en « Y », les IgA adoptent une conformation prédominante en « T » avec un angle entre fragments de fixation à l'antigène (Fab) d'environ 180°, ce qui expose fortement la région charnière et favoriserait la fixation bivalente d'antigènes relativement éloignés (Furtado et al., 2004).

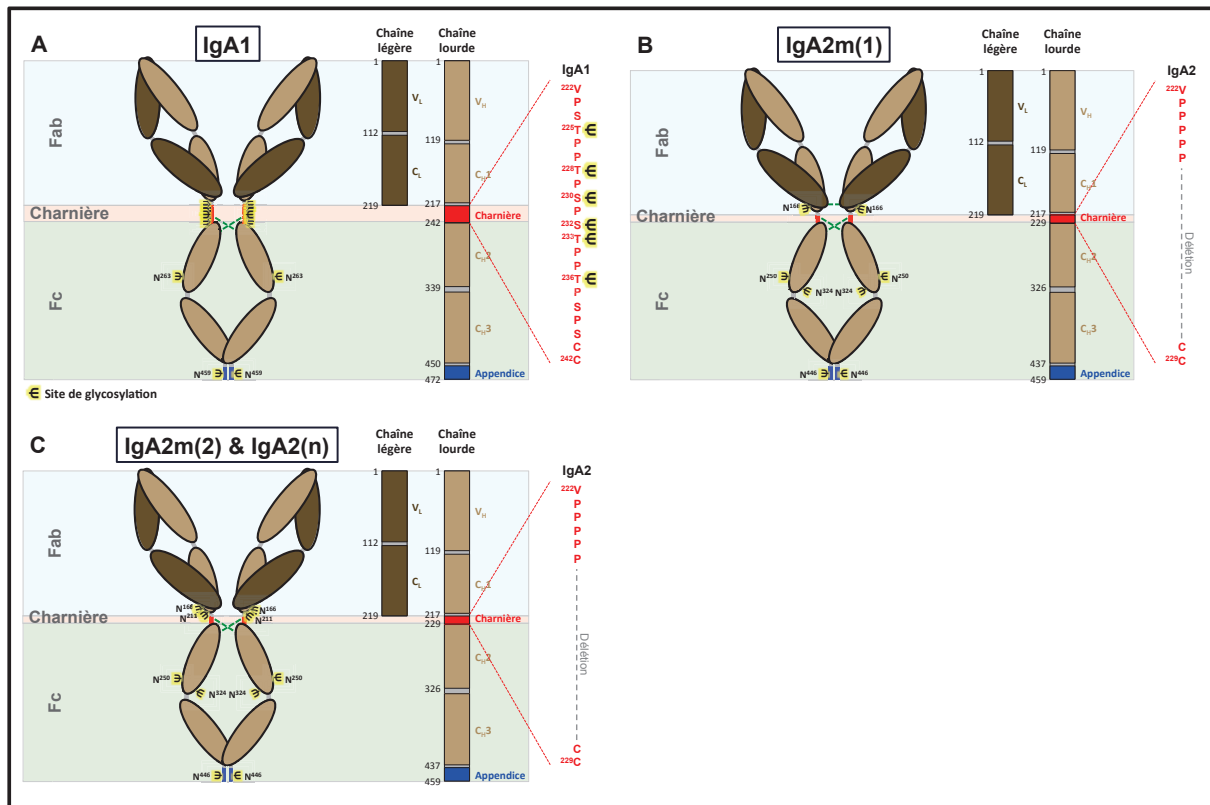


Figure I.2 : Structure des différentes sous-classes et allotypes d'IgA humains. (A, B, C) Structure bidimensionnelle détaillée (à gauche), séquences protéiques des chaînes lourdes et légères (au centre), et séquence primaire de la région charnière (à droite). Les IgA humaines s'organisent en deux sous-classes, IgA1 (A) et IgA2 (B, C), caractérisées par la longueur de leur région charnière. (A) La région charnière (en rouge) des IgA1 est longue de 21 acides aminés et comporte six sites potentiels de O-glycosylation (trident noirs et jaunes) tandis que la région charnière des IgA2 (B, C) est amputée de 13 acides aminés et ne comporte aucun site de O-glycosylation. Chaque chaîne lourde d'IgA1 contient deux sites de N-glycosylation, respectivement localisés dans le domaine C_H2 et l'appendice. La sous-classe IgA2 est subdivisée en trois allotypes, IgA2m(1) (B), IgA2m(2) et IgA2(n) (C). (B) Les IgA2m(1) diffèrent des IgA2m(2) et IgA2(n) par la présence d'un pont disulfure (trait vert en pointillés) entre leurs chaînes légères et par l'absence de liaison covalente entre chaînes lourdes et chaînes légères. Chaque chaîne lourde d'IgA2m(1) comporte quatre sites de N-glycosylation, un sur le domaine C_H1, deux sur le domaine C_H2 et un sur l'appendice. (C) Les IgA2m(2) et IgA2(n) comportent un site de glycosylation supplémentaire par rapport aux IgA2m(1), localisé sur le domaine C_H1. Les IgA2(n) sont probablement issues de la recombinaison génique entre les deux allèles *IGHA2*. De ce fait, elles sont identiques aux IgA2m(2) à l'exception du domaine C_H3, emprunté aux IgA2m(1).

De manière intéressante, la souris ne possède qu'un gène codant la chaîne lourde d'IgA (*Igha*) (Tucker et al., 1981). Parmi les nombreux allotypes rapportés entre souches murines, la majorité des différences se concentre au sein de la région charnière, dont la longueur est variable (Phillips-Quagliata, 2002). Néanmoins, les IgA murines sont généralement comparées aux IgA2 humaines, de par la faible O-glycosylation de leur région charnière (0 ou 1 site selon les allotypes) (Phillips-Quagliata, 2002).

1.2. Les IgA polymériques.

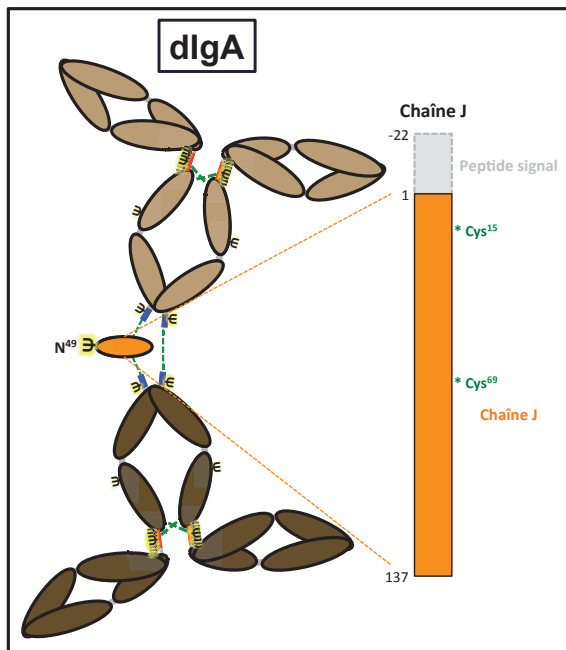


Figure I.3 : Structure d'une IgA1 dimérique (dIgA1) humaine. Structure bidimensionnelle détaillée (à gauche) d'un dimère d'IgA1 relié par la chaîne J (en orange). La séquence protéique de la chaîne J est indiquée à droite. Les résidus cystéines (Cys¹⁵ et Cys⁶⁹) de la chaîne J établissent chacun un pont disulfure (trait vert en pointillés) avec la pénultième cystéine d'une chaîne lourde d'une IgA monomérique. Un pont disulfure supplémentaire maintient directement les chaînes lourdes restantes entre elles. L'ensemble de la structure de la dIgA s'inscrit presque dans un plan mais comporte un bord convexe généré par la présence de la chaîne J. La chaîne J est constituée d'un unique site de N-glycosylation (trident noir et jaune) dont le rôle est primordial dans l'interaction des dIgA avec le pIgR.

Les IgA polymériques sont majoritairement dimériques (dIgA) mais peuvent aussi former des trimères, des tétramères et des agrégats de haut poids moléculaire (Vaerman et al., 1995). Cette possibilité leur est conférée par la présence de 18 aa à l'extrémité C_{ter} de chacune des chaînes lourdes. Le pénultième résidu de cet appendice, une cystéine, est capable d'établir un pont disulfure avec une protéine de 15 kDa, la chaîne de jonction (ou chaîne J) (figure I.3). La chaîne J, dont la structure tridimensionnelle n'est pas établie, est constituée de 137 aa dont un site de N-glycosylation (Asn⁴⁹). Six cystéines sont impliquées dans trois ponts disulfures internes tandis que les résidus Cys¹⁵ et Cys⁶⁹ peuvent chacun établir un pont disulfure avec une chaîne lourde d'IgA.

Les dIgA consistent en deux molécules de mIgA bout à bout, liées d'une part par la chaîne J qui établit un pont disulfure avec la pénultième cystéine d'une chaîne lourde de chaque mIgA, d'autre part par un pont disulfure entre les chaînes lourdes restantes (figure I.3) (Garcia-Pardo et al., 1981). La molécule de dIgA s'inscrit presque dans un plan mais la

présence de la chaîne J incline les fragments cristallisables (Fc) l'un par rapport à l'autre, générant ainsi un bord convexe (figure I.3) (Bonner et al., 2008). La caractérisation des différentes formes de pIgA suggère une augmentation du ratio molaire de chaîne J avec la taille des polymères sans que les caractéristiques de ces interactions ne soient clairement établies (Vaerman et al., 1995).

Bien que des polymères d'IgA non covalents puissent se former en l'absence de chaîne J, cette dernière facilite la constitution et stabilise les polymères de façon covalente. En outre, la présence de la chaîne J est indispensable au transport trans-épithélial des pIgA par le pIgR (Hendrickson et al., 1995; Johansen et al., 2001).

1.3. Les IgA sécrétoires.

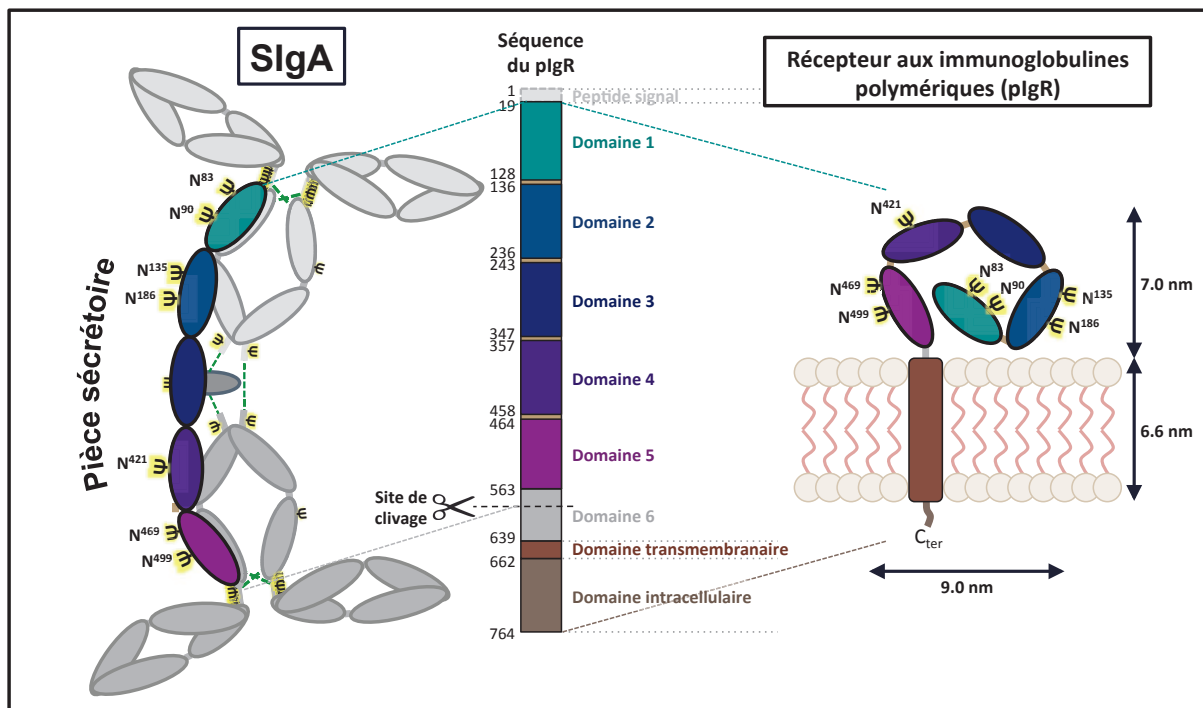


Figure I.4 : Structure d'une IgA1 sécrétoire (SIgA) humaine. Structure bidimensionnelle d'une SIgA1 dimérique (à gauche), séquence protéique du pIgR (au centre) et structure bidimensionnelle du pIgR (à droite). Le pIgR permet le transport trans-épithélial des dIgA et leur relargage dans la lumière des muqueuses. À l'issue de ce transport, le pIgR est clivé au sein du domaine 6 (ciseaux) et son ectodomaine, dès lors appelé pièce sécrétoire (SC), reste associé aux dIgA. L'ensemble (dIgA et SC) forme une IgA sécrétoire (SIgA). La SC est richement glycosylée de par la présence de sept sites de N-glycosylation (trident noirs et jaunes) répartis sur ses cinq domaines de type immunoglobuline. L'interaction entre la SC et la molécule de SIgA1 repose d'une part sur un pont disulfure entre les domaines 5 du pIgR et C_{H2} d'une chaîne lourde d'IgA, d'autre part sur des liaisons non covalentes entre le domaine 1 du pIgR et les domaines C_{H2} et C_{H3} d'une seconde chaîne lourde d'IgA. Les SIgA2m(1) (non représentées) interagissent avec la SC de manière strictement non covalente. L'ensemble de la structure de la SIgA1 s'inscrit presque dans un plan, avec un bord convexe généré du côté de la chaîne J et de la SC. À la différence des SIgA1, les SIgA2 voient leurs Fab sortir du plan constitué par les Fc, la SC et la chaîne J.

Les pIgA produites dans le chorion des muqueuses sont transportées à travers l'épithélium par le récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR), dont elles conservent le domaine extracellulaire dès lors appelé pièce sécrétoire (SC). Dans la lumière des muqueuses, les pIgA associées à la SC sont nommées SIgA. La SC est une protéine d'environ 50 à 80 kDa composée de cinq domaines globulaires de type immunoglobuline (D1 à D5) (Stadtmueller et al., 2016). Elle est hautement glycosylée de par la présence de sept sites de N-glycosylation (Asn^{65, 72, 117, 168, 403, 451 et 481}). La SC interagit avec une dIgA1 contenant une chaîne J en établissant un pont disulfure entre les résidus Cys⁴⁶⁷ de D5 et Cys³¹¹ du domaine C_H2 d'une molécule d'IgA. D'autres interactions non covalentes entre D1 et les domaines C_H3 et C_H2 de la seconde molécule d'IgA stabilisent l'ensemble de la structure (figure I.4) (Almogren et al., 2007; Fallgreen-Gebauer et al., 1993). L'association de la SC avec une dIgA2m(1) n'implique cependant pas de liaison covalente et se retrouve rompue en conditions dénaturantes (Almogren et al., 2007). L'association de la SC avec les dIgA au niveau du bord convexe des deux Fc stabilise l'ensemble de la structure et accroît leur résistance aux protéases (Crottet and Corthesy, 1998; Renegar et al., 1998). Néanmoins, cette différence d'association de la SC avec les SIgA1 et SIgA2m(1) rend ces dernières plus sensibles à l'action de certaines protéases bactériennes, comme celle produite par *P. mirabilis* (Almogren et al., 2007). Comme les dIgA1, les SIgA1 ont une structure tridimensionnelle comprenant leurs Fab et leurs Fc presque dans le même plan. Les SIgA2 en revanche voient leurs Fab sortir du plan formé par les Fc, conséquence probable de la constriction induite par la SC et de leur région charnière réduite (Bonner et al., 2009). Cette différence conformationnelle entre SIgA1 et SIgA2, associée aux différences de flexibilité et de compaction précédemment mentionnées pourraient réguler leur capacité à reconnaître certains types d'antigènes et à interagir avec leurs récepteurs (Ladjeva et al., 1989). Pareillement aux pIgA, les SIgA peuvent former des trimères, tétramères et agrégats de haut poids moléculaires. Suzuki et collègues ont analysé la réponse SIgA dans les sécrétions nasales de volontaires sains en réponse à la vaccination intranasale par le virus influenza (H3N2, virus Victoria). De manière intéressante, les résultats de cette étude ont montré que le pouvoir neutralisant des SIgA augmente selon leur degré de polymérisation (Suzuki et al., 2015). Cette observation pourrait s'expliquer par une proportion de SIgA spécifiques accrue, par l'augmentation de l'avidité et/ou de l'encombrement stérique des polymères de SIgA.

1.4. Les glycosylations des IgA.

Une caractéristique importante des IgA est leur haut niveau de glycosylation. On estime qu'environ 8 à 10% du poids total des IgA est lié aux glycosylations, les chaînes J et la SC étant elles aussi glycosylées pour respectivement 8% et 22% de leur poids (Heimburger et al., 1964; Kerr, 1990; Tomana et al., 1972). Les glycosylations des SIgA apparaissent plus riches, complexes et hétérogènes que celles des IgA sériques (McGuire et al., 1989).

1.4.1. Les O-glycosylations.

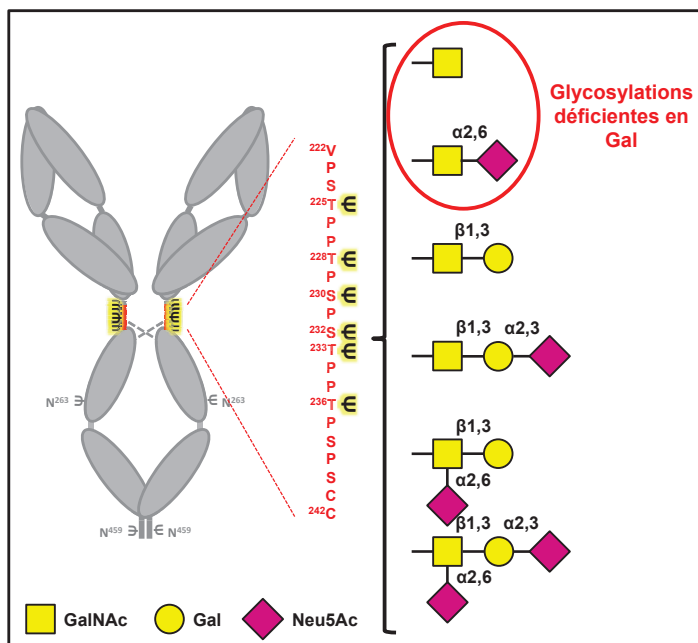


Figure I.5 : Profil des O-glycosylations des IgA1 sériques humaines. Structure bidimensionnelle d'une mIgA1 (à gauche), séquence primaire de la région charnière et de ses six sites de O-glycosylation (au centre), et représentation schématique des six motifs potentiels de O-glycosylation (à droite). Les O-glycosylations sont constituées d'un GalNAc (carré jaune) directement fixé aux acides aminés sérines ou thréonines. Au GalNAc peut être branché un Neu5Ac (losange rose) en α -2,6 et/ou un Gal (disque jaune) en β -1,3. Le Gal peut aussi être orné d'un Neu5Ac, branché en α -2,3. Les O-glycosylations déficientes en Gal (encadrées en rouge) sont fréquemment retrouvées sur les IgA1 de myélome et dans la néphropathie à IgA. GalNAc : N-acétylgalactosamine ; Gal : Galactose ; Neu5Ac : acide sialique. Figure réalisée d'après Franc et al., 2013.

Parmi les six sites potentiels de O-glycosylation de la région charnière des IgA1, seuls trois à cinq sites sont généralement occupés (quatre glycosylations par chaîne lourde étant le plus fréquent) selon l'ordre de préférence décroissant : Thr²²⁸, Ser²³⁰, Ser²³², Thr²²⁵, Thr²³⁶, Thr²³³ (Franc et al., 2013). Des O-glycosylations présentes sur les régions Fab des IgA1 sériques ont aussi été rapportées (Mattu et al., 1998). Les O-glycosylations des IgA sériques sont de structure relativement simple et consistent en un N-acétylgalactosamine (GalNAc) auquel peut être branché un galactose (Gal) en β -1,3, ce motif étant appelé antigène T (ou core 1) (figure I.5) (Baenziger and Kornfeld, 1974). À chacun de ces glucides peut aussi être branché un acide sialique (Neu5Ac), en α -2,6 sur le GalNAc et en α -2,3 sur le Gal. De ces différentes combinaisons résultent six motifs, détaillés dans la figure I.5. Deux de ces motifs, le plus souvent retrouvés sur les résidus Ser²³⁰ et Thr²³⁶, sont déficients en Gal et fréquemment

retrouvés sur les IgA1 de myélome et de patients atteints de néphropathie à IgA (Franc et al., 2013; Novak et al., 2007). L'absence de Gal sur les O-glycosylations des pIgA1 est d'ailleurs impliquée dans leur interaction avec le récepteur CD71 (*voir chapitre 2, partie 1.4*) qui joue un rôle important dans l'atteinte glomérulaire de la néphropathie à IgA (Moura et al., 2004; Tamouza et al., 2012a).

Les O-glycosylations des SIgA sont en revanche beaucoup plus diverses et complexes. Plus de 50 glycoformes ont été rapportées avec une large variété d'épitopes glucidiques, incluant notamment la présence de fucose (Huang et al., 2015; Royle et al., 2003). Cette différence majeure de O-glycosylation entre IgA1 sériques et sécrétoires suggère un profil de glycosylation spécifique des tissus dont pourraient résulter des fonctions des IgA propres à chacun de ces environnements.

1.4.2. Les N-glycosylations.

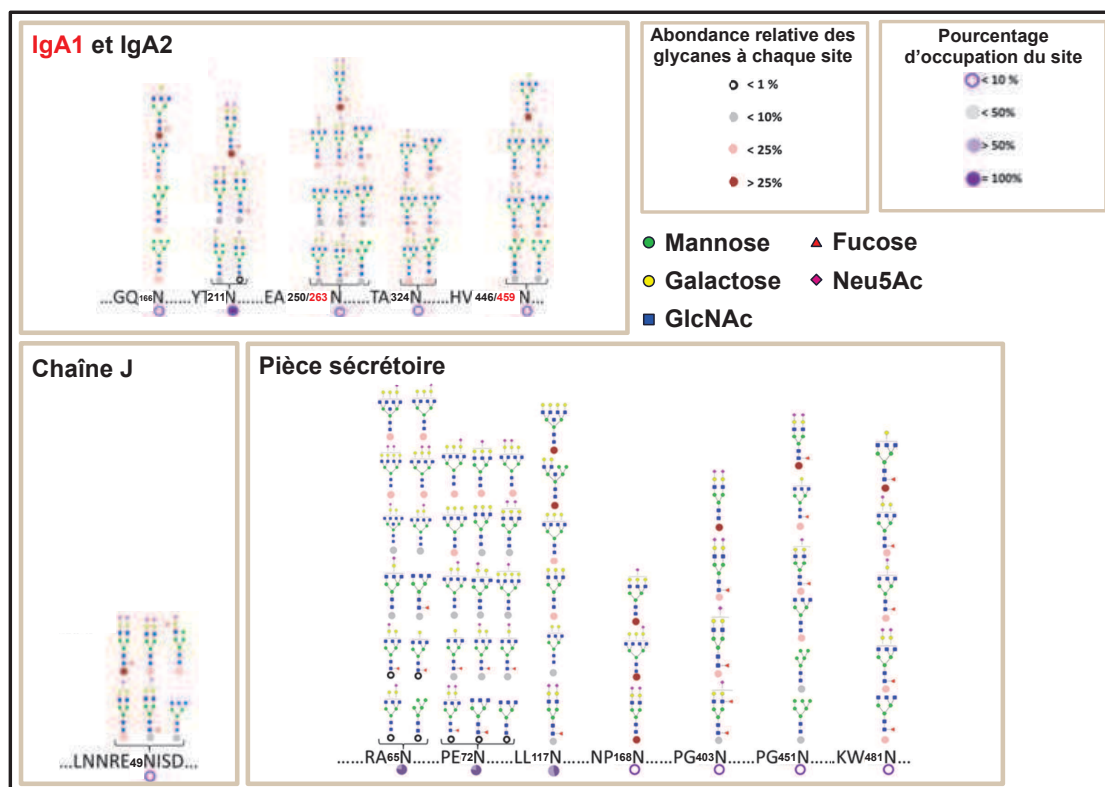


Figure I.6 : Profil des N-glycosylations des IgA sécrétoires du colostrum. Représentation schématique des motifs de N-glycosylation des SIgA1/2 du colostrum de donneurs individuels humains. Les différents N-glycanes identifiés sont en regard de chaque site de N-glycosylation des chaînes lourdes d'IgA1 et IgA2 (en haut à gauche), de la chaîne J (en bas à gauche) et de la SC (en bas à droite). L'abondance des différents motifs de glycosylation à chacun des sites est représentée par un petit disque (de blanc à rouge), tandis que le pourcentage d'occupation de chaque site est indiqué par un grand disque (de blanc à violet). Les N-glycosylations des SIgA sont très diversifiées et complexes, avec des structures bi-, tri- et tétraantennaires riches en oligomannanes. La SC est la chaîne J sont aussi richement sialylées. Figure adaptée de Huang et al., 2015.

Les N-glycosylations présentes sur les IgA sont de structure globalement plus complexe et variable que les O-glycosylations (Huang et al., 2015; Tomana et al., 1972). La majorité des travaux réalisés à partir d'IgA sériques ne détaille que les N-glycosylations des IgA1, du fait de la faible proportion d'IgA2.

Les N-glycosylations du Fc des IgA1 sériques sont principalement biantennaires, avec une bissection située au niveau des résidus N-acétylglucosamines (GlcNAc). Des résidus fucoses sont présents à la base des chaînes oligosaccharidiques portées par l'Asn⁴⁵⁹ (sur l'appendice) tandis que l'Asn²⁶³ n'en contient pas (Bondt et al., 2016; Tanaka et al., 1998). Comme pour les O-glycanes, Mattu et collègues ont montré qu'environ 30% des Fab sont glycosylés avec des structures triantennaires et plus sialylées que les N-glycanes des Fc (Mattu et al., 1998).

On constate deux différences majeures entre les mIgA et les IgA polymériques et sécrétoires. Tandis que les mIgA arborent une très faible quantité d'oligomannanes (~0,1 %) et ont plus de 90% des N-glycosylations sialylées, les pIgA et SIgA présentent plus d'oligomannanes (~8%) et sont moins sialylées (Mattu et al., 1998; Oortwijn et al., 2006b; Royle et al., 2003; Tanaka et al., 1998). Cette différence de contenu en oligomannanes, au niveau de l'Asn³⁴⁰ de l'appendice, est à l'origine de l'aptitude des pIgA à activer la voie alterne du complément. Bien qu'aussi riches que les pIgA en oligomannanes, les SIgA n'activent pas le complément, du fait de la présence de la SC au niveau du Fc (Deshpande et al., 2010; Oortwijn et al., 2006b).

Les glycosylations des SIgA du colostrum présentent aussi une majorité de structures biantennaires, et une présence accrue de N-glycanes tronqués avec un GlcNAc terminal (figure I.6) (Huang et al., 2015; Royle et al., 2003). L'unique site de glycosylation de la chaîne J est richement sialylé (> 75%) mais de façon surprenante, ce site ne semble occupé que dans 20% des cas (Royle et al., 2003). Ce faible pourcentage d'occupation soulève une importante question car l'unique glycosylation sur l'Asn⁴⁹ de la chaîne J apparaît nécessaire à la transcytose des dIgA par l'intermédiaire du pIgR (Vaerman et al., 1998). La SC possède une majorité de glycosylations tri- et tétra-antennaires avec la présence de fucoses à la base des branchements ainsi qu'une importante sialylation (Huang et al., 2015). Une faible proportion de glycanes riches en mannose est aussi notable (Huang et al., 2015). Les différences de compositions entre la SC d'une part et les IgA et la chaîne J pourrait s'expliquer par les différents types cellulaires (cellule épithéliale et plasmocyte) à l'origine de leur production. L'ensemble des données obtenues sur les SIgA est néanmoins à prendre avec précaution du fait que les SIgA du colostrum purifiées à partir de donneurs individuels

apparaissent beaucoup plus diverses et sialylées que les SIgA du colostrum commerciales utilisées dans la majorité des études (Huang et al., 2015).

En outre, il a été montré que les IgA recombinantes, utilisées dans de nombreuses études notamment *in vitro*, ne présentent pas tout à fait les mêmes oligosaccharides que les IgA naturelles. La complexité des branchements et le niveau de sialylation semblent notamment liés aux types cellulaires dans lesquels ces IgA sont produites (Lipniunas et al., 1993; Mattu et al., 1998; Schweikart et al., 1999).

Cette première partie nous a permis d'illustrer la diversité structurale des IgA. Cette diversité repose à la fois sur les différentes sous-classes et allotypes mais aussi sur la structure quaternaire des IgA, capables de former des polymères et de s'associer à la SC. Les N/O-glycosylations contribuent de manière importante à cette diversité d'une part entre IgA1 et IgA2, d'autre part entre IgA sériques et sécrétoires. De par l'ensemble de ces caractéristiques, les IgA regroupent de multiples entités moléculaires, ce qui complexifie énormément l'étude de leurs fonctions à travers l'organisme.

2. Synthèse et biodistribution des IgA.

La synthèse d'IgA par les plasmablastes et plasmocytes, collectivement appelés cellules sécrétrices d'anticorps (ASC), requiert la commutation isotypique (CSR) d'IgM en IgA (α -CSR). L' α -CSR nécessite la prolifération cellulaire du LB, la présence de facteurs commutateurs promouvant la synthèse du transcrite codant la chaîne lourde d'IgA1 ($C_{\alpha 1}$) ou d'IgA2 ($C_{\alpha 2}$), et l'induction de la cytidine désaminase induite par activation (AID) (figure I.7) (Muramatsu et al., 2000).

On admet généralement que l' α -CSR requiert deux signaux. Le premier signal est principalement apporté par le TGF- β , ainsi que par l'acide rétinoïque, l'IGIP (IgA-inducing protein) et les interleukines (IL)-2, IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10 (Endsley et al., 2009; Ramsay et al., 1994; Seo et al., 2014; Sonoda et al., 1992; Vajdy et al., 1995). Le second signal implique l'interaction du récepteur CD40 à la surface du LB et de son ligand, CD40L, exprimé par un lymphocyte T (LT) activé spécifique de l'antigène (Korthäuer et al., 1993). L' α -CSR peut aussi se faire indépendamment des LT. Dans ce cas, le second signal est apporté par l'interaction de deux facteurs solubles, BAFF (B-cell activating factor of the TNF family) et

APRIL (A proliferation-inducing ligand), avec leurs récepteurs membranaires BAFF-R, BCMA (B-cell maturation antigen) et TACI (Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor), tous trois exprimés par le LB (Litinskiy et al., 2002).

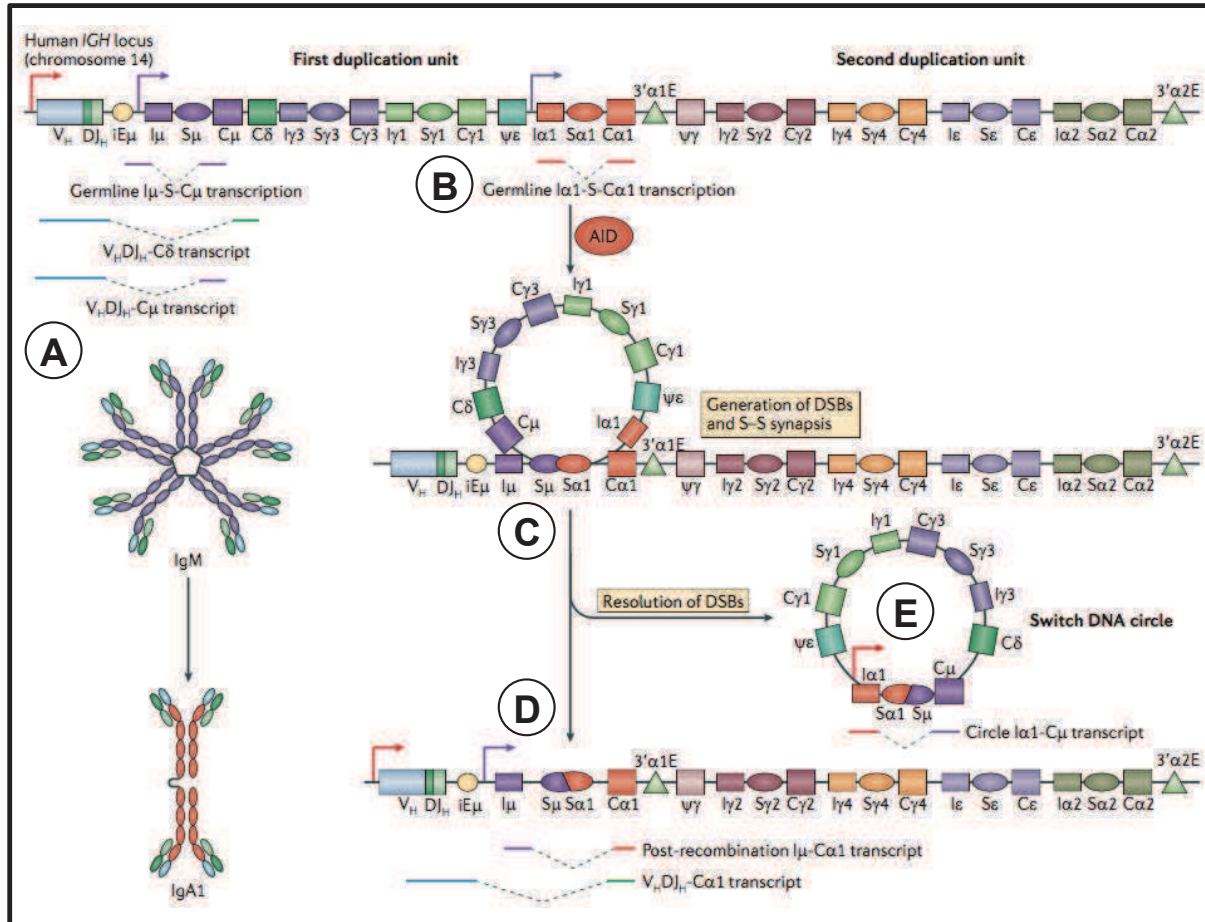


Figure I.7 : Mécanisme de commutation isotypique d'IgM en IgA1. (A) Suite à la recombinaison V(D)J, les chaînes lourdes d'IgM synthétisées s'associent à des chaînes légères et les IgM sont exprimées par les ASC. L' α -CSR est précédée par la synthèse d'un transcrit germlinal I α -S-C α (B) constitué de l'exon d'initiation (I α 1), de la région intronique de commutation (S α 1) et des exons de la chaîne lourde d'IgA (C α 1). La synthèse de ce transcrit germlinal est induite par l'activation du promoteur en amont de I α 1 en réponse aux cytokines promouvant l' α -CSR (voir texte). La prise en charge de ce transcrit primaire génère un transcrit germlinal et un transcrit épissé au niveau de sa région S. La région S épissée s'associe avec la région S correspondante sur l'ADN, formant un hybride ADN-ARN stable. (C) L'ADN simple brin de la région S riche en guanines, déplacé par la présence de l'ARN S semble être le substrat de l'AID qui opère une cassure double brin à ce niveau. (D) La machinerie de réparation de l'ADN permet ensuite la jonction des régions S α et S μ de l'ADN, ce qui permet la recombinaison du locus C_H. (E) La portion d'ADN circulaire excisée par cette recombinaison est de courte durée de vie mais témoigne de la réalisation de l' α -CSR dans l'ASC étudiée. Figure modifiée de Xu et al., 2012.

À l'état physiologique, la synthèse d'IgA dans l'organisme semble relativement compartimentalisée entre le sérum et les muqueuses. Cette distinction est suggérée d'une part par l'impossibilité de générer des ASC productrices d'IgA dans les muqueuses lors d'une immunisation systémique et inversement, par le confinement dans les muqueuses de la

réponse IgA dirigée contre les micro-organismes commensaux (Macpherson et al., 2000; Mei et al., 2009). D'autre part, la production d'IgA sériques est majoritairement monomérique (~80%) et de sous-classe IgA1 (ratio IgA1:IgA2 de 89:11), tandis que les IgA des muqueuses sont majoritairement polymériques (puis sécrétoires) avec une proportion très variable mais toutefois plus élevée d'IgA2 selon les fluides biologiques (Tableau I.1) (Kerr, 1990; Smith, 2013).

Fluide	IgA (mg.ml ⁻¹)	pIgA (%)	Ratio IgA1:IgA2
Sérum	3,3	13	89:11
Larmes	0,08-0,40		63:37
Sécrétions nasales	0,07-0,85	n.d.	71:29
Salive totale	0,10-0,21	96	56:44
Bronches	0,003	82	67:33
Colostrum	12,3-53,8	96	41:59 - 77:23
Lait	0,47-1,63	n.d.	52:48 - 65:35
Bile	0,11	65	74:26
Duodénum	0,31	n.d.	70:30
Jéjunum	0,03-0,28	95	70:30
Colon	0,24-0,83	n.d.	40:60
Vagin	0,02-0,12	42:58	55:45
Éjaculat	0,01-0,2	n.d.	83:17
Urine	≤ 0,001	n.d.	n.d.

Tableau I.1 : Biodistribution des IgA humaines. Concentration en IgA, pourcentage d'IgA polymériques et ratio IgA1:IgA2 dans les fluides biologiques humains. D'après Kerr, 1990 et Smith et al., 2013.

Cette compartimentalisation s'observe aussi par la localisation des ASC productrices d'IgA sériques et mucosales. Les LB à l'origine des ASC productrices d'IgA sériques sont activés dans la rate et les ganglions lymphatiques périphériques et les ASC expriment le récepteur CXCR4 et l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ qui permettent respectivement le recrutement par la chimiokine CXCL12 produite par la moelle osseuse et l'adhésion à VCAM-1 exprimé par l'endothélium de ce site (Macpherson et al., 2008).

Les pIgA des muqueuses sont quant à elles produites *in situ* par des ASC coexprimant la chaîne J (Brandtzaeg, 1974). Chez l'Homme, les données actuelles suggèrent que la majorité de la réponse IgA intestinale (dépendante et indépendante des LT) trouve son origine dans les centres germinatifs du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) présents dans les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés. Les plasmablastes issus de l'activation et de la différenciation des LB expriment l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ et les récepteurs aux chimiokines CCR9 et CCR10. Après recirculation dans le canal thoracique, ces trois molécules leur permettent respectivement d'adhérer à l'adressine MadCAM-1 exprimée par l'endothélium intestinal et d'être recrutés par les chimiokines CCL25 et CCL28 respectivement produites par les cellules épithéliales intestinales de l'intestin grêle et du colon (Kunkel et al., 2000; Pan

et al., 2000). De retour dans la muqueuse, les ASC disséminent dans le chorion, simple site effecteur de la réponse IgA chez l'Homme (Boursier et al., 2005). De manière intéressante, les ASC IgA⁺ générées dans l'intestin expriment un panel d'intégrines et de récepteurs aux chimiokines leur permettant d'accéder à l'ensemble des compartiments de l'organisme tandis que les ASC générées dans les tissus non muqueux sont restreintes à la moelle osseuse (Kunkel and Butcher, 2003).

Les SIgA sont obtenues après transcytose des pIgA à travers les épithéliums et ne sont théoriquement retrouvées que dans la lumière des muqueuses et dans les fluides excrétés. Plusieurs travaux rapportent néanmoins la présence d'une faible concentration de SIgA (2,2 – 10 µg.ml⁻¹) dans le sérum d'individus sains, pouvant atteindre 50 – 70 µg.ml⁻¹ dans certaines atteintes hépatiques (cirrhose et métastases hépatiques) (Delacroix and Vaerman, 1981; Oortwijn et al., 2006a; Tissandie et al., 2011). L'origine et les conséquences fonctionnelles de la présence de SIgA dans le sérum restent toutefois inconnues.

CHAPITRE 2 : Les récepteurs et protéines interagissant avec les IgA.

Ce second chapitre a pour objectif de mieux comprendre les paramètres qui régissent l'interaction des IgA avec les cellules de notre organisme. Pour ce faire, nous distinguerons les protéines interagissant avec les IgA des récepteurs aux IgA, ces derniers étant les seuls dotés d'une capacité de signalisation intracellulaire (propre ou par l'intermédiaire de chaînes intracellulaires complémentaires). Parmi les récepteurs aux IgA, nous regrouperons d'une part ceux capables d'interagir avec le Fc des IgA, d'autre part ceux interagissant spécifiquement avec leurs glycanes. Une partie sera dédiée aux récepteurs pour lesquels le domaine de liaison n'est pas identifié et aux protéines solubles dont seule une interaction avec les IgA a été rapportée. Deux récepteurs intracellulaires aux IgA seront présentés et suivis par une dernière partie composée de trois articles caractérisant des récepteurs dont l'identité reste à l'heure actuelle inconnue. Pour chacune de ces parties, nous nous attacherons à décrire la structure des récepteurs/protéines, les modalités d'interaction avec les IgA et les conséquences fonctionnelles directes de l'interaction dans les cellules impliquées.

1. Récepteurs au Fc des IgA.

1.1. Le récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR).

Le pIgR, identifié en 1980 par Mostov et collègues, est codé par le gène *PIGR* localisé sur le chromosome 1q32 (Mostov et al., 1980). Son expression est restreinte au pôle basolatéral (ou séreux) des cellules épithéliales mucosales et glandulaires. Le pIgR est un récepteur de type I à un domaine transmembranaire d'environ 120 kDa (764 aa). Il est constitué d'un domaine extracellulaire (620 aa), d'un domaine transmembranaire (23 aa) et d'un domaine intracellulaire (103 aa) (figure I.8A). La portion extracellulaire du pIgR précédemment décrite dans la SC (*voir chapitre I.3*) comprend sept sites de glycosylation et s'organise en six domaines dont cinq de type immunoglobuline (D1 à D5) (Mostov et al., 1984). Le pIgR est exclusivement capable de fixer les IgA (et IgM) polymériques, quelle que soit leur sous-classe (Rádl et al., 1971). Les N-glycosylations des IgA ne sont pas nécessaires à l'interaction mais la présence de l'unique glycosylation de la chaîne J est indispensable

(Brandtzaeg and Prydz, 1984; Chuang and Morrison, 1997; Vaerman et al., 1998). Le domaine D1 est nécessaire et suffisant à la fixation des dIgA par l'intermédiaire de liaisons non covalentes à l'interface des domaines C_H2 et C_H3 d'un monomère d'IgA tandis que le domaine D5 établit un pont disulfure avec la Cys³¹¹ du domaine C_H2 du second monomère d'IgA (figure I.8B) (Bakos et al., 1994; Fallgreen-Gebauer et al., 1993; Frutiger et al., 1986; Hamburger et al., 2004; Lewis et al., 2005).

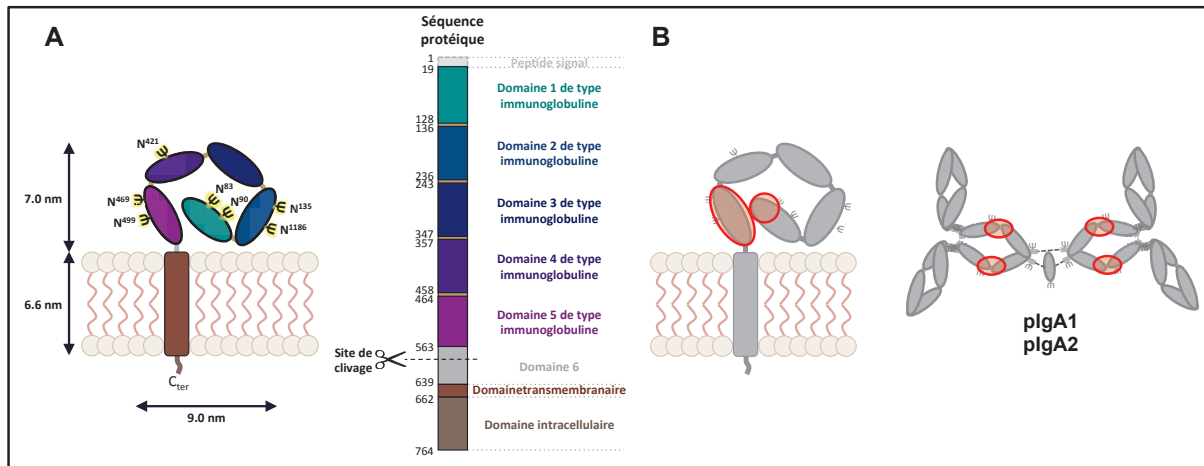


Figure I.8 : Le récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR). (A) **Structure bidimensionnelle et séquence protéique du pIgR.** Le pIgR se présente comme un récepteur transmembranaire de type I, richement glycosylé et dont le domaine extracellulaire est recroquevillé sur lui-même. La fixation des pIgA à son ectodomaine permet son dépliement et induit son clivage, générant la SC. Chaque domaine de la séquence protéique est représenté par une couleur propre, retrouvée sur la structure bidimensionnelle. Le peptide signal, excisé dans le réticulum endoplasmique est exclusivement indiqué sur la séquence protéique (en gris clair). Le site de clivage de l'ectodomaine en SC est représenté dans le domaine 6 (ciseaux). Les glycosylations sont schématisées par les tridentés noirs et jaunes. Les dimensions indiquées sont issues des données cristallographiques du récepteur (Stadtmueller et al., 2016). (B) **Interaction des IgA avec le pIgR.** Les disques rouges indiquent les domaines 1 et 5 du pIgR, et les domaines C_H2 et C_H3 des pIgA, impliqués dans l'interaction entre ces deux protéines.

Le site de clivage de l'ectodomaine du pIgR n'est pas clairement identifié mais est contenu dans le sixième domaine. Son clivage au pôle apical des cellules épithéliales permet le relargage des SIgA dans la lumière des muqueuses (Eiffert et al., 1984). Le clivage du pIgR s'opère aussi indépendamment de la présence de dIgA et permet la sécrétion de SC libre dans la lumière des muqueuses (Musil and Baenziger, 1987).

En marge de son interaction avec les immunoglobulines polymériques, le pIgR peut directement interagir avec une protéine de surface de *S. pneumoniae*, permettant la transcytose de ce pathogène à travers les cellules épithéliales respiratoires (Zhang et al., 2000). La SC, du fait de ses nombreuses N-glycosylations est aussi capable d'interagir avec le mucus, ainsi que diverses bactéries et lectines (voir chapitre 3, partie 1) (Kaetzel, 2005).

1.2. Le récepteur au Fc des IgA (CD89).

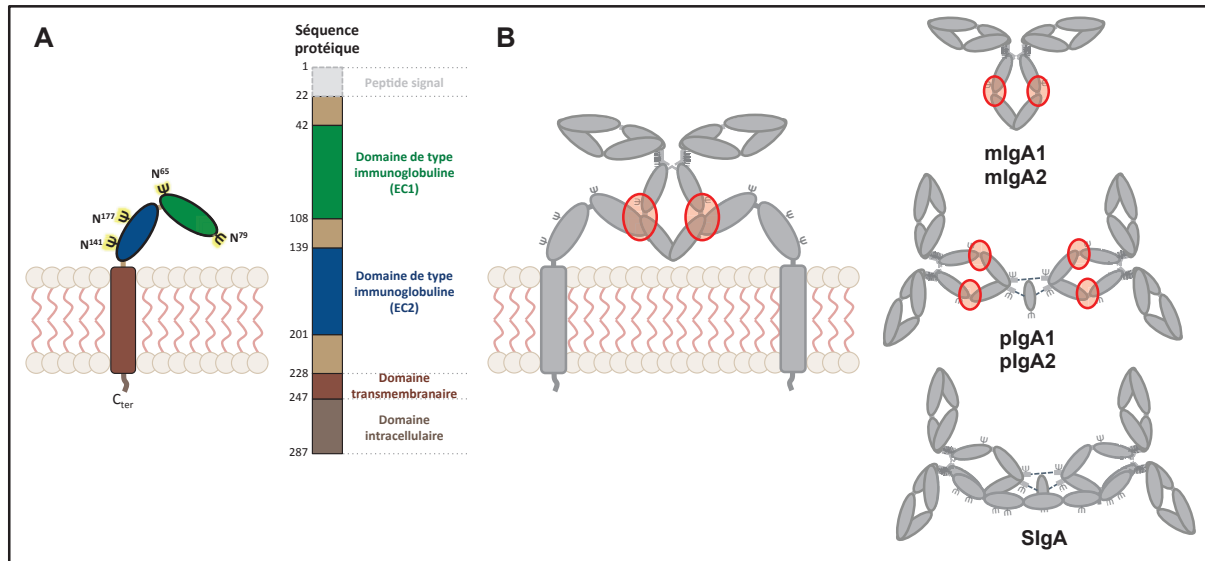


Figure I.9 : Le récepteur au Fc des IgA (FcαRI). (A) **Structure de FcαRI.** FcαRI est un récepteur membranaire de type I richement glycosylé (tridents noirs et jaunes), dont les deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline établissent un angle de 90°. La séquence protéique indique la présence d'un peptide signal (en gris clair) excisé dans le réticulum endoplasmique et non représenté sur la structure bidimensionnelle. (B) **L'Interaction d'une mIgA avec FcαRI** nécessite deux récepteurs FcαRI et implique les domaines EC1 de FcαRI et l'interface C_H2-C_H3 des chaînes lourdes d'IgA (disques rouges). FcαRI est capable d'interagir avec toutes les formes d'IgA, y compris avec les SIgA. Son interaction avec les SIgA requiert néanmoins la présence du co-récepteur Mac-1 (CD11b/CD18). Pour cette raison, le disque d'interaction n'est pas représenté sur les SIgA.

Découvert en 1990 par R. Monteiro et collaborateurs, le récepteur au Fc des IgA (FcαRI) est codé par le gène *FCAR* situé sur le chromosome 19q13 (Monteiro et al., 1990). Ce récepteur est exprimé par les cellules immunes de la lignée myéloïde que sont les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, la majorité des monocytes et macrophages, et par certaines populations de cellules dendritiques (DC) (Geissmann et al., 2001; Monteiro et al., 1990; 1993; van Egmond et al., 2000). FcαRI est un récepteur de type I à un domaine transmembranaire, composé de 266 aa. Il possède un domaine extracellulaire (206 aa), une région transmembranaire (19 aa) et une courte séquence intracellulaire (41 aa) (figure I.9A). Sa séquence primaire suggère un poids moléculaire théorique de 32 kDa mais son important niveau de glycosylations lui confère une taille apparente pouvant varier de 50 à 100 kDa selon les types cellulaires (Monteiro et al., 1993).

FcαRI est un récepteur de faible/moyenne affinité ($K_a \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$) pour les IgA1 et IgA2. Tandis que les mIgA interagissent faiblement, l'avidité des pIgA et des complexes d'IgA pour FcαRI est beaucoup plus importante (Monteiro et al., 1990). Les SIgA sont aussi

capables d'interagir avec Fc α RI (van Spriël et al., 2002). La fixation des IgA à Fc α RI implique l'interface entre les domaines C_H2 et C_H3, et plus précisément le résidu Leu²⁵⁷ et le motif ⁴⁴⁰PLAF⁴⁴³ (figure I.9B) (Carayannopoulos et al., 1996; Herr et al., 2003; Pleass et al., 1999).

L'ectodomaine de Fc α RI, constitué de deux domaines de type immunoglobuline (EC1 et EC2), interagit avec les IgA au niveau des résidus Tyr³⁵ et Arg⁵² et du motif ⁸¹YRIGHYR⁸⁷ de son domaine EC1 (Herr et al., 2003; Morton et al., 1999; Wines et al., 1999; 2001).

La présence de la SC sur les SIgA masque en partie la région C_H2-C_H3 et rend la présence de l'intégrine $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1, CD11b/CD18) strictement nécessaire à l'activation de Fc α RI. De manière intéressante, la SC se révèle nécessaire et suffisante pour interagir avec Mac-1 (van Spriël et al., 2002). Cette interaction impliquerait les glycanes de la SC.

La fixation des pIgA à Fc α RI peut induire le clivage de son domaine extracellulaire et générer des complexes solubles retrouvés dans le sérum d'individus sains et, sous une forme différente, dans celui de patients atteints de néphropathie à IgA (Launay et al., 2000; van Zandbergen et al., 1999).

La queue cytoplasmique de Fc α RI ne porte aucun motif de signalisation. Par conséquent, la signalisation en aval de Fc α RI dépend de son association avec la chaîne FcR γ intracellulaire (Pfefferkorn and Yeaman, 1994). FcR γ régule la signalisation induite par Fc α RI selon le degré de phosphorylation de son motif ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif). Ainsi les mIgA, incapables d'agréger Fc α RI, n'induisent que la phosphorylation partielle de FcR γ , dont résulte un signal ITAM inhibiteur (ITAM_i) (Pasquier et al., 2005). Ce signal ITAM_i est anti-inflammatoire comme en témoigne sa capacité à inhiber des réponses pro-inflammatoires induites par d'autres récepteurs dépendants ou non de motifs ITAM (Kanamaru et al., 2008; Pasquier et al., 2005). En revanche, l'avidité des complexes d'IgA pour Fc α RI est plus importante et favorise le regroupement de récepteurs. Ces deux facteurs induisent une forte phosphorylation de FcR γ à l'origine d'une importante réponse pro-inflammatoire directement induite par les complexes d'IgA (Pasquier et al., 2005).

En conclusion, Fc α RI est un récepteur capable de fixer toutes les formes d'IgA. Sa bifonctionnalité confère des propriétés anti-inflammatoires aux IgA sériques (majoritairement monomériques), et lui permet de déclencher une importante réponse pro-inflammatoire en réponse à la fixation de complexes immuns d'IgA, notamment en cas d'infection.

1.3. Le récepteur au Fc des IgA et des IgM (CD351).

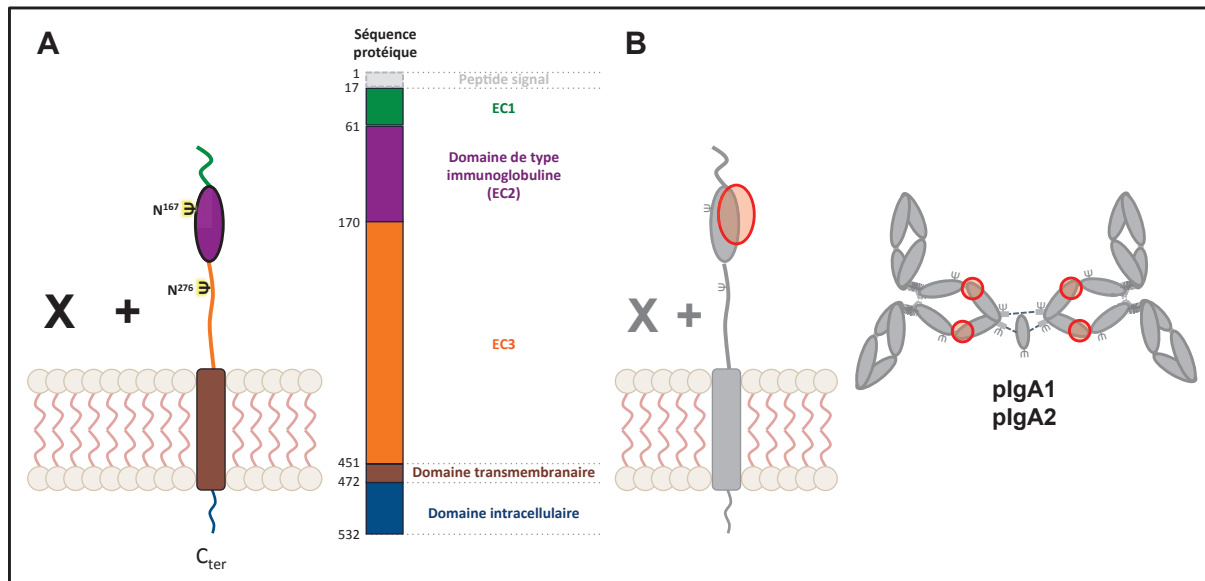


Figure I.10 : Le récepteur au Fc des IgA et des IgM (Fca/μ R). (A) **Structure de Fca/μR.** Fca/μR est un récepteur de type I constitué de trois domaines extracellulaires (EC1 à EC3). Son ectodomaine présente deux sites de N-glycosylation (trident noirs et jaunes). Sa séquence protéique comprend un peptide signal (en gris clair), non représenté sur la structure bidimensionnelle. À la surface cellulaire, Fca/μR s'hétérodimérise avec une protéine dont l'identité est inconnue (symbolisée par « X + »). (B) **Interaction des IgA avec Fca/μR.** Fca/μR sous forme hétérodimérique interagit avec les pIgA1 et pIgA2 au niveau de son domaine EC2 (disque rouge). Le motif ⁴⁴⁰PLAF⁴⁴³ à l'interface entre les domaines C_H2 et C_H3 des IgA (disque rouge) est impliquée cette interaction.

Le récepteur au Fc des IgA et des IgM (Fca/μR) est codé par le gène *FCAMR* localisé sur le chromosome 1q32 (Shibuya et al., 2000). Chez l'Homme, l'expression de Fca/μR est restreinte aux LB pré-germinatifs tonsillaires, aux cellules dendritiques folliculaires, aux cellules mésangiales ainsi qu'à l'intestin (Kikuno et al., 2007; McDonald et al., 2002; Wang et al., 2009). Fca/μR est un récepteur de type I à un domaine transmembranaire. Il est constitué de 516 aa organisés en un domaine extracellulaire (434 aa), un domaine transmembranaire (21 aa) et une queue cytoplasmique (61 aa) pour un poids moléculaire théorique de 58 kDa (figure I.10A). Chez l'Homme, les monomères de Fca/μR sont uniquement retrouvés dans le cytosol. Fca/μR est exprimé à la surface cellulaire sous forme d'hétérodimères d'environ 125 kDa avec une protéine dont l'identité n'est pas connue (Kikuno et al., 2007; Takagaki et al., 2013). Ces dimères sont non réductibles et faiblement glycosylés (Kikuno et al., 2007).

Fca/μR est un récepteur de haute affinité aux pentamères d'IgM et d'affinité intermédiaire aux dIgA. Les sous-classes IgA1 et IgA2 interagissent de façon similaire avec Fca/μR tandis que l'ajout de la SC empêche toute interaction (Ghumra et al., 2009).

L'ectodomaine de Fc α / μ R s'organise en trois domaines (EC1, EC2 et EC3). La structure d'EC2 est de type immunoglobuline et contient une séquence conservée, retrouvée dans le domaine D1 du pIgR, permettant la fixation du Fc des IgA et des IgM (Cho et al., 2006). La fixation des dIgA est indépendante des glycosylations et implique les résidus 440 à 443 (Pro-Leu-Ala-Phe) du domaine C_H3, situés à l'interface avec le domaine C_H2 (figure I.10B) (Yoo et al., 2011). De manière intéressante, cette région des IgA est aussi impliquée dans l'interaction avec le pIgR et CD89 (Ghumra et al., 2009). À la différence de l'interaction des pIgA avec le pIgR, la chaîne J n'est pas nécessaire à l'interaction avec Fc α / μ R (Yoo et al., 2011).

Malgré l'absence de motif d'endocytose conventionnel, le domaine intracellulaire de Fc α / μ R permet l'endocytose du récepteur lié aux IgM et aux IgA, mais seulement lorsque ces dernières sont agrégées entre elles (Yang et al., 2009; Yoo et al., 2011).

Dans l'intestin, Fc α / μ R est exprimé par les cellules de Paneth, les macrophages du chorion et les plasmocytes (Wang et al., 2009). Néanmoins, l'incapacité des SIgA à interagir avec ce récepteur interroge sur son importance fonctionnelle dans l'homéostasie intestinale.

En conclusion, Fc α / μ R permet uniquement la fixation et l'endocytose des pIgA, de sous-classes IgA1 et IgA2. Le rôle physiologique de cette interaction reste néanmoins à définir dans un contexte d'étude compliqué par un profil d'expression de Fc α / μ R très différent entre les populations cellulaires murines et humaines.

1.4. Le récepteur à la transferrine (CD71).

Le récepteur CD71, codé par le gène *TFRC* sur le chromosome 3q29, est exprimé par toutes les cellules de l'organisme à l'exception des érythrocytes. Son expression est étroitement corrélée à l'état de prolifération cellulaire et aux besoins en fer avec de hauts niveaux d'expression dans l'épithélium intestinal, dans les cellules mononucléées périphériques sanguines activées, dans les cellules cancéreuses et dans les précurseurs érythroïdes (Daniels et al., 2006). CD71 est un récepteur de type II à un domaine transmembranaire, long de 760 aa (~90 kDa). Il est constitué d'une queue cytoplasmique (67 aa), d'un domaine transmembranaire (21 aa) et d'un large domaine extracellulaire (672 aa) (figure I.11A). À la surface cellulaire, CD71 s'assemble en homodimères de 180 kDa liés par deux ponts disulfures. Chaque monomère possède trois sites de N-glycosylations et un de O-glycosylation.

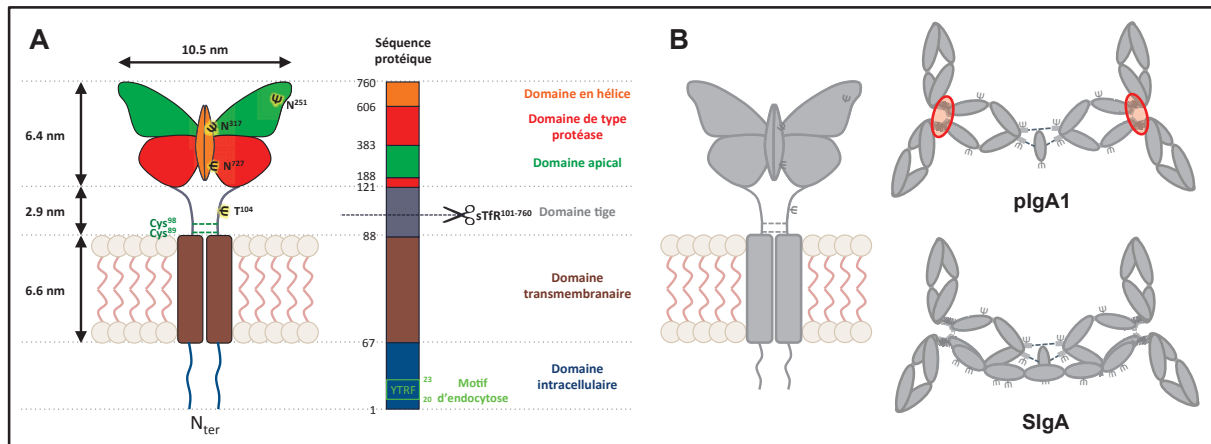


Figure I.11 : Le récepteur à la transferrine (CD71). (A) **Structure de CD71.** CD71 est un récepteur transmembranaire de type II dont l'ectodomaine peut être clivé au niveau du domaine tige (ciseaux). Son ectodomaine comprend quatre sites de glycosylation (trident noirs et jaunes) et présente une structure tridimensionnelle en « papillon ». CD71 s'assemble principalement en homodimères, reliés par deux ponts disulfures (traits verts en pointillés). Son domaine intracellulaire comporte un motif d'endocytose ²⁰YTRF²³ (en vert clair). L'ensemble de la structure bidimensionnelle de CD71 est à l'échelle, compte-tenu des données cristallographiques publiées (Lawrence, 1999). (B) **Interaction des IgA avec CD71.** La région charnière des pIgA apparaît nécessaire à leur fixation à CD71 (disques rouges). En revanche, les domaines de CD71 et des SIgA impliqués dans l'interaction ne sont pas connus.

Chaque homodimère de CD71 fixe deux molécules de son ligand canonique, l'holotransferrine. Le complexe est ensuite endocyté selon un mécanisme dépendant de la clathrine. L'acidification de l'endosome favorise la libération du fer par la transferrine et son absorption par la cellule tandis que l'interaction entre CD71 et l'apotransferrine, maintenue dans l'endosome, permet leur recyclage à la surface cellulaire (Aisen, 2004).

CD71 est aussi capable d'interagir avec une importante variété de ligands comme la chaîne lourde de la ferritine, la protéine de l'hémochromatose humaine (HFE) ainsi que certains virus (Abraham et al., 2009; Feder et al., 1998; Li et al., 2010; Martin and Uprichard, 2013; Radoshitzky et al., 2011).

Les travaux d'I. Moura et collègues ont montré que CD71 est un récepteur spécifique aux IgA1 (Moura et al., 2001; 2004). CD71 interagit préférentiellement avec les IgA1 sous forme polymérique et dont les N- et O-glycosylations sont hypogalactosylées (figure I.11B) (Moura et al., 2004). Dans la néphropathie à IgA, l'interaction entre CD71 et les pIgA1 hypogalactosylées à la surface de la cellule mésangiale induit la production de cytokines de type IL-6 et TGF- β , promeut la prolifération cellulaire et participe à la formation des dépôts pathologiques d'IgA dans le glomérule (Moura et al., 2005). Les pIgA1 interagissent aussi avec CD71 à la surface des érythroblastes, favorisant leur prolifération et leur survie en présence de doses physiologiques de facteurs de croissance (Coulon et al., 2011). Dans ce

système, la fixation des pIgA1 à CD71 induit l'activation de voies de signalisation qui convergent et potentialisent celles activées par l'érythropoïétine (EPO).

Plus récemment, notre laboratoire a montré que les SIgA sont des ligands de CD71 à la surface de la cellule épithéliale intestinale (IEC) et que cette interaction est impliquée dans la physiopathologie de la maladie cœliaque (CeD) (*voir chapitre 3, partie 4.2*) (Abed et al., 2014; Lebreton et al., 2012; Matysiak-Budnik et al., 2008).

Un isoforme de CD71, Tfr2, a été décrit et son gène identifié sur le chromosome 7q22 (Glöckner et al., 1998). Tfr2 est exprimé par les précurseurs érythroïdes, les hépatocytes et les entérocytes de l'intestin grêle (Deaglio et al., 2002). CD71 et Tfr2 peuvent former des hétérodimères mais s'assemblent préférentiellement en homodimères (Vogt et al., 2003). De manière intéressante, l'ectodomaine de Tfr2 sous forme soluble est aussi capable d'interagir avec les pIgA1 (Moura et al., 2004).

L'ensemble des données publiées sur l'interaction entre CD71 et IgA souligne l'importance des glycosylations, notamment celles de la région charnière propres aux IgA1 et suggère que la présence de la SC dans les SIgA ne masque pas le domaine d'interaction avec CD71. De plus, cette interaction peut être suivie de l'endocytose des complexes et/ou d'une signalisation, dans des types cellulaires très différents.

2. Récepteurs aux IgA de type lectine.

2.1. Le récepteur à l'asialoglycoprotéine (ASGPR).

Le récepteur à l'asialoglycoprotéine (ASGPR) est composé de deux sous-unités, ASGPR1 et ASGPR2, codées par les gènes *ASGR1* et *ASGR2*, localisés sur le chromosome 17p13. ASGPR est exclusivement exprimé par l'hépatocyte (Hudgin et al., 1974). ASGPR1 et ASGPR2 sont des récepteurs de type II à un domaine transmembranaire de 33 et 35 kDa respectivement. Ces deux sous-unités s'assemblent selon une stœchiométrie très variable, dont ASGPR1 est cependant la sous-unité majoritaire (Renz et al., 2012). De manière intéressante, cette stœchiométrie semble jouer un rôle important dans l'affinité des oligomères pour leurs ligands (Renz et al., 2012). ASGPR1 est constitué d'une courte queue cytoplasmique (40 aa), d'un domaine transmembranaire (21 aa) et d'un domaine extracellulaire de type lectine dépendant du calcium (230 aa) (figure I.12A). ASGPR2 est organisé selon le même modèle avec une queue cytoplasmique légèrement plus longue (58

aa). ASGPR est fortement glycosylé et impliqué dans le catabolisme des glycoprotéines sériques désialylées, interagissant avec les résidus galactosyl de manière dépendante du calcium (Hudgin et al., 1974). Les IgA sériques apparaissent ainsi comme le ligand majeur d'ASGPR, ce qui permet leur catabolisme hépatique.

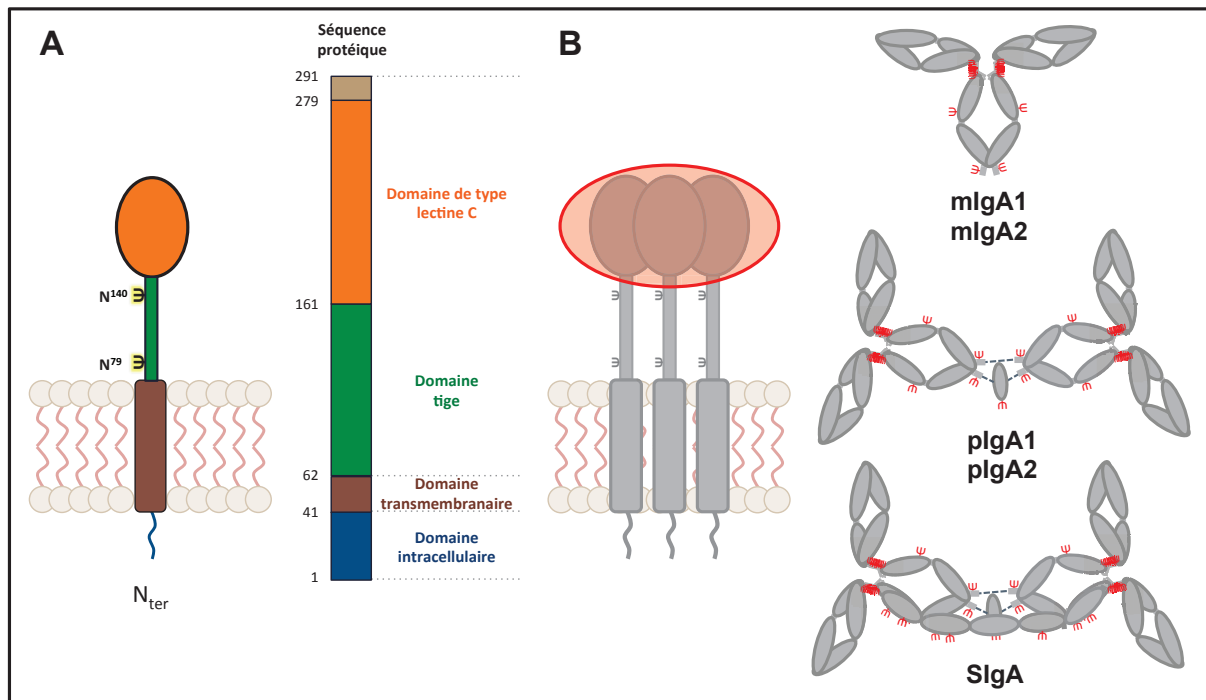


Figure I.12 : Le récepteur à l'asialoglycoprotéine (ASGPR). (A) **Structure d'ASGPR.** ASGPR est un récepteur transmembranaire de type II. Chaque monomère d'ASGPR est constitué d'un domaine extracellulaire tige comprenant deux sites de N-glycosylation (tridents noirs et jaunes) et d'un domaine de type lectine de type C. (B) **Interaction des IgA avec ASGPR.** À la surface cellulaire, ASGPR est retrouvé sous forme oligomérique, ce qui lui permet de gagner en avidité vis-à-vis de ses ligands. ASGPR interagit avec toutes les formes d'IgA par l'intermédiaire de leurs glycosylations (tridents rouges), ce qui suggère l'implication de son domaine de type lectine de type C (disque rouge). ASGPR semble néanmoins avoir une affinité préférentielle pour les IgA2, plus riches en N-glycosylations.

Les premiers travaux menés *in vitro* ont montré qu'ASGPR possède une affinité supérieure pour la sous-classe IgA1 (Stockert et al., 1982). L'étude de Tomana et collègues a confirmé ces résultats et montré que la forme (monomérique ou polymérique) n'a pas d'influence sur l'affinité pour ASGPR (figure I.12B) (Tomana and Kulhavy, 1988). Des résultats plus difficiles à interpréter ont néanmoins été obtenus pour les SIgA dont la fixation dépendante d'ASGPR mise en évidence sur des fractions de foie humain n'a pas été retrouvée sur la lignée hépatocytaire humaine (HepG2). La SC seule quant à elle, interagit fortement avec ASGPR.

Des travaux plus récents réalisés dans des souris *Asgr2^{-/-}* sont cependant venus remettre en cause les précédentes études (Rifai et al., 2000). Les chercheurs ont démontré de

manière convaincante qu'ASGPR assure la clairance préférentielle des IgA2 sériques alors qu'un faible pourcentage des IgA1 emprunte cette voie. L'inter-changement des domaines d'IgA1 et d'IgA2 a permis d'identifier la région charnière des IgA1 (et probablement leurs O-glycosylations) comme responsable de leur moindre affinité pour ASGPR. Au regard des résultats de Rifai et collègues, la clairance hépatique des IgA dépendrait des résidus Gal des N-glycosylations. Les IgA1 possèdent moins de N-glycosylations que les IgA2, ce qui expliquerait leur clairance réduite et leur présence majoritaire dans le sérum.

2.2. DC-SIGN (CD209).

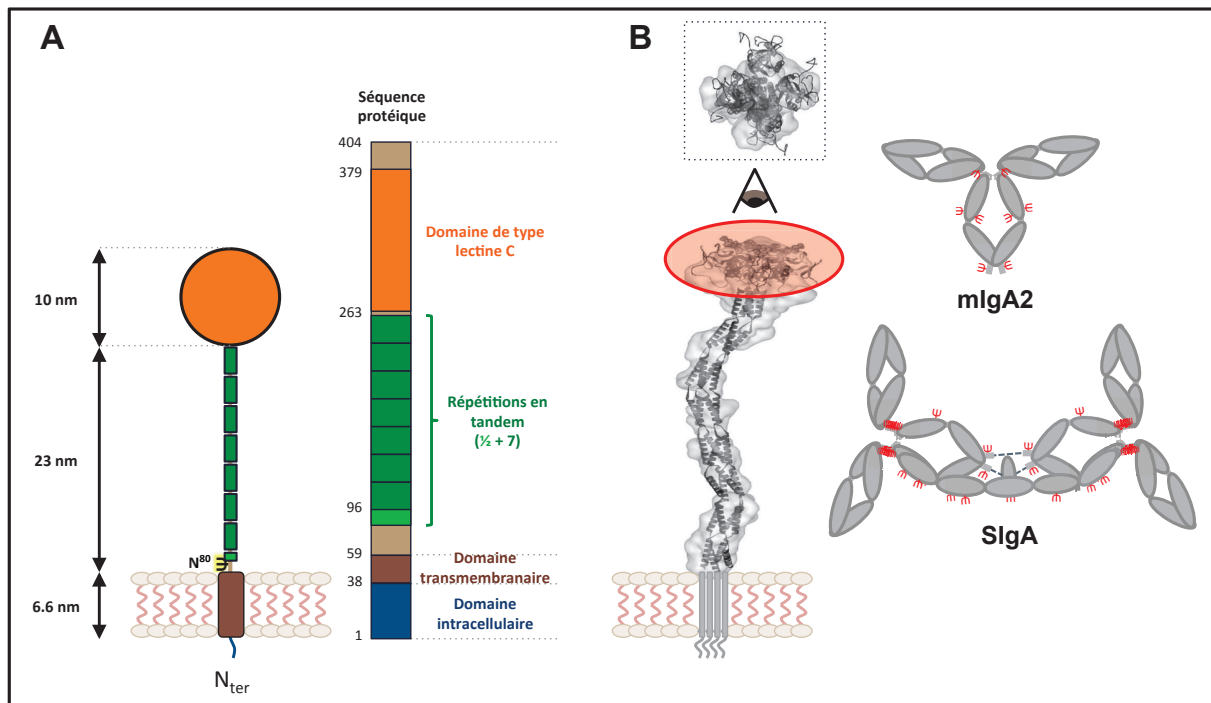


Figure I.13 : DC-SIGN. (A) Structure de DC-SIGN. DC-SIGN est un récepteur transmembranaire de type II pourvu d'un très long ectodomaine à l'extrémité duquel réside un domaine de type lectine de type C (en orange). Les nombreuses répétitions en tandem (en vert) participent à l'homotétramérisation des récepteurs à la surface. Un unique site de N-glycosylation (trident noir et jaune) est retrouvé en bordure du domaine transmembranaire (en marron). L'ensemble de la structure bidimensionnelle est à l'échelle, d'après les données cristallographiques (Tabarani et al., 2009). **(B) Interaction des IgA avec DC-SIGN.** Les glycosylations des IgA (tridents rouges) sont impliquées dans l'interaction DC-SIGN. Les paramètres d'interactions suggère le rôle du domaine de type lectine de type C de DC-SIGN (disque rouge). Une vue aérienne de l'homotétramère est représentée au-dessus de la vue de profil afin d'observer l'organisation en « fleur » du tétramère. D'après Tabarani et al., 2009.

DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin) est codé par le gène *CD209* situé sur le chromosome 19p13. Ce récepteur est exprimé par les DC des amygdales, de la peau, des muqueuses et des ganglions lymphatiques (Geijtenbeek et al., 2000b; Jameson

et al., 2002). DC-SIGN est un récepteur de type II à un domaine transmembranaire. Il est constitué de 404 aa (~44 kDa) et s'organise en trois domaines : cytoplasmique (40 aa), transmembranaire (15 aa) et extracellulaire (349 aa) (figure I.13A) (Geijtenbeek et al., 2000b). Son ectodomaine est constitué de huit répétitions en tandem formant un long « cou » de plus de 20 nm au bout duquel se situe le domaine de reconnaissance des sucres (CRD) de type lectine de type C (fixation dépendante du calcium). Le domaine répété est composé d'hélices α partiellement hydrophobes qui favoriseraient la formation des homotétramères dont le principal avantage est d'augmenter l'avidité de DC-SIGN pour ses ligands (Snyder et al., 2005; Tabarani et al., 2009).

DC-SIGN a d'abord été impliqué dans la fixation de la protéine gp120 du virus de l'immunodéficience acquise (VIH) sur le placenta humain, sans être identifié (Curtis et al., 1992). En 2000, DC-SIGN a été identifié et caractérisé comme récepteur aux molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM)-2, ICAM-3 et comme récepteur de reconnaissance de motifs (PRR) doté d'une large spécificité virale et bactérienne (Appelmelk et al., 2003; Geijtenbeek et al., 2000a; 2000b; 2003; Lozach et al., 2003).

Plus récemment, Baumann et collègues ont montré que DC-SIGN est un récepteur fixant les SIgA d'une manière dépendante du calcium et des résidus mannoses (figure I.13B) (Baumann et al., 2010). Ces premiers travaux ont montré que la SC est requise pour cette interaction, ce qui expliquerait l'incapacité de DC-SIGN à fixer les mIgA1, mIgA2, pIgA1 et pIgA2 (Baumann et al., 2010). L'expression de DC-SIGN en cellules Henrietta Lacks (HeLa) a cependant révélé sa capacité d'interaction avec des mIgA2 humaines recombinantes, complexifiant la compréhension du mécanisme d'interaction (Rochereau et al., 2013).

D'un point de vue fonctionnel, la liaison des SIgA à DC-SIGN déclenche l'endocytose du complexe (Baumann et al., 2010). Chez la souris, l'interaction SIgA – SIGNR1 (l'homologue murin de DC-SIGN) oriente les DC dérivées de la moelle osseuse vers un profil tolérogène et leur permet de diminuer la sévérité de l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale et du diabète de type 1 (Diana et al., 2013). Dans l'intestin, DC-SIGN est exprimé par une population de DC située au niveau du dôme sous-épithélial des plaques de Peyer (Jameson et al., 2002). Dans ce contexte, DC-SIGN serait impliqué dans l'internalisation par les DC de SIgA qui auraient préalablement été transportées à travers les cellules M (*voir chapitre 3, partie 4.1*). Ce mécanisme participerait à l'immunisation systémique et mucoale de souris contre l'antigène p24 du VIH (Rochereau et al., 2013). Compte-tenu des travaux précédemment décrits, l'internalisation des SIgA dépendante de

DC-SIGN semble jouer des rôles très différents selon la nature des complexes, mais aussi la population de DC et sa localisation dans l'organisme.

2.3. Dectine-1 (CD369).

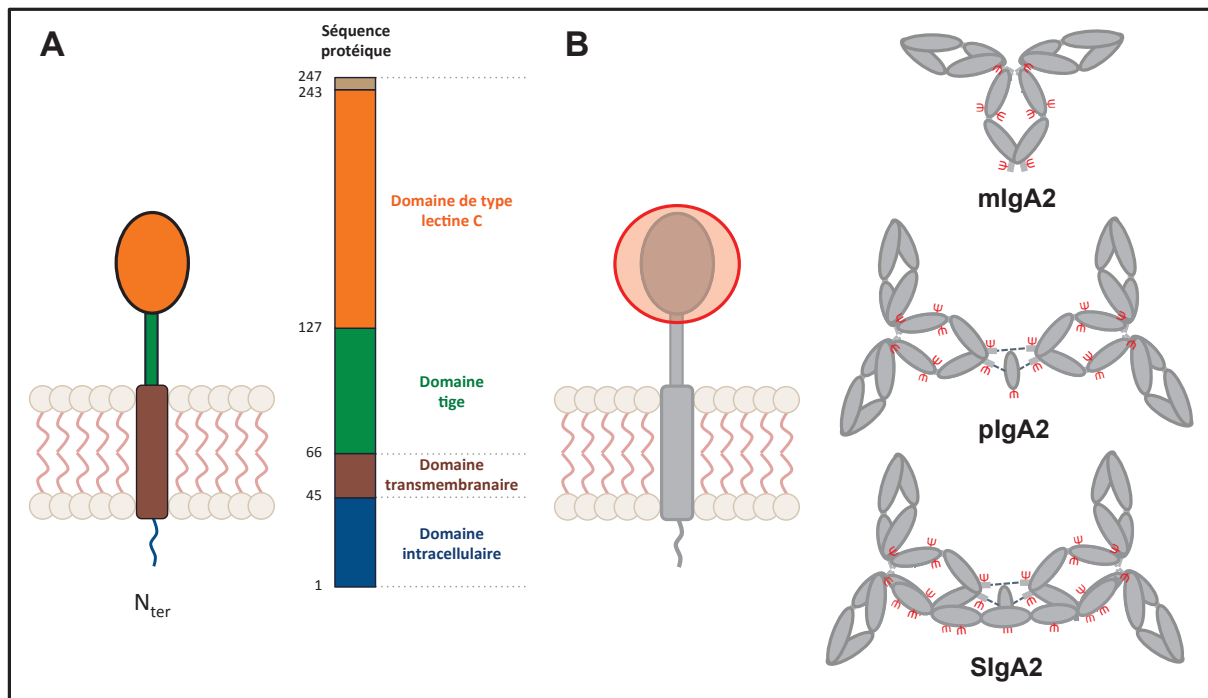


Figure I.14 : Dectine-1. (A) **Structure de dectine-1.** Dectine-1 est un récepteur transmembranaire de type II de petite taille, dont l'ectodomaine est constitué d'un domaine tige (en vert) et d'un domaine de type lectine de type C (en orange). (B) **L'Interaction des IgA avec dectine-1** implique les N-glycosylations des IgA2 monomériques, polymériques et sécrétoires (tridents rouges). Le domaine de type lectine de type C de dectine-1 (disque rouge) est très probablement impliqué, compte-tenu du fait que l'interaction dépend des résidus sialylés des IgA2.

Dectine-1 (Dendritic-cell associated C-type lectin 1) (28 kDa) est un récepteur de type II à un domaine transmembranaire, codé par le gène *CLEC7A* localisé sur le chromosome 12p13. Dectine-1 est exprimé par une large variété de cellules immunitaires (DC, macrophages, monocytes, neutrophiles et une sous-population de LT), notamment dans les poumons et l'intestin (Brown, 2006). Son ectodomaine est constitué d'un domaine de type lectine de type C, capable de fixer les β -1,3- et β -1,6-glucanes, indépendamment des ions métalliques (figure I.14A) (Brown and Gordon, 2001). Ces polymères glucidiques sont exprimés à la surface de nombreux micro-organismes (champignons, bactéries et levures) et font de dectine-1 un PRR (Brown and Gordon, 2001). L'interaction des IgA avec dectine-1 a probablement été caractérisée pour la première fois par l'étude de Mantis et collègues, sans

que le récepteur ne soit identifié (Mantis et al., 2002). Ces travaux ont montré *in vivo* que les mIgA et dIgA humaines de sous-classe IgA2 (ainsi que les IgA murines) sont capables d'interagir avec les cellules M murines à l'aide de leurs domaines C_{H1} et C_{H2}, indépendamment de la présence de la chaîne J ou de la SC (figure I.14B) (Mantis et al., 2002). En 2013, ces résultats ont été confirmés et précisés en montrant que le domaine C_{H1} des mIgA2 et des dIgA2 humaines est nécessaire et suffisant pour interagir avec dectine-1, et que cette interaction requiert la présence de résidus sialylés sur les IgA2 (Rochereau et al., 2013). D'un point de vue fonctionnel, dectine-1 est exprimé à la surface des cellules M murines et humaines, et permet la transcytose inverse des SIgA2 dans les plaques de Peyer. Ce transport d'antigènes participe au développement d'une réponse systémique et mucoale en réponse à l'administration orale de SIgA conjuguées à l'antigène p24 du VIH (*voir chapitre 3, partie 4.1*) (Rochereau et al., 2013).

2.4. Siglec-5 (CD170).

Les travaux de Rochereau et collègues décrivant l'interaction entre dectine-1 et les IgA2 ont aussi montré que siglec-5 (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 5), une lectine spécifique des résidus acides sialiques branchés en α -2,3 et α -2,6, est capable de fixer les IgA2 selon les mêmes paramètres que dectine-1 (Cornish et al., 1998; Rochereau et al., 2013). Siglec-5 (~70 kDa) est un récepteur de type I à un domaine transmembranaire codé par le gène *SIGLEC5* situé sur le chromosome 19q13. Son ectodomaine est organisé en quatre domaines de type immunoglobuline dont seul le premier est capable de fixer les résidus acides sialiques (figure I.15A) (Cornish et al., 1998; Zhuravleva et al., 2008). Comme dectine-1, la fixation des IgA2 à siglec-5 permet leur transcytose inverse par les cellules M (figure I.15B). Le rôle de l'interaction entre les SIgA2 et siglec-5 n'a cependant pas été confirmé *in vivo* (Rochereau et al., 2013). En effet, bien qu'exprimé par les cellules des plaques de Peyer chez l'Homme, aucun orthologue murin de siglec-5 n'a été rapporté (Angata et al., 2004).

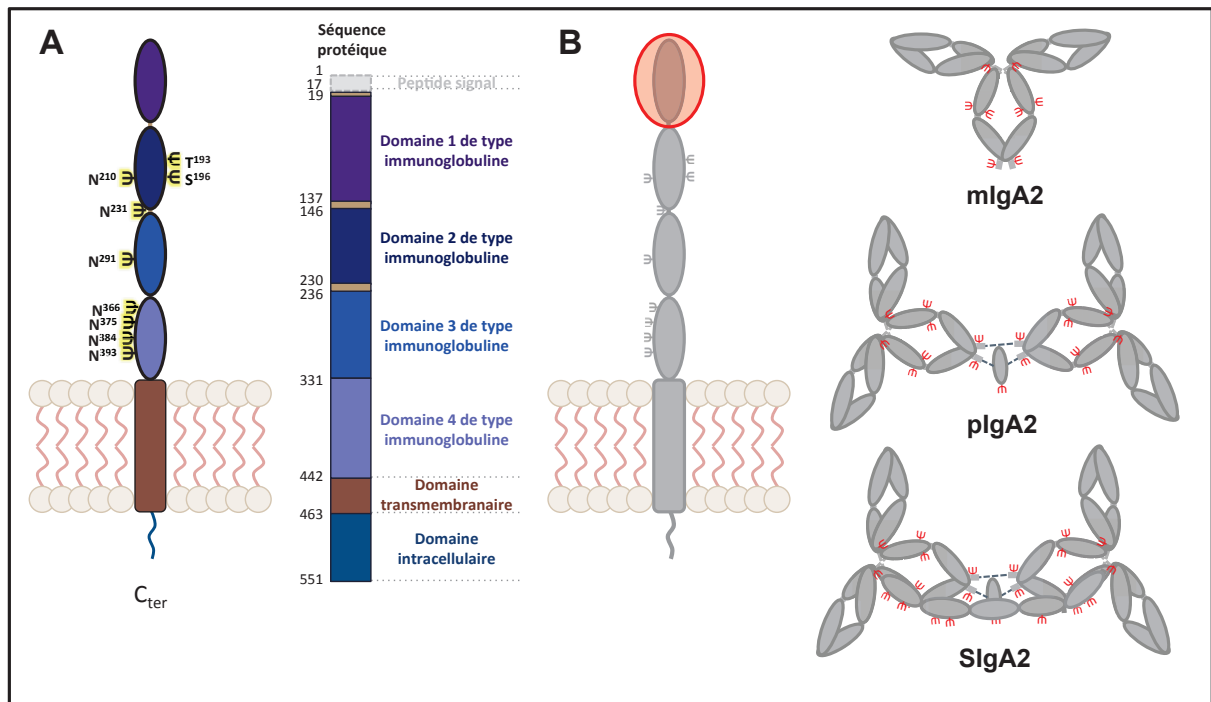


Figure I.15 : Siglec-5. (A) **Structure de siglec-5.** Siglec-5 est un récepteur transmembranaire de type I constitué de quatre domaines extracellulaires de type immunoglobuline. Siglec-5 présente sept sites de N-glycosylation (tridents noirs et jaunes) et deux sites de O-glycosylation potentiels. Le peptide signal (en gris clair), clivé dans le réticulum endoplasmique, n'est indiqué que sur la séquence protéique. (B) **Interaction des IgA avec siglec-5.** De manière similaire à dectine-1, l'interaction des IgA2 (monomériques, polymériques et sécrétoires) requiert la présence de leurs N-glycosylations. Seul le domaine 1 de siglec-5 est capable de fixer les résidus acides sialiques, ce qui suggère son implication dans l'interaction avec les IgA (disque rouge).

2.5. Le récepteur macrophagique au mannose (CD206).

Le récepteur au mannose macrophagique (MMR) est une lectine de type C de 175 kDa codée par le gène *MRC1*, situé sur le chromosome 10p12. MMR est exprimé par les macrophages et les DC immatures, particulièrement dans la peau, les amygdales et le chorion des muqueuses (Engering et al., 2002). Son expression a aussi été rapportée dans les cellules mésangiales, les cellules musculaires lisses de la trachée et dans certaines populations de cellules endothéliales (Stahl and Ezekowitz, 1998). MMR est un récepteur de type I à un domaine transmembranaire. Son ectodomaine, long de 1389 aa et richement glycosylé, est constitué d'un domaine lectine de type ricine B riche en cystéines, d'un domaine fibronectine de type II et de huit domaines de type lectine de type C (figure I.16A) (Ezekowitz et al., 1990). Le domaine lectine de type ricine B interagit avec des N-glycanes (Gal et GalNAc) sialylés indépendamment du calcium, tandis que le domaine 4 de type lectine de type C fixe préférentiellement les chaînes oligosaccharidiques se terminant par des résidus mannose, fucose ou GlcNAc, de manière dépendante du calcium (Liu et al., 2000; Taylor et al., 1992).

Intercalé entre les domaines de type lectine et le domaine riche en cystéines, le domaine fibronectine de type II confère à MMR la capacité de se fixer aux collagènes I à V (Martinez-Pomares et al., 2006). Cette diversité de domaines permet à MMR de fixer de nombreux ligands endogènes et exogènes, et le classe parmi les PRR (Martinez-Pomares, 2012; Stahl and Ezekowitz, 1998).

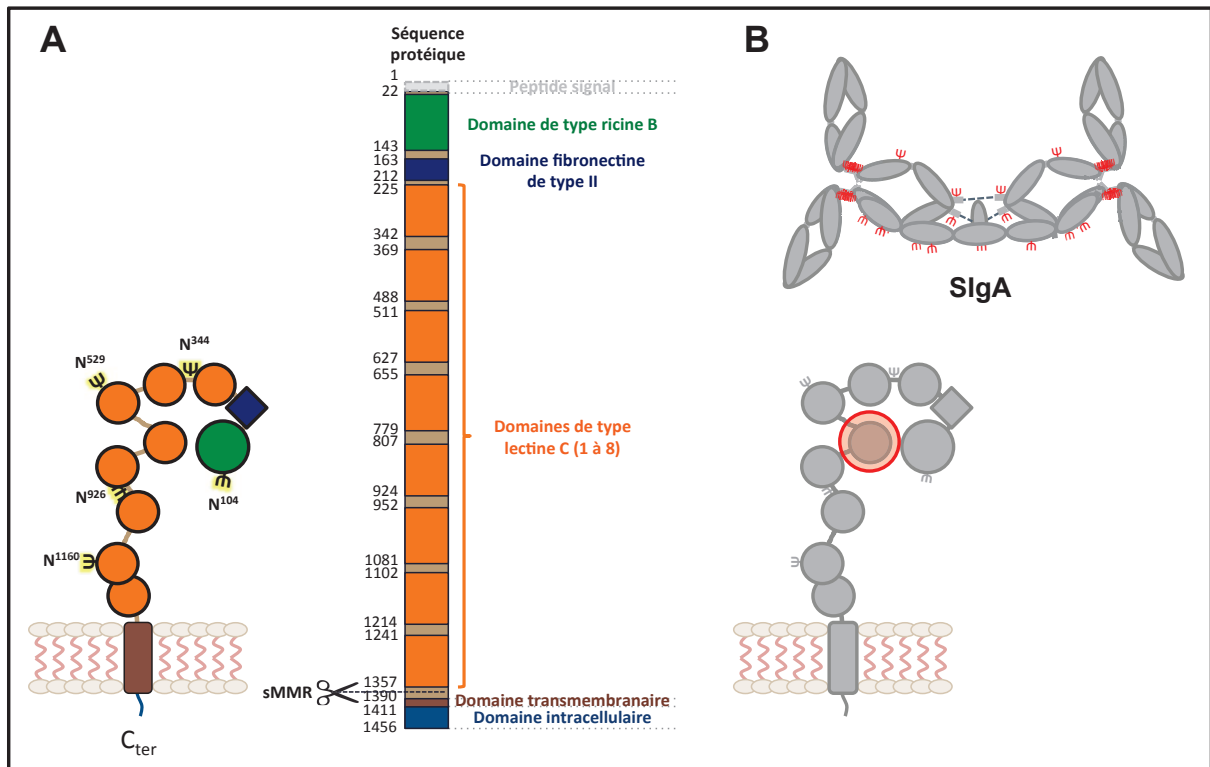


Figure I.16 : Le récepteur macrophagique au mannose (MMR). (A) **Structure de MMR.** MMR est un récepteur transmembranaire de type II de très grande taille (~175 kDa) constitué de domaines variés, lui conférant un large spectre d'interaction (*voir texte*). MMR possède cinq sites potentiels de N-glycosylation (tridents noirs et jaunes) et 24 sites potentiels de O-glycosylation (non représentés). L'ectodomaine de MMR peut être clivé (ciseaux). La structure bidimensionnelle de MMR n'est pas à l'échelle mais l'organisation relative des domaines a été établie d'après Boskovic et al. (Boskovic et al., 2006). (B) **Interaction des SIgA avec MMR.** Les données structurales indiquent que MMR est replié à l'état basal, de telle sorte que le quatrième domaine de type lectine de type C est masqué. Ce domaine est très probablement impliqué dans l'interaction avec les glycosylations des SIgA (tridents rouges) compte-tenu de ses propriétés et des paramètres de l'interaction (*voir texte*).

MMR est exclusivement capable d'interagir avec les IgA sous forme sécrétoire (figure I.16B) (Baumann et al., 2010; Heystek et al., 2002). Cette interaction met en jeu les résidus mannose des SIgA et nécessite la présence de calcium, suggérant l'implication du domaine 4 de type lectine de type C (Taylor et al., 1992). D'un point de vue fonctionnel, la fixation des SIgA par MMR à la surface des DC n'induit pas leur maturation (Heystek et al., 2002). Compte-tenu du fait que MMR est constitutivement internalisé et recyclé à la surface, la

fixation de complexes de SIgA pourrait participer à l'échantillonnage d'antigènes par les DC et au maintien de l'homéostasie intestinale à l'égard du microbiote (Stahl et al., 1980). Chez l'Homme et la souris, l'ectodomaine de MMR est aussi retrouvé sous forme soluble (sMMR) suite à son clivage par une métalloprotéase membranaire (Jordens et al., 1999; Martinez-Pomares et al., 1998). La production de sMMR par les macrophages murins est constitutive mais augmente selon un mécanisme dépendant de la fixation de β -glucanes fongiques à dectine-1 (Gazi et al., 2011). Des expériences réalisées sur des DC (dérivées de monocytes) humaines immatures indiquent aussi une production constitutive de sMMR qui se voit réduite lors de la maturation des DC induite par le LPS (Jordens et al., 1999). De manière intéressante, sMMR est retrouvé dans le sérum murin et dans le colostrum humain où il pourrait former des complexes avec les IgA et participer à leur fonction immunomodulatrice (Grapov et al., 2015; Martinez-Pomares et al., 1998).

3. Autres récepteurs et protéines solubles.

3.1. Le récepteur de type récepteur au Fc 4 (CD307d).

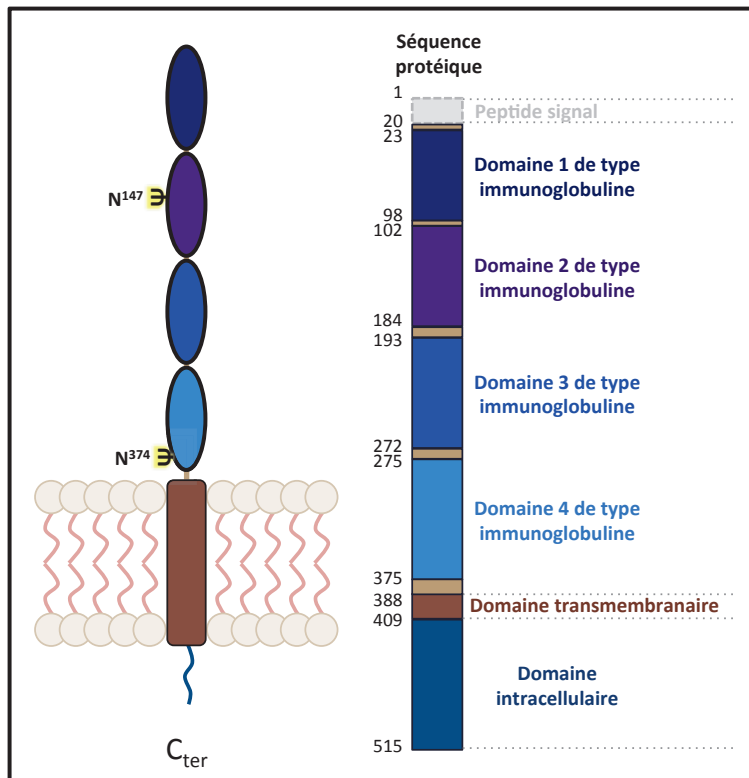


Figure I.17 : Le récepteur de type récepteur au Fc 4 (CD307d). FcRL4 est un récepteur transmembranaire de type I constitué de quatre domaines extracellulaires de type immunoglobuline et de deux sites potentiels de N-glycosylation (tridents noirs et jaunes). Le peptide signal (gris clair) est représenté sur la séquence protéique.

Le récepteur de type récepteur au Fc 4 (FcRL4) est codé par le gène *FCRL4* localisé sur le chromosome 1q23 (Figure I.17). C'est un récepteur de 57 kDa de type I à un domaine transmembranaire dont l'expression est restreinte à une sous-population de LB mémoires présente dans les zones marginales et sous-épithéliales des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (Ehrhardt et al., 2003; Wilson et al., 2012). FcRL4 est capable d'interagir avec les IgA sériques sans que le mécanisme d'interaction ne soit connu (Wilson et al., 2012). Le domaine intracellulaire de FcRL4 présente trois motifs ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif). L'expression d'une protéine chimérique contenant le domaine extracellulaire de FcγRIIb, un co-récepteur du BCR, et le domaine intracellulaire de FcRL4 inhibe la signalisation en aval du BCR selon un mécanisme dépendant des deux motifs ITIM distaux de FcRL4 (Ehrhardt et al., 2003). Compte-tenu de sa fonction inhibitrice et de son expression dans les LB mémoires, FcRL4 pourrait agir comme un régulateur négatif de la réponse humorale.

3.2. Les galectines (Gal-1, Gal-3 et Gal-8).

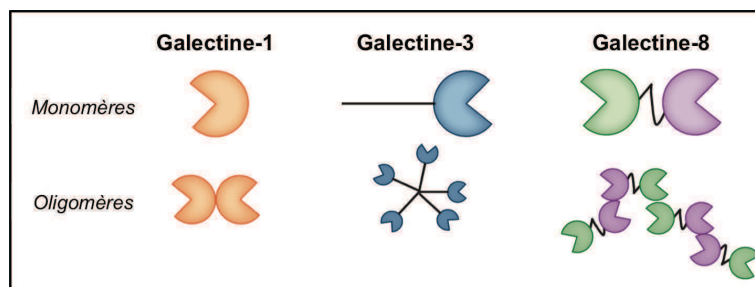


Figure I.18 : Les galectines-1, -3 et 8.

Les galectines (Gal-)1, -3 et -8 sont de petites protéines constituées d'un ou deux domaine(s) de type lectine. Au sein de la famille des galectines, Gal-1 appartient au groupe prototype de par la présence d'un seul domaine de type lectine et sa capacité à

s'homodimériser. Gal-3 est une galectine chimère constituée d'un domaine lectine mais capable de s'oligomériser par son extrémité N_{ter} lors de la fixation de ses ligands. Gal-8 est une galectine de type tandem du fait de ses deux domaines de type lectine et de sa capacité à former de larges multimères par oligomérisation de ses régions N_{ter} et C_{ter} . L'interaction des Gal-1, -3 et -8 avec les IgA est dépendante des glycosylations des IgA. Figure modifiée de Thiemann et al., 2016.

Les galectines constituent une famille de quinze protéines solubles de petite taille définie par la présence d'un ou deux domaine(s) de reconnaissance de glucides de type lectine (Cederfur et al., 2008) (figure I.18). Ces lectines lient les résidus β -galactosides et sont exprimées sous forme soluble, à la surface et dans le cytoplasme de nombreux types cellulaires. Les galectines sont caractérisées par une relativement faible affinité ($K_d \sim 10^{-6}$ M) pour leurs ligands mais aussi par une importante capacité d'oligomérisation dont résultent des interactions de haute avidité (Thiemann and Baum, 2016).

Un criblage des protéines sériques a permis de mettre en évidence l'affinité des galectines (Gal)-3 et Gal-8 pour les IgA sériques (Cederfur et al., 2008). Gal-3 est une galectine chimère, composée d'un seul domaine de type lectine mais capable de s'oligomériser par sa région N_{ter} (figure I.18) (Thiemann and Baum, 2016). Gal-3 est particulièrement affine pour les IgA et les IgE murines (Reljic et al., 2004). Gal-8 est une galectine en tandem, constituée de deux domaines de type lectine, capable de former de larges multimères (figure I.18). De manière intéressante, Gal-8 interagit avec les résidus β -1,3-galactosides α -2,3-sialylés, principalement retrouvés sur les O-glycosylations des IgA1 sériques (figure I.5) (Carlsson et al., 2012). Ainsi l'altération du profil de ces O-glycanes chez les patients atteints de néphropathie à IgA est à l'origine d'une diminution de la fraction sérique interagissant avec la Gal-8, sans qu'aucune conséquence physiopathologique ne soit toutefois établie (Carlsson et al., 2012). Sangeetha et collègues ont montré que Gal-1, une galectine prototype composée d'un unique domaine de type lectine (figure I.18), est aussi capable de fixer les IgA1 sériques, de préférence sous forme polymérique et désialylée (Sangeetha and Appukuttan, 2005).

Le fait que les fonctions des galectines soient aussi diverses que les ligands auxquels elles sont capables de se fixer rend difficile la prédiction des conséquences fonctionnelles de ces interactions.

3.3. La β -1, 4-galactosyltransférase 1 (b4Gal-T1).

La β -1, 4-galactosyltransférase 1 (b4Gal-T1) est une protéine ubiquitaire d'environ 45 – 55 kDa (figure I.19A) (Gmeiner, 1985; Tomana et al., 1993a; 1993b). B4Gal-T1 est codée par le gène *B4GALT1* situé sur le chromosome 9p21. *B4GALT1* code deux isoformes, une longue et une courte, respectivement constituées d'un domaine intracellulaire de 24 et 11 aa (Russo et al., 1990; Strous et al., 1988). Ces deux isoformes de b4Gal-T1 sont exprimées dans l'appareil de Golgi. Une faible fraction de l'isoforme longue est néanmoins retrouvée à la membrane plasmique selon un mécanisme dépendant de l'état de phosphorylation de son domaine intracellulaire (Hathaway et al., 2003; Lopez et al., 1991; Molyneux et al., 2017). B4Gal-T1 est aussi retrouvée sous forme soluble, notamment dans le lait maternel, à la suite du clivage protéolytique du récepteur transmembranaire. De manière intéressante, la forme soluble possède la même activité enzymatique que la forme membranaire (Gmeiner, 1985).

Le domaine catalytique de b4Gal-T1 permet le branchement de Gal en β 1, 4- sur des résidus N-acétylglucosamines (GlcNAc) (Hill et al., 1968). Dans les glandes mammaires, b4Gal-T1 s'hétérodimérise avec l' α -lactalbumine, générant la lactose synthétase, ce qui modifie la spécificité de substrat de b4Gal-T1 du GlcNAc au glucose (Glc) et permet la production de lactose (Glc-Gal) (Brodbeck et al., 1967). Plusieurs études suggèrent aussi que b4Gal-T1 est capable de s'homodimériser voire de former des oligomères incluant d'autres protéines, notamment les α - et β -tubulines (Ramakrishnan et al., 2002; Teasdale et al., 1994; Yamaguchi and Fukuda, 1995).

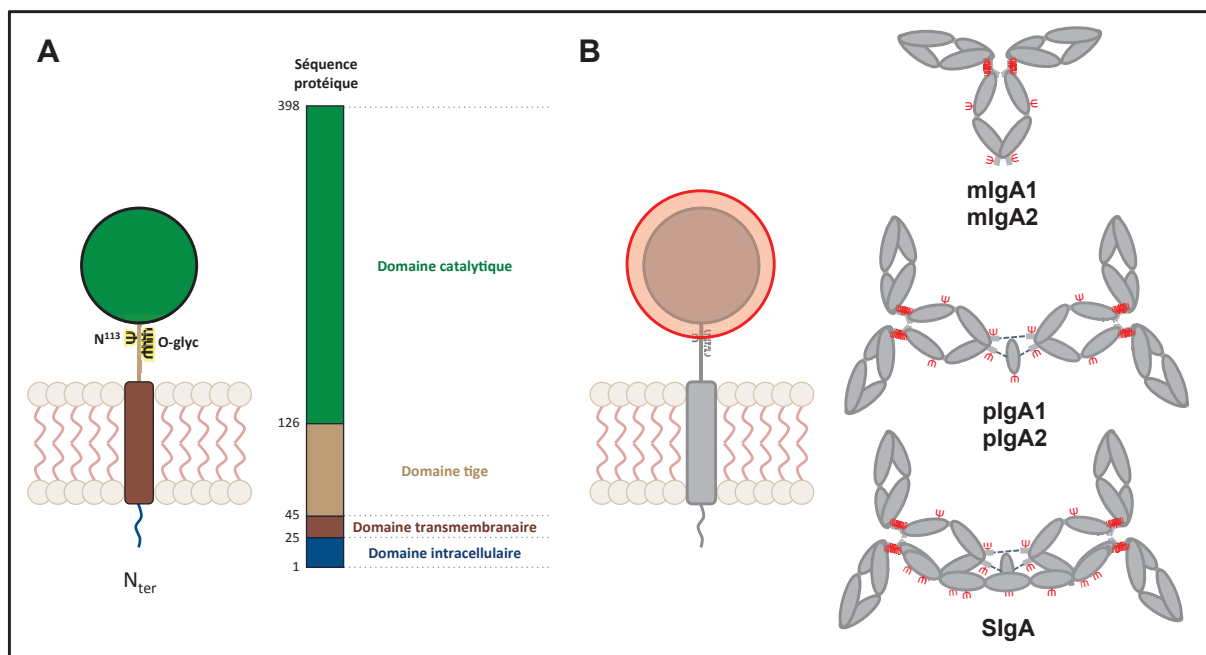


Figure I.19 : L'enzyme β -1,4-galactosyltransférase 1 (b4Gal-T1). (A) **Structure de b4Gal-T1.** B4Gal-T1 est une enzyme transmembranaire constituée d'un domaine tige au bout duquel se trouve son domaine catalytique. Le domaine tige contient un site de N-glycosylation (trident noir et jaune) et 11 sites potentiels de O-glycosylation entre les acides aminés 91 et 126, représentés sous le terme « O-glyc ». B4Gal-T1 peut être clivée au niveau du domaine tige (ciseaux) et exercer son activité enzymatique sous forme soluble. Deux isoformes (courte et longue) de b4Gal-T1 existent. Ces deux isoformes sont identiques à l'exception des 13 premiers acides aminés en N_{ter} , absents de l'isoforme courte. (B) **L'interaction de b4Gal-T1 avec les IgA** semble impliquer son domaine catalytique (disque rouge) et les glycosylations de chacune des formes d'IgA (tridents rouges).

L'interaction entre b4Gal-T1 et les IgA (figure I.19B) est dépendante de cations et implique les glycanes, préférentiellement ceux exposés par les pIgA2 mais aussi par toutes les autres formes d'IgA (Tomana et al., 1993a). Les travaux de Tomana et collègues ont montré que la fixation à b4Gal-T1 n'est associée ni au catabolisme, ni à l'internalisation des IgA (Tomana et al., 1993b).

Dans une récente étude, un criblage d'ADNc exprimés par les cellules mésangiales humaines (HMC) a révélé l'expression de b4Gal-T1 et son implication dans la fixation d'IgA

sériques à la surface des HMC (Molyneux et al., 2017). À la différence des travaux de Tomana et collègues, cet article suggère que l'interaction entre les IgA et b4Gal-T1 opère indépendamment de la présence de cations, au niveau du domaine catalytique de l'enzyme. La fixation des IgA à b4Gal-T1 induirait la production d'IL-6 et pourrait participer à l'atteinte glomérulaire observée dans la néphropathie à IgA.

4. Récepteurs et protéines intracellulaires.

4.1. La protéine contenant un motif tripartite 21 (TRIM21).

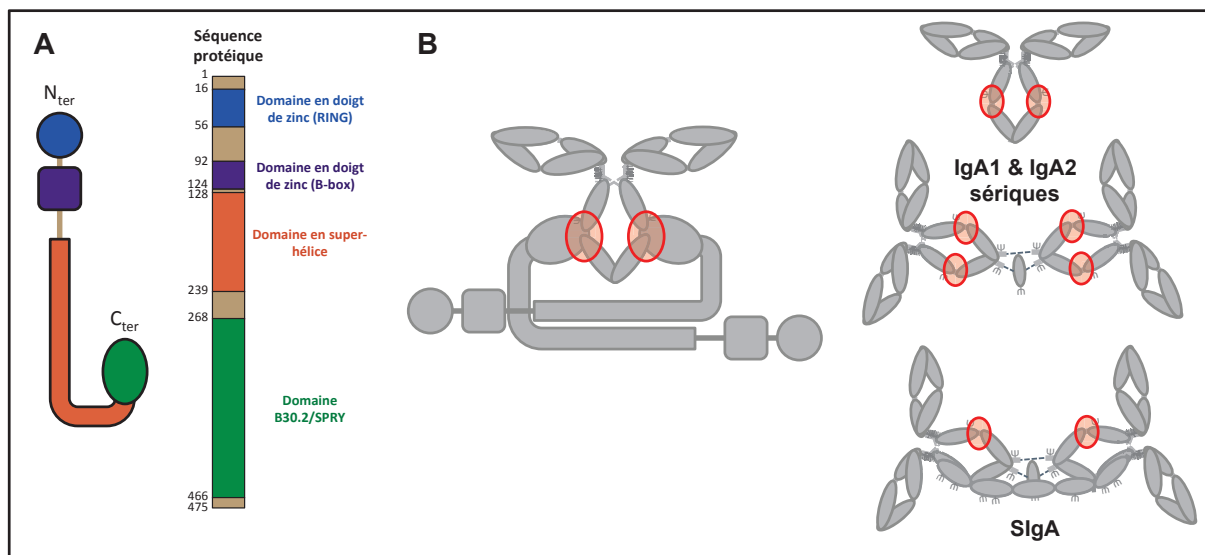


Figure I.20 : La protéine contenant un motif tripartite 21 (TRIM21). (A) **Structure de TRIM21.** TRIM21 est une protéine soluble présente dans le cytosol. Elle est constituée de quatre domaines dont deux en doigt de zinc, RING à activité ligase d'ubiquitine E3, et boîte B. TRIM21 possède aussi un domaine de dimérisation en super-hélice et un domaine B30.2/SPRY permettant son interaction avec d'autres protéines. (B) **Modèle prédictif d'interaction des IgA avec TRIM21.** Le domaine de TRIM21 en super-hélice permettrait la formation d'homodimères antiparallèles capables d'interagir avec les IgA sériques et sécrétoires *via* son domaine B30.2/SPRY. Cette interaction impliquerait l'interface entre els domaines C_{H2} et C_{H3} des IgA. Schéma réalisé d'après (James et al., 2007). RING : Really interesting new gene.

TRIM21 (Tripartite motif-containing protein 21) est une protéine cytoplasmique de 54 kDa, codée par le gène *TRIM21* situé sur le chromosome 11p15. TRIM21 est exprimé dans la majorité des tissus et dans divers types cellulaires immuns et non immuns (Yoshimi et al., 2009). Sa structure est organisée en quatre domaines. Les trois premiers domaines forment un motif tripartite constitué de deux domaines en doigt de zinc, RING (Really interesting new gene) à activité ligase d'ubiquitine E3, et boîte B, et d'un domaine en super-hélice. Le domaine B30.2/SPRY est situé en C_{ter} et permet l'interaction de TRIM21 avec ses ligands (figure I.20A) (McEwan, 2016). TRIM21 interagit avec les IgG, les IgM et les IgA, ce qui est

inhabituel pour un récepteur au Fc des immunoglobulines (Bidgood et al., 2014; Mallery et al., 2010). TRIM21 est capable de se lier aux IgA1 et aux IgA2 sériques ainsi qu'aux SIgA humaines (Bidgood et al., 2014). De manière similaire à l'interaction avec Fc α RI, Fc α / μ R et le pIgR, la modélisation du complexe TRIM21-IgA suggère l'implication du motif ⁴⁴⁰PLAF⁴⁴³ du domaine C_H2 des IgA (figure I.20B). Malgré la présence de la SC qui masque ce domaine sur au moins deux des quatre Fc d'IgA de la molécule de SIgA (figure I.4), l'exposition partielle des Fc sur le bord concave des SIgA et/ou les conditions réductrices présentes dans le cytoplasme suffirait à permettre à une fraction des SIgA d'interagir avec TRIM21 (Bidgood et al., 2014).

Couplées à des particules virales, les IgA cytosoliques sont reconnues par TRIM21 et dirigées vers la voie de dégradation du protéasome par l'intermédiaire de l'activité ligase d'ubiquitine E3 du domaine RING. Du fait de leur interaction avec TRIM21, ces complexes sont considérés comme des motifs moléculaires associés à un signal de danger (DAMP) et activent la voie NF- κ B dont résulte une importante réponse pro-inflammatoire caractérisée par la sécrétion d'interféron (IFN)- β , de TFN, d'IL-6 et de CXCL10 (Bidgood et al., 2014).

Il est important de noter que les IgA impliquées dans ces complexes immuns ne sont pas neutralisantes : elles ne préviennent pas l'entrée virale qui s'opère à l'aide des récepteurs spécifiques au virus. Ce mécanisme, potentiellement présent dans toutes les cellules de l'organisme, permettrait ainsi aux IgA de déclencher une réponse immunitaire innée, indépendamment de toute capacité d'immunosurveillance.

4.2. Le récepteur de type récepteur au Fc A (FcRLA).

Le récepteur de type récepteur au Fc A (FcRLA) est une protéine soluble codée par le gène *FCRLA* localisé sur le chromosome 1q23. FcRLA est exprimé par diverses populations de LB notamment dans les centres germinatifs et la zone marginale de la rate (Mechetina et al., 2002). Cette protéine d'environ 44 kDa, dépourvue de domaine transmembranaire, s'organise en quatre domaines (figure I.21). Le premier domaine, de structure désorganisée, est suivi de deux domaines de type immunoglobuline et d'un domaine bipartite, de type mucine riche en prolines en N_{ter} et formant une hélice α en C_{ter} (Mechetina et al., 2002). FcRLA est une protéine résidente du réticulum endoplasmique où elle est capable d'interagir avec les IgG, les IgM et les IgA (Santiago et al., 2011; Wilson et al., 2010). FcRLA pourrait jouer un

rôle de chaperonne dans l'assemblage des anticorps produits par les LB mais l'absence de phénotype des souris *Fcrla*^{-/-} suggère que son rôle est redondant (Wilson et al., 2010).

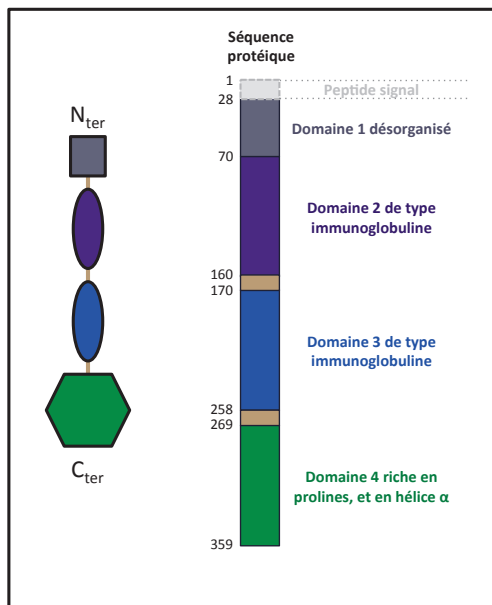


Figure I.21 : Le récepteur de type récepteur au Fc A (FcRLA). FcRLA est une protéine soluble retrouvée dans le réticulum endoplasmique. FcRL4 est constituée de quatre domaines. Un premier domaine de structure désorganisé fait suite à deux domaines de type immunoglobuline et à un dernier domaine riche en prolines en N_{ter} et organisé en hélice α en C_{ter}. Les domaines d'interaction entre FcRL4 et les IgA ne sont pas connus.

5. Les récepteurs aux IgA non identifiés.

De nombreux articles ont fait la description de récepteurs aux IgA sans parvenir à les identifier (Barratt et al., 2000; Diven et al., 1998; Gómez-Guerrero et al., 1993; Millet et al., 1989; 1988; Sibille et al., 1994). La découverte de Fc α RI en 1990 et des récepteurs précédemment décrits dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, explique probablement désormais la majorité de ces résultats. Néanmoins, il me semble qu'au moins trois de ces articles ne trouvent toujours pas de récepteur correspondant à leur description.

5.1. Récepteur(s) aux IgA monomériques.

Kitamura et collègues ont publié un article relatant la fixation des mIgA à la surface de la lignée cellulaire intestinale épithéliale humaine HT-29 (Kitamura et al., 2000). Cette interaction, saturable à une concentration en mIgA de 800 nM ($\sim 128 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), n'entre pas en compétition avec les IgG, les IgM, les SIgA ou l'asialoorosomucoïde (ligand d'ASGPR), mais seulement avec les IgA monomériques et agrégées par chauffage. Ce récepteur semble capable de fixer les mIgA1 et mIgA2 et serait aussi exprimé par d'autres lignées intestinales épithéliales humaines, T84 et Caco-2.

5.2. Récepteur(s) aux IgA sécrétoires.

Les travaux de Lamkhied et collègues ont décrit un récepteur à la SC (seule ou associée dans les SIgA) exprimé par 5 à 60% des polynucléaires éosinophiles (PNE) humains isolés de patients hyper-éosinophiles (Lamkhied et al., 1995). Cette molécule, non exprimée par les polynucléaires neutrophiles, a une taille de 15 kDa. De manière intéressante, la fixation de la SC ($100 \mu\text{g.ml}^{-1}$) est réduite de plus de 80% en présence de SIgA compétitrices ou de SC seule tandis qu'elle n'est pas/peu affectée par les mIgA et les IgG. D'un point de vue fonctionnel, l'interaction de SIgA agrégées avec un anticorps anti-IgA (ou de SC agrégée avec un anticorps anti-SC) avec ce récepteur déclencherait la dégranulation des PNE tandis que la SC seule n'aurait aucun effet. Cette activation dépendante de l'agrégation n'est pas sans rappeler celle de CD89 sur les PNN et suggère un rôle de ce récepteur dans la réponse immune infectieuse, notamment anti-parasitaire.

La présence d'un récepteur inconnu aux SIgA a aussi été rapportée par Oortwijn et collègues à la surface des HMC (Oortwijn et al., 2006a). Cette interaction, non saturable pour des concentrations en SIgA de l'ordre de $250 \mu\text{g.ml}^{-1}$, est indépendante du calcium et déclencherait la production d'IL-6 par les HMC. De par l'augmentation de la concentration sérique en SIgA chez les patients atteints de néphropathie à IgA, ce récepteur pourrait, à l'image de CD71, participer à la physiopathologie de cette maladie.

À l'image du polymorphisme structural des IgA, les récepteurs et protéines interagissant avec les IgA sont tout aussi variés. Ils semblent néanmoins pouvoir être rassemblés en deux principales catégories : les récepteurs au Fc et ceux aux glycanes (Tableau I.2). Les premiers sont organisés en domaines de type immunoglobuline et interagissent principalement avec les IgA au niveau de l'interface entre les domaines C_{H2} et C_{H3} . Dans cette famille, CD71 se distingue d'abord par sa structure qui, très différente des autres récepteurs au Fc, ne le prédispose *a priori* pas à interagir avec les IgA. En outre, l'affinité particulière de CD71 pour la région charnière et les O-glycanes des IgA tendrait à le classer parmi les récepteurs aux glycanes mais les modalités d'interaction avec ses ligands connus et l'absence de domaine de type lectine ne suggèrent pas de rôle du même type (Radoshitzky et al., 2008).

La seconde catégorie de récepteurs de type lectine, reflète la richesse et l'exposition des glycosylations des IgA, incomparablement supérieure aux autres isotypes d'anticorps. Cette diversité de glycanes, notamment sur les SIgA, est aussi mise à profit pour interagir avec de nombreux micro-organismes. De telles fonctions sont indépendantes des Fab et placent subtilement les SIgA à l'interface entre immunité adaptative (dont elles sont issues) et immunité innée (par la reconnaissance de divers motifs moléculaires associés aux microbes, MAMP). La description de ces fonctions fera, entre autres, l'objet du chapitre suivant.

Protéine	PM (kDa)	Affinité	Ca ²⁺	Interaction
pIgR	120	pIgA1 pIgA2	✗	Fc
FcαRI	50 - 100	mIgA1, pIgA1 mIgA2, pIgA2 SIgA*	✗	Fc
Fcα/μR	58	pIgA1 pIgA2	✗	Fc
CD71	90	pIgA1	✗	Fc
FcRL4	57	IgA sériques	?	Fc
TRIM21	54	IgA1 et IgA2 sériques SIgA	✗	Fc
FcRLA	47	IgA	✗	Fc
Protéine	PM (kDa)	Affinité	Ca ²⁺	Interaction
<i>Kitamura et al., 2000</i>	?	mIgA1, mIgA2	?	?
<i>Lamkhloved et al., 1995</i>	15	SIgA	?	SC
<i>Oortwijn et al., 2006</i>	?	SIgA	✗	?

Protéine	PM (kDa)	Affinité	Ca ²⁺	Interaction (ose impliqué)
ASGPR	33 - 35	IgA2 > IgA1 m = p (+ SIgA)	✓	Glycanes (Galactose)
DC-SIGN	44	mIgA2 SIgA	✓	Glycanes (Mannose)
Dectine-1	28	mIgA2, pIgA2 SIgA2	?	Glycanes (acide sialique)
Siglec-5	70	mIgA2, pIgA2 SIgA2	?	Glycanes (acide sialique)
MMR	175	SIgA	✓	Glycanes (Mannose)
Gal-1	15	pIgA1 > mIgA1	✗	Glycanes (acide sialique)
Gal-3	26	IgA	✗	Glycanes
Gal-8	36	IgA1	✗	Glycanes (acide sialique)
b4Gal-T1	45 - 55	pIgA2 ++ mIgA1, mIgA2 pIgA1, SIgA	✓/✗	Glycanes

Tableau I.2 : Synthèse des principales caractéristiques des récepteurs et protéines interagissant avec les IgA. Pour chacun des récepteurs sont mentionnés son poids moléculaire et son affinité pour les différentes sous-classes et formes d'IgA. La nécessité de cations calciques est aussi renseignée, accompagnée de la fraction de l'IgA impliquée dans l'interaction. PM : Poids moléculaire ; kDa : kilodaltons ; Ca²⁺ : Interaction dépendante du calcium ; Fc : Fragment cristallisable ; SC : Pièce sécrétoire ; ? : Paramètre inconnu.

CHAPITRE 3 : Les fonctions des IgA intestinales en relation avec l'épithélium.

Dans la lumière intestinale, les SIgA sont séparées de l'épithélium par une couche de mucus. Ce mucus, épais et dense dans le colon, forme une barrière très peu perméable aux antigènes microbiens. En revanche, l'intestin grêle est recouvert d'une couche de mucus beaucoup plus fine et désorganisée, plus permissive à l'entrée en contact des antigènes (alimentaires et microbiens) avec les IEC (Atuma et al., 2001; Shan et al., 2013). Cette plus grande promiscuité nécessite la mise en place de mécanismes complémentaires afin de limiter la pénétration de pathogènes et de maintenir la tolérance au microbiote commensal. Dans cet environnement, les SIgA contribuent de façon importante à la barrière intestinale et exercent leurs diverses fonctions en étroite collaboration avec l'épithélium. Les SIgA sont notamment capables d'empêcher l'entrée et l'adhésion des micro-organismes luminaux par divers mécanismes discutés dans la première partie de ce chapitre. Dans la seconde partie, nous verrons que les fonctions des SIgA ne se limitent pas à la lumière mais opèrent aussi dans les IEC où elles peuvent neutraliser des antigènes intracellulaires. Une troisième partie décrira la capacité des pIgA à agir dans le chorion par excrétion luminale de complexes immuns.

Le système immunitaire n'est toutefois pas ignorant de ce qui se passe dans la lumière intestinale. Des échantillons du contenu microbien luminal lui arrivent notamment par un mécanisme hautement régulé de transcytose inverse à travers les cellules M. Ce mécanisme sera détaillé dans la quatrième partie de ce chapitre. Enfin, une dernière partie illustrera le détournement de ce mécanisme physiologique par l'entérocyte, dans le cas de la maladie cœliaque.

1. L'exclusion luminale.

1.1. Exclusion dépendante de la spécificité antigénique.

Les SIgA protègent l'organisme face à de nombreux pathogènes et toxines en reconnaissant spécifiquement des épitopes de surface (Apter et al., 1993b; Hutchings et al., 2004; Michetti et al., 1992).

Un des mécanismes par lesquels les SIgA confèrent cette protection est le blocage de la liaison de l'antigène à son récepteur spécifique. Ce mécanisme opère dans un modèle murin d'infection par le reovirus de type 1 Lang (T1L) dans lequel les IgA produites en réponse à une immunisation sont nécessaires à la protection en cas de réinfection ultérieure (Silvey et al., 2001). Des études complémentaires ont montré que les SIgA protectrices contre ce virus sont neutralisantes, avec pour antigène commun le domaine de liaison de l'adhésine virale σ_1 à son récepteur cellulaire (Helander et al., 2004; Hutchings et al., 2004). Ce mécanisme de blocage de liaison entre l'antigène et son récepteur est aussi employé par les SIgA pour empêcher l'adhésion à l'épithélium de la ricine, une lectine végétale extrêmement cytotoxique, dont la crainte d'une utilisation bioterroriste stimule la recherche en vaccinologie (Mantis et al., 2006)

De façon similaire, les SIgA produites en réponse à l'immunisation par la toxine cholérique jouent un rôle majeur en cas de réinfection par *V. cholerae* (Lycke et al., 1999; Uren et al., 2005). Cette toxine est constituée de deux types de sous-unités, A et B. Cette dernière s'oligomérisse en pentamères et permet la fixation de la toxine AB₅ au ganglioside GM1, dont résulte l'internalisation du complexe (Sattler et al., 1978; Zhang et al., 1995). L'analyse des anticorps protecteurs *in vitro* montre que ceux-ci empêchent l'adhésion de la toxine à une monocouche d'IEC. Cependant, bien que dirigés contre la sous-unité B, aucun de ces anticorps n'a pour épitope le domaine de liaison à GM1 (Apter et al., 1993a). Ce résultat suggère que l'effet protecteur des SIgA contre l'infection par *V. cholerae* serait lié à un phénomène d'encombrement stérique qui empêcherait la fixation de la sous-unité B à l'épithélium.

1.2. Exclusion indépendante de la spécificité antigénique.

À la différence des exemples précédents, les fonctions des SIgA détaillées dans cette partie sont généralement attribuées à la réponse immunitaire innée. En effet, les SIgA sont hautement glycosylées et arborent des motifs oligosaccharidiques similaires aux glycoprotéines de surface des IEC. Cette ressemblance permet aux glycanes des SIgA de fixer certaines lectines microbiennes (ou toxines végétales) et d'empêcher leur adhésion épithéliale.

Plusieurs études ont montré que les SIgA sont capables de prévenir l'adhésion épithéliale de différentes souches de *E. coli*, notamment de la souche entéropathogène, en se liant à leurs adhésines (Perrier et al., 2006; Schrotten et al., 1998; Wold et al., 1990). Perrier et collègues ont montré que cette protection implique plus précisément les résidus Gal et Neu5Ac des SIgA et peut être conférée par la SC seule (Perrier et al., 2006). De manière similaire les résidus mannoses des SIgA leur permettent d'interagir avec *V. cholerae* et de limiter la formation de biofilms (Murthy et al., 2011).

Les toxines végétales et bactériennes peuvent aussi être cibles de ce mécanisme. La toxine de la ricine, déjà présentée dans la partie précédente, interagit avec des SIgA non spécifiques et la SC seule. Cette interaction dépend des résidus Gal (Mantis et al., 2004). Les Gal et Neu5Ac de la SC sont aussi mis à profit pour limiter l'effet cytopathogène de la toxine A de *C. difficile* dans le colon (Dallas and Rolfe, 1998; Perrier et al., 2006).

Les capacités d'interactions présentées dans cette partie sont généralement d'affinité modérée au regard de l'exclusion dépendante de la spécificité antigénique. Elles ne sont néanmoins pas à négliger compte tenu de l'abondance des SIgA dans la lumière intestinale et de la combinaison potentielle entre différents mécanismes de protection (Mantis et al., 2004; 2006).

1.3. Exclusion immune.

L'exclusion immune consiste en (1) la formation d'amas microscopiques ou l'agglutination, (2) l'accrochage dans le mucus et (3) la clairance des microbes, empêchant ainsi l'attachement, et l'invasion de la muqueuse (Shan et al., 2013; Williams and Gibbons, 1972).

Les travaux pionniers de Williams & Gibbons réalisés sur différentes souches de streptocoques, ont montré que les souches agglutinées par des SIgA purifiées de glandes parotides adhéraient en moyenne trois fois moins bien qu'en l'absence de SIgA (Williams and Gibbons, 1972).

Shigella flexneri est un pathogène humain responsable d'un grave syndrome dysentérique, dont la protection peut être conférée par des IgA spécifiques de l'antigène O du lipopolysaccharides (LPS) (Phalipon et al., 1994). Plusieurs études ont montré que cette protection est dépendante des glycosylations de la SC des IgA, dont l'interaction avec le

mucus permet l'ancrage des complexes immuns et leur élimination par exclusion immune (Boullier et al., 2009; Phalipon et al., 2002).

La limite majeure de l'exclusion immune par agglutination est qu'elle n'est effective qu'à de fortes densités de micro-organismes ($\geq 10^8$ unités de formation de colonies (CFU) par gramme) alors que dans nombre d'infections, les densités atteintes sont beaucoup plus faibles (10^0 - 10^7 CFU.g⁻¹) (Moor et al., 2017). Les récents travaux de Moor et collègues ont permis de revisiter la définition même du mécanisme d'exclusion immune en montrant que la formation d'amas bactériens microscopiques est suffisante à l'effectivité du mécanisme. Leur étude menée dans un modèle d'infection intestinale par *S. typhimurium* montre que des SIgA de haute avidité spécifiques du pathogène permettent l'« enchaînement bactérien » et réduiraient la densité bactérienne de 90% pour de très faibles CFU (dès 10^2 g⁻¹). Leur modélisation mathématique confirmée par des résultats expérimentaux montre que l'« enchaînement bactérien » (1) augmente le taux d'extinction clonal, (2) accélère la clairance du pathogène et (3) limiterait le transfert horizontal de plasmides entre populations séparées.

1.4. Effets sur la virulence bactérienne.

Les SIgA peuvent avoir un effet direct sur les micro-organismes dont elles sont spécifiques. Les IgA dirigées contre l'antigène O du LPS de *S. typhimurium* ont ainsi une forte capacité de réduction de la motilité bactérienne et de l'invasion épithéliale dépendante du système de sécrétion de type 3 (Forbes et al., 2008). Ces résultats, appuyés par des clichés de microscopie électronique à balayage suggèrent que l'action des SIgA serait consécutive à un stress induit par la déformation de la paroi bactérienne externe (Amarasinghe et al., 2013; Mantis and Forbes, 2010). Les SIgA spécifiques de l'antigène O du LPS de *S. flexneri* exercent un effet similaire en altérant temporairement la motilité du pathogène ainsi que la bioénergétique de son système de sécrétion de type 3 (Forbes et al., 2011).

L'ensemble de ces mécanismes exercés par les SIgA dans la lumière intestinale confère une première protection de l'organisme vis-à-vis des bactéries, virus et toxines. L'effet protecteur des SIgA est favorisé par la complémentarité de ces mécanismes. Ainsi, des pathogènes comme *S. flexneri* et *S. typhimurium* sont les cibles d'antigènes spécifiques mais aussi d'interactions dépendantes des glycanes des SIgA, dont résulte l'exclusion immune des micro-organismes. En outre, les SIgA ne constituent pas seulement une barrière physique

séparant l'hôte des micro-organismes luminaux, mais ont des effets directs sur la physiologie de leurs cibles. Toutefois, certains pathogènes réussissent à pénétrer dans les IEC et nécessitent la mise en place d'autres moyens de protection.

2. La neutralisation intracellulaire.

La neutralisation intracellulaire de virus par les IgA est un phénomène observé de longue date par les chercheurs, notamment pour le virus de Sendai, le virus influenza, le rotavirus et le VIH (Bomsel et al., 1998; Burns et al., 1996; Mazanec et al., 1995a; 1992). Cette neutralisation s'opère dans des compartiments endosomaux apicaux dans lesquels les pIgA qui transcytent associées au pIgR rencontrent les particules virales internalisées au pôle apical (Fujioka et al., 1998; Mazanec et al., 1995b). De manière intéressante, l'effet protecteur des IgA dirigées contre la protéine virale 6 (VP6) du rotavirus n'opère pas dans la lumière intestinale mais uniquement par ce mécanisme de neutralisation intracellulaire (Corthesy et al., 2006). Fernandez et collègues ont montré que ce mécanisme est aussi employé par les pIgA pour atténuer la réponse pro-inflammatoire anti-bactérienne (Fernandez et al., 2003). Dans ce modèle, les pIgA colocalisent avec le LPS dans l'endosome de recyclage apical et limitent la réponse pro-inflammatoire dépendante de la voie NF- κ B.

La neutralisation virale par le IgA directement dans le cytoplasme de cellules infectées a récemment été mise en évidence. Ce mécanisme, appelé neutralisation intracellulaire dépendante des anticorps (ADIN), est directement permis par le récepteur intracellulaire aux IgA, TRIM21 (Bidgood et al., 2014). Comme détaillé dans le chapitre 2 (partie 4.1), ce mécanisme est permis par le recouvrement de surface des particules virales par des IgA non neutralisantes. L'effectivité de ce mécanisme n'a toutefois pas encore été démontrée dans les IEC.

3. L'excrétion luminale.

Certains microbes parviennent néanmoins à atteindre le chorion des muqueuses où les pIgA intestinales peuvent exercer une ultime fonction protectrice, l'excrétion luminale des antigènes. Les travaux de Kaetzel et collègues *in vitro* ont rapporté que des complexes

immuns de pIgA formés dans le chorion des muqueuses sont capables d'emprunter la voie de transcytose du pIgR (Kaetzel et al., 1994; 1991). De manière similaire à la transcytose de pIgA seules, les complexes immuns de pIgA sont transportés sans être dégradés, puis excrétés au pôle apical de l'épithélium.

Le transport des pIgA par le pIgR joue un rôle central dans la protection conférée par les IgA en leur permettant d'exercer leurs fonctions effectrices dans le chorion et pendant leur transport trans-épithélial (neutralisation intracellulaire). Le rôle du pIgR est d'autant plus important que son action est démultipliée en conditions pro-inflammatoires. En effet, diverses études ont montré une augmentation d'expression du pIgR en réponse à l'IFN- γ , au TNF, à l'IL-1, à l'IL-4 et à l'IL-17 (Cao et al., 2012; Jaffar et al., 2009; Kaetzel, 2005). La transcytose par l'intermédiaire du pIgR apparaît ainsi comme un important pilier à l'interface entre l'immunité innée et adaptative, maintenant la séparation entre l'hôte et l'environnement extérieur.

L'hôte est néanmoins « tenu informé » de ce qui se passe dans la lumière et possède d'astucieux systèmes de rétro-transport à travers l'épithélium. Ces divers systèmes consistent notamment en l'importante capacité endocytaire des cellules M au niveau des plaques de Peyer, le passage d'antigènes associé aux cellules caliciformes (GAP), et l'émission de dendritiques à travers l'épithélium par les DC (McDole et al., 2012; Neutra et al., 1987; Rescigno et al., 2001). Un mécanisme additionnel, nommé transcytose inverse, implique les SIgA et fera l'objet de la partie suivante.

4. La transcytose inverse.

4.1. La transcytose inverse physiologique, la cellule M.

Les cellules M représentent environ 10% des cellules de l'épithélium associé aux follicules lymphoïdes (FAE), recouvrant les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés. À la différence des entérocytes des villosités intestinales, les cellules M ont une morphologie unique avec un glycocalyx réduit et l'absence presque totale de bordure en brosse. Elles forment néanmoins des jonctions serrées avec les cellules voisines et présentent une « poche intraépithéliale » basolatérale dans laquelle se logent des populations immunitaires spécifiques.

Le premier cliché mettant en évidence la fixation de SIgA au niveau des cellules M des plaques de Peyer de lapin a été pris il y a quarante ans par Roy et collègues (Roy and Varvayanis, 1987). Deux études ultérieures ont confirmé ce résultat et suggéré l'existence d'un récepteur aux IgA à la surface des cellules M (Kato, 1990; Weltzin et al., 1989). Les travaux de Mantis et collègues suivis de ceux de Rochereau et collaborateurs (Mantis et al., 2002; Rochereau et al., 2013) ont permis d'identifier ce(s) récepteur(s) comme étant dectine-1, et potentiellement siglec-5 (*voir chapitre 2, parties 2.3 & 2.4*).

Rochereau et collègues ont mis à profit ce mode de rétro-transport pour délivrer dans les plaques de Peyer des SIgA2 conjuguées à l'antigène p24 du VIH. Ils ont montré que les DC CX3CR1⁺ du dôme sous-épithélial sont ensuite capables d'endocyter les SIgA *via* DC-SIGN, et d'induire une importante réponse humorale systémique et mucoale dirigée contre l'antigène p24 du VIH (Rochereau et al., 2013).

Bien que l'existence de la transcytose inverse par les cellules M ne fasse aucun doute, le rôle de dectine-1 n'a pas été confirmé pour le rétro-transport de complexes immuns de bactéries dans les récents travaux de l'équipe de M. Rescigno (Fransen et al., 2015). Dans cette étude, ni l'administration d'anticorps bloquants anti-dectine-1, ni les souris *Clec7a*^{-/-} n'ont permis de réduire la transcytose inverse des complexes immuns.

Ces résultats contradictoires indiquent que la nature des complexes d'IgA serait déterminante dans le choix des récepteurs auxquels ils se lient à la surface des cellules M et/ou des autres cellules épithéliales des FAE et suggèrent l'existence d'un autre récepteur aux IgA non encore identifié.

4.2. La transcytose inverse pathologique, l'entérocyte et la maladie cœliaque.

La maladie cœliaque (CeD) est une entéropathie chronique induite par l'ingestion de gluten chez des individus génétiquement prédisposés (HLA-DQ2/8) (Sollid et al., 1989). Le gluten constitue la fraction protéique insoluble dans l'eau des farines de blé, de seigle et d'orge. Cet antigène alimentaire a la particularité d'être riche en résidus prolines, ce qui lui confère une résistance élevée aux enzymes gastro-pancréatiques et intestinales dépourvues d'activité endoprotéolytique efficace (Shan et al., 2002). La dégradation des peptides issus du gluten s'opère majoritairement lors de leur transport trans-épithélial, conduisant à la présence dans le chorion de courts peptides dont une très faible fraction est immunogène ($\leq 10\%$). En revanche, près de 50% de ces peptides sont retrouvés intacts ou partiellement

dégradés suite à leur transport à travers l'épithélium d'un individu cœliaque (Matysiak-Budnik et al., 2003).

Dans une muqueuse saine, l'expression de CD71 est normalement restreinte au pôle basolatéral des entérocytes mais il a été montré que son expression est augmentée et retrouvée au pôle apical des entérocytes de patients cœliaques (Barisani et al., 2004; Matysiak-Budnik et al., 2008). Après avoir écarté l'hypothèse d'un transport paracellulaire accru chez les patients cœliaques, notre laboratoire a montré que l'interaction entre les SIgA et CD71 participe à la transcytose inverse de complexes immuns de SIgA (Matysiak-Budnik et al., 2008; Ménard et al., 2012). En outre, CD71 permet aux complexes immuns d'échapper à la dégradation lysosomale et d'être relargués en partie intacts au pôle basal des entérocytes (Lebreton et al., 2012). Une étude chez la souris a permis de confirmer ces résultats. L'expression apicale de CD71 sur les entérocytes a été induite dans des souris produisant des SIgA anti-ovalbumine (OVA) (modèle de tumeur « backpack ») et gavées par de l'OVA (Abed et al., 2014). Dans ce modèle, une importante transcytose inverse d'OVA est observée et s'accompagne de la production de cytokines pro-inflammatoires de type IFN- γ par les LT CD4⁺ spécifiques de l'OVA dans les ganglions mésentériques (Abed et al., 2014).

Aucun des multiples récepteurs aux IgA décrit dans le chapitre 2 n'a été décrit au pôle apical de l'épithélium intestinal en conditions physiologiques. L'exemple de la CeD montre à quel point l'expression ectopique de l'un d'entre eux peut, en présence de SIgA spécifiques, déclencher une importante réponse pro-inflammatoire. Ces résultats renforcent l'idée que l'environnement dans lequel s'opère la transcytose inverse doit être restreint à des sites privilégiés où les mécanismes d'immunosurveillance et immunorégulateurs sont abondamment présents.

Justification et objectifs du travail de thèse.

Ma thèse s'inscrit dans la continuité des travaux du laboratoire portant sur l'étude de l'interaction entre les SIgA humaines et le récepteur à la transferrine (CD71) à la surface de l'entérocyte, dans la maladie cœliaque. Les travaux antérieurs ont montré que CD71, surexprimé au pôle apical des entérocytes chez les patients cœliaques, interagit avec les SIgA couplées à des peptides de gliadines et permet leur transcytose inverse à travers l'épithélium intestinal. L'objectif initial de ma thèse était d'étudier les voies de signalisation entérocytaires induites par cette interaction afin d'expliquer les dommages épithéliaux (atrophie villositaire, hyperplasie cryptique) observés dans la maladie cœliaque. Pour ce faire, nous avons entrepris de générer des lignées épithéliales intestinales stables dépourvues du récepteur CD71, à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9. À notre grande surprise, nous avons remarqué que l'absence de CD71 à la surface de ces différentes lignées cellulaires n'altère pas la fixation des SIgA. Nous avons ainsi réorienté nos objectifs selon quatre axes majeurs :

- (1) Confirmer que CD71 n'est pas le récepteur direct aux SIgA humaines.
- (2) Caractériser les paramètres d'interaction et identifier le(s) (co-)récepteur(s) direct(s) aux SIgA exprimé(s) par la lignée Caco-2.
- (3) Préciser l'organisation du complexe protéique interagissant avec les SIgA dans le modèle Caco-2.
- (4) Définir le rôle fonctionnel des partenaires identifiés dans le modèle Caco-2.

II. Méthodologie

1. Préparations d'immunoglobulines.

Les IgA proviennent de préparations commerciales purifiées à partir de sérums d'individus sains (MP Biomedicals, Athens Research & Technology), de patients atteints de myélome multiple à IgA1 ou IgA2m(1) (Athens Research & Technology) et de colostrum humain (Fitzgerald, Athens Research & Technology, Sigma-Aldrich). Pour toutes les solutions d'IgA que nous avons utilisées, nous avons procédé à une séparation des monomères et polymères par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Superdex 200 (GE Healthcare), suivie d'une reconcentration en tampon phosphate salin (PBS, Gibco™) par ultrafiltration (Amicon®, Merck) (figure supplémentaire 1).

Les IgG et IgM utilisées dans les expériences de compétition par cytométrie en flux proviennent de chez Athens Research & Technology.

Toutes les préparations d'immunoglobulines ont été dosées par mesure de l'absorbance à 280 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), et les concentrations déterminées selon les coefficients d'extinction molaires établis par Nikolayenko et collègues (Nikolayenko and Galkin, 2005).

2. Culture cellulaire.

Les expériences ont été réalisées sur les cellules Caco-2 (American type culture collection (ATCC®) HTB-37™), Caco-2 sous-clone TC7 (*P. Sansonetti*, Inserm U786), HT-29 (*N. Cerf-Bensussan*, Inserm U1163), HIEC (*J.-F. Beaulieu*, (Perreault and Beaulieu, 1996)) et COS-7 (*A. Hovnanian*, Inserm U1163). Ces différentes lignées ont été cultivées selon les recommandations de l'ATCC. Les cellules Caco-2 sous-clone TC7 ont été maintenues en milieu DMEM GlutaMAX (Gibco™), supplémenté par 20% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco™), 10 U.ml⁻¹ de pénicilline et 10 µg.ml⁻¹ de streptomycine (Gibco™). Le milieu de culture des cellules TFRC_em a été complété par 500 µM de citrate de fer (Merck). Les cellules ont été passées deux fois par semaine, après décrochage par la trypsine (Gibco™).

2.1. Expression hétérologue de CD71 humain.

La séquence codant CD71 humain (NM_001128148) insérée dans le vecteur pcDNA3.1(+) a été généreusement donnée par I. Moura (Inserm U1163). Le vecteur pcDNA3.1(+) seul (Invitrogen™) a été utilisé comme contrôle négatif. Les cellules COS-7 ont été transfectées à l'aide de la lipofectamine LTX (Invitrogen™) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, les cellules ont étéensemencées 24 h avant transfection en plaque 6 puits. 2,5 µg d'ADN plasmidique ont été pré-incubés pendant 20 min en milieu Opti-MEM® (Gibco™) contenant 12,5 µl de lipofectamine LTX et 2,5 µl de PLUS™ Reagent. Après lavage du tapis cellulaire, les cellules ont été incubées en présence des complexes ADN-lipides pendant 6 h à 37°C. Le milieu de culture a ensuite été remplacé par du DMEM supplémenté par 10% de SVF. Deux jours après transfection et pendant tout le temps de leur culture, les cellules transfectées ont été sélectionnées positivement par le sulfate G418 (Généticine®, Gibco™).

2.2. Extinction de gènes par la technologie CRISPR-Cas9.

Les séquences guides ciblant les gènes d'intérêt ont été déterminées à l'aide de l'outil en ligne Benchling (www.benchling.com). Parmi les séquences proposées, nous avons choisi trois séquences par gène selon les critères suivants :

- (1) La séquence génique ciblée est partagée par tous les transcrits alternatifs du gène.
- (2) La séquence génique appartient aux exons les plus proximaux.
- (3) La séquence du guide présente une spécificité et une efficacité de clivage respectivement supérieures à 80% et 60% d'après les algorithmes développés par Hsu et collaborateurs, et Doench et collègues (Doench et al., 2016; Hsu et al., 2013).

Les séquences choisies ont été clonées dans le vecteur lentiviral pLentiCRISPRv2 (Addgene) contenant la séquence codant l'enzyme Cas9, selon le protocole établi par Shalem et collègues (tableau II.1) (Shalem et al., 2014). Le plasmide pLentiCRISPRv2 a ensuite été transfecté en présence des plasmide de trans-complémentation psPAX (Addgene) et pMD2.G (Addgene) contenant respectivement les gènes d'enveloppe *Gag* du VIH et de la glycoprotéine de surface du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G). Les cellules Lenti-X 293T (Clontech Laboratories) ont été transfectées 24 h après ensemencement (~70% de confluence) par 15 µg de plasmide total (ratio insert:enveloppe:glycoprotéine de surface de

2:1:1) et 45 µl de lipofectamine 2000 (Invitrogen™). Six heures après transfection, le milieu de culture a été renouvelé. Le surnageant de culture contenant les particules virales a été récolté 72 h plus tard et filtré (0,45 µm). Les cellules Caco-2 TC7 sauvages ensemencées depuis 24 h en plaque 6 puits (~80% confluence) ont été transduites par 1 ml de surnageant complété par 500 µl de milieu Opti-MEM® et 8 µg.ml⁻¹ de polybrène (Sigma-Aldrich), pendant 2 h à 300 g et 37°C. 24 h après transduction et durant 14 jours, les cellules transduites ont été sélectionnées par la puromycine (10 µg.ml⁻¹ ; Gibco™).

Afin d'obtenir une population polyclonale déficiente en CD71 aussi homogène que possible, les cellules TFRC_em et TFRC_6 ont été triées à l'aide du cytomètre en flux SH-800 (Sony Biotechnology) selon leur niveau d'expression de CD71.

Après sélection antibiotique et/ou tri cellulaire, l'expression résiduelle des gènes ciblés a été évaluée par western-blot (WB) et/ou cytométrie en flux selon les épitopes reconnus par les anticorps disponibles.

Gène cible	Nom du guide	Séquence du guide (5' – 3')
Contrôle négatif	Scramble	GGACAATCATGGTGAAAGCGG
<i>TFRC</i>	TFRC_em TFRC_6	GAGAACCATTGTCATATACC GGGTTATGTGGCGTATAGTA
<i>LGALS3</i>	Gal-3 sg3.3 Gal-3 sg4.2	GAAGGATGGCCTGGCGCATGG GCTGATAACAATTCTGGGCA
<i>LGALS8</i>	Gal-8 sg7.1	GTGAAAGGCCACATCGGCTCG
<i>SCAMP3</i>	SCAMP3 sg1 SCAMP3 sg3	GATGGCTCAGAGCAGAGACGG GTGGGGCTGAGCTTTCTCGA
<i>BCAP31</i>	BCAP31 sg2.1 BCAP31 sg4	GTGCCACCTTCCTCTATGCGG GATACTTCCGAATTTTCGCGCA
<i>HM13</i>	HM13 sg1.1 HM13 sg1.2	GTCCGCATAACGGCAGTGCCG GCCCCACCAACAGCACTACG

Tableau II.1 : Séquences guides CRISPR-Cas9. Séquences utilisées et dont l'efficacité a été vérifiée. Contrôle négatif : Séquence oligonucléotidique ne ciblant aucun gène du génome humain.

3. Cytométrie en flux.

Pour les expériences de cytométrie en flux, les cellules ont été décrochées par la solution enzymatique TrypLE™ Express (Gibco™) en remplacement de la trypsine, afin de préserver les épitopes de surface.

3.1. Expériences de fixation des IgA et de l'holotransferrine.

Les cellules ($1-2 \times 10^5$) ont été lavées en PBS puis incubées à 4°C pendant 30 min, dans 100 µl de PBS contenant $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ d'IgA. Après un lavage, les cellules ont été incubées en présence des anticorps secondaires (Fab')₂ anti-IgA biotinylés (tableau II.2) pendant 30 min à 4°C. Un nouveau lavage a été réalisé avant d'ajouter de la streptavidine conjuguée au tandem de fluorochromes phycoérythrine-cyanine 7 (PE-Cy7), ainsi qu'un marqueur de viabilité cellulaire (Live/Dead™ cell dye Pacific Orange, Invitrogen™), pendant 30 min à 4°C. Après un ultime lavage, les cellules ont été analysées à l'aide du cytomètre en flux Canto II (BD Biosciences).

Pour les autres marquages de surface analysés par cytométrie en flux et lors des tris cellulaires, le même protocole a été utilisé en adaptant les anticorps.

Pour les expériences de compétition, les cellules ont été pré-incubées en présence de $2,0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ d'immunoglobulines compétitrices pendant 30 min à 4°C, avant d'ajouter $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de SIgA biotinylées (EZ Link™ Sulfo-NHS-Biotin, Thermo Scientific™) sans lavage intermédiaire.

Les expériences de fixation de la transferrine ont été réalisées en incubant les cellules en présence de $25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ de transferrine humaine sérique conjuguée au fluorochrome Alexa Fluor® 647 (Invitrogen™) pendant 30 min à 4°C.

Après analyse des échantillons par cytométrie en flux, l'intensité de fluorescence médiane (MFI) du bruit de fond a été soustraite à la MFI mesurée pour chaque échantillon.

3.2. Expériences d'endocytose des IgA.

Les cellules ($1-2 \times 10^5$) ont été lavées en PBS et incubées en présence d'IgA ($200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) pendant 30 min à 4°C. Un lavage par centrifugation ($400 \text{ g}/5 \text{ min}/4^\circ\text{C}$) a été réalisé afin d'éliminer toutes les IgA non fixées aux cellules. Les cellules ont été resuspendues dans 50 µl de PBS glacial, puis 500 µl de PBS pré-chauffé à 37°C ont été ajoutés et les cellules ont été incubées pendant 1 à 10 min dans un bain-marie à 37°C. La réaction a immédiatement été stoppée par ajout de 2 ml de PBS glacial et stockage des échantillons en glace. Après un lavage, les incubations en présence des anticorps secondaires, de la streptavidine et du marqueur de viabilité ont été réalisées comme précédemment détaillé.

Après analyse des échantillons par cytométrie en flux, la MFI du bruit de fond ((Fab')₂ anti-IgA biotinylés et streptavidine PE-Cy7 incubés en l'absence d'IgA), a été soustraite à la MFI de chacune des conditions. Nous avons ensuite calculé le rapport entre les MFI mesurées au différents temps d'incubation à 37°C et les MFI mesurées dans les échantillons exclusivement incubés sur glace. Toutes les conditions incubées sur glace ont été normalisées à 100% afin de ne pas tenir compte des différences de fixation initiales des différentes formes d'IgA. Enfin, toutes les valeurs obtenues ont été soustraites à 100 afin d'obtenir le pourcentage d'IgA internalisées selon le temps d'incubation à 37°C.

3.3. Anticorps et réactifs utilisés en cytométrie en flux.

Réactif ou antigène - fluorochrome	Distributeur, référence	Clone	Espèce	Dilution
CD71 - PE	BD Pharmingen™ , #555537	M-A712	Souris	1/10 ^e
CD71 - APC	eBioscience™ , #17-0719	OKT9	Souris	0,24 µg.ml ⁻¹
IgA (H) humaine	Southern Biotech, #2052-08	Polyclonal	Chèvre	10 µg.ml ⁻¹
IgA1 humaine	Southern Biotech, #9130-08	B3506B4	Souris	10 µg.ml ⁻¹
IgA2 humaine	Southern Biotech, #9140-08	A9604D2	Souris	10 µg.ml ⁻¹
Streptavidine - PE-Cy7	eBioscience™ , #25-4317	-	-	1/100 ^e
Live/Dead cell dye - Pacific Orange	Invitrogen™ , #L34957	-	-	100 µl DMSO puis 1/100 ^e
Contrôles isotypiques				
∅ - APC	Sony, #2600595	MOPC-21 (IgG1κ)	Souris	Concentration identique à l'anticorps primaire
-	CST, #5415	G3A1 (IgG1)	Souris	
-	CST, #2729	Polyclonal (IgG)	Lapin	
-	CST, #3900	DA1E (IgG)	Lapin	

Tableau II.2 : Anticorps et réactifs utilisés en cytométrie en flux. CST : Cell Signaling Technology® ; Sony : Sony Biotechnology.

4. Western-blot.

4.1. Préparation des lysats protéiques.

Les cellules ont été lysées en tampon RIPA (Sigma-Aldrich) supplémenté en inhibiteurs de protéases (cOmplete™, Roche), en PMSF (1 mM ; Sigma-Aldrich) et en EDTA (5 mM). La lyse cellulaire a été réalisée sur glace pendant 15 min sous agitation. Les débris cellulaires ont été culotés et éliminés après centrifugation à 16 000 g pendant 20 min à 4°C. La concentration protéique des échantillons a été estimée par dosage colorimétrique selon la méthode de Bradford (Bio-Rad).

4.2. Réalisation du western-blot.

Les échantillons (10 – 30 µg de protéines) ont été dilués en tampon Laemmli (Bio-Rad) en présence ou non de 5% de β-mercaptoéthanol, et chauffés pendant 5 min à 95°C sous agitation. Après une brève centrifugation, les échantillons ont été chargés sur gels de polyacrylamide pré-coulés (Gradients 4-15%, Bio-Rad). L'électrophorèse (SDS-PAGE) a été effectuée pendant 30 à 60 min à 180 V en tampon Tris-Glycine-SDS (Bio-Rad). Les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Bio-Rad) par transfert semi-sec (Trans-Blot® Turbo, Bio-Rad) selon les recommandations du fabricant.

Les membranes de PVDF ont été bloquées sous agitation pendant 60 min à température ambiante en tampon TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween® 20, pH7,6) en présence de 5% de lait ou d'albumine bovine sérique (BSA), selon les anticorps utilisés (tableau II.3). Les anticorps primaires ont été hybridés en TBS-T 2-5% de lait ou 5% de BSA, selon le blocage réalisé, pendant 60 min à température ambiante ou durant la nuit à 4°C, toujours sous agitation. Après trois lavages de 10 min en TBS-T, les membranes ont été incubées en présence de l'anticorps secondaire dilué en TBS-T 2% de lait pendant 60 min à température ambiante, sous agitation. Trois nouveaux lavages ont été réalisés et les protéines ont été révélées par chimiluminescence (Amersham™ ECL™ Prime, GE Healthcare) à l'aide d'une caméra à dispositif à transfert de charges (CCD) (ChemiDoc™ XRS+, Bio-Rad).

Lorsque deux protéines de même poids moléculaire ont dû être révélées, les anticorps du premier marquage ont été déshybridés (Restore™ Western Blot stripping buffer, Thermo

Scientific™) sous agitation forte pendant 25 min à température ambiante. Après lavages et blocage de la membrane, le second marquage a été réalisé comme décrit auparavant.

4.3. Anticorps et réactifs utilisés en western-blot.

Antigène	Distributeur, référence	Clone	Espèce	Dilution/Concentration
CD71	Thermo Fisher, #13-6800	H68.4	Souris	1,0 µg.ml ⁻¹
	CST, #13113	D7G9X	Lapin	0,15 µg.ml ⁻¹
	CST, #13208	D7S5Z	Lapin	1/1000 ^e
TfR2	Santa Cruz, sc-32271	9F8 1C11	Souris	0,20 µg.ml ⁻¹
b4Gal-T1	Atlas Antibodies, #HPA010807	Polyclonal	Lapin	0,20 µg.ml ⁻¹
HM13	Abcam, ab190253	Polyclonal	Lapin	1,0 µg.ml ⁻¹
SCAMP3	Abcam, ab96305	Polyclonal	Lapin	0,50 µg.ml ⁻¹
BCAP31	Invitrogen™, #MA3-003	CC-4	Rat	1/2000 ^e
pIgR	<i>Fourni par B. Corthésy (Université de Lausanne)</i>	Polyclonal	Lapin	1/500 ^e
β-actine	CST, #4970	13E5	Lapin	1/1000 ^e
GAPDH - HRP	CST, #3683	14C10	Lapin	1/2000 ^e
Streptavidine – HRP	CST, #3999	-	-	1/4000 ^e
Anticorps secondaires				
IgG (H+L) Souris	CST, #7076	Polyclonal	Cheval	1/2000 ^e
IgG (H+L) Lapin	CST, #7074	Polyclonal	Chèvre	1/2000 ^e
IgG (H+L) Rat	R&D, #HAF005	Polyclonal	Chèvre	1/2000 ^e
IgA (H) humaine	Southern Biotech, #2050-05	Polyclonal	Chèvre	1/2000 ^e

Tableau II.3 : Anticorps et réactifs utilisés en western-blot. CST : Cell Signaling Technology® ; H : Chaînes lourdes ; H+L : Chaînes lourdes et légères ; HRP : Peroxydase de raifort.

5. Immunoprécipitation.

5.1. Couplage des anticorps aux billes magnétiques.

Toutes les expériences d'immunoprécipitations (IP) ont été réalisées à l'aide d'anticorps couplés à des billes magnétiques fonctionnalisées par des groupements époxy (Dynabeads® M-270 Epoxy, Invitrogen™), selon les recommandations du fabricant. Brièvement, les billes magnétiques ont été lavées une fois en PBS. 15 µg d'anticorps (tableau II.4) par milligramme de billes ont été incubés en tampon de couplage pendant 24 h à 37°C, sur roue rotative. Après des lavages extensifs en présence de 0,1% de Tween® 20 (Sigma-Aldrich), les billes ont été resuspendues à 10 mg.ml⁻¹ et stockées à 4°C. Le reliquat de couplage a été dosé à 280 nm afin d'estimer la quantité d'anticorps par milligramme de billes.

5.2. Biotinylation de surface.

Les cellules ont été décrochées par traitement au TrypLE™ Express et abondamment lavées en PBS glacial. Elles ont ensuite été incubées pendant 30 min sur glace en présence de 1 mg.ml⁻¹ de réactif sulfo-NHS-biotin (Pierce) en PBS, sous agitation régulière. La fraction de réactif n'ayant pas réagi avec les groupements amines des protéines de surface a été bloquée par deux lavages en PBS contenant 100 mM de glycine, suivis d'un lavage en PBS. Le culot cellulaire a ensuite été resuspendu en tampon de lyse d'IP.

5.3. Immunoprécipitation en lysat total.

Les cellules (10⁷ cellules par IP) fraîchement confluentes ont été décrochées par incubation en TrypLE™ Express. Après deux lavages en PBS, les cellules ont été lysées en tampon Brij (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,50% Brij O20, anti-protéases cOmplete™, pH7,6) pendant 30 min, sur glace, et sur roue rotative. Les lysats ont ensuite été soniqués, centrifugés à 16 000 g pendant 20 min à 4°C, et le surnageant a été soniqué une seconde fois. La concentration protéique de la solution a été estimée selon la méthode colorimétrique de Bradford.

Les IgA couplées aux billes ont été pré-incubées pendant 20 min à température ambiante en tampon Tris (1 M Tris, pH8,5) afin de bloquer les groupements époxy non occupés. Après deux lavages des billes en tampon Brij, 10 µg d'anticorps couplés aux billes ont été incubés en présence de 2,0 mg de lysat protéique pendant 120 min à 4°C, sur une roue rotative. Les complexes d'IgA formés à la surface des billes magnétiques ont été débarrassés des contaminants cellulaires non spécifiques par cinq lavages de 5 min sur glace, dans 1 ml de tampon Brij. Le culot de billes a finalement été resuspendu dans 80 µl de tampon Laemmli sans agent réducteur, et élué par chauffage à 95°C pendant 5 min sous agitation. L'éluat a été séparé des billes magnétiques et a été chargé sur gel pour migration en SDS-PAGE. Les étapes ultérieures sont décrites dans les parties Western-blot (Partie 4.2) et spectrométrie de masse (Partie 6).

5.4. Co-immunoprécipitation sur cellules adhérentes ou en suspension.

La suspension ou le tapis cellulaire a été incubé pendant 60 min en PBS en présence d'IgA (250 µg.ml⁻¹), sur glace et sous agitation régulière. Après deux lavages, les cellules adhérentes ont été décrochées à l'aide d'un grattoir et lysées pendant 30 min sur glace en tampon Brij (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10% glycérol, 1,0% Brij O10, anti-protéases cOmplete™ sans EDTA, pH7,6). Les débris cellulaires non solubilisés ont été culotés et éliminés par centrifugation à 16 000 g pendant 20 min à 4°C. Les lysats protéiques ont été dosés et l'IP a été réalisée comme précédemment décrit, en présence de 6,0 µg d'IgG anti-IgA ou de (Fab')₂ anti-IgA couplés aux billes magnétiques. Les éluats en tampon Laemmli ont été chargés sur gel pour migration en SDS-PAGE ou stockés à -80°C en vue de leur analyse par spectrométrie de masse.

Les co-IP réalisées à l'aide des anticorps anti-CD71 et anti-SCAMP3 (tableau II.4) ont été réalisées selon le même protocole. Les billes couplées aux IgG anti-souris ou anti-lapin ont respectivement été pré-incubées en présence des anticorps anti-CD71 ou anti-SCAMP3 (selon un ratio 1:0,5) en PBS 0,1% CHAPS pendant 30 min à température ambiante, sous agitation. Après trois lavages en tampon Brij, 3,0 µg d'anticorps anti-CD71 ou anti-SCAMP3 couplés aux billes magnétiques ont été incubés en présence du lysat protéique.

Antigène	Distributeur, référence	Clone	Espèce
IgA	Southern Biotech, #2050-01	Polyclonal	Chèvre
IgA	Southern Biotech, #2052-01	Polyclonal	Chèvre
IgG de souris	Southern Biotech, #1030-01	Polyclonal	Chèvre
IgG de lapin	Southern Biotech, #4090-01	2A9	Souris
CD71	Thermo Fisher, #13-6800	H68.4	Souris
SCAMP3	Abcam, ab96305	Polyclonal	Lapin
Contrôles isotypiques			
-	CST, #5415	G3A1 (IgG1)	Souris
-	CST, #2729	Polyclonal (IgG)	Lapin

Tableau II.4 : Anticorps utilisés en immunoprécipitation.

5.5. Quantification protéique.

À la suite de la révélation des protéines d'intérêt par chimiluminescence, les images ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ 1.47v (National Institutes of Health, États-Unis). Chaque piste a été analysée selon son profil de niveaux de gris et l'intensité des bandes d'intérêt a été estimée par mesure de l'aire sous la courbe.

Dans les IP réalisées avec différentes formes d'IgA (mIgA, pIgA1 et SIgA), les quantifications ont été normalisées selon la bande de plus forte intensité (figures 3C, 10A, 11A, 12A et 13A). Pour l'IP exclusivement réalisée en présence de SIgA (figure 14A), la quantification de l'intensité de la bande SCAMP3 a été rapportée à la quantité d'IgA et normalisée selon le rapport SCAMP3/IgA des cellules contrôles.

6. Identification de protéines par spectrométrie de masse.

La préparation et l'analyse des éluats d'IP par spectrométrie de masse ont été réalisés par la plateforme de protéomique de la structure fédérative de recherche Necker – Enfants Malades.

6.1. Préparation des échantillons.

6.1.1. Digestion tryptique sur gel.

Les échantillons protéiques obtenus par IP et élués en tampon Laemmli ont été séparés par SDS-PAGE sur gels à 10% de polyacrylamide (Bio-Rad), à 200 V pendant 30 min à température ambiante. Après l'électrophorèse, les protéines ont été visualisées par marquage au nitrate d'argent, et les bandes d'intérêt ont été excisées. Les fragments de gels ont ensuite été lavés à l'eau et le nitrate d'argent a été retiré à l'aide d'une solution de décoloration (30 mM ferricyanide de potassium, 100 mM thiosulfate de sodium (v/v)) pendant 2 à 3 min. Après décoloration, les fragments de gels ont été lavés et déshydratés dans trois bains successifs constitués de 50 mM de bicarbonate d'ammonium (ABC), de 25 mM d'ABC dans 50% d'acétonitrile (ACN), et de 100% d'ACN.

Les gels déshydratés ont été placés pendant 60 min à 56°C en solution réductrice (10 mM DTT, 12 mM ABC) afin de permettre la réduction des ponts disulfures. Le surnageant a été retiré et les cystéines ont été alkylées à l'abri de la lumière pendant 45 min, dans une solution constituée de 55 mM d'iodoacétamide et de 25 mM d'ABC. Les fragments de gels ont à nouveau été lavés en solution 25 mM ABC et 50% ACN, puis déshydratés avec 100% d'ACN.

Les gels déshydratés ont été incubés pendant 16 h à 37°C en présence de trypsine hautement purifiée (Promega) selon un ratio trypsine:protéine de 1:50, dans une solution constituée de 25 mM d'ABC et de 5 mM de CaCl₂. Les peptides ont été extraits des gels par incubations successives dans une solution à 1% d'acide trifluoroacétique (TFA) dans 50% d'ACN, puis dans 100% d'ACN. La solution peptidique a finalement été déshydratée par centrifugation sous vide d'air (SpeedVac™, Thermo Scientific) avant d'être resuspendue dans une solution à 10% d'ACN et 0,1% de TFA (v/v).

6.1.2. Digestion tryptique sur filtre (FASP).

La préparation d'échantillon sur filtre (FASP) a été réalisée selon le protocole établi par Wiśniewski et collègues (Wiśniewski et al., 2009). Les éluats d'IP en tampon Laemmli ont directement été déposés sur des filtres de centrifugation (Microcon® 30 kDa, Millipore), incubés en présence de 200 µl de tampon UA (8 M urée, 100 mM Tris-HCl, pH8,8) et

centrifugés à 15 000 g pendant 15 min. Deux lavages supplémentaires dans 200 µl de tampon UA ont été réalisés afin de retirer les détergents. L'alkylation a été menée à l'abri de la lumière dans 50 mM d'iodoacétamide, pendant 45 min. Les filtres ont ensuite été lavés à deux reprises avec 100 µl de tampon UA suivis par deux lavages en tampon ABC (50 mM). Comme pour la digestion sur gel, la trypsine a été ajoutée et la digestion réalisée sur la nuit à 37°C. Les peptides digérés ont été collectés par centrifugation, lavés deux fois dans 40 µl de tampon ABC (50 mM), et déshydratés par centrifugation sous vide d'air. Les peptides ont été resuspendus dans une solution à 10% d'ACN et 0,1% de TFA (v/v).

6.2. Analyse des échantillons par spectrométrie de masse.

Pour chaque analyse, 5 µl d'échantillon ont été injectés dans un système de chromatographie en phase liquide à faible flux (Système nano-RSLC UltiMate™ 3000, Thermo Scientific™) couplé à un spectromètre de masse (MS) Orbitrap Exactive™ Plus quadripôle (Thermo Scientific™). Les peptides ont été séparés sur colonne de chromatographie liquide en phase inverse (PepMap™ C18, Thermo Scientific™). Les solvants utilisés pour la chromatographie sont (A) 0,1% d'acide formique dilué en eau, et (B) 80% d'ACN et 0,08% d'acide formique. Les peptides ont été élués de la colonne selon le gradient 5% - 40% de solution (B) (120 min) et 40% - 80% de solution (A) (10 min). Après 131 min, le gradient est retourné à 5% pour rééquilibrer la colonne pendant 30 min avant l'injection suivante. Deux blancs, un gradient court par étape de 40 min, et un gradient linéaire de 60 min ont été réalisés entre chaque analyse pour éviter toute contamination entre échantillon. Les peptides élués de la colonne ont été analysés par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), selon la méthode Top10. La résolution des balayages de MS a été réglée à 70 000, et à 17 500 pour le MS/MS dépendant des données afin d'augmenter la vitesse de balayage. Le contrôle de gain automatique prédictif a été ajusté à 3×10^6 comptes pour les balayages MS et à 10^5 comptes pour les balayages MS/MS. L'intervalle de balayage du MS a été défini pour un rapport m/z compris entre 400 et 2000. MS et MS/MS ont été enregistrés en mode profil. La durée d'exclusion dynamique de signal de fond a été établie à 20 sec.

6.2.1. Sélection des candidats identifiés par spectrométrie de masse.

Les données de spectrométrie de masse nous ont été transmises par la plateforme de spectrométrie de masse sous la forme d'un fichier contenant le nombre de peptides détectés par protéine identifiée dans chacun des échantillons. Nous avons défini les candidats d'intérêt selon les critères suivants :

(1) Cette protéine est plus abondamment retrouvée dans les échantillons incubés en présence de SIgA que de mIgA ou de pIgA_{1M}.

(2) Cette protéine n'est pas un contaminant issu du colostrum humain, d'après les données de la littérature (Grapov et al., 2015; Palmer et al., 2006).

(3) Cette protéine est exprimée à la membrane plasmique, d'après les données de la littérature.

(4) Cette protéine est identifiée dans plusieurs expériences d'IP-MS.

(5) Cette protéine est exprimée dans l'intestin humain, d'après les données de la littérature et de l'outil en ligne Protein Atlas (www.proteinatlas.org).

7. PCR quantitative en temps réel (qPCR).

7.1. Extraction des ARN cellulaires.

Les culots cellulaires ont été lysés et dénaturés en tampon RLT Plus (Qiagen) contenant de l'isothiocyanate de guanidium et 1% de β -mercaptoéthanol pendant 10 min à température ambiante. L'extraction des ARN a ensuite été réalisée à l'aide du kit RNeasy® Plus Mini (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Brièvement, les lysats ont été chargés sur colonne et centrifugés pendant 30 sec à 8 000 g en présence de fortes concentrations de sels afin d'éliminer l'ADN génomique. Les ARN présents dans la solution filtrée ont été précipités par une solution d'éthanol à 70% (1:1 v/v) et retenus sur colonne de silice par centrifugation. Après plusieurs lavages afin d'éliminer les contaminants cellulaires, les ARN ont été élués en eau. Les échantillons ont été stockés à -80°C.

7.2. Synthèse des ADN complémentaires par transcription inverse.

Les ARN totaux purifiés (1 µg) ont été dilués dans 11 µl en présence 250 ng d'amorces aléatoires et de 250 ng d'amorces oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen™). Après dénaturation à 70°C pendant 10 min, la transcription inverse des ARN messagers (ARNm) a été réalisée pendant 75 min à 37°C par ajout de 200 U de transcriptase inverse du virus Moloney de la leucémie murine, de 10 nmol de dNTP, de 200 nmol de DTT et de 40 U de RNaseOUT™ (Invitrogen™) en tampon salin (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, pH8,3). Après une ultime étape de dénaturation à 70°C pendant 5 min, les échantillons d'ADNc ont été stockés à -20°C.

7.3. PCR quantitative en temps réel.

Pour chacun des gènes étudiés, les réactions de polymérisation par réaction en chaîne (PCR) quantitative en temps réel (qPCR) ont été réalisées en duplicats et deux puits sans ADNc ont été ajoutés afin de vérifier la spécificité de l'amplification. Les ADNc obtenus par transcription inverse ont été dilués au 1/5^e en eau et 2 µl ont été amplifiés en présence des sondes TaqMan™ appropriées (Tableau II.5) dans 20 µl de tampon universel TaqMan® (Applied Biosystems™) contenant des dNTP, de l'ADN polymérase AmpliTaq Gold®, de l'uracile-ADN-glycosylase, le marqueur de référence passif ROX™. La qPCR a été réalisée à l'aide du système de PCR en temps réel StepOnePlus™ (Applied Biosystems™) selon le protocole composé d'une étape de dénaturation initiale d'1 min à 95°C, suivie par 40 cycles de PCR (5 sec à 95°C et 30 sec à 60°C) et un cycle de dissociation (15 sec à 95°C, 1 min à 60°C et 15 sec à 95°C).

Gène cible	Référence	Gène cible	Référence
<i>PIGR</i>	Hs00922561_m1	<i>B4GALT1</i>	Hs00155245_m1
<i>FCAMR</i>	Hs01049679_m1	<i>FCRL4</i>	Hs00972783_m1
<i>SIGLEC5</i>	Hs00174659_m1	<i>CD209</i>	Hs01588349_m1
<i>FCAR</i>	Hs00370197_m1	<i>LGALS1</i>	Hs00355202_m1
<i>ASGR1</i>	Hs01005019_m1	<i>CLEC7A</i>	Hs00224028_m1
<i>ASGR2</i>	Hs00910100_m1	<i>MRC1</i>	Hs00267207_m1
<i>TFR2</i>	Hs01056398_m1	<i>RPLP0</i>	Hs99999902_m1
<i>TFRC</i>	Hs00951083_m1		

Tableau II.5 : Sondes TaqMan™ utilisées en qPCR.

8. Microscopie.

8.1. Culture cellulaire.

Les cellules Caco-2 TC7 ont étéensemencées en plaque 8 puits μ -Slide ibiTreat (Ibidi®) à $5,0 \times 10^4$ cellules.cm⁻². Un jour après confluence, les cellules ont été lavées en PBS glacial, puis incubées en présence d'IgA ($250 \mu\text{g.ml}^{-1}$) en DMEM pendant 60 min à 4°C. Après deux lavages en PBS glacial, les cellules ont été fixées en acétone pendant 10 min à -20°C. Les cellules fixées ont été stockées à -20°C dans l'attente de réalisation des marquages.

8.2. FRET par FLIM.

Les cellules fixées en acétone ont été perméabilisées pendant 10 min à température ambiante en PBS en présence de 0,1% de triton X-100 et de 0,1% de BSA. Le blocage des sites de fixation non spécifiques a été réalisé en PBS 0,3% BSA pendant 30 min à température ambiante. Les anticorps primaires (tableau II.6) dilués en diluant d'anticorps (Dako) ont été incubés pendant 60 min à température ambiante. Deux lavages de 5 min ont été effectués en PBS 0,1% BSA et les cellules ont été incubées en présence des anticorps secondaires couplés aux fluorochromes (tableau II.6) pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Deux derniers lavages ont été réalisés et le milieu de montage Vectashield (Vector Laboratories) a été ajouté dans chacun des puits. Le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) a été acquis par mesure du temps de décroissance de fluorescence du fluorochrome donneur (FLIM) par comptage de photons uniques corrélé au temps (TCSPC) à l'aide du microscope confocal à balayage laser (LSM) TCS SP8 (Leica Microsystems) équipé du module PicoQuant LSM pour FLIM et spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). Les échantillons ont été excités par un laser pulsé d'une longueur d'onde de 470 nm et d'une fréquence de 40 MHz. Le signal émis par les échantillons a été récupéré dans un unique canal à l'aide d'une photodiode à avalanche de photons uniques (SPAD). Chaque acquisition a été réalisée pendant 2 min afin d'obtenir un minimum de 10^5 photons par courbe de décroissance de fluorescence.

L'analyse de la demi-vie de vie du fluorochrome donneur (Tau, en nanosecondes) a été effectuée à l'aide du logiciel SymphoTime 32 (PicoQuant). La valeur maximale des courbes de décroissance de fluorescence (figure 4C) a été normalisée à 10^5 photons afin de

permettre la superposition des courbes et l'estimation visuelle de l'évolution de Tau entre les différentes conditions. La valeur de Tau a été obtenue par modélisation biexponentielle de la portion linéaire des courbes de décroissance de fluorescence.

Le graphique représentant Tau en fonction du rapport de l'intensité du fluorochrome accepteur (I_{Acc}) sur l'intensité du fluorochrome donneur (I_{Don}) a été obtenu de la manière suivante : pour chaque mesure de FRET par FLIM, une image du champ analysé a préalablement été prise par microscopie confocale dans les canaux des fluorochromes donneur (Alexa Fluor® 488) et accepteur (Alexa Fluor® 555). La somme des intensités de chacun des pixels de ces deux images a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ 1.47v, ce qui a permis d'en calculer le rapport. Ce rapport I_{Acc}/I_{Don} , mesuré sur des champs non saturants, permet d'estimer la quantité d'IgA fixées par champ en fonction de la quantité totale de CD71 (considérée comme constante entre champs).

8.3. Expériences de ligation de proximité (PLA).

La préparation des échantillons, préalablement incubés en présence d'IgA et fixés en acétone, a été réalisée selon les recommandations du fabricant (Duolink® PLA Fluorescence, Sigma-Aldrich). Les cellules ont été perméabilisées en PBS en présence de 0,1% de triton X-100 et de 0,1% de BSA. Les sites non spécifiques ont été bloqués pendant 30 min à 37°C en chambre humide. Les anticorps primaires (tableau II.6) ont ensuite été incubés pendant 60 min à 37°C. Après deux lavages de 5 min, les deux anticorps secondaires respectivement couplés à des sondes oligonucléotidiques complémentaires « PLUS » et « MINUS » ont été incubés pendant 60 min à 37°C. Deux nouveaux lavages ont été effectués avant d'initier la ligation en présence d'1 U de ligase durant 30 min à 37°C. De cette étape de ligation, ont résulté des oligonucléotides circulaires qui ont été amplifiés par 5 U d'ADN polymérase pendant 100 min à 37°C. L'amplification s'est déroulée dans un tampon contenant des sondes oligonucléotidiques fluorescentes capables de s'hybrider avec les produits d'amplification circulaires. Deux lavages de 5 min ont été effectués et suivis d'un dernier lavage d'1 min en tampon de lavage dilué à 0,01X. Les noyaux cellulaires ont été colorés par du DAPI avant d'ajouter le milieu de montage Mowiol 4-88 dans les puits (Cold Spring Harbor Protocols, 2006). Les différentes conditions ont été observées à l'aide du microscope confocal TCS SP8. Les signaux punctiformes détectés ont été quantifiés en utilisant le module « Spot detector » du logiciel Icy (Institut Pasteur).

8.4. Microscopie confocale par déplétion par émission stimulée (STED).

Pour les expériences de microscopie confocale par STED, les cellules ont étéensemencées sur lamelles de verre d'indice réfractométrique de 1,5H. L'incubation des IgA a été réalisée comme précédemment décrit (Partie 8.1). Après fixation en acétone, les cellules ont été perméabilisées en PBS contenant 0,1% de triton X-100 et 0,1% de BSA. Les sites de fixation non spécifiques ont ensuite été bloqués en présence de PBS 0,3% BSA pendant 30 min à température ambiante. Les anticorps primaires (tableau II.6) dilués en diluant d'anticorps (Dako) ont été incubés pendant 60 min à température ambiante. Deux lavages ont été effectués et les cellules ont été incubées en présence des anticorps secondaires couplés aux fluorochromes (tableau II.6) pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. Deux derniers lavages ont été réalisés et les lamelles de verres ont été montées sur une lame de verre SuperFrost® (VWR) en présence de milieu de montage Mowiol 4-88. Ces montages lame-lamelle ont été lutés avec de la pâte dentaire afin d'éviter toute pénétration d'air.

Les échantillons ont été analysés à l'aide du microscope TCS SP8 équipé de la technologie de STED, utilisant un laser de déplétion d'une longueur d'onde de 660 nm. Les images acquises ont ensuite été déconvoluées à l'aide du logiciel Huygens (Scientific Volume Imaging).

8.5. Anticorps utilisés en microscopie.

Antigène - fluorochrome	Distributeur, référence	Clone	Espèce	Dilution/Concentration
CD71	Thermo Fisher, #13-6800 CST, #13113	H68.4 D7G9X	Souris Lapin	5,0 µg.ml ⁻¹ 1,5 µg.ml ⁻¹
HM13	Abcam, ab190253	Polyclonal	Lapin	10 µg.ml ⁻¹
SCAMP3	Abcam, ab96305	Polyclonal	Lapin	10 µg.ml ⁻¹
BCAP31	Invitrogen™, #MA3-003	CC-4	Rat	1/100 ^e
EEA1	Abcam, ab109110	EPR4245	Lapin	1/200 ^e
Anticorps secondaires				
IgA (H) humaines	Southern Biotech, #2050-01	Polyclonal	Chèvre	10 µg.ml ⁻¹
IgA (H) humaines - AF555	Southern Biotech, #2052-32	Polyclonal (Fab') ₂	Chèvre	5,0 µg.ml ⁻¹
Rat (H+L)	Abcam, ab102248	Polyclonal	Lapin	5,0 µg.ml ⁻¹
IgG de souris - AF555	Abcam, ab150114	Polyclonal	Chèvre	10 µg.ml ⁻¹
IgG de lapin - AF488	Abcam, ab150073	Polyclonal	Âne	10 µg.ml ⁻¹
IgG de lapin - AF568	Invitrogen, #A-11011	Polyclonal	Chèvre	2,0 µg.ml ⁻¹
Contrôles isotypiques				
-	CST, #5415	G3A1 (IgG1)	Souris	Concentration identique à l'anticorps primaire
-	CST, #2729	Polyclonal (IgG)	Lapin	
-	CST, #3900	DA1E (IgG)	Lapin	
-	eBiosciences™, #16-4321	(IgG2α)	Rat	

Tableau II.6 : Anticorps utilisés en microscopie. CST : Cell Signaling Technology® ; H : Chaînes lourdes ; H+L : Chaînes lourdes et légères.

9. Mise en forme des données et statistiques.

Les données numériques obtenues par les différentes techniques ont été mises en forme et analysées à l'aide du logiciel Prism 6.0 (GraphPad Software). L'échantillonnage des données étant trop faible pour déterminer si leur distribution suit une loi normale, nous avons réalisé des tests statistiques non paramétriques. Nous avons réalisé un test de Wilcoxon lorsque les données analysées étaient appariées. Les différences ont été considérées statistiquement significatives pour un risque α inférieur à 0,05.

III. Résultats

1. Réévaluation de l'interaction entre CD71 et les SIgA.

1.1.Établissement d'une lignée cellulaire stable dépourvue de CD71.

Afin d'explorer précisément le rôle de CD71 dans son interaction avec les SIgA, nous avons décidé de générer une lignée cellulaire stable dépourvue de ce récepteur. Pour ce faire, nous avons utilisé le sous-clone TC7 de la lignée de cellules épithéliales intestinales (IEC) humaines Caco-2 utilisée dans nos précédentes études (Lebreton et al., 2012). CD71 étant impliqué dans l'absorption du fer, nous nous attendions à avoir des difficultés à l'inactiver de façon complète en raison (1) de la mort des cellules CD71^{KO} et/ou (2) d'une pression de sélection promouvant l'échappement par acquisition de mutations au site ciblé par la technique d'extinction de gène utilisée.

Nous avons fait le choix d'utiliser la technologie CRISPR-Cas9 pour son efficacité supérieure aux technologies d'interférence par ARN. Nous avons dessiné un ARN guide, nommé TFRC_em, ciblant le motif d'endocytose ²⁰YTRF²³ (figure III.1A) dont la suppression et/ou la mutation empêche(nt) l'endocytose de CD71 (Rothenberger et al., 1987). Nous avons supplémenté le milieu de culture en fer soluble afin de compenser le défaut d'absorption de fer par la voie holotransferrine-CD71 (Neumannova et al., 1995). Après sept jours de sélection antibiotique, les cellules ont été triées par cytométrie en flux afin d'obtenir une population homogène dont l'expression résiduelle de CD71 testée par RT-qPCR, western-blot et cytométrie en flux est très faible (figure III.1B-D).

Dans un second temps, nous avons vérifié l'expression de TfR2, une isoforme de CD71 dont l'ectodomaine est capable de fixer l'holotransferrine et les pIgA1 (Kawabata et al., 1999; Moura et al., 2004). Par cytométrie en flux, aucune expression compensatrice de TfR2 n'a été détectée sur les cellules TFRC_em (figure III.1E). Ce résultat a été confirmé par l'incapacité de ces cellules à fixer l'holotransferrine à leur surface (figure III.1F). Nous avons cultivé ces cellules pendant plus de deux mois consécutifs, sans observer de différence majeure de prolifération par rapport aux cellules traitées par l'ARN guide contrôle (cellules contrôles ou « scramble »), et sans détecter d'échappement de clones réexprimant CD71 (données non montrées).

L'ensemble de ces résultats montre que nous avons réussi à générer des IEC humaines (Caco-2 sous-clone TC7) dépourvues de manière stable d'expression de CD71 et de capacité à fixer l'holotransferrine. Ce nouvel outil peut de ce fait être utilisé pour l'étude de l'interaction entre CD71 et les SIgA.

Figure III.1

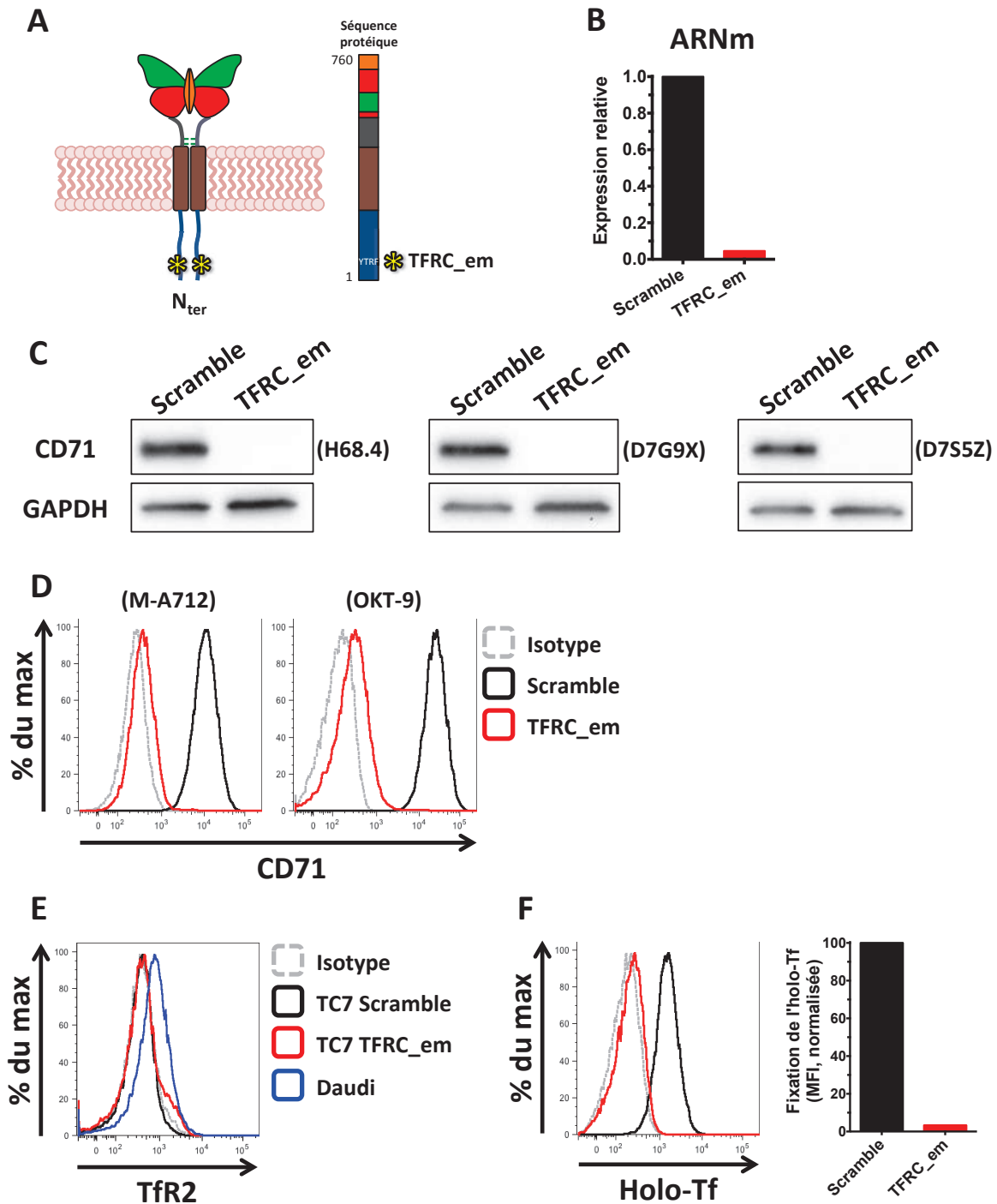


Figure III.1 : Caractérisation de la lignée Caco-2 TC7 dépourvue de CD71 de manière stable (lignée TFRC_em). (A) Représentation schématique de la structure bidimensionnelle et de la séquence protéique de CD71, indiquant la séquence cible de l'ARN guide TFRC_em (astérisque noir et jaune). (B) Évaluation par RT-qPCR de l'expression relative de l'ARNm de CD71 par rapport à l'ARNm de référence endogène RPLP0, dans les cellules Caco-2 TC7 contrôles (« scramble », en noir) et TFRC_em (en rouge). Le diagramme en bâtons indique l'expression relative de CD71 par rapport à RPLP0, normalisée par rapport aux cellules contrôles. (n = 1) (C) Évaluation de l'expression protéique de CD71 par western-blot dans les cellules Caco-2 TC7 contrôles et TFRC_em, par trois anticorps monoclonaux spécifiques de CD71 (clones indiqués entre parenthèses). (n ≥ 3) (D) Évaluation de l'expression de CD71 à la surface des cellules Caco-2 TC7 contrôles et TFRC_em par cytométrie en flux, à l'aide de deux anticorps monoclonaux spécifiques de CD71 (clones indiqués entre parenthèses). En contrôle négatif, l'anticorps anti-CD71 a été remplacé par un anticorps de même isotype, à la même concentration (isotype, en gris) (n > 3) (E) Évaluation de l'expression de Tfr2 à la surface des cellules Caco-2 TC7 contrôles (en noir) et TFRC_em (en rouge), et de la lignée de lymphoblastes B de Daudi (contrôle positif d'expression de Tfr2, en bleu). (n = 1) (F) Étude de la fixation de l'holo-Tf (25 µg.ml⁻¹) par les cellules Caco-2 TC7 contrôles et TFRC_em par cytométrie en flux. Le diagramme en bâtons indique l'intensité de fluorescence médiane (MFI) de l'holo-Tf couplée au fluorochrome Alexa Fluor® 647, normalisée par rapport aux cellules contrôles. (duplicats, n = 1) N_{ter} : Extrémité N-terminale ; ARNm : ARN messager ; Holo-Tf : Holotransferrine.

1.2. Étude de la capacité de fixation de différentes formes d'IgA par les cellules dépourvues de CD71.

Nous avons souhaité caractériser notre système cellulaire en déterminant sa capacité de fixation de différentes formes d'IgA humaines. Pour ce faire, nous avons utilisé des IgA commerciales de différents distributeurs dont nous avons, pour les IgA sériques, séparé les monomères des polymères par chromatographie d'exclusion stérique (figure supplémentaire 1).

Nous avons observé une diminution de près de 80% de la fixation des pIgA1 issues de myélome (pIgA1_M) sur les cellules TFRC_{em} par rapport aux cellules contrôles (figure III.2A-B) indiquant une fixation principalement dépendante de CD71. Bien que la fixation des mIgA1_M soit aussi dépendante de CD71, nos résultats montrent que CD71 fixe préférentiellement les IgA1 de forme polymérique comme en témoigne le niveau de fixation des mIgA1_M et pIgA1_M sur les cellules contrôles. La fixation des mIgA2_M et pIgA2_M s'est révélée partiellement dépendante de CD71 tandis que les mIgA et pIgA issues sérum de sujets sains sont peu/pas affectées, et de manière non reproductible selon les distributeurs. À notre surprise, la fixation des SIgA de colostrum apparaît indépendante de CD71, quel que soit le distributeur d'origine (Fitzgerald (FITZ), Athens Research & Technology (ART) ou Sigma-Aldrich (SIGM)).

Afin de confirmer l'ensemble de ces résultats, nous avons généré une seconde lignée cellulaire stable dépourvue de CD71 à l'aide d'un nouvel ARN guide ciblant le sixième exon de CD71 (~acide aminé 223, dans le domaine apical). La fixation des différentes formes d'IgA sur ces cellules, nommées TFRC₆, est identique aux cellules TFRC_{em} (figure III.2B).

Nous avons aussi voulu éliminer la possibilité que l'absence de diminution de fixation des SIgA soit due au sous-clone de Caco-2 utilisé (TC7) dans l'hypothèse où il exprimerait un second récepteur aux SIgA absent dans les lignées utilisées dans nos précédentes études. Nous avons ainsi inactivé CD71 dans trois nouvelles lignées d'IEC : deux lignées cancéreuses (HT-29, Caco-2 HTB-37) et une lignée primaire (HIEC) (Perreault and Beaulieu, 1996). Aucune de ces lignées ne présente une fixation des SIgA dépendante de CD71 (figure III.2C-E). Les lignées HT-29 et HIEC présentent aussi un profil différent de fixation des mIgA et pIgA1_M. L'importante fixation des mIgA sur les HT-29 est en accord avec les résultats de Kitamura et collègues qui suggèrent l'existence d'un récepteur aux mIgA non encore identifié

sur ces cellules (Kitamura et al., 2000). En outre, la lignée HT-29 exprime faiblement le pIgR à l'état basal, ce qui pourrait expliquer la fixation résiduelle des pIgA1_M sur les HT-29 TFRC_{em} (Chintalacharuvu et al., 1991). Enfin, l'absence de fixation des pIgA1_M sur les HIEC est à l'image du très faible niveau d'expression de CD71 à la surface de ces cellules.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment l'affinité préférentielle de CD71 pour les IgA1 de forme polymérique, observée par Moura et collègues (Moura et al., 2004). En outre, la fixation préférentielle à CD71 des pIgA1 de myélome par rapport aux pIgA sériques d'individus sains suggère l'importance des glycosylations dans leur interaction avec CD71. En effet, il a été rapporté que les pIgA1 de myélome comportent régulièrement des anomalies de glycosylation, avec notamment une hypogalactosylation (Renfrow et al., 2007). En revanche, nos résultats montrent qu'une fraction des IgA2 de myélome (ici d'un unique patient) peut se fixer à CD71 et que les SIgA de colostrum n'interagissent pas directement avec CD71. Les résultats obtenus avec les SIgA n'étant pas cohérents avec les précédents travaux du laboratoire, nous avons décidé de réévaluer l'interaction des SIgA avec CD71 à l'aide de techniques complémentaires.

Pour la suite de ce manuscrit, nous avons réalisé les expériences avec les SIgA commerciales de chez Athens Research & Technology (SIgA_{ART}). Les mIgA purifiées de sérums d'individus sains (mIgA, MP Biomedicals) et les pIgA1 de myélome (pIgA1_M, Athens Research & Technology) nous ont respectivement servi de contrôles négatif et positif de fixation à CD71.

Figure III.2

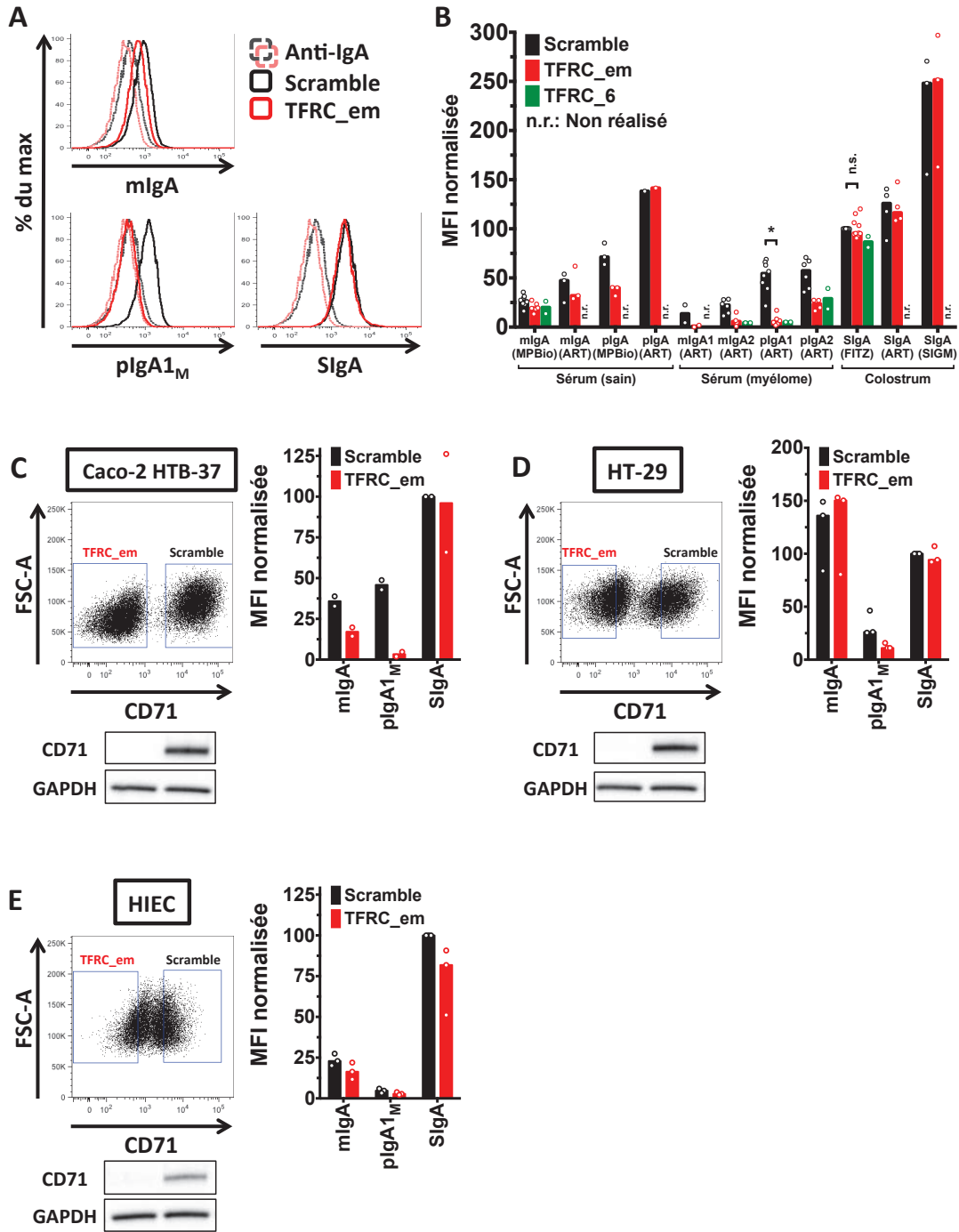


Figure III.2 : Étude par cytométrie en flux de la fixation d'IgA sur différentes lignées d'IEC humaines dépourvues ou non de CD71. (A) Histogrammes représentant la fixation de différentes formes d'IgA ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sur un mélange de cellules contrôles (en noir) et TFRC_em (en rouge) identifiées par leur niveau d'expression de CD71, par cytométrie en flux. Les contrôles négatifs consistent en l'incubation des (Fab')₂ anti-IgA biotinylés et de la streptavidine couplée au PE-Cy7, en l'absence d'IgA. (histogrammes représentatifs, $n \geq 6$). (B) Diagramme en bâtons représentant la fixation d'IgA ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sur les cellules Caco-2 TC7 contrôles (en noir), TFRC_em (en rouge) et TFRC_6 (en vert). En ordonnées, l'intensité de fluorescence médiane (MFI) du marquage IgA est normalisée par rapport à la fixation des SIgA_{FITZ} sur les cellules Caco-2 TC7 contrôles. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 1 - 10$). n.s. : Différence non significative ; * : $p < 0,05$ d'après le test statistique de Wilcoxon ; n.r. : Condition non réalisée. (C, D, E) Étude de la fixation des IgA ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) par cytométrie en flux dans trois autres lignées d'IEC humaines. Le nuage de points (à gauche) représente la taille des cellules (FSC-A) en fonction de l'expression de CD71 par cytométrie en flux, et permet de distinguer deux populations exprimant faiblement (cellules TFRC_em) et fortement (cellules contrôles) CD71 mélangées dans le même tube (graphique représentatif, $n = 2 - 3$). Sous ce graphique, le western-blot montre le niveau d'expression de CD71 par rapport à la protéine endogène GAPDH dans les lysats totaux des deux populations indiquées en cytométrie en flux ($n = 1$). Le diagramme en bâtons représente la MFI de fixation des différentes formes d'IgA ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) dans les deux populations indiquées sur le nuage de points. La MFI a été normalisée par rapport à la fixation des SIgA dans les cellules contrôles. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 2 - 3$). pIgA_{1M} : pIgA issues de myélome ; PE-Cy7 : Phycocérythrine-Cyanine 7.

1.3. Réévaluation de l'interaction entre les SIgA et CD71.

Afin de réévaluer l'interaction entre les SIgA et CD71, nous avons posé comme première hypothèse qu'un mécanisme compensateur pourrait expliquer le maintien de la fixation des SIgA à la surface des différentes lignées cellulaires étudiées. Pour tester cette hypothèse, nous avons transfecté la lignée fibroblastique rénale simienne COS-7 avec le récepteur CD71 humain.

L'expression hétérologue de CD71 en cellules COS-7 permet la synthèse d'un récepteur fonctionnel à la surface des cellules comme en atteste l'augmentation de plus de 10 fois de la fixation des pIgA_{1M} sur les cellules hCD71⁺ par rapport à la population hCD71⁻ (figure III.3A). Venant confirmer nos précédents résultats, les pIgA_{2M} se fixent de manière comparable aux pIgA_{1M} sur les deux populations étudiées. En revanche, les mIgA et SIgA ne sont que très peu affectées par la surexpression de CD71 (augmentation de fixation x1,9 et x1,4 respectivement).

L'absence d'effet notable de la suppression ou de la surexpression de CD71 sur la fixation des SIgA nous a amenés à une nouvelle hypothèse. La forte fixation basale sur les différentes lignées cellulaires contrôles pourrait masquer une faible fixation dépendante de CD71.

Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation d'IgA incubées en présence de lysats totaux, ou préalablement incubées sur cellules adhérentes ou en suspension (figure III.3B). Chacun de ces dispositifs expérimentaux confirme que seules les pIgA_{1M} sont capables d'interagir directement avec CD71 (figure III.3C).

L'ensemble de ces approches indique l'absence d'interaction physique directe entre CD71 et les SIgA. Ces résultats sont en accord avec ceux de Moura et collègues (Moura et al., 2004) mais n'expliquent pas les données précédemment obtenues par notre laboratoire (Abed et al., 2014; Lebreton et al., 2012; Matysiak-Budnik et al., 2008).

Figure III.3

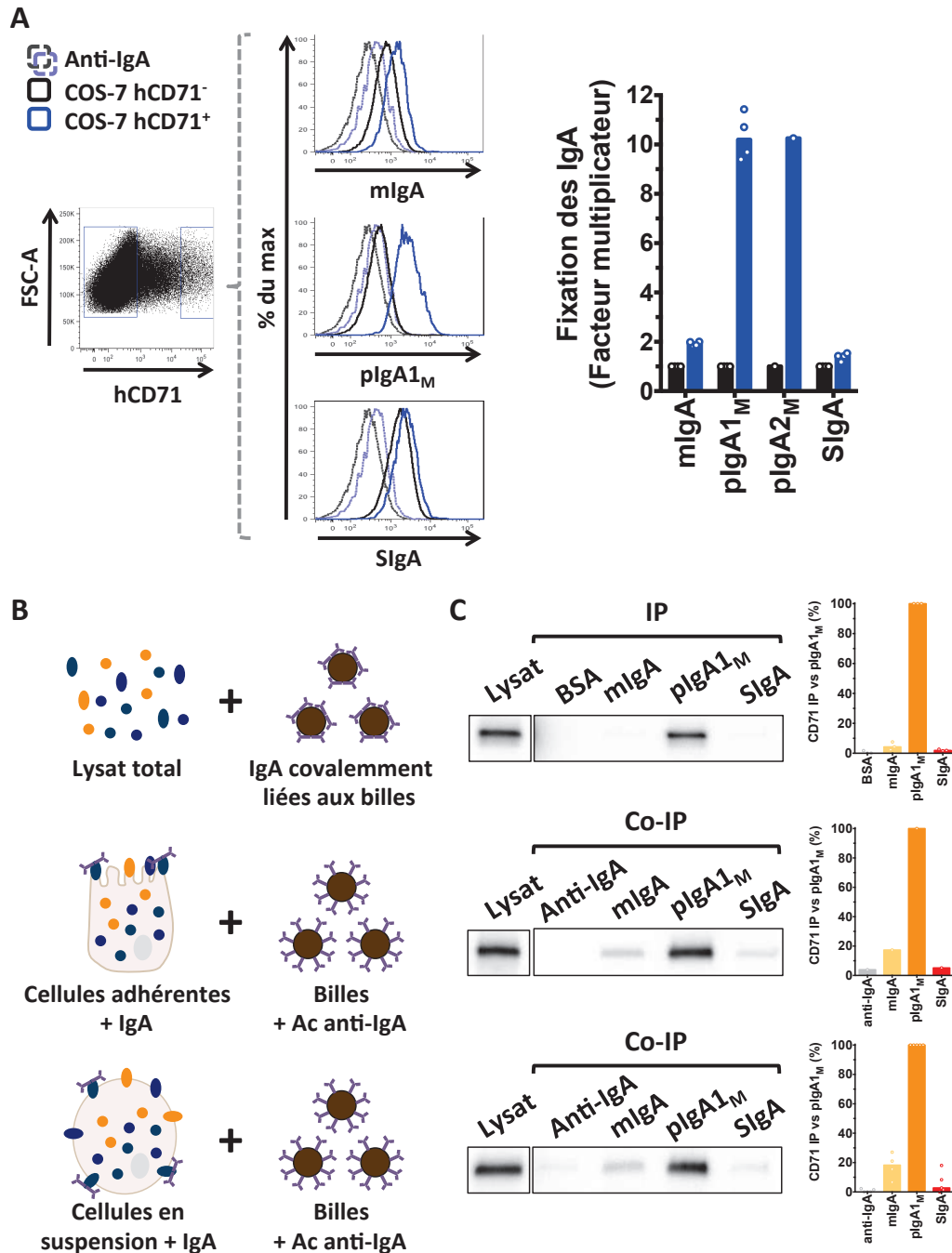


Figure III.3 : (A) Étude de la fixation d'IgA dans un système d'expression hétérologue de CD71 humain. Les cellules COS-7 ont été transfectées par un plasmide vide ou contenant le gène codant CD71 humain (hCD71). Le nuage de points (à gauche) montre la taille des cellules (FSC-A) en fonction du niveau d'expression de hCD71 dans les deux population cellulaires transfectées, mélangées dans le même tube. La fixation des IgA ($200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) (histogrammes) a été comparée entre les deux populations, négatives (en noir) et positives (en bleu) pour l'expression de hCD71, sélectionnées sur le nuage de points. Le diagramme en bâtons (à droite) indique le facteur de multiplication de la fixation des IgA entre les cellules hCD71⁻ (en noir) et hCD71⁺ (en bleu) pour chaque forme d'IgA testée. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 1 - 4$). (B) Représentation schématique des dispositifs expérimentaux d'immunoprécipitation. Les IP et co-IP réalisées sur les cellules Caco-2 TC7 ont été menées selon trois dispositifs expérimentaux. En haut, les lysats totaux ont été incubés en présence d'IgA ($10 \mu\text{g}$) couplées de façon covalente à des billes magnétiques. Au milieu, les IgA ($200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) ont été incubées sur des cellules adhérentes. Les cellules ont ensuite été lysées et la co-IP a été réalisée à l'aide d'IgG anti-IgA couplées de façon covalente à des billes magnétiques. En bas, des suspensions cellulaires ont été incubées en présence d'IgA ($200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) puis lysées. La co-IP a été réalisée à l'aide d'IgG anti-IgA couplées de façon covalente à des billes magnétiques. (C) Western-blot et quantification des (co-)immunoprécipitations. À gauche, western-blot réalisés sur les éluats de chacun des dispositif expérimentaux d'IP, et révélés à l'aide d'un anticorps spécifique de CD71 (images représentatives, $n = 1 - 5$). À droite, diagrammes en bâtons des quantifications des bandes révélées par l'anticorps anti-CD71 par western-blot. Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ et normalisées par rapport à la condition pIgA1_M. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 1 - 5$). pIgA1_M: pIgA1 issues de myélome. BSA : Albumine bovine sérique.

L'absence d'interaction physique directe par cytométrie en flux et immunoprécipitation ne préclut pas d'une étroite proximité des SIgA et de CD71 et/ou de la présence de CD71 au sein d'un complexe protéique interagissant avec les SIgA à la surface cellulaire. Pour tester cette possibilité, nous avons réalisé des expériences de ligation de proximité (PLA) dont la positivité témoigne d'une distance protéine-protéine inférieure à 40 nm, ainsi que de transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) par analyse du temps de vie de fluorescence du fluorochrome donneur (FLIM), opérant pour des distances inférieures à 10 nm.

L'étude de proximité entre CD71 et IgA par PLA confirme l'interaction directe CD71-pIgA1_M précédemment observée et indique la présence de CD71 à proximité des SIgA (figure III.4A). En revanche, aucune interaction entre les mIgA et CD71 n'est détectée. Ces résultats ont été confirmés à l'aide d'un second couple d'anticorps (données non montrées).

Les résultats obtenus par FRET-FLIM montrent un transfert de fluorescence entre le fluorochrome donneur (CD71) et l'accepteur (IgA) exclusivement en présence de pIgA1_M et de SIgA (figure III.4B-C). La modélisation mathématique de la courbe de décroissance de fluorescence du fluorochrome donneur (figure III.4C) permet de calculer la valeur de son temps de vie de fluorescence (Tau). La comparaison des Tau indique que le FRET entre CD71 et pIgA1_M/SIgA est très proche du maximum obtenu à l'aide de deux anticorps anti-CD71. La spécificité est quant à elle confirmée par l'absence de FRET entre Ep-CAM (Epithelial cell adhesion molecule) et les SIgA. Ces résultats ont été confirmés à l'aide d'un second couple d'anticorps, mais aussi en inversant la disposition des fluorochromes donneur et accepteur (données non montrées).

Les données obtenues par PLA et FRET-FLIM confirment l'interaction physique entre CD71 et les pIgA1_M et révèlent une étroite proximité (< 10 nm) entre CD71 et les SIgA, malgré l'absence d'interaction physique directe.

La valeur de Tau obtenue par FRET-FLIM est influencée par la distance entre les interactants ($1/r^6$) et par la fraction de molécules donneuses impliquée dans le FRET. De manière intéressante, les SIgA établissent un plus grand nombre d'interactions avec CD71 que les pIgA1_M (+40%) en PLA alors que les valeurs de Tau pour CD71-pIgA1_M et CD71-SIgA sont similaires. La mise en relation de ces deux résultats suggère que la distance plus importante entre CD71 et SIgA est compensée par un plus grand nombre de complexes CD71-SIgA formés (et/ou par des complexes de plus grande taille) à la surface. Pour tester cette hypothèse, nous avons représenté $\text{Tau} = f(I_{\text{IgA}}/I_{\text{CD71}})$ où I correspond à l'intensité du marquage quantifiée sur l'image obtenue par microscopie confocale (figure III.4D). Sur ce

graphique, on note que le niveau de fixation des SIgA requis pour atteindre une même valeur de Tau est plus élevé que pour les pIgA1_M. Autrement dit, pour une quantité égale d'IgA fixée, le FRET CD71-SIgA est inférieur au FRET CD71-pIgA1_M, ce qui révèle une moindre proximité entre CD71 et les SIgA.

L'ensemble de ces résultats indique qu'à la différence des pIgA1_M, les SIgA n'établissent pas d'interaction physique directe avec CD71. CD71 et SIgA sont néanmoins extrêmement proches, ce qui permet d'expliquer les précédentes observations (colocalisation, FRET et PLA) faites *in vitro* et sur biopsies de patients cœliaques (Lebreton et al., 2012; Matysiak-Budnik et al., 2008). Se pose désormais la question de l'identité du(des) protéines interagissant directement avec les SIgA à la surface de la lignée Caco-2 TC7.

Figure III.4

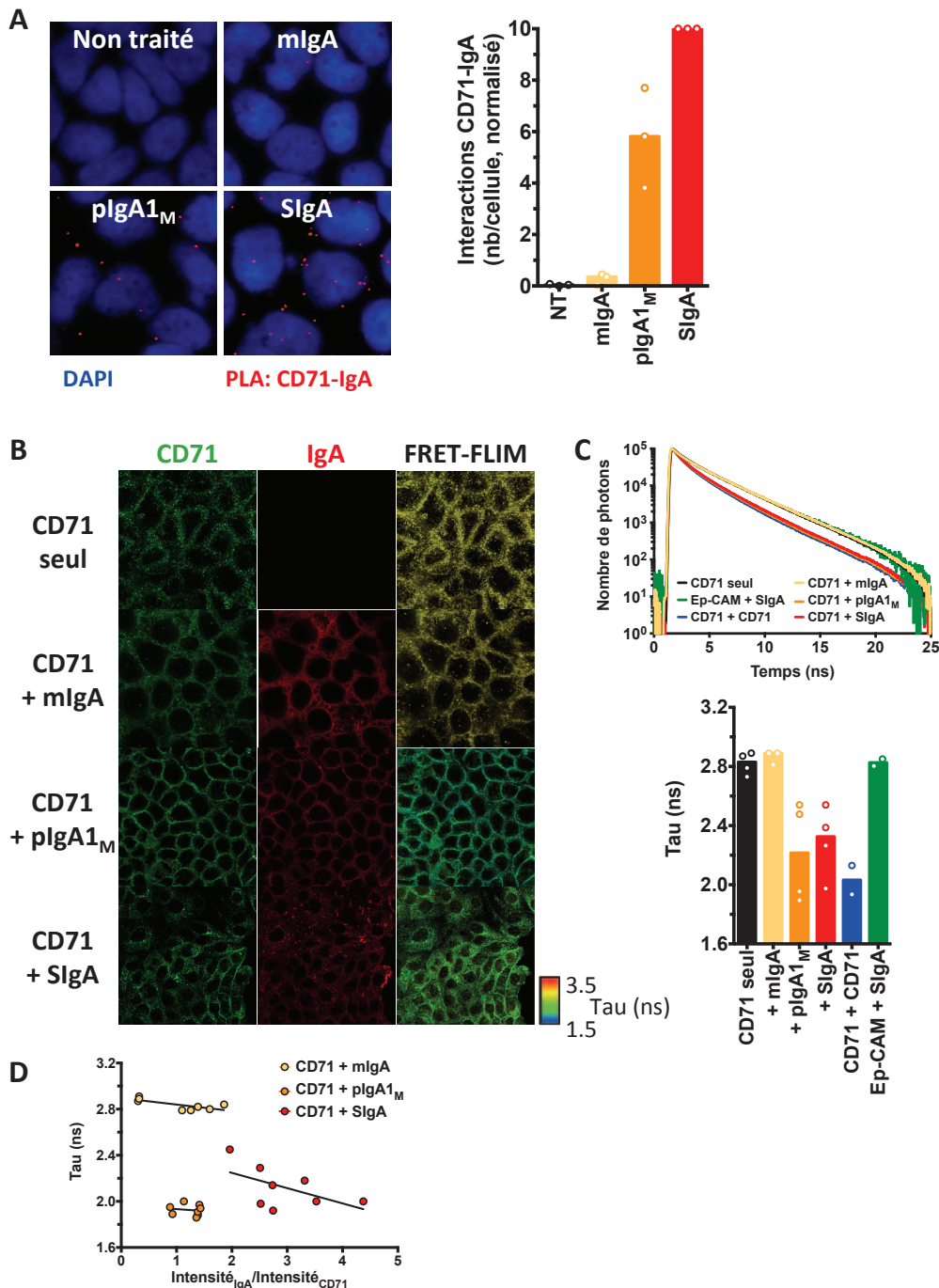


Figure III.4 : Étude de l'interaction entre CD71 et les IgA sur les cellules Caco-2 TC7 par PLA et FRET-FLIM. (A) Étude de la proximité entre CD71 et les IgA ($250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) par PLA, en microscopie confocale. À gauche, images représentatives de chacune des conditions sur lesquelles apparaissent les noyaux cellulaires (DAPI, en bleu) et les interactions de proximité CD71-IgA (points rouges). À droite, diagramme en bâtons indiquant le nombre d'interactions CD71-IgA par cellule, quantifié à l'aide du module « Spot detector » du logiciel Icy. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 3$). Le nombre d'interactions CD71-IgA a été normalisé par rapport à la condition réalisée en présence de SigA. **(B, C, D)** Étude de l'interaction entre CD71 et les IgA ($250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) par FRET-FLIM. **(B)** Images microscopiques confocales représentatives des marquages réalisés à l'aide des anticorps anti-CD71 (à gauche, en vert) et anti-IgA (au milieu, en rouge), et représentation colorimétrique du temps de vie du fluorochrome donneur (Tau, à droite) calculé par FRET-FLIM. **(C)** En haut, les courbes de décroissance de fluorescence représentant le nombre de photons émis par les échantillons et reçus par la photodiode après une stimulation du fluorochrome donneur par un laser pulsé, en fonction du temps (en nanosecondes). La valeur maximale de photons détectée a été normalisée à 10^5 pour chaque condition, afin de permettre la superposition des courbes et leur analyse visuelle. En bas, le diagramme en bâtons représente le temps de vie du fluorochrome donneur (Tau) calculé par modélisation biexponentielle de la portion linéaire décroissante des courbes de décroissance de fluorescence, pour chacune des conditions. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 2 - 4$). **(D)** Nuage de points représentant le temps de vie du fluorochrome donneur (Tau) en fonction du rapport des intensités de fluorescence des marquages IgA et CD71. Les intensités de fluorescence ont été quantifiées sur les images obtenues par microscopie confocale, à l'aide du logiciel ImageJ. Chaque symbole représente un champ microscopique (8 champs par condition, $n = 2$). Pour chaque condition, une courbe de tendance linéaire a été tracée. DAPI : 4'-6-diamidino-2-phénylindole ; NT : Cellules non traitées ; pIgA1_M : pIgA1 issues de myélocyte.

2. Caractérisation des paramètres de fixation des SIgA et identification de partenaires du complexe protéique.

2.1. Paramètres de fixation des SIgA à la surface des cellules Caco-2 TC7.

Dans un premier temps, nous avons décidé de caractériser les paramètres de fixation des SIgA à la surface de la lignée Caco-2 TC7. Par cytométrie en flux, la fixation des SIgA n'est pas saturable sur l'intervalle de concentrations [0 ; 2 mg.ml⁻¹] (figure III.5A), même si un léger infléchissement de la courbe est observé à partir de 0,75 – 1 mg.ml⁻¹. En outre, l'interaction n'est pas dépendante de cations (figure III.5B). Après avoir déterminé par ELISA le ratio IgA1:IgA2 dans notre préparation de SIgA (80:20), nous avons comparé la fixation des SIgA1 et des SIgA2 à l'aide d'anticorps spécifiques de chaque isotype. La figure III.5C indique que sur l'intervalle de concentrations testées [0 ; 400 µg.ml⁻¹], aucune différence de fixation n'est observée entre IgA1 et IgA2.

Dans un second temps, nous avons déterminé la spécificité de l'interaction entre les SIgA et ce récepteur. Pour ce faire, nous avons pré-incubé les cellules en présence de 2 mg.ml⁻¹ d'Ig compétitrices non marquées avant d'ajouter des SIgA (200 µg.ml⁻¹) biotinylées. Malgré une importante variabilité probablement due à l'absence de saturation complète du récepteur aux concentrations utilisées, cette expérience suggère que la fixation des SIgA est spécifique et n'entre pas en compétition avec les autres isotopes ou formes d'IgA utilisées (figure III.5D). La spécificité de la fixation des SIgA a aussi été confirmée en présence de sérum de veau foetal ($\leq 2\%$) et d'importantes concentrations de BSA (≤ 150 mg.ml⁻¹) (données non montrées).

Ces données suggèrent que les cellules Caco-2 TC7 expriment un(des) récepteur(s) capable(s) d'interagir spécifiquement avec les SIgA, indépendamment de la sous-classe d'IgA et de la présence de cations.

Figure III.5

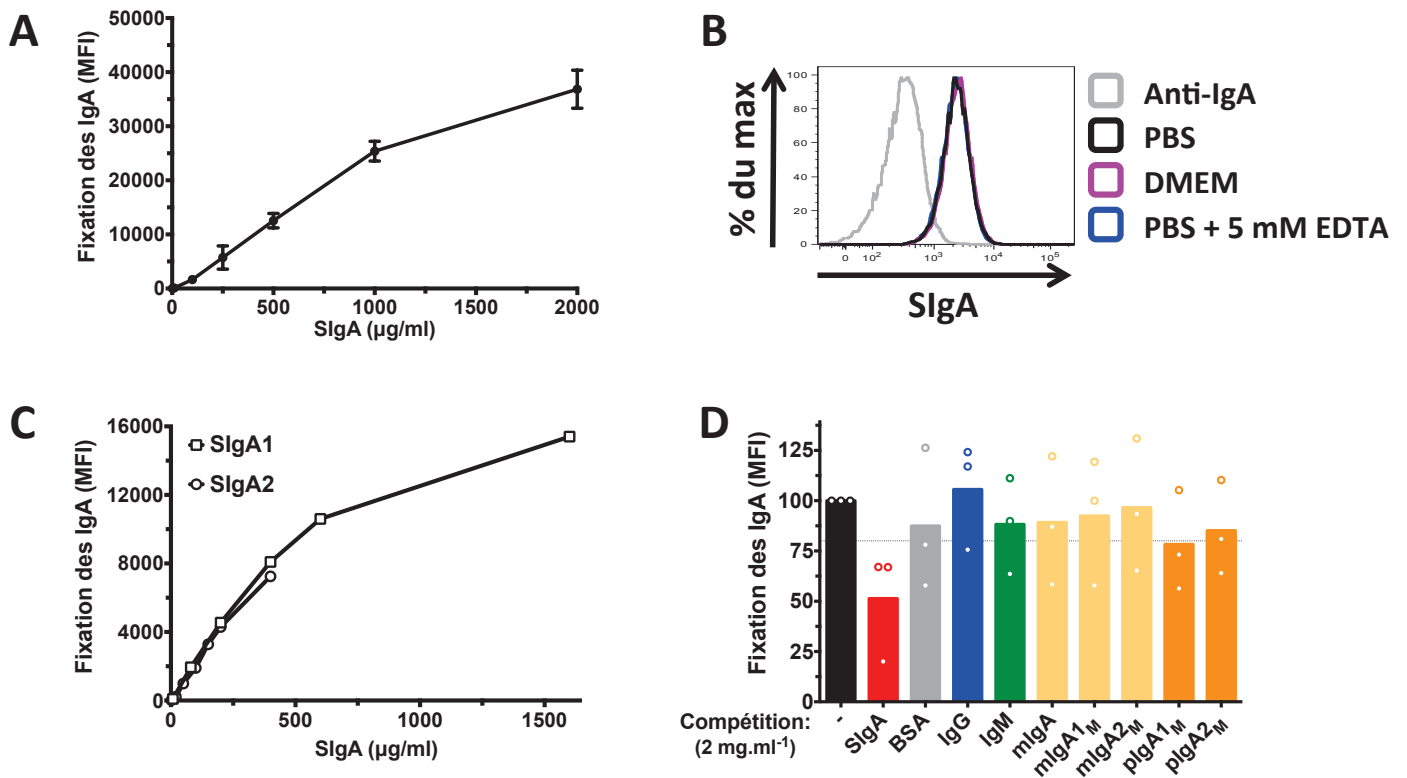


Figure III.5 : Étude des paramètres de fixation des SIgA à la surface des cellules Caco-2 TC7. (A) Courbe de fixation des SIgA à la surface des cellules Caco-2 TC7 en fonction de la dose de SIgA (0 – 2 mg.ml⁻¹), par cytométrie en flux (moyenne ± déviation standard à la moyenne (SEM), n = 2). MFI : Intensité moyenne de fluorescence. (B) Histogramme représentant la fixation des SIgA (200 µg.ml⁻¹) sur les cellules Caco-2 TC7 dans différents milieux d'incubation (histogramme représentatif, n = 2). (C) Courbe de fixation des SIgA1 et SIgA2 à la surface des cellules Caco-2 TC7, déterminée à l'aide d'anticorps spécifiques de chaque isotype, par cytométrie en flux (n = 1). MFI : Intensité de fluorescence moyenne. (D) Diagramme en bâtons représentant la fixation des SIgA (200 µg.ml⁻¹) en présence d'immunoglobulines compétitrices (2 mg.ml⁻¹), par cytométrie en flux. L'intensité de fluorescence moyenne (MFI) a été normalisée par rapport à la condition SIgA en l'absence d'immunoglobuline compétitrice (moyenne, n = 3). Chaque symbole représente une expérience indépendante (n = 3).

2.2. Criblage d'expression des récepteurs et protéines interagissant avec les IgA décrits dans la littérature.

Après avoir déterminé les paramètres de fixation des SIgA, nous avons entrepris de vérifier l'expression des récepteurs aux IgA décrits dans la littérature par RT-qPCR et/ou western-blot. Les résultats de RT-qPCR de la figure III.6A indiquent que, parmi les ARN messagers (ARNm) étudiés, seuls TFR2 (TfR2), B4GALT1 (b4Gal-T1) et FCAMR (Fcα/µR) sont exprimés à des niveaux supérieurs à 0,01 fois un contrôle positif d'expression. Nous avons confirmé l'expression des protéines correspondant à ces trois transcrits, ainsi que des galectines (Gal)-3 et Gal-8 par western-blot (figure III.6B).

D'après ces résultats, la lignée Caco-2 TC7 exprime cinq candidats récepteurs/protéines interagissant avec les IgA. Néanmoins, l'analyse des caractéristiques de fixation des SIgA (figure III.5) et des données de la littérature permet d'en éliminer deux. Comme nous l'avons déjà montré (figure III.1), Tfr2 n'est pas exprimé à la surface des cellules. D'autre part, Fcα/μR n'est exprimé que sous forme monomérique (~58 kDa) dans les Caco-2 TC7 (figure III.6B) alors que seule la forme hétérodimérique non réductible (~125 kDa) est exprimée à la surface cellulaire (Kikuno et al., 2007). De plus, nous avons montré que la présence d'IgM compétitrices ne réduit pas la fixation des SIgA (figure III.5D).

Figure III.6

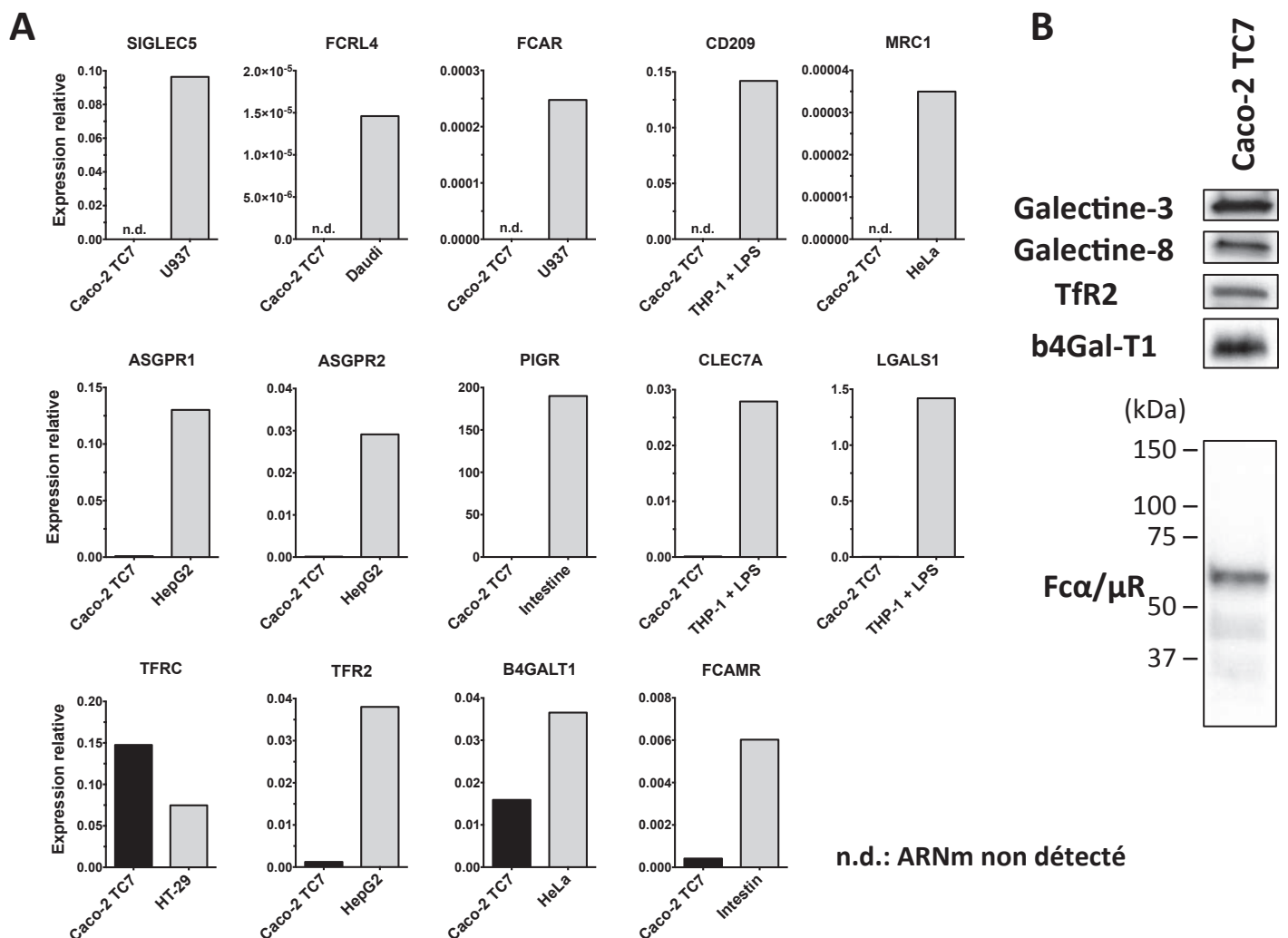


Figure III.6 : Étude de l'expression des gènes codant les protéines capables d'interagir avec les IgA, par RT-qPCR et western-blot. (A) Expression par les cellules Caco-2 TC7 des ARNm codant les différentes protéines capables d'interagir avec les IgA. L'expression de chacun des transcrits a été rapportée au transcrit de référence endogène, RPLP0. Pour chaque transcrit, une lignée de cellules humaines a servi de contrôle positif d'expression. n.d. : ARNm non détecté après 40 cycles d'amplification par qPCR (n = 1). (B) Western-blot réalisé sur lysats totaux de cellules Caco-2 TC7 et révélé à l'aide d'anticorps spécifiques des protéines étudiées (n ≥ 2).

2.3. Les galectines-3, -8 et l'enzyme b4Gal-T1, trois candidates potentielles.

Ces données nous ont conduits à explorer le rôle de Gal-3, Gal-8 et b4Gal-T1 dans la fixation des SIgA. Pour ce faire, nous avons réalisé l'extinction des gènes correspondants par la technologie CRISPR-Cas9 (figure III.7A, C et E). La fixation des SIgA sur ces cellules a ensuite été analysée par cytométrie en flux (figure III.7B, D et F). Aucune altération de fixation des SIgA n'a été détectée dans les cellules déficientes en chacun de ces gènes.

Le criblage de toutes les protéines capables d'interagir avec les IgA décrites dans la littérature n'a pas permis d'identifier le partenaire direct des SIgA à la surface de la lignée Caco-2 TC7. Ces résultats nous ont conduits à entreprendre des expériences d'immunoprécipitation suivies par de la spectrométrie de masse (IP-MS) pour tenter d'identifier le(s) protéine(s) responsable(s) de la fixation des SIgA.

Figure III.7

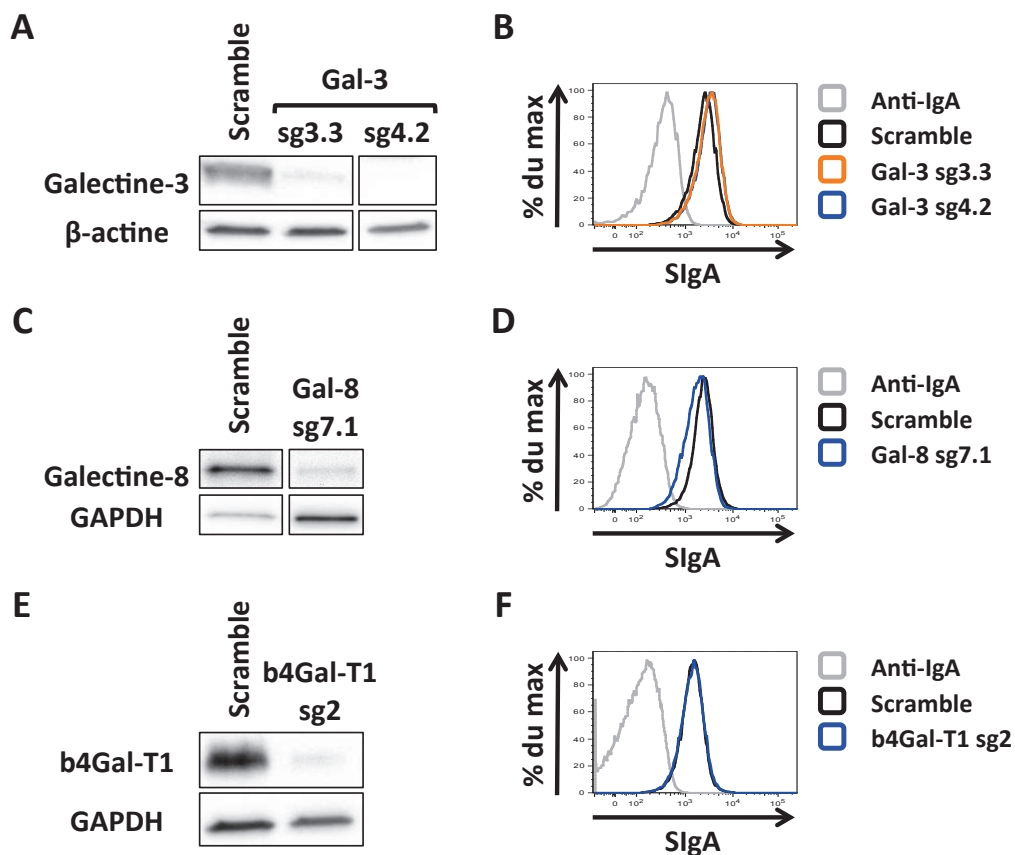


Figure III.7 : Étude de trois protéines candidates capables d'interagir avec les SIgA. (A, C, E) Western-blot réalisés à l'aide d'anticorps spécifiques de chacun des candidats sur les cellules contrôles (ou « scramble », transduites par un ARN guide ne ciblant aucun gène humain) ou inactivées pour le gène d'intérêt par la technologie CRISPR-Cas9 ($n \geq 2$). **(B, D, F)** Histogrammes représentant la fixation des SIgA ($200 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) par cytométrie en flux à la surface des différentes lignées étudiées ($n \geq 2$).

2.4. Recherche de candidat(s) récepteur(s) aux SIgA par IP-MS.

Une première approche a consisté à coupler de façon covalente les IgA avec des billes magnétiques fonctionnalisées avec des groupements époxy. Cette stratégie a pour principal avantage de retenir les IgA lors de l'élution finale en tampon Laemmli et d'améliorer la sensibilité de détection de candidats faiblement présents. Cette première tentative ne s'est pas révélée concluante. Les résultats de MS ont montré une importante contamination par des protéines provenant du colostrum, issues de la préparation de SIgA commerciales (données non montrées). Nous supposons que ces protéines ont été adsorbées à la surface des billes lors du couplage des IgA et éluées en même temps que les protéines immunoprécipitées, diluant le signal spécifique dans un important bruit de fond.

La seconde approche a été de coupler de façon covalente des IgG anti-IgA aux billes magnétiques afin de réaliser une co-immunoprécipitation (co-IP) des IgA préalablement incubées sur cellules vivantes en suspension (figure III.8A). La figure III.8C illustre une expérience de co-IP réalisée après biotinylation de surface des cellules vivantes pour contrôler la qualité de l'IP avant l'analyse par MS (les échantillons envoyés en MS n'étant pas biotinylés). On note la présence de nombreuses bandes non spécifiques dans l'IP contrôle réalisée avec l'IgG anti-IgA seule, témoignant de la réactivité des protéines du lysat avec l'anticorps utilisé pour l'IP. Une bande de 35 kDa, spécifiquement retrouvée dans l'IP réalisée en présence de SIgA est néanmoins observée. Sa révélation par la streptavidine couplée à la peroxydase de raifort indique que cette protéine a été biotinylée et qu'elle comporte au moins un domaine extracellulaire exposé à la surface cellulaire. La MS a permis d'identifier cette protéine comme étant SCAMP3 (Secretory carrier-associated membrane protein 3), et de confirmer sa présence exclusivement dans l'échantillon incubé en présence de SIgA (figure III.8E).

Finalement, une troisième approche a été mise au point (figure III.8B). Nous avons biotinylé d'importantes quantités de cellules en suspension à l'aide de groupements sulfo-NHS-biotin avant de les incuber avec les IgA. Nous avons réalisé une première co-IP avec un (Fab')₂ anti-IgA couplé aux billes pour réduire le bruit de fond observé avec l'IgG anti-IgA précédemment utilisée. Après une élution douce, une deuxième IP a été faite avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Cette seconde IP a eu pour avantage d'éliminer les contaminants intracellulaires adsorbés aux (Fab')₂ anti-IgA et aux IgA. Théoriquement, cette stratégie d'IP en tandem permet de ne retenir que les protéines préalablement biotinylées qui

de fait, ont été exposées à la surface cellulaire. Cette troisième approche nous a permis d'identifier deux candidats uniquement immunoprécipités pas les SIgA, BCAP31 (B-cell receptor-associated protein 31) et HM13 (Histocompatibility minor 13) (figure III.8D-E).

Figure III.8

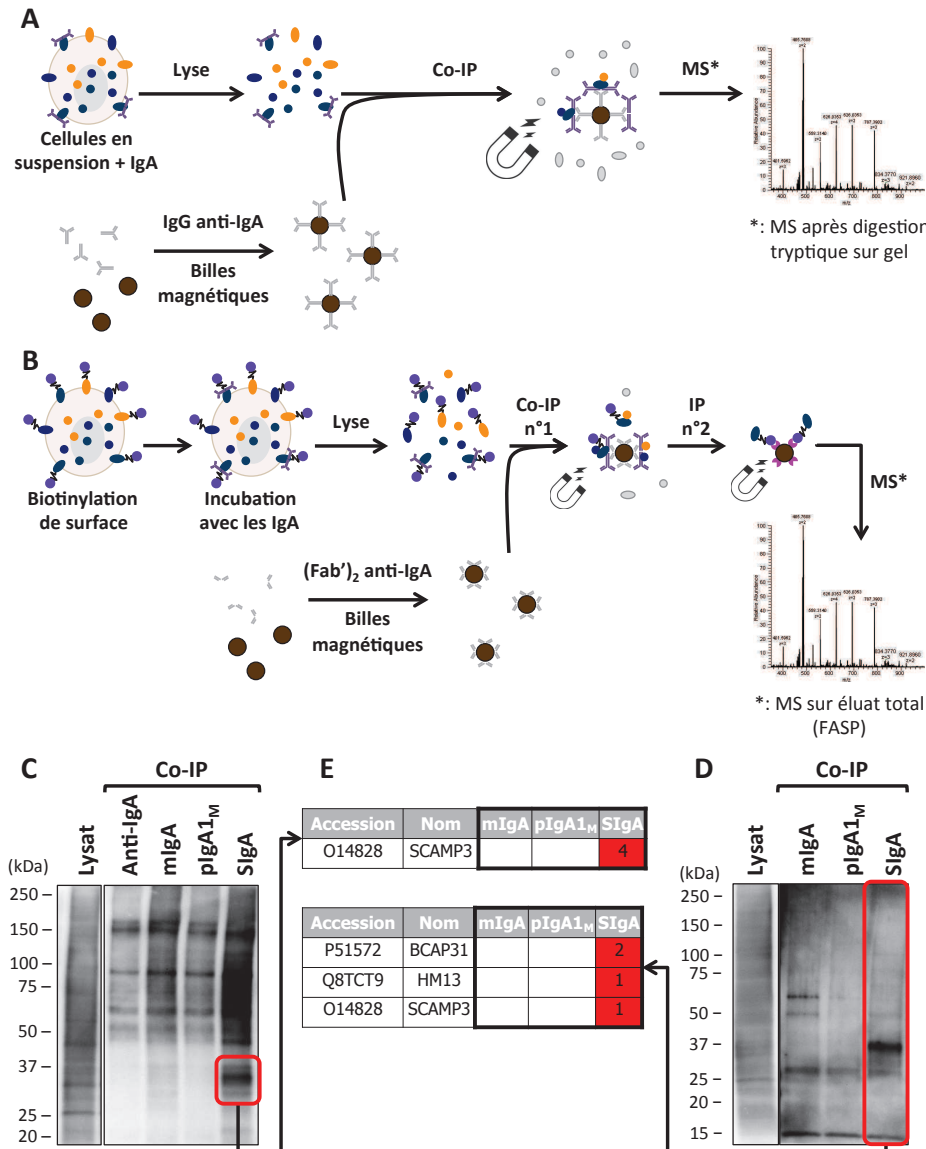
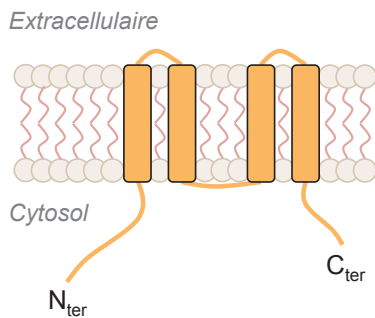


Figure III.8 : Identification de(s) récepteur(s) aux SIgA par IP-MS. (A, B) Représentations schématiques des dispositifs expérimentaux d'IP-MS. **(A)** Des suspensions de cellules Caco-2 TC7 ont été incubées en présence d'IgA (200 – 500 µg.ml⁻¹) avant d'être lysées. La co-IP a été réalisée à l'aide d'IgG anti-IgA couplées de façon covalente à des billes magnétiques. Les éluats de co-IP ont été analysés par spectrométrie de masse après digestion tryptique sur gel. **(B)** Les cellules Caco-2 TC7 en suspension ont été biotinylées avant d'être incubées en présence d'IgA (200 – 500 µg.ml⁻¹) et lysées. Une co-IP a ensuite été réalisée à l'aide de (Fab')₂ anti-IgA couplés de façon covalente à des billes magnétiques. Une seconde IP a été menée par des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Les protéines éluées ont été digérées par FASP et analysées par MS. **(C)** Parallèlement à l'envoi des échantillons en MS, une expérience de contrôle selon le dispositif (A) a été réalisée sur des cellules dont les protéines de surface ont préalablement été biotinylées. Les protéines co-immunoprécipitées ont été éluées et révélées par la streptavidine-HRP après migration en SDS-PAGE. Ces résultats ont permis d'orienter la découpe sur gel (symbolisée par le rectangle rouge) des échantillons envoyés en MS. **(D)** 20% des éluats de co-IP ont été mis à migrer en SDS-PAGE et révélés par la streptavidine-HRP afin d'évaluer la qualité de la co-IP envoyée pour analyse en MS. Le rectangle rouge symbolise l'analyse de l'éluat total permis par la méthode de digestion FASP. **(E)** Tableaux résumant le nombre de peptides détectés dans une analyse MS après une co-IP selon le dispositif (A) (tableau du haut) ou (B) (tableau du bas). Le nombre de peptides détectés par condition est indiqué pour chacun des candidats identifiés. Accession : Référence de la protéine identifiée dans les bases données ; MS : Spectrométrie de masse ; FASP : Digestion tryptique sur filtre.

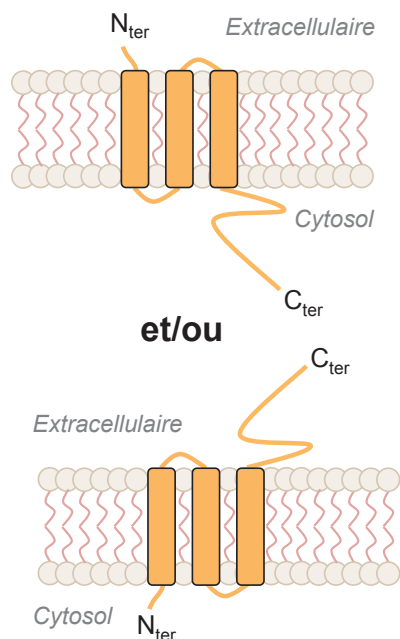
La difficulté majeure de ces approches par IP-MS a été de réussir à discriminer le signal spécifique par rapport au bruit de fond. L'efficacité de ces IP est en effet relativement faible, conséquence probable de la faible affinité des SIgA pour leur récepteur, et les contaminants cellulaires et/ou du colostrum, très nombreux. Nos différentes stratégies nous ont toutefois permis d'identifier trois candidats exclusivement présents dans les échantillons incubés avec les SIgA : SCAMP3, BCAP31 et HM13 (figure III.9).

Figure III.9

A SCAMP3



B BCAP31



C HM13 (ou SPP)

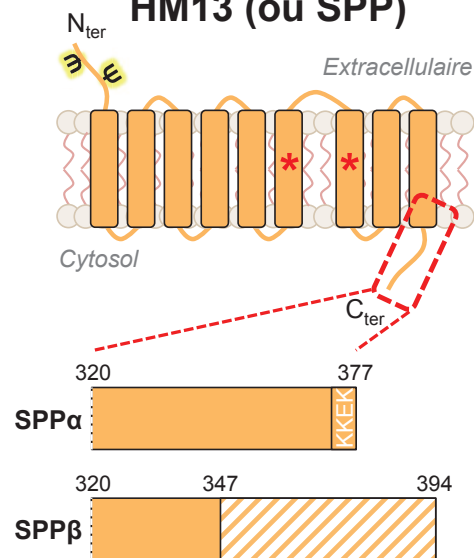


Figure III.9 : Représentations schématiques des trois protéines identifiées par IP-MS. (A) SCAMP3 est une protéine d'environ 35 kDa, composée de quatre domaines transmembranaires, et dont les extrémités N_{ter} et C_{ter} sont cytosoliques. (B) BCAP31 est une protéine d'environ 28 kDa, comprenant trois domaines transmembranaires et dont deux topologies ont été rapportées. L'extrémité C_{ter} de BCAP31 comporte trois sites potentiels de O-glycosylation (non représentés) (C) HM13 (ou SPP) est une protéine de 41-43 kDa, constituée de neuf domaines transmembranaires. Son extrémité N_{ter} comprenant deux résidus N-glycosylés (tridents noirs et jaunes) est exposée dans le RE ou à la surface cellulaire. Les domaines transmembranaires 6 et 7 contiennent les résidus du domaine catalytique (étoiles rouges) dont résulte son activité aspartyl protéase. Deux isoformes de HM13 ont été décrites, SPPα (377 aa) et SPPβ (394 aa) identiques pour les acides aminés 1 à 347 mais dont l'extrémité C_{ter} (carré en pointillés rouges) diffère. La différence de séquence entre SPPα et SPPβ est notifiée par les hachures blanches sur la séquence de SPPβ. SPPα possède un motif de rétention dans le RE (KKEK) en C_{ter}, absent sur SPPβ. N_{ter} : Extrémité N-terminale ; C_{ter} : Extrémité C-terminale.

3. Confirmation des candidats obtenus par IP-MS.

3.1. Secretory carrier-associated membrane protein 3 (SCAMP3).

SCAMP3 (35 kDa) est une protéine constituée de quatre domaines transmembranaires, et dont les extrémités N_{ter} et C_{ter} sont intracellulaires (figure III.9A). SCAMP3 est exprimé dans de nombreux tissus, à la surface cellulaire et dans différentes organelles impliquées dans le recyclage des protéines de surface (Castle, 2005; Singleton et al., 1997). SCAMP3 peut s'homodimériser, ce qui est associé à sa tendance à former des amas à la surface cellulaire (Castle, 2005; Singleton et al., 1997). La colocalisation entre CD71 et SCAMP3 a été rapportée dans les endosomes précoces (Castle, 2005). SCAMP3 peut être ubiquitinylé et interagir avec des protéines du complexe de tri endosomal requis pour le transport (ESCRT)-0 et -1 (Aoh et al., 2009). D'un point de vue fonctionnel, SCAMP3 est impliqué dans le trafic intracellulaire de l'EGFR (Aoh et al., 2009; Falguières et al., 2011).

Dans un premier temps, nous avons confirmé l'interaction physique entre les SIgA et le candidat SCAMP3 à l'aide d'un anticorps spécifique de SCAMP3. Nous avons réalisé des co-IP avec des IgG anti-IgA dans lesquelles SCAMP3 n'a été détecté qu'en présence de SIgA (figure III.10A). Des co-IP réalisées avec des IgG anti-SCAMP3 ont permis de confirmer l'existence de l'interaction entre SCAMP3 et les SIgA (figure III.10A). Ces expériences démontrent la présence d'une interaction physique retrouvée entre SCAMP3 et les SIgA, mais pas entre SCAMP3 et les mIgA ou les pIgA_{1M}. De manière similaire, le PLA révèle la proximité entre SCAMP3 et les SIgA (figure III.10B). Cette technique indique aussi des interactions de proximité entre SCAMP3 et les pIgA_{1M}, mais dans des proportions beaucoup moins importantes (5 fois moins d'interactions que les SIgA). En revanche, aucune interaction entre SCAMP3 et les SIgA n'a pu être mise en évidence par FRET-FLIM malgré l'utilisation de plusieurs couples d'anticorps, et de cellules surexprimant SCAMP3 (données non montrées).

Pour déterminer si l'interaction physique entre les SIgA et SCAMP3 est directe, nous avons généré deux lignées cellulaires déficientes en SCAMP3 (figure III.10D) et avons caractérisé leur capacité de fixation des IgA par cytométrie en flux (figure III.10E). L'absence d'altération de la fixation des SIgA à la surface de ces cellules montre que l'interaction physique entre SIgA et SCAMP3 n'est pas directe.

En conclusion, les données obtenues par IP, PLA et MS indiquent que SCAMP3 interagit physiquement avec les SIgA. Néanmoins, les résultats de cytométrie en flux et de FRET écartent la possibilité que cette interaction soit directe.

Figure III.10

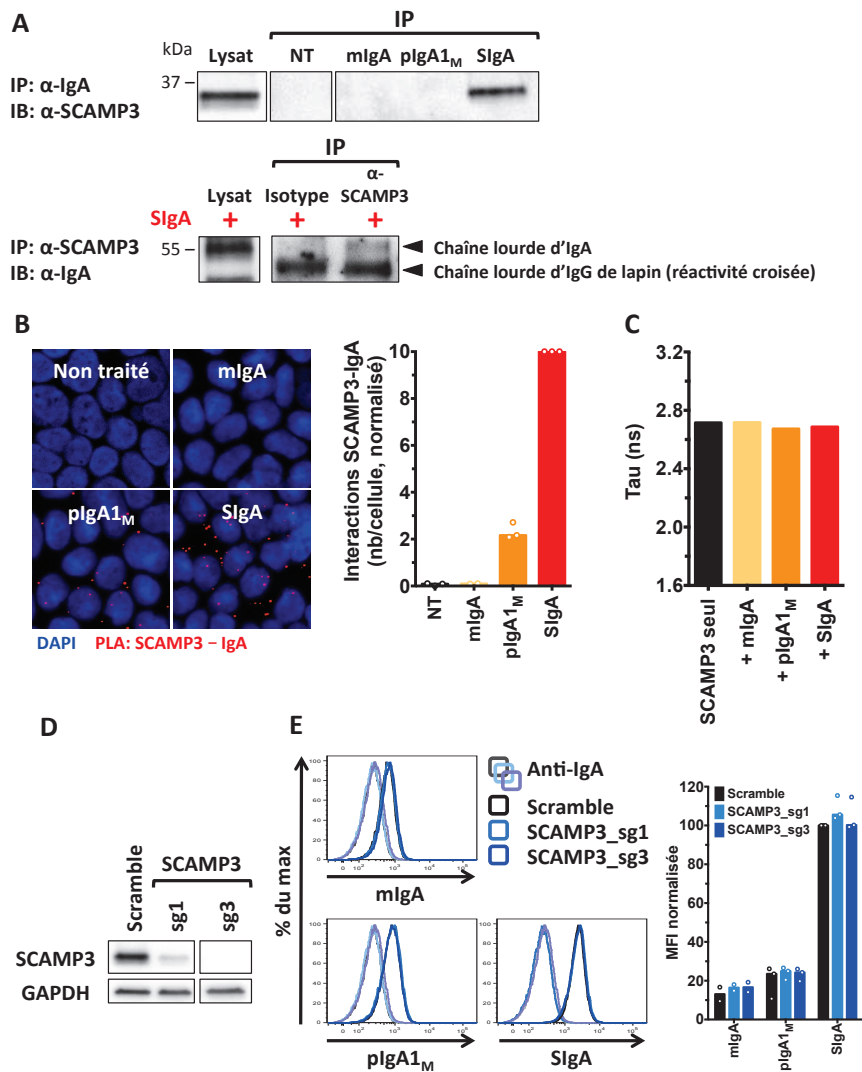


Figure III.10 : Étude de l'interaction entre SCAMP3 et les IgA sur les cellules Caco-2 TC7. (A) Des suspensions cellulaires ont été incubées en présence ou non d'IgA ($200 - 500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) puis lysées en tampon d'IP. Une co-IP a ensuite été réalisée à l'aide d'IgG anti-IgA (en haut) ou d'IgG anti-SCAMP3 (en bas) et les protéines éluées ont été analysées par western-blot. En haut, la membrane a été révélée à l'aide d'un anticorps anti-SCAMP3 ($n \geq 3$). En bas, la membrane a été révélée à l'aide d'un anticorps anti-IgA ($n = 2$). (B) Étude de la proximité entre SCAMP3 et les IgA ($200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) par PLA, en microscopie confocale. À gauche, images représentatives de chacune des conditions sur lesquelles apparaissent les noyaux cellulaires (DAPI, en bleu) et les interactions de proximité SCAMP3-IgA (points rouges). À droite, diagramme en bâtons indiquant le nombre d'interactions SCAMP3-IgA par cellule, quantifié à l'aide du module « Spot detector » du logiciel Icy. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 2 - 3$). Le nombre d'interactions SCAMP3-IgA a été normalisé par rapport à la condition réalisée en présence de SIgA. (C) Diagramme en bâtons représentant le temps de vie du fluorochrome donneur (Tau) obtenu par FRET-FLIM et calculé par modélisation biexponentielle de la courbe de décroissance de fluorescence, pour chacune des conditions en présence ou non d'IgA ($250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) (diagramme représentatif de trois expériences). (D) Évaluation par western-blot de l'expression de SCAMP3 dans les cellules contrôles et dans les deux lignées inactivées par la technologie CRISPR-Cas9. (E) À gauche, histogrammes représentatif de la fixation de différentes formes d'IgA ($200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) sur les cellules contrôles (en noir) et déficientes en SCAMP3 (en bleus clair et foncé) par cytométrie en flux. À droite, diagramme en bâtons montrant la MFI de fixation des IgA, normalisée par rapport à la fixation des SIgA sur les cellules contrôles. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 2 - 3$). NT : Cellules incubées en absence d'IgA (non traitées) ; pIgA_{1M} : pIgA1 issues de myélome. MFI : Intensité de fluorescence médiane.

3.2. B-cell receptor-associated protein 31 (BCAP31).

BCAP31 (~28 kDa) est une protéine ubiquitaire composée de trois domaines transmembranaires dont l'extrémité C_{ter} est cytosolique (figure III.9B). BCAP31 est abondamment retrouvée dans le réticulum endoplasmique (RE) où elle opère en tant que chaperonne de nombreuses protéines comme la cellubrevine, le CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) ou l'IgD membranaire (Annaert et al., 1997; Lambert et al., 2001; Schamel et al., 2003). BCAP31 régule aussi la dégradation protéique associée au RE (ERAD) ainsi que l'export de protéines à la membrane plasmique comme l'intégrine β_2 CD11b/CD18 ou le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-I (Abe et al., 2009; Wang et al., 2008; Zen et al., 2004). Enfin, BCAP31 est impliqué dans le déclenchement de l'apoptose induite par le stress du RE (Namba et al., 2013). L'expression de BCAP31 à la membrane plasmique a récemment été montrée à la surface des PNN et des cellules souches embryonnaires humaines (hESC) (Bartee et al., 2010; Kim et al., 2015). De manière intéressante, BCAP31 présente une topologie inversée et expose son extrémité C_{ter} à la surface des hESC (figure III.9B) (Kim et al., 2015).

Comme nous l'avons fait pour SCAMP3, nous avons d'abord vérifié les résultats obtenus par MS à l'aide de différentes techniques. Par IP, nous avons confirmé que BCAP31 interagit physiquement avec les SIgA tandis qu'une interaction semble aussi présente avec les mIgA, mais dans une moindre mesure (figure III.11A). Les expériences de PLA ont confirmé l'interaction entre les SIgA et BCAP31, et beaucoup plus faiblement avec les mIgA (figure III.11B). En revanche, cette dernière technique indique que malgré l'absence d'interaction physique détectable par IP, BCAP31 se trouve à proximité des complexes CD71-pIgA_{1M}.

Nous avons généré deux lignées cellulaires déficientes en BCAP31 afin d'évaluer sa capacité d'interaction avec les IgA par cytométrie en flux (figure III.11C). L'absence de différence par rapport aux cellules contrôles montre que BCAP31 n'est pas nécessaire à la fixation des IgA à la surface des cellules Caco-2 TC7 (figure III.11D).

L'ensemble de ces données indique que BCAP31 est un partenaire du complexe protéique interagissant physiquement, mais de manière indirecte, avec les SIgA.

Figure III.11

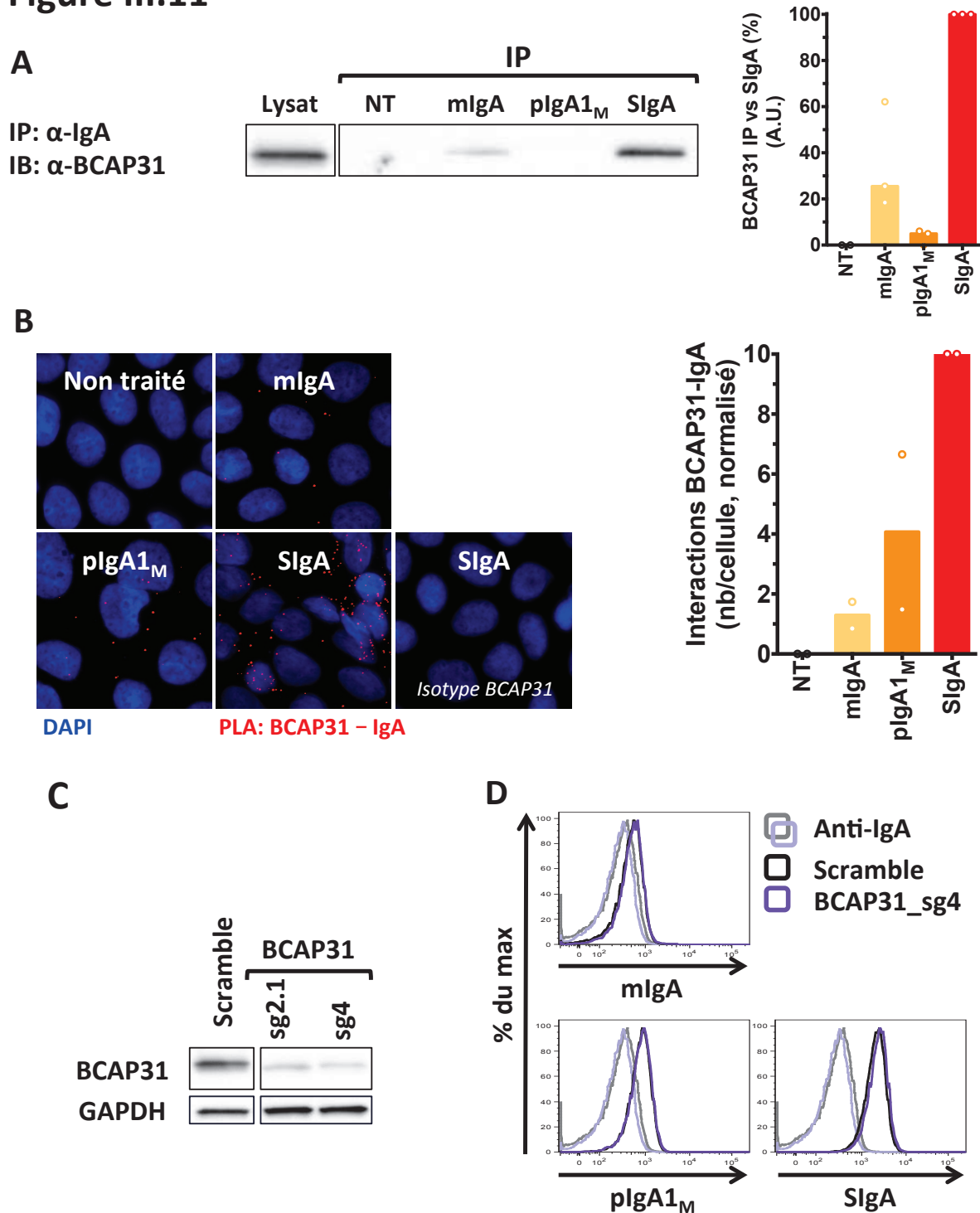


Figure III.11 : Étude de l'interaction entre BCAP31 et les IgA dans les cellules Caco-2 TC7. (A) Des suspensions cellulaires ont été incubées en présence ou non d'IgA ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) puis lysées en tampon d'IP. Une co-IP a ensuite été réalisée à l'aide d'IgG anti-IgA et les protéines éluées ont été analysées par western-blot. La membrane a été révélée à l'aide d'un anticorps anti-BCAP31 (à gauche). À droite, diagramme en bâtons des quantifications des bandes révélées par l'anticorps anti-BCAP31. Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ et normalisées par rapport à la condition réalisée en présence de SIgA. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 3$). (B) Étude de la proximité entre BCAP31 et les IgA ($250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) par PLA, en microscopie confocale. À gauche, images représentatives de chacune des conditions sur lesquelles apparaissent les noyaux cellulaires (DAPI, en bleu) et les interactions de proximité BCAP31-IgA (points rouges). À droite, diagramme en bâtons indiquant le nombre d'interactions BCAP31-IgA par cellule, quantifié à l'aide du module « Spot detector » du logiciel Icy. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 2$). Le nombre d'interactions BCAP31-IgA a été normalisé par rapport à la condition réalisée en présence de SIgA. (C) Évaluation par western-blot de l'expression de BCAP31 dans les cellules contrôles et dans deux lignées inactivées par la technologie CRISPR-Cas9. (D) Histogrammes représentatifs de la fixation de différentes formes d'IgA ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sur les cellules contrôles (en noir) et déficientes en BCAP31 (en violet) par cytométrie en flux (histogramme représentatif, $n = 2$). NT : Cellules incubées en absence d'IgA (non traitées) ; pIgA1_M : pIgA1 issues de myélome.

3.3. Histocompatibility minor 13 (HM13).

HM13 (aussi nommée peptidase de peptide signal, SPP) est une protéine d'environ 41 kDa (377 aa) constituée de neuf domaines transmembranaires, dotée d'une activité aspartyl protéase intramembranaire (figure III.9C) (Friedmann et al., 2004; Weihofen et al., 2002). HM13 exerce sa fonction enzymatique lorsqu'il est sous forme homotétramérique (Miyashita et al., 2011). La présence d'un motif peptidique KKEK en C_{ter} de l'isoforme α (SPP α) majoritaire explique sa caractérisation initiale comme protéine résidente du RE (Weihofen et al., 2002). De par son activité enzymatique, HM13 est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires comme le clivage de peptides signaux de récepteurs transmembranaires de type II après un premier clivage par une signal peptidase, la dégradation de protéines par la voie ERAD ainsi que la maturation de protéines virales (Chen et al., 2014; McLauchlan et al., 2002; Weihofen et al., 2002). De manière intéressante, HM13 est aussi capable de former d'importants complexes oligomériques (200 – 600 kDa), indépendamment de son activité aspartyl protéase (Schrul et al., 2010). En 2006, une seconde isoforme de HM13 (SPP β) a été décrite chez la souris. SPP β (~43 kDa, 394 aa) est identique à SPP α pour les acides aminés 1 à 347 mais son extrémité C_{ter} diffère et ne possède pas de motif de rétention dans le RE (figure III.9C) (Urny et al., 2006). De manière intéressante, Urny et collègues ont montré que SPP β , mais pas SPP α , est exprimé à la membrane plasmique (Urny et al., 2006). SPP β a aussi été mis en évidence chez l'Homme, ce qui suggère, à l'image de son orthologue murin, l'expression de cette isoforme de HM13 à la surface des cellules humaines. À ce jour, aucune fonction n'a été attribuée à SPP β .

Pour ce troisième candidat, nous avons entrepris la même démarche que pour les deux candidats précédents, à l'aide d'un anticorps polyclonal capable de réagir avec les deux isoformes de HM13. Comme dans le cas de BCAP31, l'étude par IP montre que HM13 interagit physiquement avec les SIgA, dans une moindre mesure avec les mIgA, mais pas avec les pIgA_{1M} (figure III.12A). Les données de PLA indiquent la proximité entre HM13 et les trois formes d'IgA testées (figure III.12B). Les interactions sont néanmoins 2,5 fois plus nombreuses en présence de pIgA_{1M} et de SIgA qu'en présence de mIgA. Nous avons généré deux lignées déficientes en HM13 à l'aide d'ARN guides ciblant des séquences conservées entre les isoformes SPP α et SPP β (figure III.12C) et avons montré que les cellules déficientes en HM13 ne présentent aucune altération de la fixation des IgA par cytométrie en flux (figure III.12D).

Ces résultats permettent d'établir que HM13 est membre du complexe protéique liant les SIgA à la surface cellulaire mais indiquent qu'il n'est pas directement impliqué dans la fixation des SIgA. L'anticorps utilisé dans ces expériences ne permet toutefois pas de déterminer quelle(s) isoforme(s) de HM13 interagi(ssen)t avec les SIgA.

Figure III.12

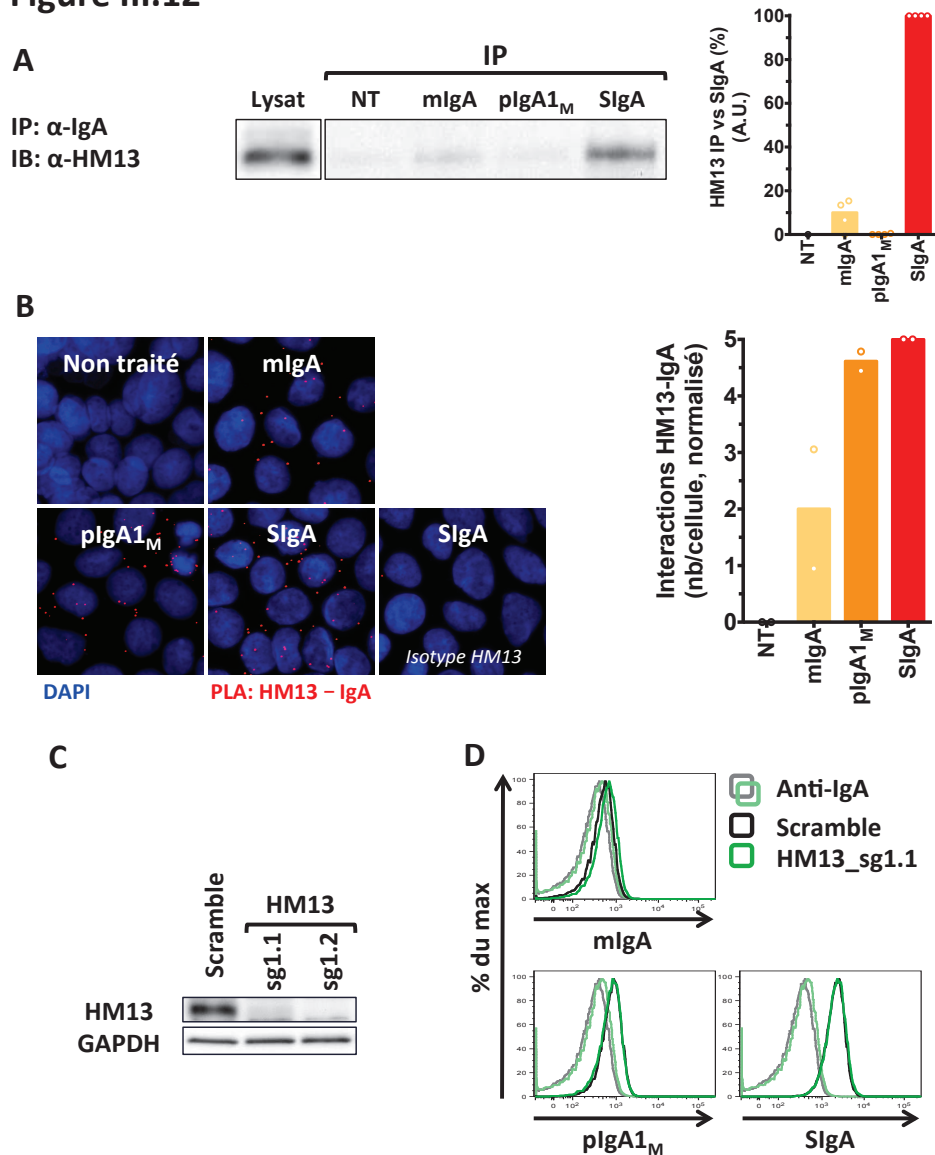


Figure III.12 : Étude de l'interaction entre HM13 et les IgA dans les cellules Caco-2 TC7. (A) Des suspensions cellulaires ont été incubées en présence ou non d'IgA ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) puis lysées en tampon d'IP. Une co-IP a ensuite été réalisée à l'aide d'IgG anti-IgA et les protéines éluées ont été analysées par western-blot. La membrane a été révélée à l'aide d'un anticorps anti-HM13 (à gauche). À droite, diagramme en bâtons des quantifications des bandes révélées par l'anticorps anti-HM13. Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ et normalisées par rapport à la condition réalisée en présence de SIgA. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 4$). (B) Étude de la proximité entre HM13 et les IgA ($250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) par PLA, en microscopie confocale. À gauche, images représentatives de chacune des conditions sur lesquelles apparaissent les noyaux cellulaires (DAPI, en bleu) et les interactions de proximité HM13-IgA (points rouges). À droite, diagramme en bâtons indiquant le nombre d'interactions HM13-IgA par cellule, quantifié à l'aide du module « Spot detector » du logiciel Icy. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 2$). Le nombre d'interactions HM13-IgA a été normalisé par rapport à la condition réalisée en présence de SIgA. (C) Évaluation par western-blot de l'expression de HM13 dans les cellules contrôles et dans deux lignées inactivées par la technologie CRISPR-Cas9. (D) Histogrammes représentatifs de la fixation de différentes formes d'IgA ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sur les cellules contrôles (en noir) et déficientes en HM13 (en vert) par cytométrie en flux ($n = 2$). NT : Cellules incubées en absence d'IgA (non traitées) ; pIgA_{1M} : pIgA1 issues de myélocyte.

En conclusion de cette partie, nous avons identifié et caractérisé trois nouvelles protéines capables d'interagir physiquement, mais de manière indirecte, avec les SIgA à la surface des IEC Caco-2 TC7. Notre stratégie par IP-MS ne nous a néanmoins pas permis d'identifier le partenaire direct des SIgA. Pour y parvenir, nous avons entrepris deux nouvelles approches dont les résultats ne sont pas connus à ce jour (*voir Discussion*). En complément de ces expériences, nous nous sommes attachés à préciser les liens entre ces différents partenaires afin de mieux caractériser l'organisation du complexe de fixation des SIgA.

4. Organisation du complexe de fixation des SIgA.

4.1. Dynamique de l'interaction entre SCAMP3, CD71 et les IgA.

Dans un premier temps, nous nous sommes demandés si les différents partenaires des SIgA interagissent entre eux à l'état basal. Par IP et PLA, nous avons montré que CD71 et SCAMP3 interagissent physiquement en l'absence d'IgA (figure III.13A-B). Des données préliminaires par IP suggèrent que CD71 et BCAP31 interagissent aussi physiquement à l'état basal (données non montrées). HM13 et BCAP31 ayant récemment été identifiés par MS, l'interaction de ces deux protéines entre elles et avec CD71 et SCAMP3 en l'absence d'IgA reste à évaluer.

De manière intéressante, la stimulation des cellules par les pIgA1_M et les SIgA augmente la quantité d'interactions SCAMP3-CD71 observées en PLA tandis qu'aucune différence n'apparaît par IP (figure III.13B). Cette absence de corrélation entre IP et PLA suggère que la fixation des pIgA1_M et des SIgA induit le regroupement de CD71 et SCAMP3 au sein de complexes multimériques [CD71_x:SCAMP3_y]_n par agrégation d'oligomères (CD71)_x:(SCAMP3)_y déjà constitués (n étant variable, pour x et y constants) (figure III.13C).

Figure III.13

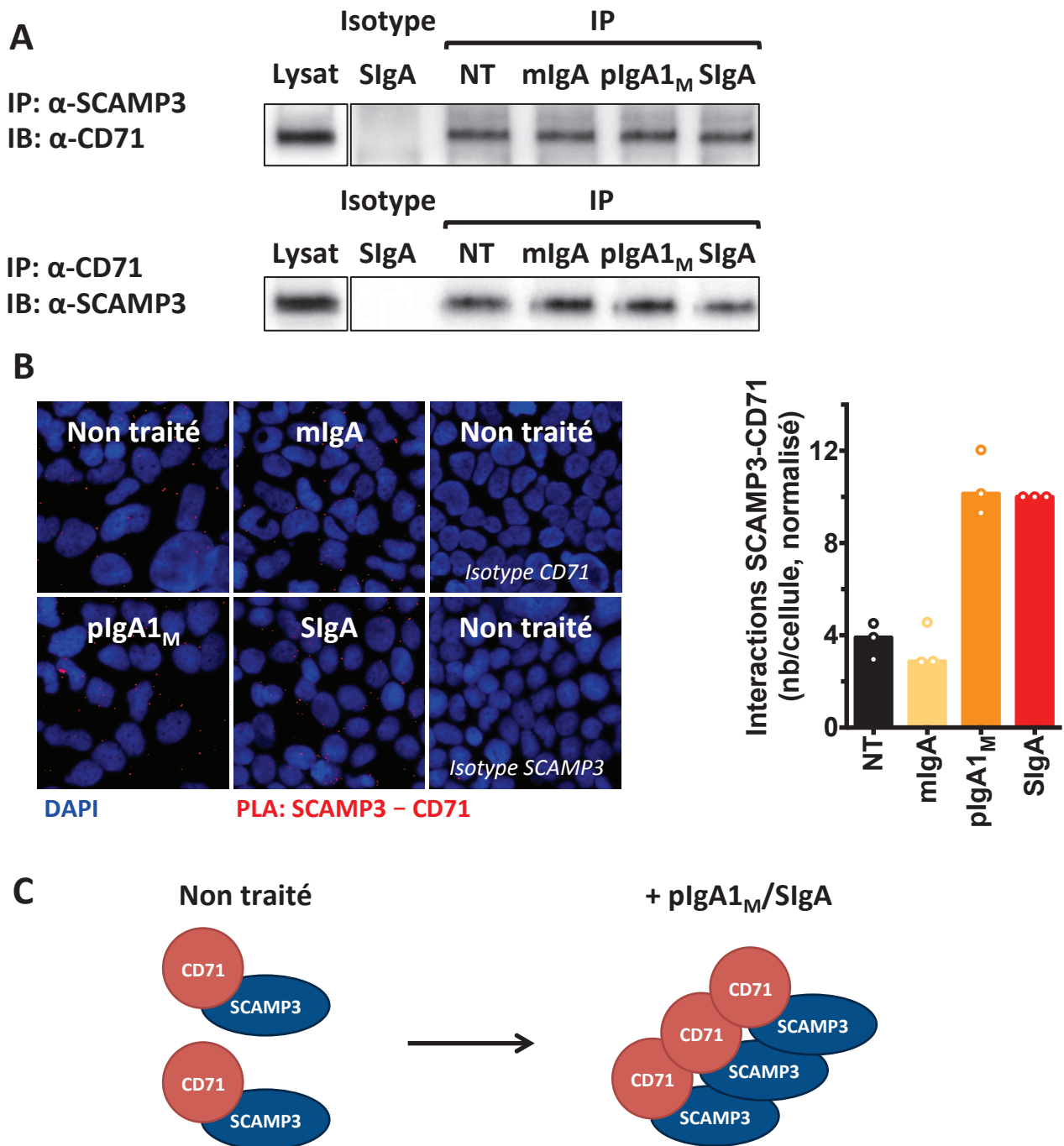


Figure III.13 : Étude de l'interaction entre SCAMP3 et CD71 dans les cellules Caco-2 TC7. (A) Des suspensions cellulaires ont été incubées en présence ou non d'IgA ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) puis lysées en tampon d'IP. Une co-IP a ensuite été réalisée à l'aide d'IgG anti-SCAMP3 (en haut) ou d'IgG anti-CD71 (en bas) et les protéines éluées ont été analysées par western-blot. En haut, la membrane a été révélée à l'aide d'un anticorps anti-CD71 ($n = 3$). En bas, la membrane a été révélée à l'aide d'un anticorps anti-SCAMP3 ($n \geq 4$). (B) Étude de la proximité entre SCAMP3 et CD71 par PLA en présence ou non d'IgA ($250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), en microscopie confocale. À gauche, images représentatives de chacune des conditions sur lesquelles apparaissent les noyaux cellulaires (DAPI, en bleu) et les interactions de proximité SCAMP3-CD71 (points rouges). À droite, diagramme en bâtons indiquant le nombre d'interactions SCAMP3-CD71 par cellule, quantifié à l'aide du module « Spot detector » du logiciel Icy. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 3$). Le nombre d'interactions HM13-IgA a été normalisé par rapport à la condition réalisée en présence de SIgA. (C) Schéma hypothétique de l'oligomérisation des complexes CD71-SCAMP3 en présence de pIgA1_M et de SIgA, d'après les données d'IP et de PLA.

L'étude par IP de l'interaction entre SCAMP3 et les SIgA sur les cellules TFRC_em montre un défaut de recrutement de SCAMP3 de l'ordre de 70% au sein du complexe de fixation des SIgA (figure III.14A). De la même manière, le nombre d'interactions SCAMP3-SIgA diminue de 80% dans les cellules TFRC_em (figure III.14B). Ces résultats indiquent que CD71 est nécessaire au recrutement de SCAMP3 au sein du complexe protéique, ainsi qu'à l'interaction physique entre SCAMP3 et les SIgA (figure III.14C).

Figure III.14

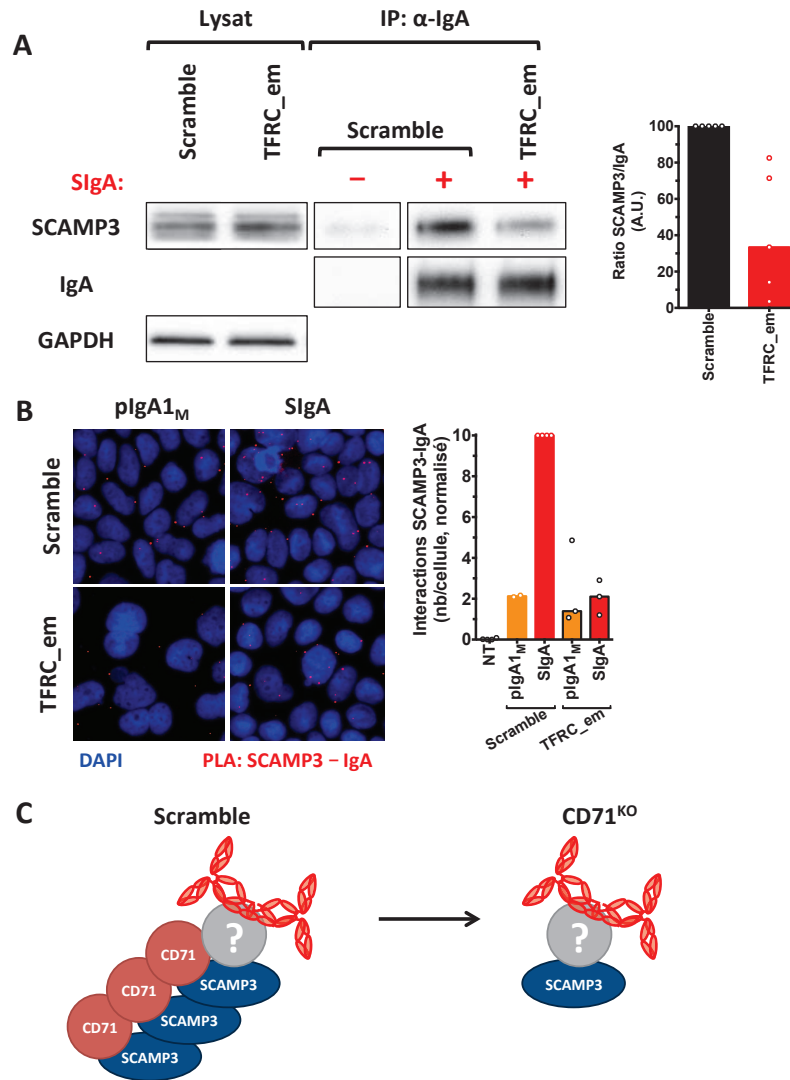


Figure III.14 : Étude de l'interaction entre SCAMP3 et les IgA sur les cellules TFRC_em. (A) Des suspensions de cellules contrôles et TFRC_em ont été incubées en présence ou non de SIgA ($200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) puis lysées en tampon d'IP. Une co-IP a ensuite été réalisée à l'aide de (Fab')₂ anti-IgA et les protéines éluées ont été analysées par western-blot. À gauche, la membrane a été révélée à l'aide d'anticorps anti-CD71, anti-IgA (chaîne lourde) et anti-GAPDH. À droite, diagramme en bâtons représentant la quantification des bandes révélées par l'anticorps anti-SCAMP3, rapportée à la quantification des bandes révélées par l'anticorps anti-IgA. Les quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ et normalisées par rapport aux cellules contrôles incubées en présence de SIgA. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, n = 5). (B) Étude de la proximité entre SCAMP3 et les IgA ($250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) par PLA, en microscopie confocale. À gauche, images représentatives de chacune des conditions sur lesquelles apparaissent les noyaux cellulaires (DAPI, en bleu) et les interactions de proximité SCAMP3-IgA (points rouges). À droite, diagramme en bâtons indiquant le nombre d'interactions SCAMP3-IgA par cellule, quantifié à l'aide du module « Spot detector » du logiciel Icy. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, n = 2 – 4). Le nombre d'interactions SCAMP3-IgA a été normalisé par rapport aux cellules contrôles incubées en présence de SIgA. (C) Schéma hypothétique illustrant le rôle de CD71 dans le recrutement de SCAMP3 au sein du complexe de fixation des SIgA. Le point d'interrogation indique le récepteur direct aux SIgA non identifié.

Réciproquement, nous avons voulu savoir si SCAMP3 influence le recrutement de CD71. Pour ce faire, nous avons comparé l'IP de CD71 par les pIgA_{1M} sur les cellules contrôles et SCAMP3^{KO} (figure III.15A). Aucune différence n'apparaît entre ces deux conditions, suggérant que SCAMP3 n'est pas impliqué dans l'interaction physique entre CD71 et les pIgA_{1M}. En revanche, aucune interaction entre CD71 et les pIgA_{1M} ou les SIgA n'est détectée par PLA et FRET dans les cellules SCAMP3^{KO} (figure III.15B-C). Ces résultats sont très surprenants compte-tenu de l'absence d'altération de la fixation des IgA sur les cellules SCAMP3^{KO} par cytométrie en flux (figure III.10E). Néanmoins, les interactions CD71-pIgA_{1M} et CD71-SIgA n'ont pas été totalement abolies dans une des trois expériences de FRET (symbolisée par le disque rouge sur la figure III.15C). Dans cette expérience, l'intensité de FRET CD71-IgA obtenue sur les cellules contrôles est très élevée (Tau < 2,0 ns), et des interactions CD71-pIgA_{1M} et CD71-SIgA résiduelles (Tau ~2,6 ns) sont détectées sur les cellules SCAMP3^{KO}.

L'ensemble de ces résultats indique que les interactions CD71-pIgA_{1M} et CD71-SIgA sont toujours présentes sur les cellules SCAMP3^{KO} mais suggère un défaut de formation des complexes protéiques permettant l'amplification et la détection du signal en PLA et en FRET. Cette hypothèse selon laquelle SCAMP3 serait nécessaire à l'oligomérisation des complexes protéiques à la surface (figure III.15D) est confortée par la capacité de SCAMP3 à former des homodimères stables, comme le suggèrent nos résultats de western-blot et les données de la littérature (figure supplémentaire 2A) (Singleton et al., 1997).

Figure III.15

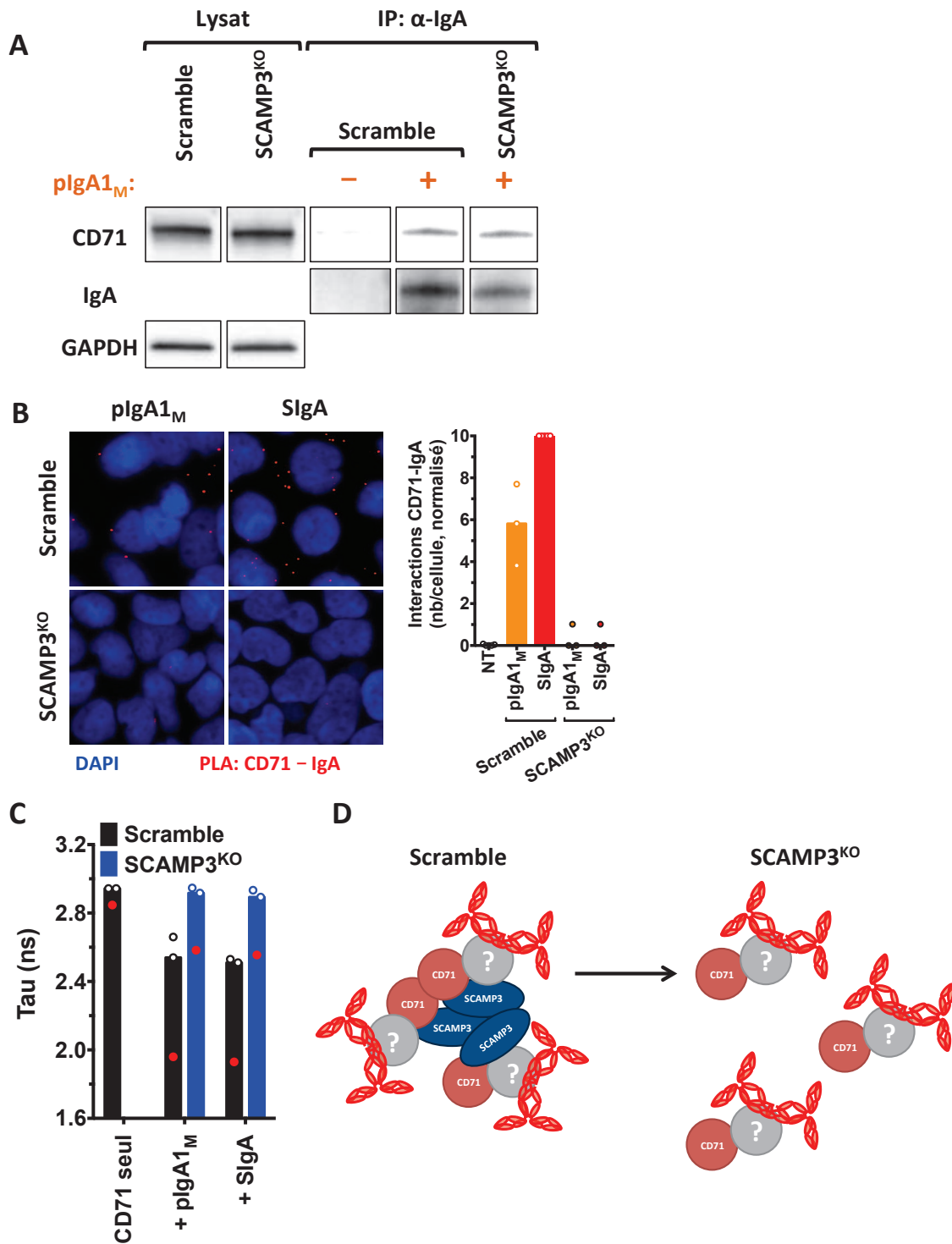


Figure III.15 : Étude de l'interaction entre CD71 et les IgA sur les cellules SCAMP3^{KO}. (A) Des suspensions de cellules contrôles et SCAMP3^{KO} ont été incubées en présence ou non de pIgA (200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) puis lysées en tampon d'IP. Une co-IP a ensuite été réalisée à l'aide de (Fab')₂ anti-IgA et les protéines éluées ont été analysées par western-blot. La membrane a été révélée à l'aide d'anticorps anti-CD71, anti-IgA (chaîne lourde) et anti-GAPDH (médiane, n = 2). (B) Étude de la proximité entre CD71 et les IgA (250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) par PLA, en microscopie confocale. À gauche, images représentatives de chacune des conditions sur lesquelles apparaissent les noyaux cellulaires (DAPI, en bleu) et les interactions de proximité CD71-IgA (points rouges). À droite, diagramme en bâtons indiquant le nombre d'interactions CD71-IgA par cellule, quantifié à l'aide du module « Spot detector » du logiciel Icy. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, n = 3 – 4). Le nombre d'interactions CD71-IgA a été normalisé par rapport aux cellules contrôles incubées en présence de SIgA. (C) Diagramme en bâtons représentant le temps de vie du fluorochrome donneur (Tau) obtenu par FRET-FLIM et calculé pour les cellules contrôles (en noir) et SCAMP3^{KO} incubées ou non en présence d'IgA (250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, n = 3). Les valeurs symbolisées par les disques rouges ont été réalisées au sein de la même expérience. (D) Schéma hypothétique illustrant le rôle de SCAMP3 dans la formation d'oligomères de complexes protéiques d'IgA, nécessaire à la détection de signaux par PLA et FRET-FLIM.

4.2. Dynamique de l'interaction entre HM13, BCAP31 et les IgA.

Le manque présent de données concernant les interactions HM13-SIgA et BCAP31-SIgA rend difficile de définir précisément leur position et leur rôle dans l'organisation du complexe. Néanmoins, nos résultats préliminaires obtenus par PLA sur cellules TFRC_{em} et SCAMP3^{KO} suggèrent que CD71 est nécessaire au recrutement de HM13 et BCAP31 (figure III.16A-B) tandis que SCAMP3 est exclusivement requis pour recruter BCAP31 (figure III.16A-B).

Compte-tenu de l'implication de CD71 dans le recrutement de SCAMP3 (figure III.14A), l'absence d'altération de l'interaction HM13-IgA sur les cellules SCAMP3^{KO} suggère que le recrutement de HM13 est indépendant de l'oligomérisation, et lié à la présence de CD71 et/ou d'autres partenaires présents dans le « cœur » du complexe protéique (figure IV.1).

En ce qui concerne les interactions BCAP31-pIgA_{1M} et BCAP31-SIgA, nos données préliminaires d'IP indiquant son interaction avec CD71 (lui-même associé à SCAMP3) à l'état basal, suggèrent son recrutement dans le cœur du complexe protéique par l'intermédiaire de CD71 et de SCAMP3.

À l'heure actuelle, de nombreuses inconnues persistent concernant chacun des partenaires du complexe protéique impliqué dans l'interaction avec les pIgA_{1M} et les SIgA. Nous avons néanmoins tenté d'élaborer un modèle global d'organisation dont les hypothèses seront justifiées dans la discussion de ce manuscrit (figure IV.1).

Figure III.16

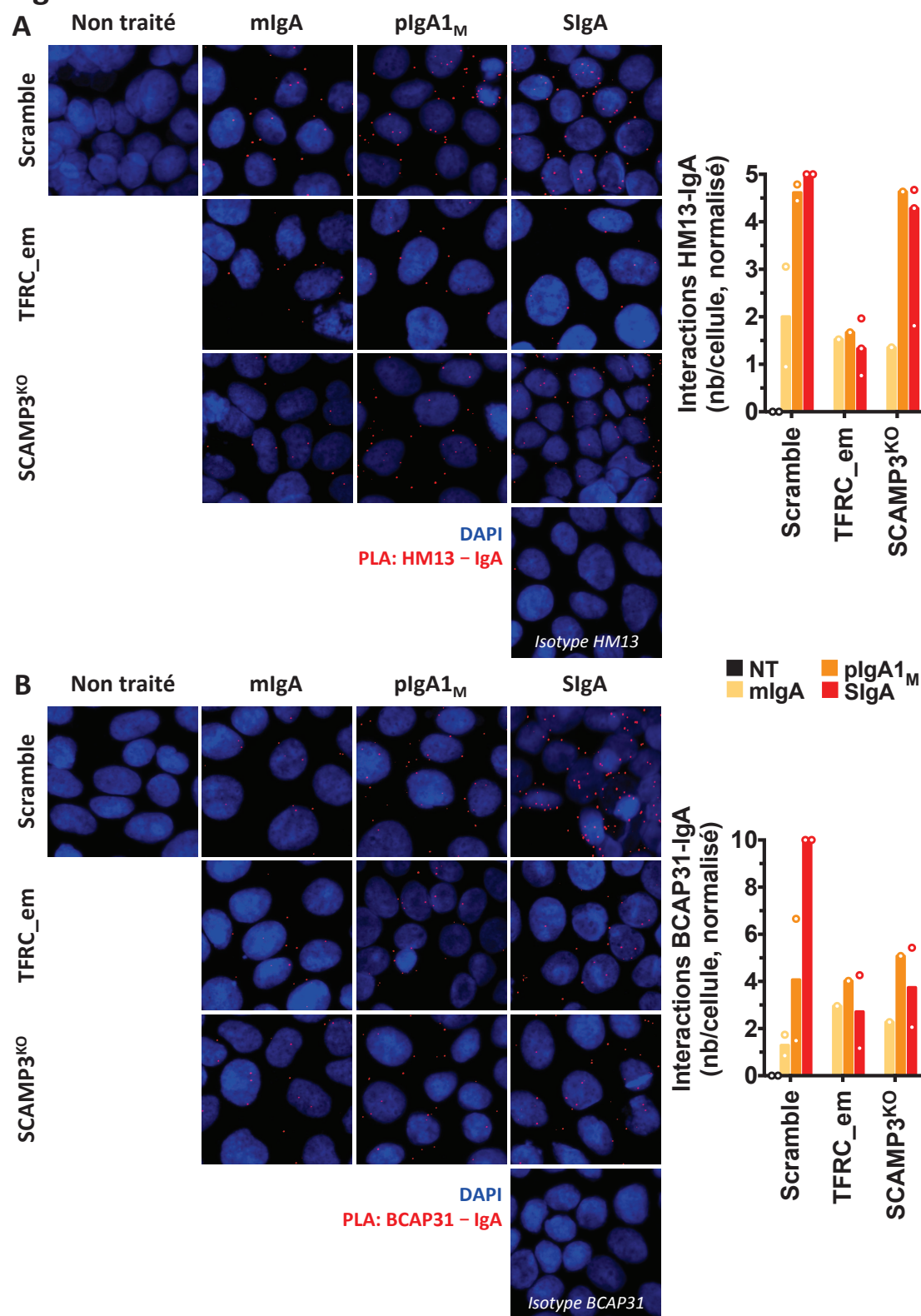


Figure III.16 : Étude des interactions HM13-IgA et BCAP31-IgA dans les cellules TFRC_em et SCAMP3^{KO}. (A) Étude de la proximité entre HM13 et les IgA ($250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) par PLA, en microscopie confocale. À gauche, images représentatives de chacune des conditions sur lesquelles apparaissent les noyaux cellulaires (DAPI, en bleu) et les interactions de proximité HM13-IgA (points rouges). À droite, diagramme en bâtons indiquant le nombre d'interactions HM13-IgA par cellule, quantifié à l'aide du module « Spot detector » du logiciel Icy. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 1 - 3$). Le nombre d'interactions HM13-IgA a été normalisé par rapport aux cellules contrôles incubées en présence de SIgA. (B) Étude de la proximité entre BCAP31 et les IgA ($250 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) par PLA. À gauche, images représentatives de chacune des conditions sur lesquelles apparaissent les noyaux cellulaires (DAPI, en bleu) et les interactions de proximité BCAP31-IgA (points rouges). À droite, diagramme en bâtons indiquant le nombre d'interactions BCAP31-IgA par cellule, quantifié à l'aide du module « Spot detector » du logiciel Icy. Chaque symbole représente une expérience indépendante (médiane, $n = 1 - 3$). Le nombre d'interactions BCAP31-IgA a été normalisé par rapport aux cellules contrôles incubées en présence de SIgA.

5. Rôle fonctionnel des membres du complexe de fixation des SIgA.

Compte-tenu du rôle de CD71 dans la transcytose inverse des SIgA mis en évidence par notre laboratoire, nous avons souhaité déterminer l'implication des différents partenaires identifiés dans l'endocytose des SIgA. Pour ce faire, nous avons d'abord vérifié qu'après fixation à la surface, les SIgA sont endocytées. La figure III.17A indique qu'après 10 min à 37°C, une fraction des SIgA colocalise avec le marqueur endosomal précoce EEA1 dans le cytoplasme. Nous avons alors mis au point un test d'endocytose par cytométrie en flux afin de permettre une quantification précise de l'endocytose des IgA en fonction du temps.

Dans un premier temps, nous avons étudié la dynamique d'internalisation des différentes formes d'IgA sur les cellules contrôles (figure III.17B). Pour pouvoir comparer la vitesse d'endocytose indépendamment de la capacité de fixation des IgA sur les cellules, nous avons normalisé ce paramètre. Cette représentation montre que les SIgA sont plus rapidement endocytées que les pIgA_{1M} par les cellules Caco-2 TC7. Malgré leur très faible fixation à la surface cellulaire, les mIgA sont néanmoins internalisées selon une dynamique similaire aux SIgA.

L'internalisation des SIgA, complète en 10 min, suggère fortement l'implication d'une voie d'endocytose active et non passive (beaucoup plus lente et linéaire). Ce point méritera néanmoins d'être confirmé à l'aide d'inhibiteurs spécifiques de l'endocytose. Par ailleurs, l'internalisation des SIgA est plus rapide que celle des pIgA_{1M} dépendante de CD71, ce qui suggère un mécanisme d'endocytose distinct.

Dans un second temps, nous avons comparé la dynamique d'endocytose des SIgA sur les différentes lignées cellulaires générées (figure III.17C). De manière surprenante, aucune des lignées étudiées ne présente d'altération de l'internalisation des SIgA, y compris les cellules déficientes en CD71 et SCAMP3 (cellules double KO).

L'ensemble de ces résultats indique qu'aucun des partenaires identifiés n'intervient dans la phase initiale d'internalisation du complexe protéique. En outre, l'oligomérisation induite par SCAMP3 suggérée par nos précédents résultats ne semble pas influencer l'endocytose des SIgA.

Compte-tenu des rôles de SCAMP3 et CD71 décrits dans la littérature et de l'importance de CD71 dans la transcytose inverse des SIgA, ces protéines pourraient intervenir plus tardivement, notamment dans l'orientation du transport intracellulaire des SIgA (*voir Discussion*).

Figure III.17

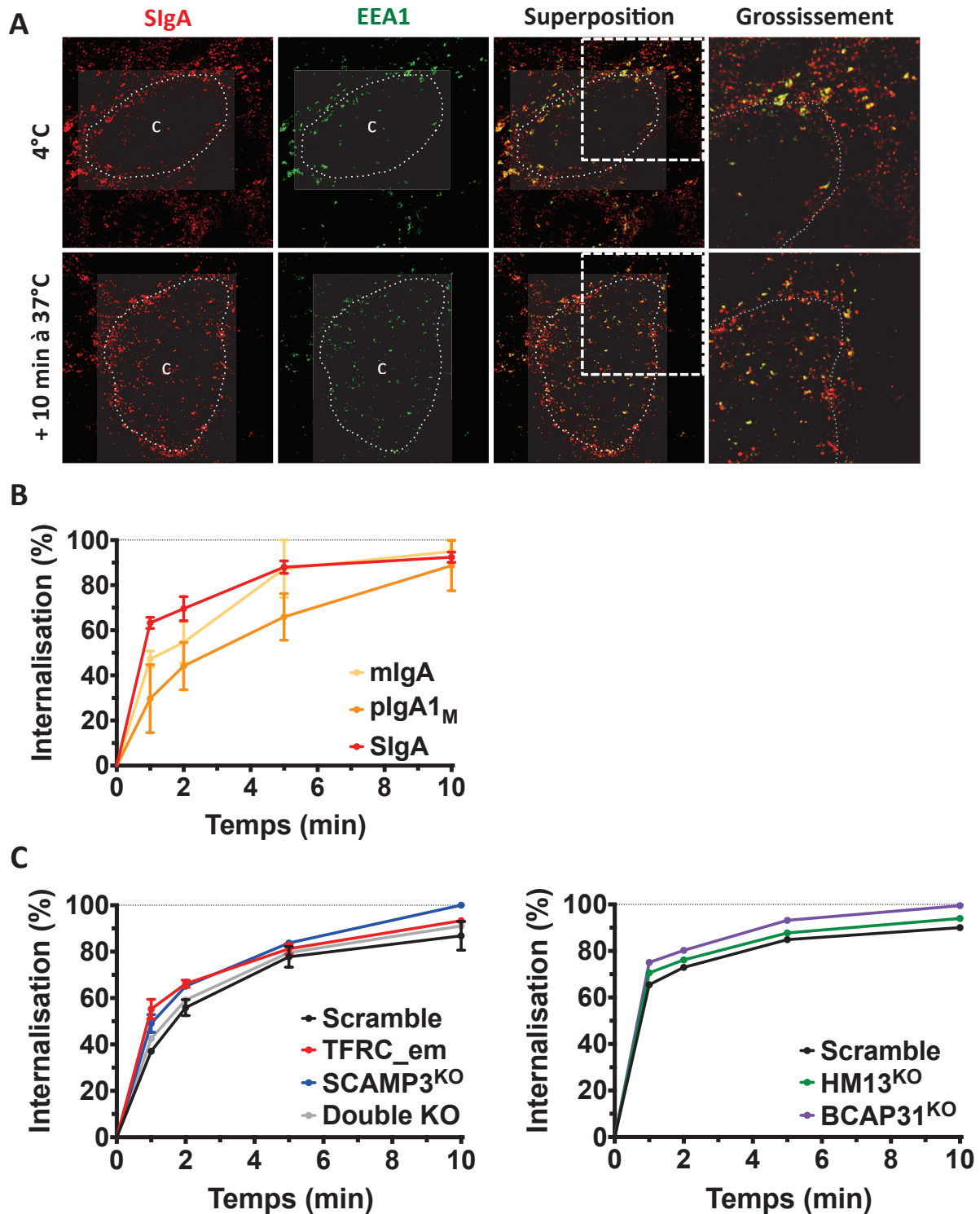


Figure III.17 : Étude de l'endocytose des IgA par les cellules Caco-2 TC7. (A) Images obtenues en microscopie confocale par STED sur des cellules contrôles pré-incubées en présence de SIgA (250 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) pendant 60 min sur glace et incubées ou non pendant 10 min à 37°C. Les cellules ont été fixées en acétone et immunomarquées à l'aide d'anticorps anti-IgA (à gauche) et anti-EEA1 (milieu gauche). Sur l'image superposant les deux immunomarquages (milieu droit), un carré en pointillés blancs indique le champ grossi sur l'image de droite. Le « c » indique le cytoplasme cellulaire, tandis que la forme circulaire en pointillés blancs définit la membrane plasmique d'une cellule. (B) Courbes représentant l'internalisation de différentes formes d'IgA (200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) par cytométrie en flux sur des cellules contrôles. Le protocole détaillé pour l'obtention des courbes est présenté dans la partie 3.2 du Matériels et Méthodes (moyenne \pm SEM, n = 3). (C) À gauche, courbes représentant l'internalisation de SIgA (200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) en fonction du temps d'incubation à 37°C sur les cellules contrôles (en noir), TFRC_{em} (en rouge), SCAMP3^{KO} (en bleu) et double KO (en gris) (moyenne \pm SEM, n = 1 – 2). À droite, courbes représentant l'internalisation de SIgA (200 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) en fonction du temps d'incubation à 37°C sur les cellules contrôles (en noir), HM13^{KO} (en vert) et BCAP31^{KO} (en violet) (n = 1). La ligne en pointillés noirs indique le maximum théorique d'internalisation (100%). EEA1 : Early endosome antigen 1 ; pIgA1_M : pIgA1 issues de myélome ; Double KO : Cellules dépourvues de CD71 et SCAMP3.

IV. Discussion & Perspectives

Nos travaux ont permis de réévaluer l'interaction entre CD71 et les IgA humaines à l'aide d'un nouveau modèle dépourvu de CD71 de manière stable. À la différence de l'approche par petits ARN interférents (siARN) utilisée dans de précédents articles, notre système a l'avantage de permettre la réalisation d'expériences à distance de la transfection cellulaire et d'éviter tout biais lié aux conséquences aiguës de la répression d'expression de CD71. Néanmoins, CD71 est un récepteur dont les fonctions sont essentielles au métabolisme cellulaire (Wang et al., 2015). Il est ainsi possible que sur le long terme, les cellules déficientes en CD71 échappent au mécanisme de répression par acquisition de mutation(s). Ce mécanisme d'échappement a d'ailleurs été observé lors de notre première tentative d'inactivation (données non montrées), lorsque nous avons utilisé un ARN guide ciblant la séquence nucléotidique codant les acides aminés 24 à 26 (immédiatement après le motif d'endocytose ²⁰YTRF²³). Les clones cellulaires isolés par dilution limite et cultivés en l'absence de supplémentation en fer soluble n'ont présenté qu'une réduction d'expression de CD71, suivie d'une récupération de l'expression après quelques passages en culture cellulaire. Le séquençage de la séquence nucléotidique codant le domaine intracellulaire de CD71 a montré la présence de mutations au site de clivage par l'enzyme Cas9 (données non montrées). La sélection de clones mutés résulte probablement de la pression de sélection exercée par les conditions de culture (dilution limite et absence de supplémentation en fer). Ces événements n'ont pas été observés dans les cellules TFRC_{em} dont le site ciblé par l'ARN guide est un motif conservé entre espèces et nécessaire à la fonction du récepteur.

1. Interaction directe entre CD71 et les pIgA.

L'utilisation de ce nouveau modèle a confirmé les résultats obtenus par Moura et collègues sur la capacité de fixation des pIgA_{1M} par CD71 (Moura et al., 2004). Ces auteurs ont attribué la capacité de fixation préférentielle des IgA₁ à CD71 à leur région charnière et notamment à la présence de O-glycosylations hypogalactosylées (Moura et al., 2004). Toutefois, nous avons montré que les IgA₂ de myélome (d'un unique patient, d'allotype IgA_{2m}(1) voir figure supplémentaire 1C) peuvent directement interagir avec CD71, de manière comparable aux IgA₁ de myélome. Cette observation n'est en accord ni avec les travaux de Moura et collègues ni avec les données chez la souris dont les IgA de structure

similaire aux IgA2 humaines ne sont pas capables d'interagir avec CD71 (Abed et al., 2014; Moura et al., 2004).

Les immunoglobulines issues de myélome sont fréquemment anormales, de par leur structure primaire et/ou leur profil de glycosylations (Despont et al., 1974; Franc et al., 2013). Ces anomalies pourraient contribuer à expliquer nos résultats. Le clone d'IgA2m(1) que nous avons utilisé pourrait comporter des mutations à l'origine d'une modification de sa région charnière et/ou de l'apparition de sites de O-glycosylations normalement retrouvées sur les IgA1. Cette hypothèse est suggérée par les travaux de Silvain et collègues qui décrivent un clone hybride IgA1-IgA2 chez un patient atteint de myélome multiple (Silvain et al., 1993). Néanmoins, l'approche génétique par mutation des sites de glycosylations des IgA1 réalisée par Moura et collègues suggère la participation des N-glycosylations des IgA1 dans leur fixation à CD71 (Moura et al., 2004). La similarité des N-glycosylations entre IgA1 et IgA2m(1), ainsi que la fixation du clone IgA2 dans notre étude pourraient conduire à reconsidérer l'importance relative de la séquence primaire et des O/N-glycosylations dans l'interaction des IgA avec CD71. L'étude de la fixation d'autres clones d'IgA2 humaines apparaît néanmoins indispensable avant toute reconsidération.

2. Interaction indirecte entre CD71 et les SIgA.

À l'aide de différentes techniques à la fois biochimiques et microscopiques, nous avons montré que CD71 et les SIgA de colostrum humain établissent des interactions de proximité, mais que celles-ci ne sont pas directes. Compte-tenu des précédentes études du laboratoire, ces résultats ont constitué la surprise majeure de nos travaux. Dans ce contexte, nous avons dû procéder à une analyse fine des limites de chacune des techniques utilisées afin de réinterpréter nos données. Pour ce faire, nous avons inclus les mIgA et pIgA1_M comme contrôles négatif et positif d'interaction directe avec CD71. Ces contrôles nous ont permis d'établir un « seuil de positivité », notamment dans les expériences d'immunoprécipitation où nous avons pu constater un bruit de fond qui, en l'absence des conditions mIgA/pIgA1_M, aurait pu être interprété comme un signal spécifique. Il en est de même dans les expériences de surexpression de CD71 humain en système hétérologue où la fixation des mIgA et des SIgA a été augmentée d'un facteur proche de deux entre cellules hCD71⁻ et hCD71⁺, avec une translation des histogrammes similaire aux mêmes cellules incubées en présence d'anticorps

secondaires seuls. Ce phénomène pourrait être lié au caractère transitoire de la transfection et de la surexpression de CD71 dont résulterait une altération aiguë du métabolisme, du cycle cellulaire et, par conséquent, du protéome de surface (Özlü et al., 2015). De façon non exclusive, il est possible que la surexpression de CD71 par transfection entraîne l'apparition d'interactions artéfactuelles, non retrouvées en systèmes plus physiologiques.

La forte résolution du FRET (1 – 10 nm) est généralement utilisée pour démontrer l'existence d'une interaction directe entre protéines. Cette distance théorique est toutefois à nuancer selon le dispositif expérimental (Vereb et al., 2011). La détection des SIgA à l'aide d'un anticorps caprin anti-IgA, lui-même reconnu par un anticorps fluorescent anti-chèvre, ainsi que de CD71 avec un anticorps de lapin conjugué à un anticorps anti-lapin fluorescent augmentent de façon importante le risque d'obtenir un signal positif pour des protéines éloignées de plus de 10 nm. Nous avons testé cette hypothèse en remplaçant la chaîne d'anticorps anti-IgA par un unique (Fab')₂ anti-IgA fluorescent, mais les résultats ont été identiques malgré une intensité de FRET réduite (données non montrées). La démonstration rigoureuse d'une interaction de moins de 10 nm nécessiterait l'expression d'une protéine de fusion CD71-GFP, incubée en présence d'IgA directement conjuguées au fluorochrome accepteur, ce qui n'a pas été réalisé à ce jour.

3. Recherche du(des) protéine(s) responsable(s) de la fixation des SIgA.

La remise en question de l'interaction directe entre CD71 et SIgA indique la présence d'(un) autre(s) récepteur(s) aux SIgA à la surface de la lignée cellulaire Caco-2 TC7. Après avoir éliminé les protéines déjà connues pour interagir avec les IgA, nous avons comme principale préoccupation de vérifier que la fixation observée est spécifique. En effet, les SIgA utilisées sont polyclonales, couvrent un large répertoire antigénique, et pourraient présenter une certaine réactivité vis-à-vis d'antigènes de surface, notamment présents à la surface des lignées cellulaires utilisées. Cette hypothèse est difficile à réfuter mais nous possédons néanmoins plusieurs arguments à son encontre. Premièrement, les mIgA purifiées de sérums d'individus sains sont également polyclonales et ne présentent pas le même niveau de fixation que les SIgA. Deuxièmement, les SIgA issues de différents distributeurs présentent pour deux d'entre elles une capacité de fixation identique, et n'entrent en compétition ni avec la BSA ni avec tout autre isotype d'anticorps y compris des IgM, similaires en termes de polyclonalité et

de degré d'oligomérisation. Enfin, nous observons une fixation importante et indépendante de CD71 pour un clone de SIgA chimériques anti-ovalbumine (B Cell Design, Limoges) (données non montrées).

Une fois ces contrôles réalisés, nous avons entrepris l'identification de la (des) protéine(s) responsable(s) de la fixation des SIgA à la surface cellulaire. Notre approche par IP-MS a permis d'identifier trois nouveaux partenaires de ce complexe protéique : SCAMP3, BCAP31 et HM13. L'identité du récepteur direct reste néanmoins inconnue, malgré les différentes stratégies développées. Les difficultés de l'approche par immunoprécipitation pourraient être liées aux caractéristiques physico-chimiques du récepteur putatif, entraînant son agrégation lors de l'élution par chauffage en conditions dénaturantes et/ou réductrices. L'agrégation dépendante du pH et de la température a été caractérisée en détail pour de nombreuses protéines, notamment pour CD71 dont l'agrégation opère à pH inférieur à 5, ou à température supérieure à 70°C (Schüler et al., 1999). Nous avons en effet observé une perte conséquente de CD71 lorsque l'élution est réalisée en présence d'agent réducteur (données non montrées). De telles caractéristiques, combinées à la faible affinité potentielle des SIgA pour ce récepteur pourraient expliquer les difficultés rencontrées dans son identification.

Pour identifier cette(ces) protéine(s), nous avons entrepris deux nouvelles approches dont les résultats ne sont pas connus à ce jour. Notre première stratégie consiste en l'utilisation d'un agent de réticulation chimique, breveté sous la technologie LRC-TriCEPS™ (Dualsystems Biotech) (Frei et al., 2012). Cette molécule est dotée de trois groupements fonctionnels. Le premier est un groupement NHS qui permet le couplage covalent du ligand (ici, les SIgA) ; le second est un groupement hydrazide qui réagit avec les glycanes oxydés ; le troisième est une biotine permettant la purification des complexes. Dans cette approche, les SIgA sont couplées à l'agent de réticulation, puis incubées sur des cellules dont les glycoprotéines de surface ont préalablement été oxydées afin d'établir des liaisons covalentes entre les SIgA et leur(s) glycorécepteur(s). La purification utilisant le groupement biotine peut être conduite dans des conditions plus stringentes que celles requises dans notre stratégie de co-IP. Les éluats sont ensuite analysés par spectrométrie de masse afin d'identifier les glycoprotéines retenues. Cette technologie a l'avantage d'augmenter le rapport signal/bruit de fond (par diminution des contaminants intracellulaires) et de stabiliser des interactions de faible affinité, deux limites rencontrées dans nos précédentes stratégies.

Notre seconde approche, entreprise par un étudiant en doctorat, consiste en une version haut débit de la technologie CRISPR-Cas9. Nous allons réaliser un criblage parmi plus de 19 000 gènes du génome humain, à l'aide d'une bibliothèque d'ARN guides pré-

établie en vecteur lentiviral (Shalem et al., 2014). Après transduction par la librairie, les cellules Caco-2 TC7 qui auront perdu toute capacité de fixer les SIgA seront triées par cytométrie en flux. Une dernière étape consistera en l'identification des ARN guide présents dans les cellules triées, par séquençage de nouvelle génération, ce qui permettra de connaître l'identité du(des) gène(s) réprimé(s). Cette dernière stratégie a l'avantage de reposer sur une approche génétique, permettant de s'affranchir des limites notamment liées à un faible niveau d'expression de la protéine recherchée et/ou de caractéristiques physico-chimiques qui rendraient les approches biochimiques complexes.

4. Modèle d'organisation du complexe de fixation des SIgA.

En complément des approches d'identification du(des) récepteur(s) aux SIgA, nous avons entrepris d'étudier l'organisation des quatre partenaires du complexe protéique identifiés à l'heure actuelle : CD71, SCAMP3, BCAP31 et HM13. À la différence de SCAMP3, identifié à la fin du mois de février, BCAP31 et HM13 ne l'ont été qu'à la fin du mois de juin, ce qui explique leur caractérisation encore très incomplète. La relation entre SCAMP3 et CD71 a, quant à elle, fait l'objet d'une étude plus approfondie. Alors qu'un seul article fait mention d'une colocalisation entre SCAMP3 et CD71 au sein de l'endosome, nous avons montré que ces protéines interagissent physiquement à l'état basal (figure III.13A-B) (Castle, 2005). Ce résultat a été utilisé pour établir le modèle proposé (figure IV.1). Du fait de l'observation d'un FRET de faible intensité et peu reproductible (données non montrées), nous n'avons pu conclure à une interaction directe entre SCAMP3 et CD71. En outre, nos données ne permettent pas de préciser le lieu de cette interaction qui pourrait être retrouvée à la surface cellulaire et/ou dans les compartiments de recyclage (endosome, réseau du trans-Golgi) dans lesquels ces deux protéines sont abondamment retrouvées. Néanmoins, l'identification de SCAMP3 par IP-MS parmi les protéines de surface biotinylées (figure III.8E) suggère qu'au moins une fraction des complexes SCAMP3-CD71 réside à la surface.

Nos résultats obtenus par IP et cytométrie en flux sur cellules SCAMP3^{KO} ont montré que SCAMP3 n'est pas nécessaire à l'interaction directe des pIgA_{1M} avec CD71 (figures III.10E et III.15A). En revanche, SCAMP3 est requis pour la détection des interactions CD71-pIgA_{1M} et CD71-SIgA par PLA et FRET (figures III.15B-C). Afin d'expliquer la disparition des interactions détectées par PLA et FRET entre CD71 et les IgA en l'absence de SCAMP3,

nous avons posé l'hypothèse que SCAMP3 participe au regroupement de plusieurs « cœurs » de complexes (figure IV.1). Selon cette hypothèse, le regroupement de complexes conduirait à des amas suffisamment conséquents pour générer un signal détectable par PLA et FRET. Cette hypothèse est supportée par l'expérience de FRET entre CD71 et les IgA symbolisée par les disques rouges dans la figure III.15C. Dans cette expérience où un FRET de très forte intensité a été observé dans les cellules contrôles, un FRET résiduel a pu être mis en évidence sur les cellules SCAMP3^{KO}. L'augmentation des interactions CD71-SCAMP3 par PLA en présence de pIgA_M et de SIgA (figure III.13B), alors qu'aucune différence n'est détectée par IP (figure III.13A), suggère aussi que la formation de complexes protéiques oligomériques n'affecte pas la stœchiométrie entre CD71 et SCAMP3 (figure IV.1).

Pour tester notre hypothèse de formation d'oligomères, nous avons entrepris la construction de protéines de fusion SCAMP3-GFP et SCAMP3-mCherry dont les séquences nucléotidiques reliées par la séquence codant un peptide 2A ont été insérées dans un vecteur lentiviral. La complémentation des cellules SCAMP3^{KO} par ce vecteur bicistronique permettra l'expression équimolaire des deux constructions et la détection de FRET intermoléculaire en cas de dimérisation induite par les SIgA (Tramier et al., 2003). De manière similaire, nous pourrions coupler deux préparations de SIgA d'une part à un fluorochrome donneur (p. ex. Alexa Fluor® 488), d'autre part à un fluorochrome accepteur (p. ex. Alexa Fluor® 555) et les incuber ensemble afin de voir apparaître un FRET en cas de formation de complexes oligomériques à la surface cellulaire. Ces deux approches pourraient aussi contribuer à déterminer si les oligomères formés résultent du regroupement de plusieurs « cœurs », comportant chacun une molécule de SIgA, ou si les SIgA servent de « pont moléculaire » au regroupement de plusieurs complexes.

D'un point de vue mécanistique, la formation d'oligomères pourrait s'expliquer par la capacité d'homomultimérisation de la majorité des protéines du complexe, notamment de CD71 (multimères), de SCAMP3 (dimères) et de HM13 (dimères-tétramères) (figure supplémentaire 2A) (Bernhard et al., 2004; Miyashita et al., 2011; Nyborg et al., 2004; Singleton et al., 1997).

HM13 (ou SPP) est une protéase dont un des rôles est de cliver les peptides signaux persistant dans la membrane du RE après que l'ectodomaine a été éliminé par un premier clivage effectué par une peptidase du signal. De par la topologie de son domaine catalytique, HM13 ne clive que les peptides signaux provenant de récepteurs transmembranaires de type II (Weihofen et al., 2002). La présence de HM13 a aussi été décrite dans des complexes de haut

poids moléculaires, indépendamment de sa fonction enzymatique (Schrul et al., 2010). L'existence d'une protéine homologue de HM13, SPPL2b (signal peptide peptidase-like 2b), capable d'interagir et de dégrader le domaine transmembranaire de CD71 (une fois l'ectodomaine clivé) permet d'envisager l'association entre HM13 et CD71 au sein du complexe protéique (figure IV.1) (Zahn et al., 2013). Dans le contexte du complexe de fixation des IgA, HM13 s'associerait avec CD71, mais la présence de l'ectodomaine de CD71 empêcherait toute activité enzymatique de HM13. Cette hypothèse expliquerait les résultats de PLA qui montrent l'interaction entre HM13 et les IgA dans les cellules contrôles et SCAMP3^{KO}, mais pas dans les cellules TFRC_em. Dans l'ensemble, ces résultats préliminaires conduisent à suggérer que CD71 (mais pas SCAMP3) est nécessaire au recrutement de HM13 dans les complexes induits par la présence de pIgA_{1M} et de SIgA (figure III.16A).

Deux isoformes de HM13 (ou SPP) existent, SPP α et SPP β . Ces deux isoformes sont respectivement constituées de 377 et 394 aa et sont identiques pour les acides aminés 1 à 347. Chez la souris, la présence du motif KKEK en C_{ter} de SPP α , absent sur SPP β et d'ailleurs responsable de leur expression respective dans le RE et à la membrane plasmique (Urny et al., 2006). L'alignement des séquences codant les isoformes murines et humaines indique une similarité de séquence de plus de 97%, notamment à l'extrémité C_{ter} (données non montrées). Ces données suggèrent fortement que comme son orthologue murin, SPP β humain peut être exprimé à la membrane plasmique des cellules Caco-2 TC7. L'inactivation de HM13 par CRISPR-Cas9 a été réalisée à l'aide d'un ARN guide ciblant une région conservée entre les deux isoformes. Cependant, l'anticorps polyclonal utilisé en western-blot a été généré par immunisation de lapins contre la séquence 327-377 de SPP α et ne permet pas de distinguer quelle(s) isoforme(s) est(sont) immunoprécipitée(s) par les SIgA (les poids moléculaires théorique de 41 et 43 kDa étant trop proches). Afin de différencier ces deux isoformes, nous avons prévu de compléter les cellules HM13^{KO} par transduction lentivirale de chacune des isoformes fusionnées à une séquence peptidique FLAG (DYKDDDDK). Ces cellules complémentées exprimant sélectivement chacune des isoformes pourront ensuite être utilisées dans les expériences de co-IP, de PLA et de FRET.

En ce qui concerne BCAP31, aucune interaction avec les partenaires du complexe n'a été décrite dans la littérature. Nos données préliminaires par IP suggèrent néanmoins son interaction avec CD71 à l'état basal (données non montrées), tandis que le PLA indique un recrutement dépendant de SCAMP3 et/ou de CD71 (CD71 étant lui-même nécessaire au

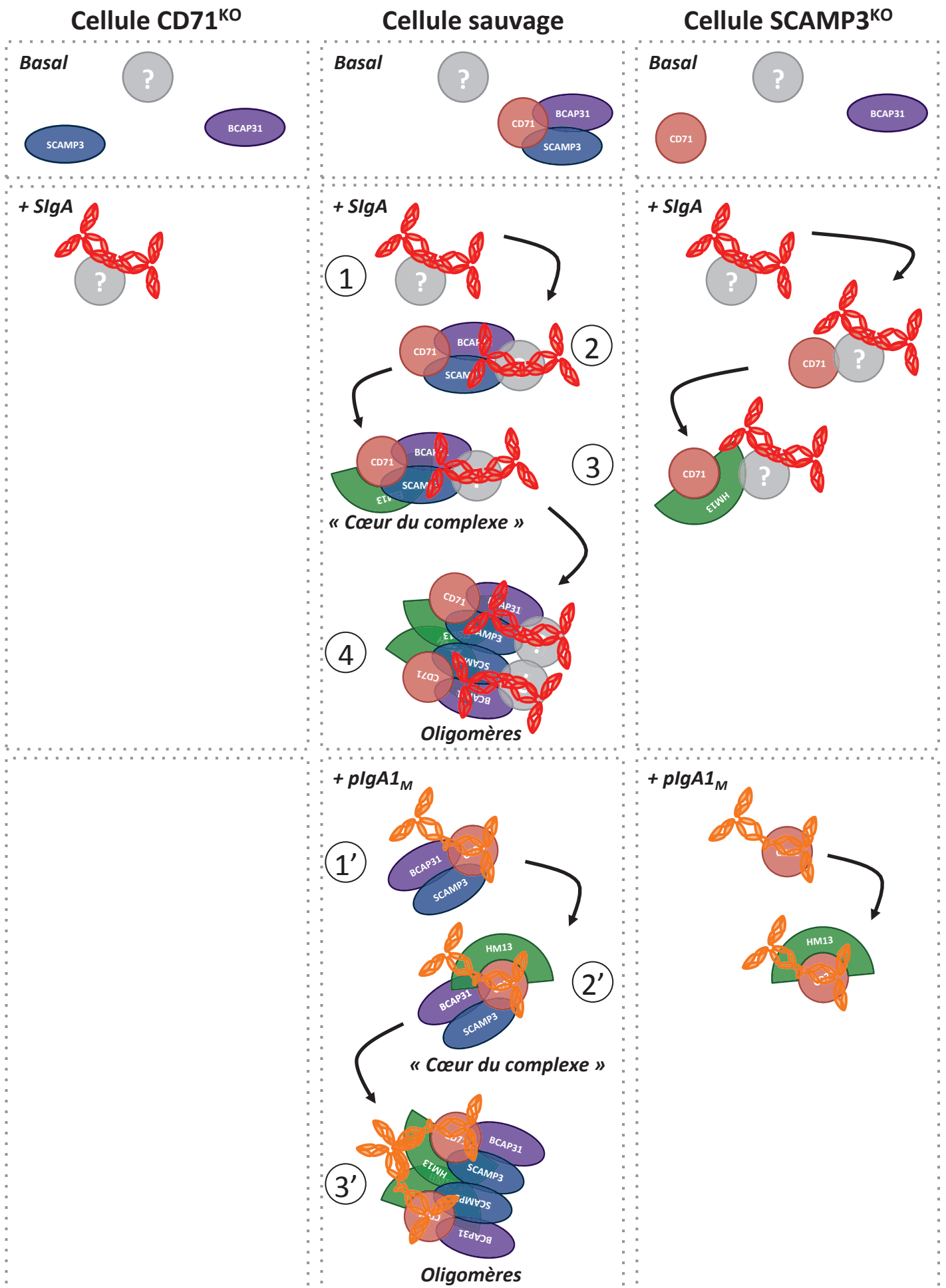
recrutement de SCAMP3) (figure III.16B). La confrontation de ces données permet de faire l'hypothèse que BCAP31 est associé à CD71 et SCAMP3 à l'état basal, et que son recrutement dans le « cœur » du complexe est en partie assuré par le complexe CD71-SCAMP3 (figure IV.1).

L'ensemble de ces hypothèses nous a permis de générer le modèle présenté dans la figure IV.1. Ce modèle permet d'expliquer la majorité de nos données mais ne rend toutefois pas compte de certaines observations.

Le PLA entre les IgA et les différents partenaires met en évidence un nombre d'interactions supérieur en présence de SIgA par rapport aux pIgA (figures III.4A, III.10B et III.11B). Cette observation peut aisément s'expliquer par la fixation plus importante des SIgA à la surface des cellules, dont résulte un plus grand nombre de complexes formés. Néanmoins, les interactions HM13-IgA (figure III.12B) et CD71-SCAMP3 (figure III.13B) échappent à cette règle. Cette contradiction pourrait être secondaire à un phénomène de saturation et à la non linéarité inhérents au caractère semi-quantitatif du PLA. Ces deux limites du PLA ont en effet été démontrées dans un modèle d'homodimérisation de l'EGFR en réponse à l'EGF, dont seul le FRET est capable de rendre compte (Mocanu et al., 2011). Au regard des limites du PLA et de l'absence de données concernant les interactions HM13-pIgA_{1M}, HM13-SIgA et CD71-SCAMP3 en présence de pIgA_{1M} ou de SIgA par FRET, nous n'avons pas tenu compte de ces apparentes contradictions dans notre modèle.

En outre, notre modèle n'explique pas la capacité propre aux SIgA à co-immunoprécipiter chacun des partenaires du complexe, à l'exception de CD71, tandis que les pIgA_{1M} se comportent de manière strictement opposée (figures III.3C, III.10A, III.11A et III.12A). En effet, notre dispositif d'IP en lysat total (figure III.3B) montre l'association directe de CD71 exclusivement avec les pIgA_{1M}. Nous nous attendions néanmoins à observer CD71 dans les deux autres dispositifs de co-IP en présence de SIgA, témoignant d'une interaction indirecte. Cette tendance de CD71 à ne pas être conservé au sein du complexe protéique lors des co-IP pourrait être liée à ses caractéristiques physico-chimiques, entraînant son agrégation et sa perte. De façon non exclusive, l'établissement de liaisons relativement faibles entre CD71 et les autres membres du complexe protéique pourrait constituer une seconde explication. Afin de tenir compte de ces observations, nous avons positionné CD71 à une extrémité du complexe, permettant sa « perte » dans les expériences de co-IP par les SIgA, tout en conservant les autres membres du complexe (figure IV.1).

Figure IV.1



← **Figure IV.1 : Représentation hypothétique des complexes protéiques formés par les pIgA_{1M} et les SIgA à la surface des cellules Caco-2 TC7.** *Dans les cellules contrôles* (en haut au centre), **(1)** les SIgA interagiraient avec un(des) récepteur(s) inconnu(s) (disque gris avec un point d'interrogation). **(2)** La fixation des SIgA induirait le recrutement de complexes protéiques composés de CD71, SCAMP3 et BCAP31, déjà formés à l'état basal. **(3)** HM13 serait présent au sein des complexes CD71-SCAMP3-BCAP31 à l'état basal et/ou recruté de manière dépendante de CD71 pour former le « cœur » du complexe de fixation des SIgA. **(4)** L'oligomérisation de plusieurs complexes serait ensuite initiée par SCAMP3, avec la participation potentielle des autres partenaires et des SIgA dans la stabilisation des oligomères. Ces agrégats de taille importante seraient ensuite endocytés selon un mécanisme dépendant du(des) récepteur(s) inconnu(s) et/ou d'autre(s) membre(s) de ces larges agrégats afin d'être rétro-transportés à travers l'IEC. *Dans les cellules CD71^{KO}* (en haut à gauche), l'absence de CD71 empêcherait la formation des complexes CD71-SCAMP3-BCAP31 à l'état basal et limiterait les complexes aux SIgA fixées à leur(s) récepteur(s) inconnu(s). Ces complexes de taille réduite sont toutefois correctement endocytés par l'IEC. *Dans les cellules SCAMP3^{KO}* (en haut à droite), l'absence de SCAMP3 empêcherait la formation des complexes CD71-SCAMP3-BCAP31 à l'état basal. CD71 serait néanmoins capable d'être recruté par le complexe de fixation des SIgA et de recruter à son tour HM13. L'absence de SCAMP3 serait responsable d'un « cœur » de complexe réduit, déficient en BCAP31 et incapable de former des oligomères, mais dont l'endocytose n'est pas altérée. *Dans les cellules contrôles* (en bas au centre), **(1')** Les pIgA_{1M} interagissent directement avec CD71, présent sous forme de complexes avec SCAMP3 et BCAP31 à l'état basal. **(2')** HM13, déjà présent au sein des complexes CD71-SCAMP3-BCAP31 à l'état basal et/ou recruté de manière dépendante de CD71 viendrait former le « cœur » du complexe de fixation des pIgA_{1M}. **(3')** L'oligomérisation de plusieurs complexes serait ensuite initiée par SCAMP3, avec la participation potentielle des autres partenaires et des pIgA_{1M} dans la stabilisation des oligomères. Ces agrégats membranaires de taille importante seraient ensuite endocytés selon un mécanisme dépendant de CD71 et/ou d'autre(s) partenaire(s) inconnu(s) du complexe protéique. *Dans les cellules CD71^{KO}* (en bas à gauche), l'absence de fixation des pIgA_{1M} prévient toute formation de complexe. *Dans les cellules SCAMP3^{KO}* (en bas à droite), les pIgA_{1M}, toujours capables d'interagir avec CD71 et de recruter HM13, ne pourraient pas recruter BCAP31 ni former d'oligomères. Ces complexes de taille réduite sont toutefois correctement endocytés par l'IEC.

5. Transport du complexe protéique à travers l'IEC.

La compréhension de l'organisation de ce complexe protéique devrait contribuer à mieux appréhender les conséquences fonctionnelles de la fixation des SIgA. En ce sens, le laboratoire a déjà montré que la transcytose inverse de complexes immuns SIgA-gliadines par l'intermédiaire de CD71 pourrait contribuer à la physiopathologie de la maladie cœliaque (Lebreton et al., 2012; Matysiak-Budnik et al., 2008). Par conséquent, nous nous sommes intéressés à l'endocytose des complexes de SIgA dans notre modèle *in vitro*. Après avoir confirmé par microscopie confocale à haute résolution que les SIgA sont endocytées (figure III.17A), nous avons développé une approche quantitative de l'endocytose par cytométrie en flux. Cette technique a révélé qu'aucun des partenaires du complexe ne semble participer à l'endocytose des SIgA. De par son dispositif expérimental (*voir partie Méthodologie*), notre approche ne permet toutefois d'explorer que la phase initiale d'internalisation. De ce fait, nous pensons désormais que les partenaires du complexes participent à l'orientation intracellulaire des endosomes durant la transcytose inverse des SIgA. Le déclenchement de l'internalisation dépendrait quant à lui du(des) récepteur(s) aux SIgA et/ou d'autres partenaires non encore identifié(s).

Parmi les protéines que nous avons identifiées, CD71 est connue pour participer à l'endocytose et au recyclage de la transferrine, tandis que SCAMP3 oriente le trafic intracellulaire de l'EGFR (Epidermal growth factor receptor) (Aisen, 2004; Aoh et al., 2009; Falguières et al., 2011).

À l'image du transport de son ligand naturel, CD71 pourrait orienter l'ensemble du complexe protéique vers les compartiments endosomaux de recyclage (apicaux puis basolatéraux) et ainsi permettre la transcytose inverse des SIgA. Les travaux passés du laboratoire ont montré une inhibition partielle de la transcytose inverse des complexes immuns de SIgA en présence de CD71 soluble (sCD71) (Lebreton et al., 2012; Matysiak-Budnik et al., 2008). Compte-tenu de l'absence d'interaction directe entre les SIgA et CD71, nous pouvons désormais envisager que sCD71 s'associe aux complexes protéiques de surface à la place du récepteur endogène et que l'absence de domaine transmembranaire de sCD71 empêche la correcte orientation intracellulaire du complexe protéique. Cette hypothèse pourrait être testée en comparant le trafic intracellulaire du complexe de SIgA entre les cellules CD71^{KO} plus ou moins supplémentées en sCD71, et les cellules sauvages.

À l'image de l'endocytose des SIgA (figure III.17C), la déficience en SCAMP3 n'affecte pas l'internalisation de l'EGFR (Falguières et al., 2011). Son rôle dans le trafic

intracellulaire de l'EGFR semble néanmoins complexe, avec deux articles aux conclusions contradictoires (Aoh et al., 2009; Falguières et al., 2011). La première publication par Aoh et collègues montre que SCAMP3 favorise le recyclage de l'EGFR tandis que les travaux de Falguières et collaborateurs indiquent que SCAMP3 promeut sa dégradation lysosomale. SCAMP3 peut interagir avec les ligases d'ubiquitines de la famille Nedd4 et être multimonoubiquitinylé (Aoh et al., 2009). Il peut aussi, indépendamment de son état d'ubiquitinylation, interagir avec les protéines Hrs et Tsg101 appartenant respectivement à la machinerie ESCRT-0 et ESCRT-I (Aoh et al., 2009). Le recrutement de la machinerie ESCRT à la membrane de l'endosome est impliqué dans la formation de vésicules intraluminales, générant des corps multi-vésiculaires à destination du lysosome. Ces deux articles suggèrent qu'à travers de complexes interactions avec ses différents partenaires, SCAMP3 est capable d'orienter un même récepteur (ici, l'EGFR) selon deux voies intracellulaires opposées. Falguières et collègues suggèrent que ce mécanisme est dépendant de l'état d'ubiquitinylation initial de SCAMP3, SCAMP3 ubiquitinylé permettant le recyclage de l'EGFR. L'ubiquitinylation de SCAMP3, en présence de CD71, pourrait ainsi constituer un second signal nécessaire à la transcytose inverse des complexes de SIgA à travers l'IEC.

6. Existence et conséquences fonctionnelles de cette interaction *in vivo*.

La capacité des différentes lignées d'IEC de notre étude à fixer les SIgA *in vitro* soulève la question de l'existence de ce mécanisme *in vivo*. Physiologiquement, il est admis que l'interaction des SIgA avec l'épithélium intestinal humain est favorisée dans l'intestin grêle où l'épaisseur de mucus est relativement fine, et plus particulièrement au niveau des FAE recouvrant les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés. Comme discuté dans l'introduction de ce manuscrit, une telle interaction a été décrite il y a quarante ans à la surface des cellules M (Roy and Varvayanis, 1987). Bien que les travaux de Rochereau et collègues aient montré que la fixation de SIgA2 conjuguées à l'antigène p24 du VIH implique le(s) récepteur(s) dectine-1 et/ou siglec-5 (Rochereau et al., 2013), les travaux récents de Fransen et collaborateurs n'ont pas confirmé ces résultats avec des complexes immuns de bactéries (Fransen et al., 2015). Dans ce dernier article, l'incubation de *S. typhimurium* sur des cellules Caco-2 en présence de SIgA murines spécifiques (clone Sal4) permet une internalisation accrue de bactéries comparée aux IgA Sal4 non sécrétoires. Ces résultats

suggèrent l'existence d'un (d')autre(s) récepteur(s) aux IgA que dectine-1/siglec-5, respectivement très faiblement et non exprimés par les cellules Caco-2 (figure III.6A et (Fransen et al., 2015)). En outre, le(s) récepteur(s) caractérisé(s) à la surface des cellules Caco-2 dans cet article et par nos travaux semble(nt) avoir une affinité accrue pour les SIgA, ce qui le(s) distingue encore de dectine-1 et siglec-5. Néanmoins, l'utilisation d'IgA murines dans ces expériences rend difficile toute comparaison avec nos données. La capacité de ce(s) récepteur(s) à permettre la transcytose inverse de complexes immuns de SIgA *in vivo* est toutefois réminiscente de celle décrite dans les travaux publiés par notre laboratoire.

L'existence de la fixation et de la transcytose inverse de SIgA par l'épithélium intestinal a en effet été amplement démontrée par notre laboratoire dans le contexte de la maladie cœliaque (Abed et al., 2014; Lebreton et al., 2012; Matysiak-Budnik et al., 2008). Pour les patients cœliaques actifs comme dans le modèle murin développé par Abed et collègues, l'expression de CD71 au pôle apical des entérocytes apparaît nécessaire à la transcytose inverse des complexes de SIgA (Abed et al., 2014). En outre, ce modèle murin montre l'importance du transport protégé dans la rupture de tolérance vis-à-vis de l'antigène alimentaire ovalbumine. La rupture de tolérance n'est pas liée à l'absorption massive d'antigènes alimentaires, dont on sait depuis plus de cent ans qu'elle mène au mécanisme de tolérance orale (Wells and Osborne, 1911). Par conséquent, un signal de danger doit être associé à la transcytose des SIgA pour expliquer les observations faites chez la souris, et potentiellement chez les patients cœliaques.

CD71 pourrait fournir ce signal de danger comme cela a été rapporté dans la néphropathie à IgA. Plusieurs études ont montré que l'interaction entre les pIgA1 et CD71 à la surface des cellules mésangiales humaines (HMC) induit la production d'IL-6 selon un mécanisme dépendant de la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinases) et du récepteur à l'angiotensine I (Moura et al., 2005; Tamouza et al., 2012b). En outre, Oortwijn et collègues ont caractérisé un récepteur aux SIgA à la surface des HMC dont la description ressemble en tout point au(x) récepteur(s) que nous recherchons (Oortwijn et al., 2006a). De manière intéressante, la fixation des SIgA sur ces cellules est aussi capable d'induire la production d'IL-6. L'ensemble de ces résultats suggère qu'à la surface des HMC, pIgA1 et SIgA convergent vers les mêmes voies de signalisation à travers deux récepteurs distincts. Cette distinction ne pourrait être que superficielle et engager une même plateforme protéique, similaire à celle décrite par nos travaux. Réciproquement, la production d'IL-6 par les IEC en

présence de SIgA pourrait fournir le signal de danger nécessaire à la rupture de tolérance au gluten dans la maladie cœliaque.

À la lueur de ces similarités entre maladie cœliaque et néphropathie à IgA, la plateforme protéique caractérisée par nos travaux pourrait une fois de plus réunir ces deux pathologies qui, bien que cliniquement très différentes, partagent de nombreux mécanismes physiopathologiques communs.

V. Conclusion

En conclusion, l'ensemble des résultats prolonge les travaux du laboratoire analysant l'interaction entre les SIgA et CD71 au pôle apical de l'IEC dans la physiopathologie de la maladie cœliaque. Néanmoins, les nouvelles données obtenues conduisent à réviser le rôle de CD71 en montrant qu'il n'est pas le récepteur aux SIgA mais membre d'un large complexe protéique associé à un (des) récepteur(s) aux SIgA encore inconnu(s). Les travaux effectués, basés sur l'immunoprécipitation et la spectrométrie de masse, ont permis d'identifier trois nouveaux partenaires de ce complexe de fixation des SIgA : SCAMP3, BCAP31 et HM13. Aucune de ces protéines ne s'est révélée être le récepteur aux SIgA. Nous avons néanmoins initié l'analyse des interactions au sein du complexe, et montré que SCAMP3 et CD71 interagissent à l'état basal et qu'ils sont recrutés en réponse à la fixation des SIgA. Nos résultats suggèrent aussi que SCAMP3 participe au regroupement de surface de complexes d'IgA sous forme de larges oligomères. En outre, nous avons confirmé les données publiées par le laboratoire montrant que les SIgA fixées à la surface des IEC sont rapidement endocytées. Les données obtenues indiquent toutefois que l'endocytose observée est indépendante de CD71 et des autres partenaires protéiques identifiés. Compte-tenu du rôle établi de SCAMP3 dans le trafic intracellulaire et des données antérieures du laboratoire sur l'orientation dans la voie de recyclage des SIgA associées à CD71, une hypothèse plausible est le rôle de l'un ou de plusieurs membre(s) du complexe dans l'orientation du trafic intracellulaire des complexes d'IgA.

La priorité des prochaines études est d'identifier le(s) récepteur(s) aux SIgA à la surface des IEC. Il sera aussi nécessaire de déterminer le rôle de chacun des partenaires identifiés, notamment dans le contexte de la transcytose inverse de SIgA et de l'activation potentielle de voies de signalisation entérocytaires.

Ces données apportent un nouvel exemple de la très grande complexité des interactions développées par les IgA avec leurs partenaires cellulaires et illustrent comment les subtiles différences structurales entre pIgA et SIgA contribuent à cette complexité. Ces observations conduisent à s'interroger sur les avantages conférés par cette complexité qui ont pu conduire à sa persistance voire à sa sélection au cours de l'évolution. Il est possible que la capacité des IgA à interagir avec un très grand nombre de structures participe à leur fonction de protection contre les microorganismes présents dans la lumière des muqueuses. Leur capacité à interagir de façon croisée avec différents microbes a ainsi été mise en évidence dans de nombreux travaux. À l'inverse, se pose la question du risque conféré par cette promiscuité d'interactions. Ce risque est illustré par le rôle des IgA dans la néphropathie à IgA. Il contribue probablement aussi à la pathogénie de la maladie cœliaque. Des travaux complémentaires seront néanmoins nécessaires pour définir le rôle exact des SIgA dans cette maladie.

VI. Bibliographie

- Abe, F., Van Prooyen, N., Ladasky, J.J., and Edidin, M. (2009). Interaction of Bap31 and MHC Class I Molecules and Their Traffic Out of the Endoplasmic Reticulum. *J. Immunol.* *182*, 4776–4783.
- Abed, J., Lebreton, C., Champier, G., Cuvillier, A., Cogné, M., Meresse, B., Dugave, C., Garfa-Traoré, M., Corthesy, B., Cerf-Bensussan, N., et al. (2014). Abnormal apical-to-basal transport of dietary ovalbumin by secretory IgA stimulates a mucosal Th1 response. *Mucosal Immunol* *7*, 315–324.
- Abraham, J., Kwong, J.A., Albariño, C.G., Lu, J.G., Radoshitzky, S.R., Salazar-Bravo, J., Farzan, M., Spiropoulou, C.F., and Choe, H. (2009). Host-Species Transferrin Receptor 1 Orthologs Are Cellular Receptors for Nonpathogenic New World Clade B Arenaviruses. *PLoS Pathog* *5*, e1000358.
- Aisen, P. (2004). Transferrin receptor 1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *36*, 2137–2143.
- Almogren, A., Senior, B.W., and Kerr, M.A. (2007). A comparison of the binding of secretory component to immunoglobulin A (IgA) in human colostral S-IgA1 and S-IgA2. *Immunology* *120*, 273–280.
- Amarasinghe, J.J., D'Hondt, R.E., Waters, C.M., and Mantis, N.J. (2013). Exposure of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to a Protective Monoclonal IgA Triggers Exopolysaccharide Production via a Diguanilate Cyclase-Dependent Pathway. *Infect. Immun.* *81*, 653–664.
- Angata, T., Margulies, E.H., Green, E.D., and Varki, A. (2004). Large-scale sequencing of the CD33-related Siglec gene cluster in five mammalian species reveals rapid evolution by multiple mechanisms. *Pnas* *101*, 13251–13256.
- Annaert, W.G., Becker, B., Kistner, U., Reth, M., and Jahn, R. (1997). Export of cellubrevin from the endoplasmic reticulum is controlled by BAP31. *J. Cell Biol.* *139*, 1397–1410.
- Aoh, Q.L., Castle, A.M., Hubbard, C.H., Katsumata, O., and Castle, J.D. (2009). SCAMP3 negatively regulates epidermal growth factor receptor degradation and promotes receptor recycling. *Mol. Biol. Cell* *20*, 1816–1832.
- Appelmelk, B.J., van Die, I., van Vliet, S.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Geijtenbeek, T.B.H., and van Kooyk, Y. (2003). Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J. Immunol.* *170*, 1635–1639.
- Apter, F.M., Lencer, W.I., Finkelstein, R.A., Mekalanos, J.J., and Neutra, M.R. (1993a). Monoclonal immunoglobulin A antibodies directed against cholera toxin prevent the toxin-induced chloride secretory response and block toxin binding to intestinal epithelial cells in vitro. *Infect. Immun.* *61*, 5271–5278.
- Apter, F.M., Michetti, P., Winner, L.S., Mack, J.A., Mekalanos, J.J., and Neutra, M.R. (1993b). Analysis of the roles of antilipopolysaccharide and anti-cholera toxin immunoglobulin A (IgA) antibodies in protection against *Vibrio cholerae* and cholera toxin by use of monoclonal IgA antibodies in vivo. *Infect. Immun.* *61*, 5279–5285.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., and Holm, L. (2001). The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology* *280*, G922–G929.
- Baenziger, J., and Kornfeld, S. (1974). Structure of the carbohydrate units of IgA1 immunoglobulin. II. Structure of the O-glycosidically linked oligosaccharide units. *Journal of Biological Chemistry* *249*, 7270–7281.
- Bakos, M.A., Widen, S.G., and Goldblum, R.M. (1994). Expression and purification of biologically active domain I of the human polymeric immunoglobulin receptor. *Molecular Immunology* *31*, 165–168.
- Barisani, D., Parafioriti, A., Bardella, M.T., Zoller, H., Conte, D., Armiraglio, E., Trovato, C., Koch, R.O., and Weiss, G. (2004). Adaptive changes of duodenal iron transport proteins in celiac disease. *Physiol. Genomics* *17*, 316–325.
- Barratt, J., Greer, M.R., Pawluczyk, I.Z.A., Allen, A.C., Bailey, E.M., Buck, K.S., and Feehally, J. (2000). Identification of a novel Fc α receptor expressed by human mesangial cells. *Kidney Int.* *57*, 1936–1948.
- Bartee, E., Eyster, C.A., Viswanathan, K., Mansouri, M., Donaldson, J.G., and Früh, K. (2010). Membrane-Associated RING-CH Proteins Associate with Bap31 and Target CD81 and CD44 to Lysosomes. *PLoS ONE* *5*, e15132.

- Baumann, J., Park, C.G., and Mantis, N.J. (2010). Recognition of secretory IgA by DC-SIGN: implications for immune surveillance in the intestine. *Immunol. Lett.* *131*, 59–66.
- Bernhard, O.K., Sheil, M.M., and Cunningham, A.L. (2004). Lateral membrane protein associations of CD4 in lymphoid cells detected by cross-linking and mass spectrometry. *Biochemistry* *43*, 256–264.
- Bidgood, S.R., Tam, J.C.H., McEwan, W.A., Mallery, D.L., and James, L.C. (2014). Translocalized IgA mediates neutralization and stimulates innate immunity inside infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 13463–13468.
- Bomsel, M., Heyman, M., Hocini, H., Lagaye, S., and Belec, L. (1998). Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM. *Immunity*.
- Bondt, A., Nicolardi, S., Jansen, B.C., Stavenhagen, K., Blank, D., Kammeijer, G.S.M., Kozak, R.P., Fernandes, D.L., Hensbergen, P.J., Hazes, J.M.W., et al. (2016). Longitudinal monitoring of immunoglobulin A glycosylation during pregnancy by simultaneous MALDI-FTICR-MS analysis of N- and O-glycopeptides. *Nature Publishing Group* *6*, 27955.
- Bonner, A., Almogren, A., Furtado, P.B., Kerr, M.A., and Perkins, S.J. (2009). The Nonplanar Secretory IgA2 and Near Planar Secretory IgA1 Solution Structures Rationalize Their Different Mucosal Immune Responses. *J. Biol. Chem.* *284*, 5077–5087.
- Bonner, A., Furtado, P.B., Almogren, A., Kerr, M.A., and Perkins, S.J. (2008). Implications of the near-planar solution structure of human myeloma dimeric IgA1 for mucosal immunity and IgA nephropathy. *J. Immunol.* *180*, 1008–1018.
- Boskovic, J., Arnold, J.N., Stilion, R., Gordon, S., Sim, R.B., Rivera-Calzada, A., Wienke, D., Isacke, C.M., Martinez-Pomares, L., and Llorca, O. (2006). Structural model for the mannose receptor family uncovered by electron microscopy of Endo180 and the mannose receptor. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 8780–8787.
- Boullier, S., Tanguy, M., Kadaoui, K.A., Caubet, C., Sansonetti, P., Corthésy, B., and Phalipon, A. (2009). Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits. *The Journal of Immunology* *183*, 5879–5885.
- Boursier, L., Gordon, J.N., and Thiagamorthy, S. (2005). Human intestinal IgA response is generated in the organized gut-associated lymphoid tissue but not in the lamina propria. *Gastroenterology*.
- Brandtzaeg, P. (1974). Presence of J chain in human immunocytes containing various immunoglobulin classes. *Nature* *252*, 418–420.
- Brandtzaeg, P., and Prydz, H. (1984). Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature*.
- Brodbeck, U., Denton, W.L., Tanahashi, N., and Ebner, K.E. (1967). The isolation and identification of the B protein of lactose synthetase as alpha-lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry* *242*, 1391–1397.
- Brown, G.D., and Gordon, S. (2001). Immune recognition: A new receptor for [beta]-glucans. *Nature*.
- Brown, G.D. (2006). Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* *6*, 33–43.
- Burns, J.W., Siadat-Pajouh, M., Krishnaney, A.A., and Greenberg, H.B. (1996). Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science* *272*, 104–107.
- Cao, A.T., Yao, S., Bin Gong, Elson, C.O., and Cong, Y. (2012). Th17 Cells Upregulate Polymeric Ig Receptor and Intestinal IgA and Contribute to Intestinal Homeostasis. *J. Immunol.* *189*, 4666–4673.
- Carayannopoulos, L., Hexham, J.M., and Capra, J.D. (1996). Localization of the binding site for the monocyte immunoglobulin (Ig) A-Fc receptor (CD89) to the domain boundary between Calpha2 and Calpha3 in human IgA1. *J. Exp. Med.* *183*, 1579–1586.
- Carlsson, M.C., Bakoush, O., Tengroth, L., Kilsgård, O., Malmström, J., Hellmark, T., Segelmark, M., and Leffler, H. (2012). Galectin-8 in IgA nephritis: decreased binding of IgA by galectin-8 affinity chromatography

- and associated increased binding in non-IgA serum glycoproteins. *J. Clin. Immunol.* *32*, 246–255.
- Castle, A. (2005). Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface. *J. Cell. Sci.* *118*, 3769–3780.
- Cederfur, C., Salomonsson, E., Nilsson, J., Halim, A., Öberg, C.T., Larson, G., Nilsson, U.J., and Leffler, H. (2008). Different affinity of galectins for human serum glycoproteins: Galectin-3 binds many protease inhibitors and acute phase proteins. *Glycobiology* *18*, 384–394.
- Chen, C.Y., Malchus, N.S., Hehn, B., Stelzer, W., Avci, D., Langosch, D., and Lemberg, M.K. (2014). Signal peptide peptidase functions in ERAD to cleave the unfolded protein response regulator XBP1u. *Embo J.* *33*, 2492–2506.
- Chintalacharuvu, K.R., Piskurich, J.F., Lamm, M.E., and Kaetzel, C.S. (1991). Cell polarity regulates the release of secretory component, the epithelial receptor for polymeric immunoglobulins, from the surface of HT-29 colon carcinoma cells. *J. Cell. Physiol.* *148*, 35–47.
- Chintalacharuvu, K.R., Raines, M., and Morrison, S.L. (1994). Divergence of human alpha-chain constant region gene sequences. A novel recombinant alpha 2 gene. *J. Immunol.* *152*, 5299–5304.
- Cho, Y., Usui, K., Honda, S.-I., Tahara-Hanaoka, S., Shibuya, K., and Shibuya, A. (2006). Molecular characteristics of IgA and IgM Fc binding to the Fc α / μ R. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *345*, 474–478.
- Chuang, P.D., and Morrison, S.L. (1997). Elimination of N-linked glycosylation sites from the human IgA1 constant region: effects on structure and function. *J. Immunol.* *158*, 724–732.
- Cold Spring Harbor Protocols (2006). Mowiol mounting medium. *Cold Spring Harb Protoc* *2006*, pdb.rec10255.
- Cornish, A.L., Freeman, S., Forbes, G., Ni, J., Zhang, M., Cepeda, M., Gentz, R., Augustus, M., Carter, K.C., and Crocker, P.R. (1998). Characterization of siglec-5, a novel glycoprotein expressed on myeloid cells related to CD33. *Blood* *92*, 2123–2132.
- Corthesy, B., Benureau, Y., Perrier, C., Fourgeux, C., Parez, N., Greenberg, H., and Schwartz-Cornil, I. (2006). Rotavirus Anti-VP6 Secretory Immunoglobulin A Contributes to Protection via Intracellular Neutralization but Not via Immune Exclusion. *J. Virol.* *80*, 10692–10699.
- Coulon, S., Dussiot, M., Grapton, D., Maciel, T.T., Wang, P.H.M., Callens, C., Tiwari, M.K., Agarwal, S., Fricot, A., Vandekerckhove, J., et al. (2011). Polymeric IgA1 controls erythroblast proliferation and accelerates erythropoiesis recovery in anemia. *Nat Med* *17*, 1456–1465.
- Crottet, P., and Corthesy, B. (1998). Secretory component delays the conversion of secretory IgA into antigen-binding competent F(ab')₂: a possible implication for mucosal defense. *J. Immunol.* *161*, 5445–5453.
- Curtis, B.M., Scharnowske, S., and Watson, A.J. (1992). Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Pnas* *89*, 8356–8360.
- Dallas, S.D., and Rolfe, R.D. (1998). Binding of *Clostridium difficile* toxin A to human milk secretory component. *J. Med. Microbiol.* *47*, 879–888.
- Daniels, T.R., Delgado, T., Rodriguez, J.A., Helguera, G., and Penichet, M.L. (2006). The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin. Immunol.* *121*, 144–158.
- Deaglio, S., Capobianco, A., Calì, A., Bellora, F., Alberti, F., Righi, L., Sapino, A., Camaschella, C., and Malavasi, F. (2002). Structural, functional, and tissue distribution analysis of human transferrin receptor-2 by murine monoclonal antibodies and a polyclonal antiserum. *Blood* *100*, 3782–3789.
- Delacroix, D., and Vaerman, J.P. (1981). Reassessment of levels of secretory IgA in pathological sera using a quantitative radioimmunoassay. *Clin Exp Immunol* *43*, 633–640.
- Deshpande, N., Jensen, P.H., Packer, N.H., and Kolarich, D. (2010). GlycoSpectrumScan: Fishing

Glycopeptides from MS Spectra of Protease Digests of Human Colostrum sIgA. *J. Proteome Res.* 9, 1063–1075.

Despont, J.P., Abel, C.A., Grey, H.M., and Penn, G.M. (1974). Structural studies on a human IgA1 myeloma protein with a carboxy-terminal deletion. *J. Immunol.* 112, 1517–1525.

Diana, J., Moura, I.C., Vaugier, C., Gestin, A., Tissandie, E., Beaudoin, L., Corthésy, B., Hocini, H., Lehuen, A., and Monteiro, R.C. (2013). Secretory IgA induces tolerogenic dendritic cells through SIGNR1 dampening autoimmunity in mice. *The Journal of Immunology* 191, 2335–2343.

Diven, S.C., Caflisch, C.R., Hammond, D.K., Weigel, P.H., Oka, J.A., and Goldblum, R.M. (1998). IgA induced activation of human mesangial cells: Independent of Fc α R1 (CD 89). *Kidney Int.* 54, 837–847.

Doench, J.G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E.W., Donovan, K.F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., et al. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology* 34, 184–191.

Ehrhardt, G.R.A., Davis, R.S., Hsu, J.T., Leu, C.-M., Ehrhardt, A., and Cooper, M.D. (2003). The inhibitory potential of Fc receptor homolog 4 on memory B cells. *Pnas* 100, 13489–13494.

Eiffert, H., Quentin, E., Decker, J., Hillemeir, S., Hufschmidt, M., Klingmüller, D., Weber, M.H., and Hilschmann, N. (1984). The primary structure of human free secretory component and the arrangement of disulfide bonds. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 365, 1489–1495.

Endsley, M.A., Njongmeta, L.M., Shell, E., Ryan, M.W., Indrikovs, A.J., Ulualp, S., Goldblum, R.M., Mwangi, W., and Estes, D.M. (2009). Human IgA-inducing protein from dendritic cells induces IgA production by naive IgD+ B cells. *The Journal of Immunology* 182, 1854–1859.

Engering, A., Geijtenbeek, T.B.H., van Vliet, S.J., Wijers, M., van Liempt, E., Demaurex, N., Lanzavecchia, A., Franssen, J., Figdor, C.G., Piguet, V., et al. (2002). The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol.* 168, 2118–2126.

Ezekowitz, R.A., Sastry, K., Bailly, P., and Warner, A. (1990). Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J. Exp. Med.* 172, 1785–1794.

Falguières, T., Castle, D., and Gruenberg, J. (2011). Regulation of the MVB Pathway by SCAMP3. *Traffic* 13, 131–142.

Fallgreen-Gebauer, E., Gebauer, W., Bastian, A., Kratzin, H.D., Eiffert, H., Zimmermann, B., Karas, M., and Hilschmann, N. (1993). The covalent linkage of secretory component to IgA. Structure of sIgA. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374, 1023–1028.

Feder, J.N., Penny, D.M., Irrinki, A., Lee, V.K., Lebron, J.A., Watson, N., Tsuchihashi, Z., Sigal, E., Bjorkman, P.J., and Schatzman, R.C. (1998). The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Pnas* 95, 1472–1477.

Fernandez, M.I., Pedron, T., Tournebise, R., and Olivo-Marin, J.C. (2003). Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin a by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. *Immunity* 18, 739–749.

Forbes, S.J., Bumpus, T., McCarthy, E.A., Corthésy, B., and Mantis, N.J. (2011). Transient Suppression of *Shigella flexneri* Type 3 Secretion by a Protective O-Antigen-Specific Monoclonal IgA. *mBio* 2, e00042–11–e00042–11.

Forbes, S.J., Eschmann, M., and Mantis, N.J. (2008). Inhibition of *Salmonella enterica* serovar typhimurium motility and entry into epithelial cells by a protective antilipopolysaccharide monoclonal immunoglobulin A antibody. *Infect. Immun.* 76, 4137–4144.

Franc, V., Řehulka, P., Raus, M., Stulík, J., Novak, J., Renfrow, M.B., and Šebela, M. (2013). Elucidating heterogeneity of IgA1 hinge-region O-glycosylation by use of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry: Role of cysteine alkylation during sample processing. *Journal of Proteomics* 92, 299–312.

- Fransen, F., Zagato, E., Mazzini, E., Fosso, B., Manzari, C., Aidy, El, S., Chiavelli, A., D'Erchia, A.M., Sethi, M.K., Pabst, O., et al. (2015). BALB/c and C57BL/6 Mice Differ in Polyreactive IgA Abundance, which Impacts the Generation of Antigen-Specific IgA and Microbiota Diversity. *Immunity* *43*, 527–540.
- Frei, A.P., Jeon, O.-Y., Kilcher, S., Moest, H., Henning, L.M., Jost, C., Plückthun, A., Mercer, J., Aebersold, R., Carreira, E.M., et al. (2012). Direct identification of ligand-receptor interactions on living cells and tissues. *Nature Biotechnology* *30*, 997–1001.
- Friedmann, E., Lemberg, M.K., Weihofen, A., Dev, K.K., Dengler, U., Rovelli, G., and Martoglio, B. (2004). Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins. *Journal of Biological Chemistry* *279*, 50790–50798.
- Frutiger, S., Hughes, G.J., Hanly, W.C., Kingzette, M., and Jaton, J.C. (1986). The amino-terminal domain of rabbit secretory component is responsible for noncovalent binding to immunoglobulin A dimers. *Journal of Biological Chemistry* *261*, 16673–16681.
- Fujioka, H., Emancipator, S.N., Aikawa, M., Huang, D.S., Blatnik, F., Karban, T., DeFife, K., and Mazanec, M.B. (1998). Immunocytochemical Colocalization of Specific Immunoglobulin A with Sendai Virus Protein in Infected Polarized Epithelium. *J. Exp. Med.* *188*, 1223–1229.
- Furtado, P.B., Whitty, P.W., Robertson, A., Eaton, J.T., Almogren, A., Kerr, M.A., Woof, J.M., and Perkins, S.J. (2004). Solution Structure Determination of Monomeric Human IgA2 by X-ray and Neutron Scattering, Analytical Ultracentrifugation and Constrained Modelling: A Comparison with Monomeric Human IgA1. *Journal of Molecular Biology* *338*, 921–941.
- Garcia-Pardo, A., Lamm, M.E., Plaut, A.G., and Frangione, B. (1981). J chain is covalently bound to both monomer subunits in human secretory IgA. *Journal of Biological Chemistry* *256*, 11734–11738.
- Gazi, U., Rosas, M., Singh, S., Heinsbroek, S., Haq, I., Johnson, S., Brown, G.D., Williams, D.L., Taylor, P.R., and Martinez-Pomares, L. (2011). Fungal Recognition Enhances Mannose Receptor Shedding through Dectin-1 Engagement. *Journal of Biological Chemistry* *286*, 7822–7829.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., et al. (2000a). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* *100*, 587–597.
- Geijtenbeek, T.B.H., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C.F., Adema, G.J., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000b). Identification of DC-SIGN, a Novel Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Receptor that Supports Primary Immune Responses. *Cell* *100*, 575–585.
- Geijtenbeek, T.B.H., van Vliet, S.J., Koppel, E.A., Sanchez-Hernandez, M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Ben Appelmelk, and van Kooyk, Y. (2003). Mycobacteria Target DC-SIGN to Suppress Dendritic Cell Function. *J. Exp. Med.* *197*, 7–17.
- Geissmann, F., Launay, P., Pasquier, B., Lepelletier, Y., Leborgne, M., Lehuen, A., Brousse, N., and Monteiro, R.C. (2001). A Subset of Human Dendritic Cells Expresses IgA Fc Receptor (CD89), Which Mediates Internalization and Activation Upon Cross-Linking by IgA Complexes. *J. Immunol.* *166*, 346–352.
- Ghumra, A., Shi, J., Mcintosh, R.S., Rasmussen, I.B., Braathen, R., Johansen, F.E., Sandlie, I., Mongini, P.K., Areschoug, T., Lindahl, G., et al. (2009). Structural requirements for the interaction of human IgM and IgA with the human Fc α / μ receptor. *Eur. J. Immunol.* *39*, 1147–1156.
- Glöckner, G., Scherer, S., Schattevoy, R., Boright, A., Weber, J., Tsui, L.C., and Rosenthal, A. (1998). Large-scale sequencing of two regions in human chromosome 7q22: analysis of 650 kb of genomic sequence around the EPO and CUTL1 loci reveals 17 genes. *Genome Res.* *8*, 1060–1073.
- Gmeiner, B.M. (1985). Conversion of the amphiphilic galactosyltransferase from human mammary carcinoma cells to an active hydrophilic enzyme form by limited proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta* *829*, 76–82.
- Gómez-Guerrero, C., González, E., and Egido, J. (1993). Evidence for a specific IgA receptor in rat and human mesangial cells. *J. Immunol.* *151*, 7172–7181.

- Grapov, D., Lemay, D.G., Weber, D., Phinney, B.S., Azulay Chertok, I.R., Gho, D.S., German, J.B., and Smilowitz, J.T. (2015). The Human Colostrum Whey Proteome Is Altered in Gestational Diabetes Mellitus. *J. Proteome Res.* *14*, 512–520.
- Grey, H.M., Abel, C.A., Yount, W.J., and Kunkel, H.G. (1968). A subclass of human gamma-A-globulins (gamma-A2) which lacks the disulfid bonds linking heavy and light chains. *J. Exp. Med.* *128*, 1223–1236.
- Hamburger, A.E., West, A.P., Jr., and Bjorkman, P.J. (2004). Crystal Structure of a Polymeric Immunoglobulin Binding Fragment of the Human Polymeric Immunoglobulin Receptor. *Structure* *12*, 1925–1935.
- Hathaway, H.J., Evans, S.C., Dubois, D.H., Foote, C.I., Elder, B.H., and Shur, B.D. (2003). Mutational analysis of the cytoplasmic domain of β 1,4-galactosyltransferase I: influence of phosphorylation on cell surface expression. *J. Cell. Sci.* *116*, 4319–4330.
- Heimburger, N., Heide, K., Haupt, H., and Schultze, H.E. (1964). Analysis of the structure of human serum proteins. *Clin. Chim. Acta* *10*, 293–307.
- Helander, A., Miller, C.L., Myers, K.S., Neutra, M.R., and Nibert, M.L. (2004). Protective immunoglobulin A and G antibodies bind to overlapping intersubunit epitopes in the head domain of type 1 reovirus adhesin sigma1. *J. Virol.* *78*, 10695–10705.
- Hendrickson, B.A., Conner, D.A., Ladd, D.J., Kendall, D., Casanova, J.E., Corthesy, B., Max, E.E., Neutra, M.R., Seidman, C.E., and Seidman, J.G. (1995). Altered hepatic transport of immunoglobulin A in mice lacking the J chain. *J. Exp. Med.* *182*, 1905–1911.
- Herr, A.B., Ballister, E.R., and Bjorkman, P.J. (2003). Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human Fc α RI and its complex with IgA1-Fc. *Nature*.
- Heystek, H.C., Moulon, C., Woltman, A.M., Garonne, P., and van Kooten, C. (2002). Human Immature Dendritic Cells Efficiently Bind and Take up Secretory IgA Without the Induction of Maturation. *J. Immunol.* *168*, 102–107.
- Hill, R.L., Brew, K., Vanaman, T.C., Trayer, I.P., and Mattock, P. (1968). The structure, function, and evolution of alpha-lactalbumin. *Brookhaven Symp. Biol.* *21*, 139–154.
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology* *31*, 827–832.
- Huang, J., Guerrero, A., Parker, E., Strum, J.S., Smilowitz, J.T., German, J.B., and Lebrilla, C.B. (2015). Site-specific glycosylation of secretory immunoglobulin A from human colostrum. *J. Proteome Res.* *14*, 1335–1349.
- Hudgin, R.L., Pricer, W.E., Ashwell, G., Stockert, R.J., and Morell, A.G. (1974). The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* *249*, 5536–5543.
- Hutchings, A.B., Helander, A., Silvey, K.J., Chandran, K., Lucas, W.T., Nibert, M.L., and Neutra, M.R. (2004). Secretory immunoglobulin A antibodies against the sigma1 outer capsid protein of reovirus type 1 Lang prevent infection of mouse Peyer's patches. *J. Virol.* *78*, 947–957.
- Jaffar, Z., Ferrini, M.E., Lou A Herritt, and Roberts, K. (2009). Cutting Edge: Lung Mucosal Th17-Mediated Responses Induce Polymeric Ig Receptor Expression by the Airway Epithelium and Elevate Secretory IgA Levels. *J. Immunol.* *182*, 4507–4511.
- James, L.C., Keeble, A.H., Khan, Z., Rhodes, D.A., and Trowsdale, J. (2007). Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function. *Pnas* *104*, 6200–6205.
- Jameson, B., Baribaud, F., Pöhlmann, S., Ghavimi, D., Mortari, F., Doms, R.W., and Iwasaki, A. (2002). Expression of DC-SIGN by dendritic cells of intestinal and genital mucosae in humans and rhesus macaques. *J. Virol.* *76*, 1866–1875.
- Johansen, F.E., Braathen, R., and Brandtzaeg, P. (2001). The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA. *J. Immunol.* *167*, 5185–5192.

- Jordens, R., Thompson, A., Amons, R., and Koning, F. (1999). Human dendritic cells shed a functional, soluble form of the mannose receptor. *International Immunology* *11*, 1775–1780.
- Kaetzel, C.S., Robinson, J.K., and Lamm, M.E. (1994). Epithelial transcytosis of monomeric IgA and IgG cross-linked through antigen to polymeric IgA. A role for monomeric antibodies in the mucosal immune system. *J. Immunol.* *152*, 72–76.
- Kaetzel, C.S., Robinson, J.K., Chintalacheruvu, K.R., Vaerman, J.P., and Lamm, M.E. (1991). The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Pnas* *88*, 8796–8800.
- Kaetzel, C.S. (2005). The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol. Rev.* *206*, 83–99.
- Kanamaru, Y., Pfirsch, S., Aloulou, M., Vrtovsniak, F., Essig, M., Loirat, C., Deschênes, G., Guérin-Marchand, C., Blank, U., and Monteiro, R.C. (2008). Inhibitory ITAM signaling by Fc alpha RI-FcR gamma chain controls multiple activating responses and prevents renal inflammation. *J. Immunol.* *180*, 2669–2678.
- Kato, T. (1990). A study of secretory immunoglobulin A on membranous epithelial cells (M cells) and adjacent absorptive cells of rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol. Jpn.* *25*, 15–23.
- Kawabata, H., Yang, R., Hiramata, T., Vuong, P.T., Kawano, S., Gombart, A.F., and Koeffler, H.P. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 20826–20832.
- Kerr, M.A. (1990). The structure and function of human IgA. *Biochem. J.* *271*, 285–296.
- Kikuno, K., Kang, D.W., Tahara, K., Torii, I., Kubagawa, H.M., Ho, K.J., Baudino, L., Nishizaki, N., Shibuya, A., and Kubagawa, H. (2007). Unusual biochemical features and follicular dendritic cell expression of human Fc α / μ receptor. *Eur. J. Immunol.* *37*, 3540–3550.
- Kim, W.-T., Choi, H.S., Hwang, H.J., Jung, H.-S., and Ryu, C.J. (2015). Epitope Mapping of Antibodies Suggests the Novel Membrane Topology of B-Cell Receptor Associated Protein 31 on the Cell Surface of Embryonic Stem Cells: The Novel Membrane Topology of BAP31. *PLoS ONE* *10*, e0130670–13.
- Kitamura, T., Garofalo, R.P., Kamijo, A., Hammond, D.K., Oka, J.A., Caflisch, C.R., Shenoy, M., Casola, A., Weigel, P.H., and Goldblum, R.M. (2000). Human Intestinal Epithelial Cells Express a Novel Receptor for IgA. *J. Immunol.* *164*, 5029–5034.
- Korthäuer, U., Graf, D., Mages, H.W., Briere, F., Padayachee, M., Malcolm, S., Ugazio, A.G., Notarangelo, L.D., Levinsky, R.J., and Kroczeck, R.A. (1993). Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* *361*, 539–541.
- Kunkel, E.J., Campbell, J.J., Haraldsen, G., Pan, J., Boisvert, J., Roberts, A.I., Ebert, E.C., Vierra, M.A., Goodman, S.B., Genovese, M.C., et al. (2000). Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J. Exp. Med.* *192*, 761–768.
- Kunkel, E.J., and Butcher, E.C. (2003). Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* *3*, 822–829.
- Ladjeva, I., Peterman, J.H., and Mestecky, J. (1989). IgA subclasses of human colostrum antibodies specific for microbial and food antigens. *Clin Exp Immunol* *78*, 85–90.
- Lambert, G., Becker, B., Schreiber, R., Boucherot, A., Reth, M., and Kunzelmann, K. (2001). Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression by BAP31. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 20340–20345.
- Lamkhioued, B., Gounni, A.S., Gruart, V., Pierce, A., Capron, A., and Capron, M. (1995). Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation. *Eur. J. Immunol.* *25*, 117–125.

- Launay, P., Grossetête, B., Arcos-Fajardo, M., Gaudin, E., Torres, S.P., Beaudoin, L., Patey-Mariaud de Serre, N., Lehuen, A., and Monteiro, R.C. (2000). Fc α receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-IgA complexes in patients and CD89 transgenic mice. *J. Exp. Med.* *191*, 1999–2009.
- Lawrence, C.M. (1999). Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor. *Science* *286*, 779–782.
- Lebreton, C., Ménard, S., Abed, J., Moura, I.C., Coppo, R., Dugave, C., Monteiro, R.C., Fricot, A., Traore, M.G., Griffin, M., et al. (2012). Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology* *143*, 698–707.e1–4.
- Lewis, M.J., Pleass, R.J., Batten, M.R., Atkin, J.D., and Woof, J.M. (2005). Structural Requirements for the Interaction of Human IgA with the Human Polymeric Ig Receptor. *J. Immunol.* *175*, 6694–6701.
- Li, L., Fang, C.J., Ryan, J.C., Niemi, E.C., Lebrón, J.A., Bjorkman, P.J., Arase, H., Torti, F.M., Torti, S.V., Nakamura, M.C., et al. (2010). Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 3505–3510.
- Lipniunas, P., Gronberg, G., Krotkiewski, H., Angel, A.S., and Nilsson, B. (1993). Investigation of the Structural Heterogeneity in the Carbohydrate Portion of a Mouse Monoclonal Immunoglobulin A Antibody. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *300*, 335–345.
- Litinskiy, M.B., Nardelli, B., Hilbert, D.M., He, B., Schaffer, A., Casali, P., and Cerutti, A. (2002). DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* *3*, 822–829.
- Liu, Y., Chirino, A.J., Misulovin, Z., Leteux, C., Feizi, Ten, Nussenzweig, M.C., and Bjorkman, P.J. (2000). Crystal Structure of the Cysteine-Rich Domain of Mannose Receptor Complexed with a Sulfated Carbohydrate Ligand. *J. Exp. Med.* *191*, 1105–1116.
- Lopez, L.C., Youakim, A., Evans, S.C., and Shur, B.D. (1991). Evidence for a molecular distinction between Golgi and cell surface forms of beta 1,4-galactosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* *266*, 15984–15991.
- Lozach, P.-Y., Lortat-Jacob, H., De Lacroix De Lavalette, A., Staropoli, I., Foug, S., Amara, A., Houlès, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J.-L., et al. (2003). DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. *Journal of Biological Chemistry* *278*, 20358–20366.
- Lycke, N., Erlandsson, L., Ekman, L., Schön, K., and Leanderson, T. (1999). Lack of J Chain Inhibits the Transport of Gut IgA and Abrogates the Development of Intestinal Antitoxic Protection. *J. Immunol.* *163*, 913–919.
- Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.E., and Brandtzaeg, P. (2008). The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* *1*, 11–22.
- Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., and Zinkernagel, R.M. (2000). A Primitive T Cell-Independent Mechanism of Intestinal Mucosal IgA Responses to Commensal Bacteria. *Science* *288*, 2222–2226.
- Mallery, D.L., McEwan, W.A., Bidgood, S.R., Towers, G.J., Johnson, C.M., and James, L.C. (2010). Antibodies mediate intracellular immunity through tripartite motif-containing 21 (TRIM21). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 19985–19990.
- Mantis, N.J., and Forbes, S.J. (2010). Secretory IgA: arresting microbial pathogens at epithelial borders. *Immunol. Invest.* *39*, 383–406.
- Mantis, N.J., Cheung, M.C., Chintalacharuvu, K.R., Rey, J., Corthésy, B., and Neutra, M.R. (2002). Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J. Immunol.* *169*, 1844–1851.
- Mantis, N.J., Farrant, S.A., and Mehta, S. (2004). Oligosaccharide Side Chains on Human Secretory IgA Serve

as Receptors for Ricin. *J. Immunol.* *172*, 6838–6845.

Mantis, N.J., McGuinness, C.R., Sonuyi, O., Edwards, G., and Farrant, S.A. (2006). Immunoglobulin A antibodies against ricin A and B subunits protect epithelial cells from ricin intoxication. *Infect. Immun.* *74*, 3455–3462.

Martin, D.N., and Uprichard, S.L. (2013). Identification of transferrin receptor 1 as a hepatitis C virus entry factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 10777–10782.

Martinez-Pomares, L., Mahoney, J.A., Káposzta, R., Linehan, S.A., Stahl, P.D., and Gordon, S. (1998). A functional soluble form of the murine mannose receptor is produced by macrophages in vitro and is present in mouse serum. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 23376–23380.

Martinez-Pomares, L. (2012). The mannose receptor. *Journal of Leukocyte Biology* *92*, 1177–1186.

Martinez-Pomares, L., Wienke, D., Stillion, R., McKenzie, E.J., Arnold, J.N., Harris, J., McGreal, E., Sim, R.B., Isacke, C.M., and Gordon, S. (2006). Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1074–1082.

Mattu, T.S., Pleass, R.J., Willis, A.C., Kilian, M., Wormald, M.R., Lellouch, A.C., Rudd, P.M., Woof, J.M., and Dwek, R.A. (1998). The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc α receptor interactions. *Journal of Biological Chemistry* *273*, 2260–2272.

Matysiak-Budnik, T., Candalh, C., Dugave, C., Namane, A., Cellier, C., Cerf-Bensussan, N., and Heyman, M. (2003). Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* *125*, 696–707.

Matysiak-Budnik, T., Moura, I.C., Arcos-Fajardo, M., Lebreton, C., Ménard, S., Candalh, C., Ben-Khalifa, K., Dugave, C., Tamouza, H., Van Niel, G., et al. (2008). Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *Journal of Experimental Medicine* *205*, 143–154.

Mazanec, M.B., Coudret, C.L., and Fletcher, D.R. (1995a). Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies. *J. Virol.* *69*, 1339–1343.

Mazanec, M.B., Kaetzel, C.S., Lamm, M.E., Fletcher, D., and Nedrud, J.G. (1992). Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Pnas* *89*, 6901–6905.

Mazanec, M.B., Kaetzel, C.S., Lamm, M.E., Fletcher, D., Peterra, J., and Nedrud, J.G. (1995b). Intracellular neutralization of Sendai and influenza viruses by IgA monoclonal antibodies. *Adv. Exp. Med. Biol.* *371A*, 651–654.

McDole, J.R., Wheeler, L.W., McDonald, K.G., Wang, B., Konjufca, V., Knoop, K.A., Newberry, R.D., and Miller, M.J. (2012). Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* *483*, 345–349.

McDonald, K.J., Cameron, A.J.M., Allen, J.M., and Jardine, A.G. (2002). Expression of Fc α/μ Receptor by Human Mesangial Cells: A Candidate Receptor for Immune Complex Deposition in IgA Nephropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *290*, 438–442.

McEwan, W. (2016). Surveillance for Intracellular Antibody by Cytosolic Fc Receptor TRIM21. *Antibodies* *5*, 21–12.

McGuire, E.J., Kerlin, R., Cebra, J.J., and Roth, S. (1989). A human milk galactosyltransferase is specific for secreted, but not plasma, IgA. *J. Immunol.* *143*, 2933–2938.

McLauchlan, J., Lemberg, M.K., Hope, G., and Martoglio, B. (2002). Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. *Embo J.* *21*, 3980–3988.

Mechetina, L.V., Najakshin, A.M., Volkova, O.Y., Guselnikov, S.V., Faizulin, R.Z., Alabyev, B.Y., Chikaev, N.A., Vinogradova, M.S., and Tarantin, A.V. (2002). FCRL, a novel member of the leukocyte Fc receptor family possesses unique structural features. *Eur. J. Immunol.* *32*, 87–96.

- Mei, H.E., Yoshida, T., Sime, W., Hiepe, F., Thiele, K., Manz, R.A., Radbruch, A., and Dörner, T. (2009). Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. *Blood* *113*, 2461–2469.
- Ménard, S., Lebreton, C., Schumann, M., Matysiak-Budnik, T., Dugave, C., Bouhnik, Y., Malamut, G., Cellier, C., Allez, M., Crenn, P., et al. (2012). Paracellular versus Transcellular Intestinal Permeability to Gliadin Peptides in Active Celiac Disease. *180*, 608–615.
- Michetti, P., Mahan, M.J., Slauch, J.M., Mekalanos, J.J., and Neutra, M.R. (1992). Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* *60*, 1786–1792.
- Millet, I., Briere, F., Vincent, C., Rousset, F., Andreoni, C., De Vries, J.E., and Revillard, J.P. (1989). Spontaneous expression of a low affinity Fc receptor for IgA (Fc alpha R) on human B cell lines. *Clin Exp Immunol* *76*, 268–273.
- Millet, I., Panaye, G., and Revillard, J.P. (1988). Expression of receptors for IgA on mitogen-stimulated human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* *18*, 621–626.
- Miyashita, H., Maruyama, Y., Isshiki, H., Osawa, S., Ogura, T., Mio, K., Sato, C., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2011). Three-dimensional structure of the signal peptide peptidase. *J. Biol. Chem.* *286*, 26188–26197.
- Mocanu, M.M., Váradi, T., Szöllosi, J., and Nagy, P. (2011). Comparative analysis of fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assay (PLA). *Proteomics* *11*, 2063–2070.
- Molyneux, K., Wimbury, D., Pawluczyk, I., Muto, M., Bhachu, J., Mertens, P.R., Feehally, J., and Barratt, J. (2017). β 1,4-galactosyltransferase 1 is a novel receptor for IgA in human mesangial cells. *Kidney Int.*
- Monteiro, R.C., Hostoffer, R.W., Cooper, M.D., Bonner, J.R., Gartland, G.L., and Kubagawa, H. (1993). Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. *Journal of Clinical Investigation* *92*, 1681–1685.
- Monteiro, R.C., Kubagawa, H., and Cooper, M.D. (1990). Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. *J. Exp. Med.* *171*, 597–613.
- Moor, K., Diard, M., Sellin, M.E., Felmy, B., and Wotzka, S.Y. (2017). High-avidity IgA protects the intestine by enchainning growing bacteria. *Nature.*
- Morton, H.C., van Zandbergen, G., van Kooten, C., Howard, C.J., van de Winkel, J.G.J., and Brandtzaeg, P. (1999). Immunoglobulin-binding Sites of Human Fc α RI (CD89) and Bovine Fc γ 2R Are Located in their Membrane-distal Extracellular Domains. *J. Exp. Med.* *189*, 1715–1722.
- Mostov, K.E., Friedlander, M., and Blobel, G. (1984). The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains. *Nature* *308*, 37–43.
- Mostov, K.E., Kraehenbuhl, J.P., and Blobel, G. (1980). Receptor-mediated transcellular transport of immunoglobulin: synthesis of secretory component as multiple and larger transmembrane forms. *Pnas* *77*, 7257–7261.
- Moura, I.C., Centelles, M.N., Arcos-Fajardo, M., Malheiros, D.M., Collawn, J.F., Cooper, M.D., and Monteiro, R.C. (2001). Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J. Exp. Med.* *194*, 417–425.
- Moura, I.C., Arcos-Fajardo, M., Gdoura, A., Leroy, V., Sadaka, C., Mahlaoui, N., Lepelletier, Y., Vrtovsniak, F., Haddad, E., Benhamou, M., et al. (2005). Engagement of transferrin receptor by polymeric IgA1: evidence for a positive feedback loop involving increased receptor expression and mesangial cell proliferation in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* *16*, 2667–2676.
- Moura, I.C., Arcos-Fajardo, M., Sadaka, C., Leroy, V., Benhamou, M., Novak, J., Vrtovsniak, F., Haddad, E., Chintalacharuvu, K.R., and Monteiro, R.C. (2004). Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* *15*, 622–634.

- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563.
- Murthy, A.K., Chaganty, B.K.R., Troutman, T., Guentzel, M.N., Yu, J.-J., Ali, S.K., Lauriano, C.M., Chambers, J.P., Klose, K.E., and Arulanandam, B.P. (2011). Mannose-containing oligosaccharides of non-specific human secretory immunoglobulin A mediate inhibition of *Vibrio cholerae* biofilm formation. *PLoS ONE* 6, e16847.
- Musil, L.S., and Baenziger, J.U. (1987). Cleavage of membrane secretory component to soluble secretory component occurs on the cell surface of rat hepatocyte monolayers. *J. Cell Biol.* 104, 1725–1733.
- Namba, T., Tian, F., Chu, K., Hwang, S.-Y., Yoon, K.W., Byun, S., Hiraki, M., Mandinova, A., and Lee, S.W. (2013). CDIP1-BAP31 Complex Transduces Apoptotic Signals from Endoplasmic Reticulum to Mitochondria under Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Reports* 5, 331–339.
- Neumannova, V., Richardson, D.R., Kriegerbeckova, K., and Kovar, J. (1995). Growth of human tumor cell lines in transferrin-free, low-iron medium. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 31, 625–632.
- Neutra, M., Phillips, T., Mayer, E., and Fishkind, D. (1987). Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. - PubMed - NCBI. *Cell Tissue Res* 247, 537–546.
- Nikolayenko, I.V., and Galkin, O.Y. (2005). Preparation of highly purified human IgG, IgM, and IgA for immunization and immunoanalysis. *Ukrainica*
- Novak, J., Moldoveanu, Z., Renfrow, M.B., Yanagihara, T., Suzuki, H., Raska, M., Hall, S., Brown, R., Huang, W.-Q., Goepfert, A., et al. (2007). IgA nephropathy and Henoch-Schoenlein purpura nephritis: aberrant glycosylation of IgA1, formation of IgA1-containing immune complexes, and activation of mesangial cells. *Contrib Nephrol* 157, 134–138.
- Nyborg, A.C., Kornilova, A.Y., Jansen, K., Ladd, T.B., Wolfe, M.S., and Golde, T.E. (2004). Signal peptide peptidase forms a homodimer that is labeled by an active site-directed gamma-secretase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 279, 15153–15160.
- Oortwijn, B.D., van der Boog, P.J.M., Roos, A., van der Geest, R.N., de Fijter, J.W., Daha, M.R., and van Kooten, C. (2006a). A pathogenic role for secretory IgA in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 69, 1131–1138.
- Oortwijn, B.D., Roos, A., Royle, L., van Gijlswijk-Janssen, D.J., Faber-Krol, M.C., Eijgenraam, J.-W., Dwek, R.A., Daha, M.R., Rudd, P.M., and van Kooten, C. (2006b). Differential glycosylation of polymeric and monomeric IgA: a possible role in glomerular inflammation in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 3529–3539.
- Özlü, N., Qureshi, M.H., Toyoda, Y., Renard, B.Y., Mollaoglu, G., Özkan, N.E., Bulbul, S., Poser, I., Timm, W., Hyman, A.A., et al. (2015). Quantitative comparison of a human cancer cell surface proteome between interphase and mitosis. *Embo J.* 34, 251–265.
- Palmer, D.J., Kelly, V.C., Smit, A.-M., Kuy, S., Knight, C.G., and Cooper, G.J. (2006). Human colostrum: Identification of minor proteins in the aqueous phase by proteomics. *Proteomics* 6, 2208–2216.
- Pan, J., Kunkel, E.J., Gossler, U., and Lazarus, N. (2000). Cutting edge: a novel chemokine ligand for CCR10 and CCR3 expressed by epithelial cells in mucosal tissues. *The Journal of Immunology.*
- Pasquier, B., Launay, P., Kanamaru, Y., Moura, I.C., Pfirsch, S., Ruffié, C., Hénin, D., Benhamou, M., Pretolani, M., Blank, U., et al. (2005). Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcR γ ITAM. *Immunity* 22, 31–42.
- Perreault, N., and Beaulieu, J.F. (1996). Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell Res.* 224, 354–364.
- Perrier, C., Sprenger, N., and Corthésy, B. (2006). Glycans on secretory component participate in innate protection against mucosal pathogens. *Journal of Biological Chemistry* 281, 14280–14287.

- Pfefferkorn, L.C., and Yeaman, G.R. (1994). Association of IgA-Fc receptors (Fc alpha R) with Fc epsilon RI gamma 2 subunits in U937 cells. Aggregation induces the tyrosine phosphorylation of gamma 2. *The Journal of Immunology*.
- Phalipon, A., Cardona, A., Kraehenbuhl, J.P., and Edelman, L. (2002). Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity*.
- Phalipon, A., Michetti, P., Kaufmann, M., Cavaillon, J.M., Huerre, M., Kraehenbuhl, J.P., and Sansonetti, P.J. (1994). Protection against invasion of the mouse pulmonary epithelium by a monoclonal IgA directed against *Shigella flexneri* lipopolysaccharide. *Annals of the New York Academy of Sciences* 730, 356–358.
- Phillips-Quagliata, J.M. (2002). Mouse IgA allotypes have major differences in their hinge regions. *Immunogenetics* 53, 1033–1038.
- Pleass, R.J., Dunlop, J.I., Anderson, C.M., and Woof, J.M. (1999). Identification of residues in the CH2/CH3 domain interface of IgA essential for interaction with the human fcalpha receptor (FcalphaR) CD89. *Journal of Biological Chemistry* 274, 23508–23514.
- Pohlner, J., Halter, R., and Meyer, T.F. (1987). *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. Secretion and implications for pathogenesis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53, 479–484.
- Putnam, F.W., Liu, Y.S., and Low, T.L. (1979). Primary structure of a human IgA1 immunoglobulin. IV. Streptococcal IgA1 protease, digestion, Fab and Fc fragments, and the complete amino acid sequence of the alpha 1 heavy chain. *Journal of Biological Chemistry* 254, 2865–2874.
- Qiu, J., Brackee, G.P., and Plaut, A.G. (1996). Analysis of the specificity of bacterial immunoglobulin A (IgA) proteases by a comparative study of ape serum IgAs as substrates. *Infect. Immun.* 64, 933–937.
- Radoshitzky, S.R., Kuhn, J.H., Spiropoulou, C.F., Albariño, C.G., Nguyen, D.P., Salazar-Bravo, J., Dorfman, T., Lee, A.S., Wang, E., Ross, S.R., et al. (2008). Receptor determinants of zoonotic transmission of New World hemorrhagic fever arenaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 105, 2664–2669.
- Radoshitzky, S.R., Longobardi, L.E., Kuhn, J.H., Retterer, C., Dong, L., Clester, J.C., Kota, K., Carra, J., and Bavari, S. (2011). Machupo virus glycoprotein determinants for human transferrin receptor 1 binding and cell entry. *PLoS ONE* 6, e21398.
- Ramakrishnan, B., Balaji, P.V., and Qasba, P.K. (2002). Crystal Structure of β 1,4-Galactosyltransferase Complex with UDP-Gal Reveals an Oligosaccharide Acceptor Binding Site. *Journal of Molecular Biology* 318, 491–502.
- Ramsay, A.J., Husband, A.J., Ramshaw, I.A., and Bao, S. (1994). The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science*.
- Rádl, J., Klein, F., van den Berg, P., de Bruyn, A.M., and Hijmans, W. (1971). Binding of secretory piece to polymeric IgA and IgM paraproteins in vitro. *Immunology* 20, 843–852.
- Reljic, R., Crawford, C., Challacombe, S., and Ivanyi, J. (2004). Mouse monoclonal IgA binds to the galectin-3/Mac-2 lectin from mouse macrophage cell lines. *Immunol. Lett.* 93, 51–56.
- Renegar, K.B., Jackson, G.D.F., and Mestecky, J. (1998). In Vitro Comparison of the Biologic Activities of Monoclonal Monomeric IgA, Polymeric IgA, and Secretory IgA. *J. Immunol.* 160, 1219–1223.
- Renfrow, M.B., Mackay, C.L., Chalmers, M.J., Julian, B.A., Mestecky, J., Kilian, M., Poulsen, K., Emmett, M.R., Marshall, A.G., and Novak, J. (2007). Analysis of O-glycan heterogeneity in IgA1 myeloma proteins by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: implications for IgA nephropathy. *Anal Bioanal Chem* 389, 1397–1407.
- Renz, M., Daniels, B.R., Vámosi, G., Arias, I.M., and Lippincott-Schwartz, J. (2012). Plasticity of the asialoglycoprotein receptor deciphered by ensemble FRET imaging and single-molecule counting PALM imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.a.* 109, E2989–E2997.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.-

- P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2, 361–367.
- Rifai, A., Fadden, K., Morrison, S.L., and Chintalacharuvu, K.R. (2000). The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes. *J. Exp. Med.* 191, 2171–2182.
- Rochereau, N., Drocourt, D., Perouzel, E., Pavot, V., Redelinguys, P., Brown, G.D., Tiraby, G., Roblin, X., Verrier, B., Genin, C., et al. (2013). Dectin-1 Is Essential for Reverse Transcytosis of Glycosylated SIgA-Antigen Complexes by Intestinal M Cells. *PLoS Biol* 11, e1001658.
- Roque-Barreira, M.C., and Campos-Neto, A. (1985). Jacalin: an IgA-binding lectin. *J. Immunol.* 134, 1740–1743.
- Rothenberger, S., Iacopetta, B.J., and Kühn, L.C. (1987). Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. *Cell* 49, 423–431.
- Roy, M.J., and Varvayanis, M. (1987). Development of dome epithelium in gut-associated lymphoid tissues: association of IgA with M cells. *Cell Tissue Res* 248, 645–651.
- Royle, L., Roos, A., Harvey, D.J., Wormald, M.R., Van Gijlswijk-Janssen, D., Redwan, E.-R.M., Wilson, I.A., Daha, M.R., Dwek, R.A., and Rudd, P.M. (2003). Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. *Journal of Biological Chemistry* 278, 20140–20153.
- Rudd, P.M., Fortune, F., Patel, T., Parekh, R.B., Dwek, R.A., and Lehner, T. (1994). A human T-cell receptor recognizes “O”-linked sugars from the hinge region of human IgA1 and IgD. *Immunology* 83, 99–106.
- Russo, R.N., Shaper, N.L., and Shaper, J.H. (1990). Bovine beta-1,4-galactosyltransferase: two sets of mRNA transcripts encode two forms of the protein with different amino-terminal domains. In vitro translation experiments demonstrate that both the short and the long forms of the enzyme are type II membrane-bound glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 265, 3324–3331.
- Sangeetha, S.R., and Appukuttan, P.S. (2005). IgA1 is the premier serum glycoprotein recognized by human galectin-1 since T antigen (Galbeta1->3GalNAc-) is far superior to non-repeating N-acetyl lactosamine as ligand. *Int. J. Biol. Macromol.* 35, 269–276.
- Santiago, T., Kulemzin, S.V., Reshetnikova, E.S., Chikaev, N.A., Volkova, O.Y., Mechetina, L.V., Zhao, M., Davis, R.S., Taranin, A.V., Najakshin, A.M., et al. (2011). FCRLA is a resident endoplasmic reticulum protein that associates with intracellular Igs, IgM, IgG and IgA. *International Immunology* 23, 43–53.
- Sattler, J., Schwarzmann, G., Knack, I., Röhm, K.H., and Wiegandt, H. (1978). Studies of ligand binding to cholera toxin. III. Cooperativity of oligosaccharide binding. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 359, 719–723.
- Schamel, W.W.A., Kuppig, S., Becker, B., Gimborn, K., Hauri, H.-P., and Reth, M. (2003). A high-molecular-weight complex of membrane proteins BAP29/BAP31 is involved in the retention of membrane-bound IgD in the endoplasmic reticulum. *Pnas* 100, 9861–9866.
- Schroten, H., Stapper, C., Plogmann, R., Köhler, H., Hacker, J., and Hanisch, F.G. (1998). Fab-independent antiadhesion effects of secretory immunoglobulin A on S-fimbriated *Escherichia coli* are mediated by sialyloligosaccharides. *Infect. Immun.* 66, 3971–3973.
- Schrul, B., Kapp, K., Sinning, I., and Dobberstein, B. (2010). Signal peptide peptidase (SPP) assembles with substrates and misfolded membrane proteins into distinct oligomeric complexes. *Biochem. J.* 427, 523–534.
- Schüler, J., Frank, J., Saenger, W., and Georgalis, Y. (1999). Thermally Induced Aggregation of Human Transferrin Receptor Studied by Light-Scattering Techniques. *Biophys. J.* 77, 1117–1125.
- Schweikart, F., Jones, R., Jaton, J.-C., and Hughes, G.J. (1999). Rapid structural characterisation of a murine monoclonal IgA α chain: heterogeneity in the oligosaccharide structures at a specific site in samples produced in different bioreactor systems. *Journal of Biotechnology* 69, 191–201.
- Seo, G.-Y., Jang, Y.-S., Kim, J., Choe, J., Han, H.-J., Lee, J.-M., Kang, S.-H., Rhee, K.-J., Park, S.-R., Kim, W.-

- S., et al. (2014). Retinoic acid acts as a selective human IgA switch factor. *Human Immunology* 75, 923–929.
- Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, T., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., et al. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343, 84–87.
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G.M., Sollid, L.M., and Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297, 2275–2279.
- Shan, M., Gentile, M., Yeiser, J.R., Walland, A.C., Bornstein, V.U., Chen, K., He, B., Cassis, L., Bigas, A., Cols, M., et al. (2013). Mucus Enhances Gut Homeostasis and Oral Tolerance by Delivering Immunoregulatory Signals. *Science* 342, 447–453.
- Shibuya, A., Sakamoto, N., Shimizu, Y., Shibuya, K., Osawa, M., Hiroyama, T., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Endo, Y., Fujita, T., et al. (2000). Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol* 1, 441–446.
- Sibille, Y., Depelchin, S., Staquet, P., Chatelain, B., Coulie, P., Shen, L., Vander Maelen, C., and Vaerman, J.P. (1994). Fc alpha-receptor expression on the myelomonocytic cell line THP-1: comparison with human alveolar macrophages. *Eur. Respir. J.* 7, 1111–1119.
- Silvain, C., Aucouturier, P., Leduc, I., Mihaesco, E., Preud'homme, J.L., and Cogné, M. (1993). A human myeloma IgA with a hybrid heavy chain resulting from putative somatic gene conversion. *Eur. J. Immunol.* 23, 364–368.
- Silvey, K.J., Hutchings, A.B., Vajdy, M., Petzke, M.M., and Neutra, M.R. (2001). Role of immunoglobulin A in protection against reovirus entry into Murine Peyer's patches. *J. Virol.* 75, 10870–10879.
- Singleton, D.R., Wu, T.T., and Castle, J.D. (1997). Three mammalian SCAMPs (secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 17), 2099–2107.
- Smith, P.D. (2013). *Principles of Mucosal Immunology*, Garland Science (Taylor & Francis Groupe).
- Snyder, G.A., Ford, J., Torabi-Parizi, P., Arthos, J.A., Schuck, P., Colonna, M., and Sun, P.D. (2005). Characterization of DC-SIGN/R Interaction with Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 and ICAM Molecules Favors the Receptor's Role as an Antigen-Capturing Rather than an Adhesion Receptor. *J. Virol.* 79, 4589–4598.
- Sollid, L.M., Markussen, G., Ek, J., Gjerde, H., Vartdal, F., and Thorsby, E. (1989). Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J. Exp. Med.* 169, 345–350.
- Sonoda, E., Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Ishii, T., Tominaga, A., Araki, S., and Takatsu, K. (1992). Differential regulation of IgA production by TGF-beta and IL-5: TGF-beta induces surface IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes their survival and maturation into IgA-secreting cells. *Cell. Immunol.* 140, 158–172.
- Stadtmueller, B.M., Huey-Tubman, K.E., López, C.J., and Yang, Z. (2016). The structure and dynamics of secretory component and its interactions with polymeric immunoglobulins. *Elife*.
- Stahl, P.D., and Ezekowitz, R.A. (1998). The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current Opinion in Immunology* 10, 50–55.
- Stahl, P., Schlesinger, P.H., Sigardson, E., and Rodman, J.S. (1980). Receptor-mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling. *Cell*.
- Stockert, R.J., Kressner, M.S., Collins, J.C., Sternlieb, I., and Morell, A.G. (1982). IgA interaction with the asialoglycoprotein receptor. *Pnas* 79, 6229–6231.
- Strous, G.J., Kerkhof, P.V., and Berger, E.G. (1988). In vitro biosynthesis of two human galactosyltransferase polypeptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151, 314–319.

- Suzuki, T., Kawaguchi, A., Ainai, A., Tamura, S.-I., Ito, R., Multihartina, P., Setiawaty, V., Pangesti, K.N.A., Odagiri, T., Tashiro, M., et al. (2015). Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. *Pnas* *112*, 7809–7814.
- Tabarani, G., Thépaut, M., Stroebel, D., Ebel, C., Vivès, C., Vachette, P., Durand, D., and Fieschi, F. (2009). DC-SIGN neck domain is a pH-sensor controlling oligomerization: SAXS and hydrodynamic studies of extracellular domain. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 21229–21240.
- Takagaki, K., Satoh, K., Honda, S.-I., and Shibuya, A. (2013). Molecular characterization of the dimer formation of Fc α / μ receptor (CD351). *Molecular Immunology* *56*, 23–27.
- Tamouza, H., Chemouny, J.M., Raskova Kafkova, L., Berthelot, L., Flamant, M., Demion, M., Mesnard, L., Paubelle, E., Walker, F., Julian, B.A., et al. (2012a). The IgA1 immune complex-mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy. *Kidney Int.* *82*, 1284–1296.
- Tamouza, H., Chemouny, J.M., Raskova Kafkova, L., Berthelot, L., Flamant, M., Demion, M., Mesnard, L., Paubelle, E., Walker, F., Julian, B.A., et al. (2012b). The IgA1 immune complex-mediated activation of the MAPK/ERK kinase pathway in mesangial cells is associated with glomerular damage in IgA nephropathy. *Kidney Int.* *82*, 1284–1296.
- Tanaka, A., Iwase, H., Hiki, Y., Kokubo, T., Ishii-Karakasa, I., Toma, K., Kobayashi, Y., and Hotta, K. (1998). Evidence for a site-specific fucosylation of N-linked oligosaccharide of immunoglobulin A1 from normal human serum. *Glycoconj. J.* *15*, 995–1000.
- Taylor, M.E., Bezouska, K., and Drickamer, K. (1992). Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor. *Journal of Biological Chemistry* *267*, 1719–1726.
- Teasdale, R.D., Matheson, F., and Gleeson, P.A. (1994). Post-translational modifications distinguish cell surface from Golgi-retained beta 1,4 galactosyltransferase molecules. Golgi localization involves active retention. *Glycobiology* *4*, 917–928.
- Thiemann, S., and Baum, L.G. (2016). Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do? *Annu. Rev. Immunol.* *34*, 243–264.
- Tissandie, E., Morelle, W., Berthelot, L., Vrtovnik, F., Daugas, E., Walker, F., Lebrec, D., Trawalé, J.-M., Francoz, C., Durand, F., et al. (2011). Both IgA nephropathy and alcoholic cirrhosis feature abnormally glycosylated IgA1 and soluble CD89-IgA and IgG-IgA complexes: common mechanisms for distinct diseases. *Kidney Int.* *80*, 1352–1363.
- Tomana, M., Mestecky, J., and Niedermeier, W. (1972). Studies on human secretory immunoglobulin A. IV. Carbohydrate composition. *J. Immunol.* *108*, 1631–1636.
- Tomana, M., Zikan, J., Kulhavy, R., Bennett, J.C., and Mestecky, J. (1993a). Interactions of galactosyltransferase with serum and secretory immunoglobulins and their component chains. *Molecular Immunology* *30*, 277–286.
- Tomana, M., Zikan, J., Moldoveanu, Z., Kulhavy, R., Bennett, J.C., and Mestecky, J. (1993b). Interactions of cell-surface galactosyltransferase with immunoglobulins. *Molecular Immunology* *30*, 265–275.
- Tomana, M., and Kulhavy, R. (1988). Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin a by human liver. *Gastroenterology* *94*, 762–770.
- Torano, A., and Putnam, F.W. (1978). Complete amino acid sequence of the alpha 2 heavy chain of a human IgA2 immunoglobulin of the A2m (2) allotype.
- Tramier, M., Piolot, T., Gautier, I., Mignotte, V., Coppey, J., Kemnitz, K., Durieux, C., and Coppey-Moisan, M. (2003). Homo-FRET versus hetero-FRET to probe homodimers in living cells. *Meth. Enzymol.* *360*, 580–597.
- Tsuzukida, Y., Wang, C.C., and Putnam, F.W. (1979). Structure of the A2m (1) allotype of human IgA - a recombinant molecule. *Pnas* *76*, 1104–1108.

- Tucker, P.W., Slightom, J.L., and Blattner, F.R. (1981). Mouse IgA heavy chain gene sequence: implications for evolution of immunoglobulin hinge axons. *Pnas* 78, 7684–7688.
- Uren, T.K., Wijburg, O.L.C., Simmons, C., Johansen, F.E., Brandtzaeg, P., and Strugnell, R.A. (2005). Vaccine-induced protection against gastrointestinal bacterial infections in the absence of secretory antibodies. *Eur. J. Immunol.* 35, 180–188.
- Urny, J., Hermans-Borgmeyer, I., and Schaller, H.C. (2006). Cell-surface expression of a new splice variant of the mouse signal peptide peptidase. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1759, 159–165.
- Vaerman, J.P., Langendries, A., and Vander Maelen, C. (1995). Homogenous IgA monomers, dimers, trimers and tetramers from the same IgA myeloma serum. *Immunol. Invest.* 24, 631–641.
- Vaerman, J.P., Langendries, A., Giffroy, D., Brandtzaeg, P., and Kobayashi, K. (1998). Lack of SC/pIgR-mediated epithelial transport of a human polymeric IgA devoid of J chain: in vitro and in vivo studies. *Immunology* 95, 90–96.
- Vajdy, M., Kosco-Vilbois, M.H., Kopf, M., Köhler, G., and Lycke, N. (1995). Impaired mucosal immune responses in interleukin 4-targeted mice. *J. Exp. Med.* 181, 41–53.
- van Egmond, M., van Garderen, E., van Spriel, A.B., Damen, C.A., van Amersfoort, E.S., van Zandbergen, G., van Hattum, J., Kuiper, J., and van de Winkel, J.G. (2000). Fc α RI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med* 6, 680–685.
- van Spriel, A.B., Leusen, J.H.W., Vile, H., and van de Winkel, J.G.J. (2002). Mac-1 (CD11b/CD18) as Accessory Molecule for Fc R (CD89) Binding of IgA. *J. Immunol.* 169, 3831–3836.
- van Zandbergen, G., Westerhuis, R., Mohamad, N.K., van de Winkel, J.G., Daha, M.R., and van Kooten, C. (1999). Crosslinking of the human Fc receptor for IgA (Fc α RI/CD89) triggers FcR gamma-chain-dependent shedding of soluble CD89. *J. Immunol.* 163, 5806–5812.
- Vereb, G., Nagy, P., and Szöllosi, J. (2011). Flow cytometric FRET analysis of protein interaction. *Methods Mol. Biol.* 699, 371–392.
- Vogt, T.M., Blackwell, A.D., Giannetti, A.M., Bjorkman, P.J., and Enns, C.A. (2003). Heterotypic interactions between transferrin receptor and transferrin receptor 2. *Blood* 101, 2008–2014.
- Wang, B., Heath-Engel, H., Zhang, D., Nguyen, N., Thomas, D.Y., Hanrahan, J.W., and Shore, G.C. (2008). BAP31 Interacts with Sec61 Translocons and Promotes Retrotranslocation of CFTR Δ F508 via the Derlin-1 Complex. *Cell* 133, 1080–1092.
- Wang, R., Fu, Y., Zhao, Q., Pan, L., and Zhang, W. (2009). Human Fc α / μ R and pIgR distribute differently in intestinal tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381, 148–152.
- Wang, T., Birsoy, K., Hughes, N.W., Krupczak, K.M., Post, Y., Wei, J.J., Lander, E.S., and Sabatini, D.M. (2015). Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science* 350, 1096–1101.
- Weihofen, A., Binns, K., Lemberg, M.K., Ashman, K., and Martoglio, B. (2002). Identification of signal peptide peptidase, a presenilin-type aspartic protease. *Science* 296, 2215–2218.
- Wells, H.G., and Osborne, T.B. (1911). Accept Terms and Conditions on JSTOR. *J. Infect. Dis.*
- Weltzin, R., Lucia-Jandris, P., Michetti, P., Fields, B.N., Kraehenbuhl, J.P., and Neutra, M.R. (1989). Binding and transepithelial transport of immunoglobulins by intestinal M cells: demonstration using monoclonal IgA antibodies against enteric viral proteins. *J. Cell Biol.* 108, 1673–1685.
- Williams, R.C., and Gibbons, R.J. (1972). Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science* 177, 697–699.
- Wilson, T.J., Fuchs, A., and Colonna, M. (2012). Cutting Edge: Human FcRL4 and FcRL5 Are Receptors for IgA and IgG. *J. Immunol.* 188, 4741–4745.

- Wilson, T.J., Gilfillan, S., and Colonna, M. (2010). Fc receptor-like A associates with intracellular IgG and IgM but is dispensable for antigen-specific immune responses. *The Journal of Immunology* 185, 2960–2967.
- Wines, B.D., Hulett, M.D., Jamieson, G.P., Trist, H.M., Spratt, J.M., and Hogarth, P.M. (1999). Identification of residues in the first domain of human Fc alpha receptor essential for interaction with IgA. *J. Immunol.* 162, 2146–2153.
- Wines, B.D., Sardjono, C.T., Trist, H.H., Lay, C.S., and Hogarth, P.M. (2001). The interaction of Fc alpha RI with IgA and its implications for ligand binding by immunoreceptors of the leukocyte receptor cluster. *J. Immunol.* 166, 1781–1789.
- Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., and Mann, M. (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods* 6, 359–362.
- Wold, A.E., Mestecky, J., Tomana, M., Kobata, A., Ohbayashi, H., Endo, T., and Edén, C.S. (1990). Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for Escherichia coli type 1 fimbrial lectin. *Infect. Immun.* 58, 3073–3077.
- Yamaguchi, N., and Fukuda, M.N. (1995). Golgi retention mechanism of beta-1,4-galactosyltransferase. Membrane-spanning domain-dependent homodimerization and association with alpha- and beta-tubulins. *Journal of Biological Chemistry* 270, 12170–12176.
- Yang, L., Shen, L., Shao, Y., Zhao, Q., and Zhang, W. (2009). Cytoplasmic domain of human Fc alpha/mu receptor is required for ligand internalization. *Cell. Immunol.* 258, 78–82.
- Yoo, E.M., Trinh, K.R., Lim, H., Wims, L.A., and Morrison, S.L. (2011). Characterization of IgA and IgM binding and internalization by surface-expressed human Fc alpha/mu receptor. *Molecular Immunology* 48, 1818–1826.
- Yoshimi, R., Chang, T.-H., Wang, H., Atsumi, T., Morse, H.C., and Ozato, K. (2009). Gene Disruption Study Reveals a Nonredundant Role for TRIM21/Ro52 in NF- κ B-Dependent Cytokine Expression in Fibroblasts. *J. Immunol.* 182, 7527–7538.
- Zahn, C., Kaup, M., Fluhrer, R., and Fuchs, H. (2013). The transferrin receptor-1 membrane stub undergoes intramembrane proteolysis by signal peptide peptidase-like 2b. *FEBS Journal* 280, 1653–1663.
- Zen, K., Utech, M., Liu, Y., Soto, I., Nusrat, A., and Parkos, C.A. (2004). Association of BAP31 with CD11b/CD18. Potential role in intracellular trafficking of CD11b/CD18 in neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* 279, 44924–44930.
- Zhang, J.R., Mostov, K.E., Lamm, M.E., Nanno, M., Shimida, S., Ohwaki, M., and Tuomanen, E. (2000). The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* 102, 827–837.
- Zhang, R.-G., Scott, D.L., Westbrook, M.L., Nance, S., Spangler, B.D., Shipley, G.G., and Westbrook, E.M. (1995). The Three-dimensional Crystal Structure of Cholera Toxin. *Journal of Molecular Biology* 251, 563–573.
- Zhuravleva, M.A., Trandem, K., and Sun, P.D. (2008). Structural implications of Siglec-5-mediated sialoglycan recognition. *Journal of Molecular Biology* 375, 437–447.

VII. Annexes

Figure supplémentaire 1

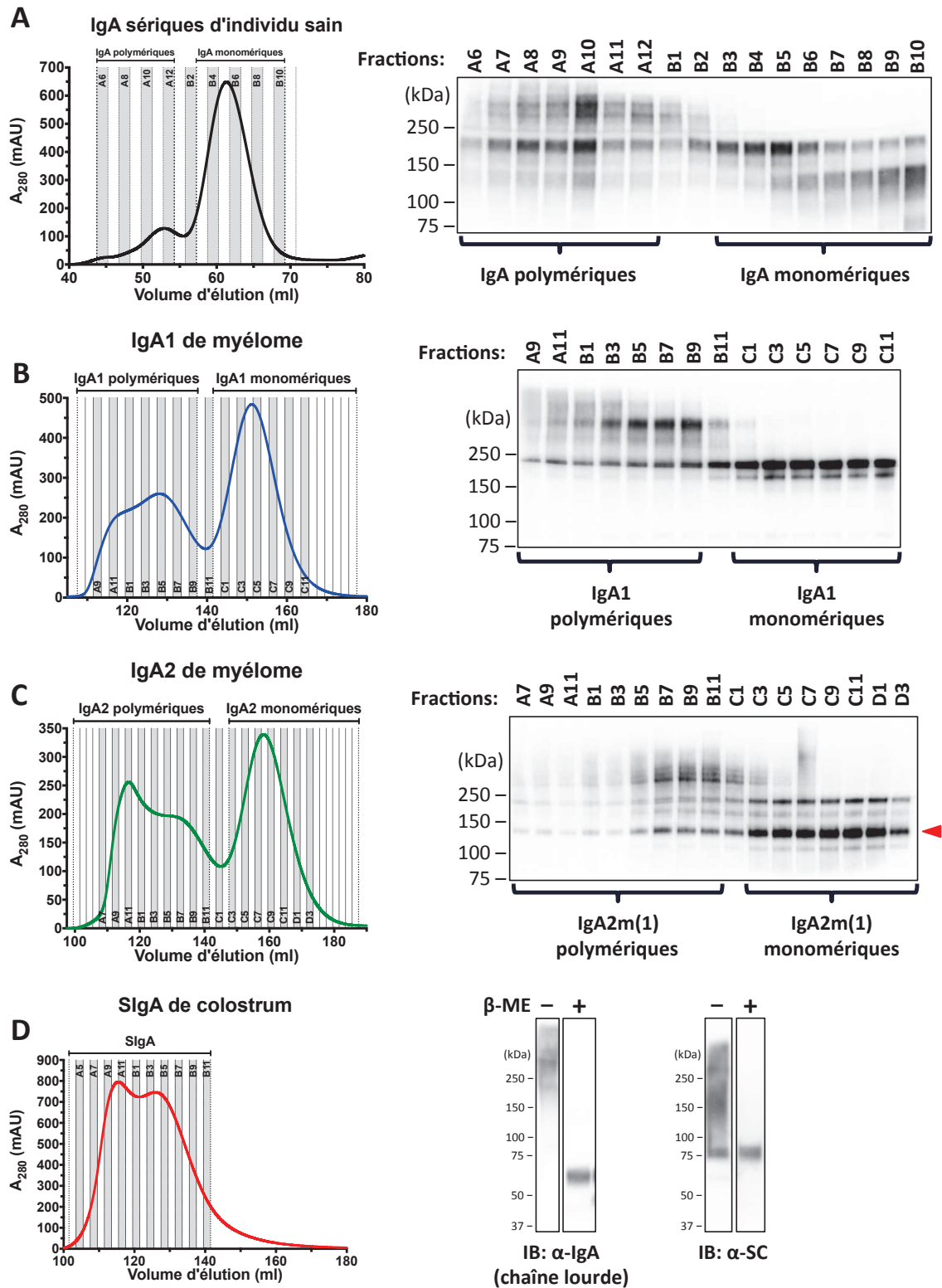


Figure supplémentaire 1 : Séparation des différentes formes d'IgA à partir des échantillons commerciaux. (A, B, C) Les IgA sériques d'individus sains, ainsi que les IgA1 et IgA2 de myélome ont été séparées par chromatographie d'exclusion stérique (profil d'élution à gauche) et les fractions contenant les IgA monomériques d'une part, et les IgA polymériques d'autre part ont été regroupées (regroupements indiqués par les mentions « IgA polymériques » et « IgA monomériques » au-dessus des graphiques). Pour chaque échantillon d'IgA, 500 ng des différentes fractions ont été mis à migrer en SDS-PAGE en conditions dénaturantes non réductrices, et la membrane a été révélée par un anticorps anti-IgA (chaîne lourde) afin de déterminer les fractions comportant des IgA monomériques et/ou polymériques. (C) À droite, la flèche rouge indique la présence de dimères de chaînes lourdes, permettant de préciser que cet échantillon d'IgA2 est d'allotype IgA2m(1). (D) Les SIgA issues de colostrum ont été séparées par chromatographie d'exclusion stérique (profil d'élution à gauche) et les fractions A4 à B11 ont été regroupées. La chaîne lourde d'IgA et la pièce sécrétoire (SC) ont été révélées après migration en SDS-PAGE en présence ou non de β-mercaptoéthanol (β-ME), à l'aide d'anticorps spécifiques.

Figure supplémentaire 2

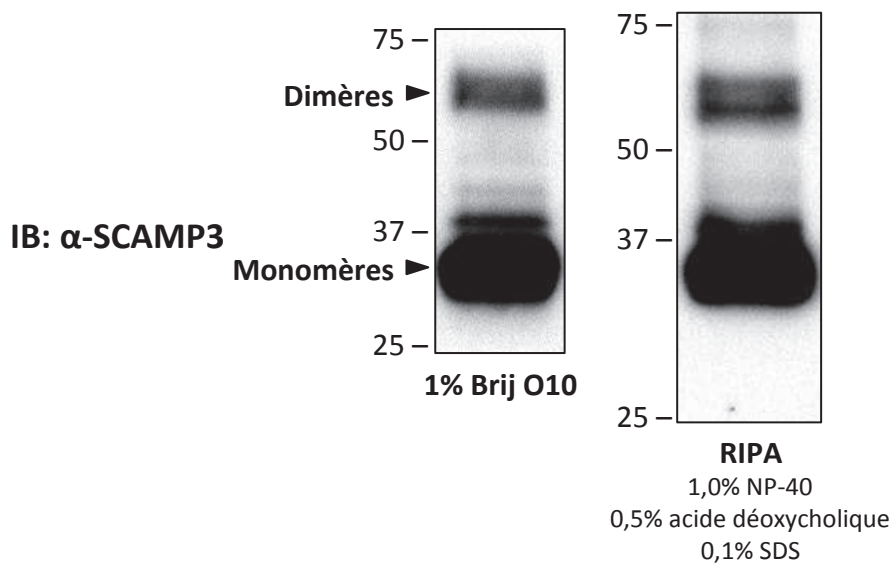


Figure supplémentaire 2 : SCAMP3 semble former des dimères stables dans les cellules Caco-2 TC7. Les cellules Caco-2 TC7 ont été lysées en tampon de lyse contenant 1% de Brij O10 ou en tampon RIPA et 20 μ g de protéines ont été mis à migrer en SDS-PAGE en conditions dénaturantes et réductrices (5% β -ME). La révélation des membranes à l'aide d'un anticorps spécifique de SCAMP3 indique la présence de monomères (~35 kDa) et de dimères (60 – 70 kDa) absents sur les cellules SCAMP3^{KO} (non montré).

Résumé

Parmi les cinq isotypes d'anticorps présents chez l'Homme, les immunoglobulines A (IgA) prédominent dans les muqueuses. Les IgA sont produites dans le chorion sous forme majoritairement polymérique (pIgA) et sécrétées dans la lumière des muqueuses. Leur transport trans-épithélial est assuré par le récepteur aux immunoglobulines polymériques (pIgR), exprimé au pôle basal des épithéliums. Les pIgA ainsi sécrétées conservent le domaine extracellulaire du pIgR et sont appelées IgA sécrétoires (SIgA).

Une fonction essentielle des SIgA intestinales est de maintenir microorganismes et antigènes alimentaires dans la lumière des muqueuses afin d'empêcher leur pénétration dans l'organisme. Néanmoins, la transcytose inverse des SIgA couplées à des bactéries a été décrite dans les plaques de Peyer où elle participe à la génération de la réponse immune contre ces bactéries. En outre, les travaux passés du laboratoire ont suggéré que le récepteur de la transferrine (CD71), surexprimé au pôle apical des entérocytes chez les patients cœliaques, interagit avec les SIgA couplées à des peptides de gliadines et permet leur transcytose inverse à travers l'épithélium intestinal.

Ce travail de thèse a eu pour objectif de mieux caractériser l'interaction SIgA-CD71 dans les entérocytes humains.

Dans un premier temps, nous avons utilisé la technologie CRISPR-Cas9 pour générer une lignée cellulaire intestinale humaine (Caco-2 TC7) dépourvue du récepteur CD71 (CD71^{KO}). De manière inattendue, nous n'avons observé aucune altération de la fixation des SIgA sur les cellules Caco-2 CD71^{KO}. Ce résultat nous a amenés à réévaluer le rôle de CD71 comme récepteur aux SIgA.

Dans un second temps, nous avons vérifié et confirmé que les SIgA interagissent avec CD71, mais nous avons montré que cette interaction est indirecte. Nous avons ensuite criblé les récepteurs aux IgA déjà décrits dans la littérature et montré qu'aucun n'est responsable de la fixation des SIgA à la surface des cellules Caco-2 TC7. Ces résultats nous ont amenés à chercher le(s) autre(s) partenaire(s) du complexe SIgA-CD71. Par immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse, nous avons identifié les protéines Secretory Carrier Membrane Protein 3 (SCAMP3), B-Cell Receptor-Associated Protein 31 (BCAP31) et Histocompatibility minor 13 (HM13) comme membres du complexe SIgA-CD71. En nous appuyant à nouveau sur la technologie CRISPR-Cas9, nous avons montré qu'aucun de ses partenaires n'interagit directement avec les SIgA. Néanmoins, nos résultats suggèrent que SCAMP3 est nécessaire à l'oligomérisation de surface des complexes de fixation des SIgA. Enfin, l'internalisation des SIgA n'est pas altérée par l'absence de chacun des partenaires du complexe, suggérant que leur rôle advient durant le transport trans-épithélial des SIgA.

L'ensemble de nos travaux montre que les SIgA interagissent avec l'épithélium intestinal via un complexe protéique composé d'au moins cinq membres : CD71, SCAMP3, BCAP31, HM13 et le(s) récepteur(s) inconnu(s) aux SIgA. Ces résultats complètent les travaux antérieurs sur le rôle physiopathologique des SIgA dans la maladie cœliaque et contribuent à souligner la complexité des interactions entre IgA et entérocytes. Une question importante sera d'identifier le(s) récepteur(s) aux SIgA et de déterminer le rôle des partenaires identifiés dans la transcytose inverse des SIgA par l'entérocyte.

Mots clés : Immunoglobuline A sécrétoire, SIgA, CD71, SCAMP3, BCAP31, HM13, entérocyte