



UNIL | Université de Lausanne

Unicentre

CH-1015 Lausanne

<http://serval.unil.ch>

Year : 2016

Retrotransport of secretory IgA by the human Transferrin receptor through intestinal epithelial cells

Delaloix Margaux-Sarah

Delaloix Margaux-Sarah, 2016, Retrotransport of secretory IgA by the human Transferrin receptor through intestinal epithelial cells

Originally published at : Thesis, University of Lausanne

Posted at the University of Lausanne Open Archive <http://serval.unil.ch>

Document URN : urn:nbn:ch:serval-BIB_19D7D08192608

Droits d'auteur

L'Université de Lausanne attire expressément l'attention des utilisateurs sur le fait que tous les documents publiés dans l'Archive SERVAL sont protégés par le droit d'auteur, conformément à la loi fédérale sur le droit d'auteur et les droits voisins (LDA). A ce titre, il est indispensable d'obtenir le consentement préalable de l'auteur et/ou de l'éditeur avant toute utilisation d'une oeuvre ou d'une partie d'une oeuvre ne relevant pas d'une utilisation à des fins personnelles au sens de la LDA (art. 19, al. 1 lettre a). A défaut, tout contrevenant s'expose aux sanctions prévues par cette loi. Nous déclinons toute responsabilité en la matière.

Copyright

The University of Lausanne expressly draws the attention of users to the fact that all documents published in the SERVAL Archive are protected by copyright in accordance with federal law on copyright and similar rights (LDA). Accordingly it is indispensable to obtain prior consent from the author and/or publisher before any use of a work or part of a work for purposes other than personal use within the meaning of LDA (art. 19, para. 1 letter a). Failure to do so will expose offenders to the sanctions laid down by this law. We accept no liability in this respect.



UNIL | Université de Lausanne

Faculté de biologie
et de médecine

Retrotransport of secretory IgA by the human Transferrin receptor through intestinal epithelial cells

Rapport de thèse de doctorat ès sciences de la vie (PhD)

Conduite au sein du Département de Médecine, Service Immunologie et d'Allergie
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV)

Présentée à la Faculté de Biologie et de Médecine
de l'Université de Lausanne

Par

Margaux-Sarah DELALOIX

Diplômée d'un Master 2 STS Mention Biosanté de l'Université Paul Sabatier, Toulouse,
France

Jury

Prof. Nadia CHABANE, Présidente
Dr Blaise CORTESY, Directeur de thèse
Prof. François SPERTINI, Expert CHUV-UNIL
Dr Stéphane PAUL, Expert extérieur

Lausanne, Novembre 2016

Imprimatur

Vu le rapport présenté par le jury d'examen, composé de

<i>Président · e</i>	Madame Prof. Nadia Chabanne
<i>Directeur · rice de thèse</i>	Monsieur Dr Blaise Corthésy
<i>Experts · es</i>	Monsieur Prof. François Spertini
	Monsieur Dr Stéphane Paul

le Conseil de Faculté autorise l'impression de la thèse de

Madame Margaux Delaloix

Master 2 STS Mention Biosanté de l' Université Paul Sabatier, Toulouse, France

intitulée

**Retrotransport of secretory IgA by the human Transferrin receptor
through intestinal epithelial cells**

Lausanne, le 11 novembre 2016

pour le Doyen
de la Faculté de biologie et de médecine

Prof. Nadia Chabanne



Table des matières

Table des matières.....	3
Remerciements.....	5
Résumé destiné au large public.....	6
Résumé.....	8
Abstract.....	10
Abréviations.....	12
Unités de mesure.....	17
Introduction.....	18
I. Le tractus gastro-intestinal.....	18
A. Généralités.....	18
B. Anatomie du tractus gastro-intestinal.....	19
C. Les fonctions intestinales: balance entre digestion et immuno-surveillance.....	20
II. La muqueuse intestinale.....	22
A. Structure et organisation de la muqueuse intestinale.....	22
B. Les cellules épithéliales intestinales, rôle de barrière.....	27
III. L'immunité des muqueuses.....	28
A. Structure et organisation de la fonction barrière intestinale.....	28
B. Muqueuse intestinale : un rôle central dans le système immunitaire.....	30
C. Muqueuse intestinale : équilibre entre tolérance et immunité l'homéostasie.....	34
IV. Immunoglobuline A de sécrétion.....	40
A. Généralités.....	40
B. SIgA, rôle central dans la protection intestinale.....	42
C. Les récepteurs aux IgA/SIgA.....	44
D. Le récepteur à la transferrine, nouveau récepteur aux IgA.....	46
V. Etude sur le transport anormal des IgA au travers des épithéliums dans le cas de maladies inflammatoires rénales et intestinales.....	50
A. Cas des néphropathies aux IgA.....	50
B. Cas des maladies céliaques actives.....	52
C. Etablissement d'un rétrotransport des IgA au travers des épithéliums.....	54

Intérêt du projet	56
Matériel biologique.....	58
I. Molécule de l'IgA de sécrétion	58
I. Molécule de transferrine	59
II. Lignée de cellules épithéliales intestinales : Caco-2.....	60
VI. Extinction génique/silence de l'expression du hTfR1.....	62
VII. Expression du TfR1 humain par des cellules CHO	62
VIII. Liste des principaux réactifs	63
Chapitre I : caractérisation de l'interaction entre la SIgA et le hTfR1 exprimé à la surface des cellules Caco-2	65
I. Présentation.....	65
II. Procédures expérimentales et résultats.....	66
III. Discussion.....	73
Chapitre II : identification du rôle de la transferrine dans la liaison SIgA-hTfR1.....	75
I. Présentation.....	75
II. Procédures expérimentales et résultats.....	75
III. Discussion.....	81
Chapitre III : rétrotransport de la SIgA au travers d'un modèle <i>in vitro</i> des cellules épithéliales intestinales polarisées	83
I. Présentation.....	83
II. Procédures expérimentales et résultats.....	83
III. Discussion.....	85
Chapitre IV : aspect immunologique du rétrotransport des SIgA au travers d'un modèle <i>in vitro</i> des cellules épithéliales intestinales polarisées	88
I. Présentation.....	88
II. Procédures expérimentales et résultats.....	89
III. Discussion.....	91
Discussion – Conclusion - Perspectives.....	93
Références	105
Appendice	111

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, le Dr Blaise CORTHESEY de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et permis de réaliser ce travail de thèse. Je tiens tout particulièrement à le remercier pour son encadrement, sa disponibilité, ses conseils, sa patience tout le long de ces trois ans.

Je tiens à remercier également les membres de mon comité de thèse : le Prof. François SPERTINI et le Dr Stéphane PAUL pour avoir pris sur leur précieux temps de travail pour lire ce mémoire et de leur implication dans la validation de mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement ma Présidente le Prof. Nadia CHABANE d'avoir acceptée la présidence de mon jury et de son implication dans cette tâche.

Je souhaite remercier le responsable de la plateforme de microscopie du CHUV le Dr Jean-Yves CHATON, ainsi que ces collaborateurs Luigi BOSSO et Yannick KREMPP pour leurs précieux conseils et soutiens techniques. Je souhaite remercier Sintia WINKLER pour ces conseils pour la compréhension de la cytométrie de flux.

Un grand merci à mes collègues: le Dr Régime AUDRAN, le Dr Gilles BIOLEY, Kristi GEIGER, le Dr Lerisa GOVENDER, le Dr Stéphanie LONGET, Carole MAYOR, le Dr Josip MIKULIC, Justine MONNERAT, Anne-Christine THIERRY ainsi que les étudiants et collaborateurs qui ont fait un passage plus ou moins long au laboratoire. Merci pour leur aide, et leur bonne humeur dans le cadre professionnel et pour les moments moins professionnels autour d'un café ou de la pause déjeuner... Je tiens à remercier les collaborateurs du laboratoire de l'institut Ludwig avec qui nous avons partagé les laboratoires du temps de l'HO et aux collaborateurs du CLE-D2. Merci à tous.

Pour clore avec ces remerciements, je tiens à remercier mes parents qui m'ont soutenus et appris à aller toujours plus loin malgré la distance qui nous sépare. Un grand merci à eux ainsi qu'à toute ma famille, mes proches et amis d'un peu partout en France, de Lausanne, en Europe qui ont été présents pour les moments de joie, de fête et ceux un peu plus difficiles de la vie. Merci à ma cocotte, mon loulou, mes choupis, ma choupinette, mes poulettes, mes froufrous et j'en passe...

«La force ne vient pas des capacités physiques; elle vient d'une indomptable volonté.» Mahatma GANDHI

Résumé destiné au large public

Le tractus gastro-intestinal est considéré depuis peu comme le deuxième cerveau humain. En effet, l'appareil digestif est le lieu d'assimilation de la nourriture. Il est perpétuellement exposé à des substances extérieures alimentaires, bactéries, toxines et virus. Il constitue une barrière de protection appelée muqueuse qui est composée de cellules épithéliales qui filtrent les substances ingérées. Cette muqueuse est associée à des mécanismes de protection mécaniques, chimiques et immunologiques plus ou moins spécifiques de type cellulaire et production d'anticorps. L'immunoglobuline A est l'anticorps le plus abondant dans les sécrétions sous forme de sécrétion nommée SIgA. Elle est produite dans le compartiment interne stérile sous-jacent de la muqueuse intestinale appelée lamina propria. Elle est ensuite conduite dans la lumière intestinale. La SIgA constitue une première ligne de défense contre les microorganismes entériques pathogènes qui prévient le contact avec la muqueuse.

Dans le cas des maladies inflammatoires intestinales, la SIgA est reconduite dans la lamina propria sous forme de complexes avec des peptides alimentaires et induit une forte réaction inflammatoire invalidant l'épithélium intestinal. Ce retour dans la lamina propria est produit par le récepteur à la transferrine. Le but de ce travail de thèse est de déterminer dans les conditions de l'homéostasie (absence de pathogènes), si le mécanisme de rétrotransport des SIgA se produit par l'intermédiaire du récepteur à la transferrine. Ce rétrotransport constitue un nouveau mode de séquestration des pathogènes et d'induction du système immunitaire.

Un modèle de cellules humaines épithéliales intestinales nommées Caco-2 a permis de reproduire l'interaction entre la SIgA reconstituée *in vitro* et le récepteur de la transferrine exprimé à la surface de ces cellules et de mimer la barrière intestinale. Une première série d'expériences ont mis en évidence une interaction forte entre la SIgA et le récepteur à la transferrine. Ensuite, les cellules Caco-2 ont été cultivées dans un système de culture permettant de reproduire la barrière intestinale, c'est-à-dire un modèle de cellules polarisées qui conduit le courant électrique. Des essais de rétrotransport de la SIgA ont été effectués sur les cellules Caco-2 polarisées. La SIgA a été déposée à la surface apicale des cellules polarisées pendant 2h à 37°C. Ces derniers tests ont montré l'établissement d'un

transport des SIgA au travers des cellules depuis le compartiment apical représentant la lumière intestinale jusqu'au milieu basolatéral qui mime la lamina propria.

Afin de déterminer la capacité d'induction du système immunitaire par ce rétrotransport des SIgA par le récepteur à la transferrine, la SIgA reconstituée *in vitro* reconnaît la bactérie *Shigella flexneri*. Les complexes SIgA-*Shigella flexneri* sont déposés sur les cellules polarisées à la surface apicale. Après 2h à 37°C, la bactérie est retrouvée dans le milieu basolatéral ce qui montre que la bactérie est transportée avec la SIgA via le récepteur à la transferrine au travers des cellules polarisées.

En conclusion, dans les conditions de l'homéostasie, la SIgA est transportée au travers des cellules épithéliales intestinales polarisées via le récepteur à la transferrine sous forme seule ou de complexes avec une bactérie. Ce mécanisme via le récepteur à la transferrine constitue un nouveau mécanisme de présentation des antigènes aux cellules immunitaires dans la lamina propria et d'induction du système immunitaire.

Résumé

Le tractus gastro-intestinal est l'interface majeure du corps humain avec le milieu extérieur. Cette interface appelée muqueuse régule les échanges avec le milieu extérieur et interne du corps. Il s'établit un système de communication entre tous les partenaires qui constituent la barrière intestinale. C'est le site de nombreuses agressions physiques, chimiques et biologiques comme les bactéries, les toxines et les virus. La muqueuse est équipée d'un ensemble de mécanismes de protection de type physique, chimique, mécanique et immunologique. Cette protection prévient des infections en neutralisant l'adhésion des pathogènes avec la muqueuse, et assure l'intégrité de la barrière et le maintien de la symbiose avec la flore commensale intestinale. La muqueuse est composée essentiellement de cellules épithéliales intestinales qui sont en étroite collaboration avec le système immunitaire qui se localise dans les tissus lymphoïdes sous jacents à la monocouche épithéliale afin d'induire une réponse immunitaire efficace. En plus de cette barrière physique, il y a des sécrétions de l'immunoglobuline A sous forme de SIgA qui est l'acteur principal de la neutralisation des pathogènes dans la lumière intestinale par exclusion immunitaire.

L'immunoglobuline A constitue une première ligne de défense. En effet, cet anticorps est produit dans la lamina propria sous forme polymérique puis est conduit dans la lumière intestinale par le récepteur aux immunoglobulines polymériques au travers des cellules épithéliales intestinales. A la surface apicale des cellules, l'immunoglobuline A est libérée sous forme complexée avec le domaine extracellulaire du récepteur afin de former la SIgA. Une fois libérée dans la lumière intestinale, elle reconnaît les antigènes et les pathogènes pour les neutraliser.

Dans le cas des maladies céliaques actives, il a été démontré un transport anormal des SIgA associées à des peptides alimentaires de type gliadine, au travers des cellules épithéliales intestinales par le récepteur à la transferrine. Le transport anormal des pIgA est observé dans le cas des néphropathies aux IgA et provoque la déposition des pIgA dans les cellules mésangiales. Le but de ce travail de thèse était de déterminer si le rétrotransport des SIgA par le récepteur à la transferrine s'établit dans le contexte du « steady state » dans le but de présenter un antigène aux cellules dendritiques résidentes de la lamina propria et d'induire

une réponse immunitaire. Afin de mimer de manière *in vitro* les interactions entre la SIgA et les cellules épithéliales intestinales, il a été développé deux modèles d'étude : un premier non polarisé pour déterminer les interactions de surface et un second polarisé pour mimer le rétrotransport de la SIgA à partir de la lignée humaine de cellules épithéliales intestinales Caco-2.

Les résultats ont montré à partir du modèle en suspension l'établissement d'une interaction forte entre la SIgA et le récepteur à la transferrine exprimé à la surface des cellules Caco-2. Il a été prouvé que la transferrine (présente dans la lumière intestinale) a un activateur de l'interaction entre son récepteur et la SIgA. A partir du modèle polarisé, il a été montré un rétrotransport rapide de la SIgA sous forme intacte au travers de la monocouche cellulaire. De plus, la transferrine favorise le rétrotransport des SIgA. Afin de mettre en évidence la fonctionnalité de ce rétrotransport, il a été effectué des essais de transport avec des SIgA associées à une bactérie. En effet, la SIgA reconstituée *in vitro* est spécifique de *Shigella flexneri*. Dans les mêmes conditions de culture que les essais de rétrotransport de la SIgA, il a été observé un transport (apical-basolatéral) efficace de la bactérie intacte après une incubation de 2h à 37°C.

En conclusion, le récepteur à la transferrine permet le rétrotransport des SIgA seules ou associées à un antigène dans la lamina propria. En perspectives, il serait intéressant de voir si les complexes SIgA-bactérie sont libérés de manière intacte dans le milieu basolatéral afin de déterminer s'il y a présentation des antigènes aux cellules dendritiques qui pourraient être co-cultivées dans le milieu basolatéral des Snapwell et l'induction d'une réponse immunitaire.

Abstract

The gastrointestinal tract is the largest human body interface with the external environment. This interface called mucosa is the site of many exchanges between the body internal cavity and the environment. The intestinal barrier is composed by various partners, which constitute a real communication system with the environment. It represents too a site where occurs a lot of physical, chemical, and biological aggressions as toxins, bacteria and virus. The mucosa is associated to the immune system in order to ensure the protection against the pathogens. There are different protection mechanisms such as physical, chemical, and immunological, in order to prevent the intestinal barrier neutralizing the pathogen, to ensure the integrity of the barrier and to maintain the symbiosis with the commensal. The mucosa is composed essentially of intestinal epithelial cells, which are associated to lymphoid nodes localized into the lamina propria (under the mucosa). This collaboration allows inducing the specific immune response against the invading pathogens. SIgA secreted into the lumen represents the first protective barrier against enteric pathogens. It makes the immune exclusion in order to prevent the pathogen's adhesion to the barrier.

Immunoglobulin A which produces into the lamina propria by resident plasma cells into a polymeric form, is captured by the polymeric immunoglobulin receptor. It releases in the lumen, associated with the extracellular domain of the receptor in order to form the secretory form, which acts the immune exclusion.

In persons suffering of active celiac disease, it was showed an abnormal SIgA retrotransport across intestinal epithelial cells by the Transferrin receptor. This SIgA retrotransport is observed into the mesengial of persons suffering of IgA nephropathies. The Transferrin receptor is responsible of IgA deposition in the mesengial. The aim of this thesis project was to demonstrate in a steady state context the establishment of this transport in order to induce a specific immune response against the transported antigen. To attest about this SIgA retro-transport, we developed two *in vitro* models from human intestinal epithelial Caco-2 cells. The first model with a suspension of Caco-2 cells was established to study the interaction between SIgA and the cell receptor. The second model with polarized Caco-2

cells allows to mimic the intestinal barrier and to reconstitute the SIgA retro-transport across it.

The results affirm that SIgA binds to the Transferrin receptor expressed by Caco-2 cells. The Transferrin is an activator of the interaction between its receptor and SIgA. From the polarized model, we have attested about an establishment of SIgA retrotransport across the polarized monolayer. SIgA is delivered into the basolateral medium in an intact form and Transferrin has a helper role because it favors the retrotransport. To determine on the immunological aspect of the SIgA retrotransport by the Transferrin receptor, retrotransport assays were performed with immune complexes. SIgA is specific to *Shigella flexneri*.

In conclusion, the Transferrin receptor allows the SIgA (alone or associated to the antigen) retrotransport across an intestinal epithelial polarized cell monolayer. In perspectives, it will be interesting to determine if the retrotransported immune complexes are in an intact form in order to present the antigen to the dendritic cells (which we can find in co-culture on the basolateral surface of the polarized Caco-2 cells) inducing the immune response.

Abréviations

Ac : anticorps

ADCC : antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

ADN/DNA : acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

AID : activation-induced cytidine deaminase

AJ : jonction adhérente

AMP : peptide antimicrobien

APC : cellule présentatrice d'antigène

ApoTf : transferrine non chargée en fer

APRIL : a proliferative inducing ligand

ARN/RNA : acide ribonucléique

ASGP-R : asialoglycoprotein receptor

ATP : adénosine triphosphate

ATPase : adénosine tri-phosphatase

BAFF : B cells activating factor

cDMEM : Dulbecco's-modified Eagle's medium complet

CEI : cellule épithéliale intestinale

CHO : chinese hamster ovaries

cRPMI : Roswell Park Memorial Institute medium complet

CSR : class-switch recombinaison

Cy3 : indocyanine 3

Cy5 : indocyanine 5

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DC : cellule dendritique

DM : desmosome

DMEM : Dulbecco's-modified Eagle's medium

DMT-1 : divalent metal transporter 1

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EEA-1 : early endosome antigen 1

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FcRn : récepteur Fc néonatal

FCS : sérum de vœux foetal

Fc α / μ R : Fc α / μ receptor

Fc α RI : human immunoglobulin A Fc receptor

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FP : fluosphères

G 418 : geneticin

GALT : tissu lymphoïde associé au tractus digestif

GFP : green fluorescent protein

GI : gastro-intestinal

GTPase : guanosine tri-phosphatase

HD-5/6 : défensine humaine 5/6

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HFE : protéine de l'hémochromatose humaine

HoloTf : transferrine riche en fer

ICAM-2/3 : intercellular adhesion molecule 2/3

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

IgA : immunoglobuline A

IL : interleukine

ILF : follicule lymphoïde isolé

IP : immuno-précipitation

IRAK : interleukin-1 receptor-associated kinase

IκB : facteurs d'inhibition de la voie NF-κB

IκK : IκB kinase

JAM : molécule d'adhésion jonctionnelle

JNK : c-Jun N-terminal kinases

LAMP-1 : lysosomal-associated membrane protein 1

LB : lysogeny borth ou Luria Bertani

LP : lamina propria

M : microfold

MALT : tissu lymphoïde associé à une muqueuse

MAMP : molecule associated molecular patterns

MCA : maladies céliaques actives

MCDK : Madin-Barby Canine Kidney

MFI : median fluorescence intensity

MHC I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

MLN : nœud lymphoïde mésentérique

MOI : multiplicity of infection

My88 : myeloid differentiation primary response gene 88

NF- κ B : nuclear factor-kappa B

NLR : nucleotide oligomerization domain receptors

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PAMP : pathogen associated molecular Patterns

PBS : phosphate buffered saline

PE : phycoérythrine

pIgA : polymérique immunoglobuline A

pIgM : polymérique immunoglobuline M

pIgR : récepteur aux immunoglobulines polymériques

PP : plaque de Peyer

PRR : pattern recognition receptor

PVDF : polyvinylidene difluoride

RIP-2 : receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SC : pièce sécrétoire

SDS : sodium dodecyl sulfate

SED : dômes sub-épithéliaux

SIgA : immunoglobuline A de sécrétion

siRNA : petit acide ribonucléique interférant

STEAP-3 : six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3

TAF : TATA binding protein -associated factors

TENT : Tris-Cl - EDTA - NaCl -Triton X-100

TER : transepithelial resistance

Tf : transferrine

TfR/hTfR : récepteur à la transferrine humain

Tgase 2 : transglutaminase 2

TGF- β : tumor growth factor β

Th : cellules T helper

TIR : toll-interleukin receptor

TIRAP : TIR domain-containing adaptor protein

TJ : jonctions serrées

TLR : toll like receptor

TNF : tumor necrosis factor

TRAF : tumor necrosis associated factor

TRAM : TRIF-related adaptor molecule

Treg : cellule T régulatrice

TRIF : TIR domain- containing adaptor inducing IFN-beta

TSLP : lymphoprotéine stromale thymique

ZO : zonula occludens

Unités de mesure

% : pourcentage

°C : degrés Celsius

cm : centimètre

g : vitesse de centrifugation

h : heure

kDa : kilo daltons

kg : kilogramme

m : mètre

MFI : median fluorescence intensity

mg : milligramme

min : minute

mL : millilitre

mM : milli molaire

mm : millimètre

MOI : multiplicity of infection

TER : transepithelial resistance

µg : microgramme

µm : micromètre

Ω : ohm

G : gramme

Introduction

Le corps humain est perpétuellement exposé à de nombreuses agressions extérieures comme les antigènes (Ag) alimentaires, les microorganismes résidants, et les pathogènes entériques ¹. Le corps est équipé d'interfaces spécifiques, qui délimitent la cavité interne stérile du milieu extérieur ², comme la barrière cutanée, les yeux, la bouche, le tractus gastro-intestinal (GI), l'appareil respiratoire et le tractus uro-génital. Cet ensemble de muqueuses représente une très large surface d'échange, dont 400 m² uniquement pour le tube digestif ³, où le corps peut « communiquer » avec l'environnement. Ces interfaces cellulaires contrôlent les échanges entre les deux milieux interne et externe ² et assurent l'intégrité des tissus et leur fonction biologique. Ces muqueuses cellulaires sont associées au système immunitaire, afin de prévenir des infections et d'assurer l'intégrité de l'épithélium et du corps humain. Ces muqueuses sont qualifiées de « guardian » ⁴ du corps humain dans la littérature scientifique spécialisée.

I. Le tractus gastro-intestinal

A. Généralités

Le tractus GI représente la plus grande interface du corps humain (75%). Cet appareil mesure 8 m de long chez les adultes et s'étend de la bouche à l'anus ^{5,6}. Les fonctions fondamentales du tractus GI sont la digestion des aliments, l'absorption des nutriments tels que les carbohydrates, les protéines, l'acides gras, les minéraux, les vitamines, l'eau, les xéno-biotiques et d'autres substances organiques exogènes ^{2,3,6,7,8,9}; et l'élimination des déchets ^{5,6,7}. Un gradient de pH favorise la digestion des aliments. Dans l'estomac, le pH est acide et diminue jusqu'à devenir neutre au fur et à mesure de la progression dans le tube

digestif. En dehors de ce tractus, d'autres organes annexes contribuent à la fonction digestion comme le foie et le pancréas ⁶.

B. Anatomie du tractus gastro-intestinal

Le tractus GI se compose de deux entités : la partie supérieure comprend la bouche, l'œsophage et l'estomac, et la partie inférieure contient l'intestin grêle, le côlon et le rectum (Figure 1).

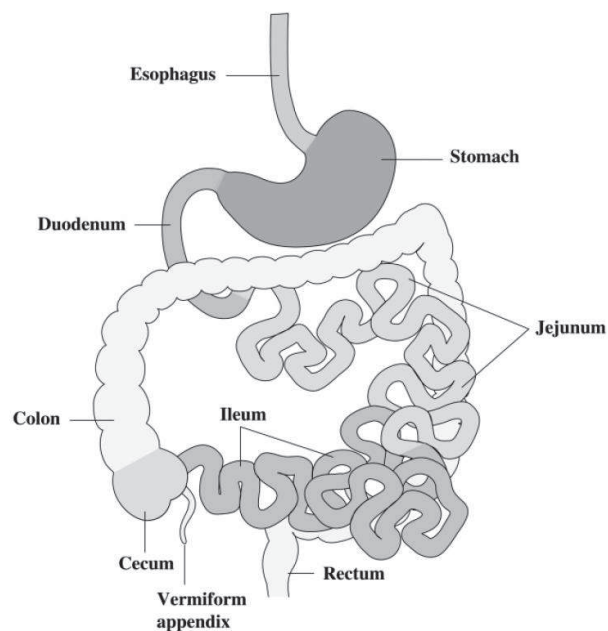


Figure 1. Anatomie du tractus gastro-intestinal humain (Extrait de DeSesso et Jacobson, 2001).

L'œsophage arrive dans l'estomac. L'intestin grêle se divise en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléum, qui se poursuit dans le côlon. Ce dernier se divise en caecum, côlon, rectum puis l'anus.

La bouche est la porte d'entrée du tractus GI où la fonction digestion s'initie ⁵. Durant la mastication, les aliments ingérés sont broyés et mélangés à la salive dans la bouche. Les aliments ingurgités sont lubrifiés pour faciliter la déglutination. Les aliments ingérés quittent la cavité orale ³ par péristaltisme ⁶ pour atteindre le pharynx puis l'œsophage qui sont constitués de tissus conjonctifs et assurent le transfert des aliments ingérés dans l'estomac ⁵. Le pharynx est un organe commun à l'appareil respiratoire et GI. Dans l'estomac, les

aliments mastiqués sont mélangés à des enzymes pour former le chyme qui sera conduit dans l'intestin grêle par le pylore. L'intestin, qui se divise en 3 parties le duodénum, le jéjunum et l'iléum ¹⁰, est le site majeur de l'absorption des aliments et des nutriments ingérés ⁵. L'eau et les électrolytes sont absorbés au niveau du côlon ^{3,5}. Les nutriments sont scindés par les bactéries de la flore intestinale dans le côlon. Chez l'Homme, le côlon se divise en plusieurs parties : le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde, le rectum et l'anus.

C. Les fonctions intestinales: balance entre digestion et immuno-surveillance

La fonction primaire du tractus GI est la digestion et l'absorption des nutriments ¹⁰. Dans le tube digestif, les aliments ingérés proviennent du milieu extérieur, ce qui nécessite le confinement des aliments à l'intérieur du tube digestif. L'absorption se fait au niveau des intestins après traitement physique, mécanique et chimique ⁶ dans la partie supérieure du canal (duodénum et jéjunum) ^{5,8}. Le tube contrôle les deux fonctions la digestion – l'absorption des nutriments et la séquestration du non soi dans l'intérieur du canal.

Le tube digestif s'étend de la bouche à l'anus et forme une muqueuse qui représente la première ligne de défense ou barrière du corps humain ⁵. Cette muqueuse est constituée d'une couche de cellules épithéliales recouvrant une couche de tissu conjonctif la lamina propria (LP) qui est connectée à la circulation sanguine et au réseau lymphatique.

L'absorption des nutriments requiert le passage au travers de l'épithélium intestinal (cellules épithéliales) et l'entrée dans la LP pour rejoindre la circulation sanguine ou le réseau lymphatique ⁵. L'absorption se fait tout le long du tube digestif mais préférentiellement dans les intestins. Dans l'estomac, les molécules de taille modérée, de type lipophile et non ionisé sont abordées ⁵. La muqueuse adopte une conformation spécifique (Figure 2) pour contrôler les échanges. Elle forme des surfaces de contact entre

les deux milieux interne et externe ce qui permet le passage des substances lumineuses dans le système vasculaire ⁵. La muqueuse présente des projections nommées villis et des dépressions appelées cryptes. L'absorption est facilitée par la flore microbienne commensale résidante du tube digestif qui participe à la métabolisation des aliments notamment des xéno-biotiques ³.

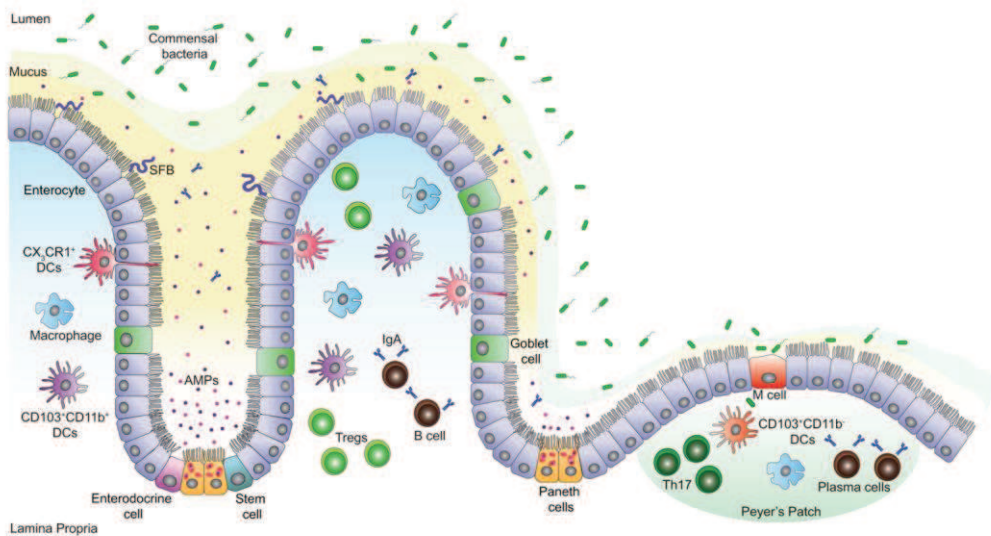


Figure 2. La muqueuse intestinale dans les conditions du « steady state » (Extrait de Luciana R. Muniz et al, 2012). La barrière épithéliale intestinale est une surface ou muqueuse organisée et imperméable. L'épithélium se constitue d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEI), recouverte de mucus qui est colonisée par la flore commensale excepté la couche la plus interne. Le mucus contient les immunoglobulines A (IgA) et les peptides antimicrobiens (AMP). Il existe quatre types de CEI dérivées d'une seule espèce de cellules souches épithéliales : les entérocytes, les cellules de Goblets, les cellules endocriniennes, les cellules de Paneth. Les cellules microfold (M) échantillonnent les Ag luminaux. La LP localisée sous la monocouche de CEI, contient les cellules immunitaires : les lymphocytes T, les macrophages, les cellules B productrices d'IgA. Dans les plaques de Peyer (PP), les cellules dendritiques (DC) favorisent le développement des lymphocytes T auxiliaires (Th17) et T régulateurs (Treg).

Dans les régions absorbantes, l'épithélium est composé d'une couche de cellules comprenant : les entérocytes qui constituent le principal acteur de l'absorption nutritive. Ces entérocytes sont des cellules épithéliales en colonne qui forment une monocouche

imperméable⁵. Leur surface apicale présente des micro-villis (créant une bordure en brosse visibles au microscope).

Le tube digestif constitue un lieu de communication entre les milieux externe et interne mais il constitue une véritable barrière physique qui contrôle tous les échanges de molécules, d'ions, de solutés², d'eau et des éléments de nature immunologique comme les anticorps (Ac), les molécules extérieures du soi dites Ag et les cellules immunitaires. L'épithélium intestinal représente une première ligne de défense qui inhibe l'invasion par des pathogènes et la dissémination dans le système vasculaire. Le tractus GI a un rôle important dans l'immuno-surveillance contrôlée par la présence des tissus lymphoïdes associés au tractus GI (GALT) tels que les PP et les follicules lymphoïdes isolés (ILF) sous jacents la muqueuse⁶.

II. La muqueuse intestinale

A. Structure et organisation de la muqueuse intestinale

Le tube digestif est tapissé d'une superposition de plusieurs couches cellulaires. Il y a quatre différentes épaisseurs⁵ : la muqueuse, la sous muqueuse, la musculuse, et la séreuse (Figure 3).

La muqueuse est la couche la plus externe⁶ c'est-à-dire en contact direct avec l'intérieur de la lumière intestinale. La composition cellulaire de la muqueuse peut varier selon sa localisation dans le tube digestif⁶. La muqueuse se compose de trois sous-couches : une monocouche d'entérocytes orienté vers la lumière intestinale, une couche de tissus conjonctifs nommée LP et une dernière de cellules musculaires⁶.

La muqueuse est en contact avec l'intérieur de la lumière intestinale et recouverte d'une matrice de mucus. Elle se compose d'une couche de plusieurs types de cellules. L'épithélium

se superpose sur la LP qui contient les tissus lymphoïdes et les cellules immunitaires de type DC et les cellules B et T. Cette monocouche est organisée dans une conformation spécifique qui sépare le compartiment luminaire et la LP ¹¹.

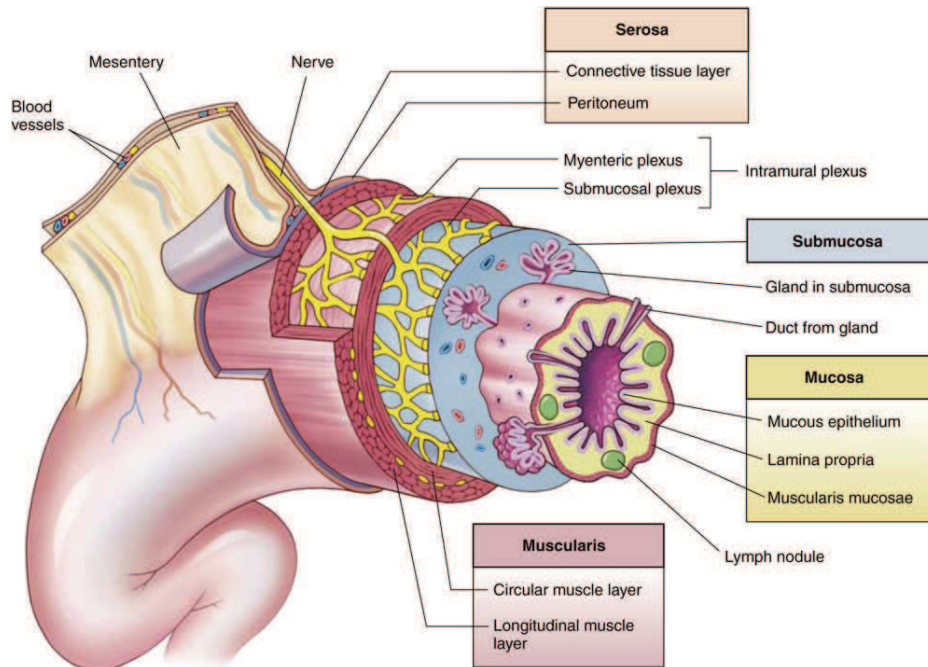


Figure 3. Représentation de la paroi du tube digestif (Extrait de Reed et Wickham, 2009). Le tube digestif est constitué de quatre épaisseurs qui séparent la lumière intestinale de la cavité interne : la muqueuse, la sous muqueuse, la musculuse et la séreuse.

Cette monocouche cellulaire est constituée de quatre différents types de cellules ^{7,12,13}. Les cellules de Paneth sont localisées dans les cryptes ^{7,14}, et produisent des AMP comme les α défensines (HD-5 et HD-6) ^{12,16,17}, les cathélicidines, la lectine de type C, les ribonucléases ¹⁸, des facteurs de croissance ¹ et des enzymes digestives comme le lysozyme ¹⁰. Les cellules de Goblet sécrètent le mucus ^{7,15} dont le composant principal est la protéine mucine 2 *Muc2* ^{1,10}. Les cellules M permettent l'échantillonnage des Ag luminaux et leur transport dans la LP ¹⁶. En effet, ces cellules recouvrent les tissus lymphoïdes PP ou ILF contenant les cellules immunitaires associés aux intestins ⁸. Les entérocytes représentent le type de CEI le plus

abondant de la muqueuse intestinale (80%)¹⁶. Elles sont polarisées¹⁶, assurent l'absorption des nutriments¹¹, et sécrètent de nombreuses molécules telles que des enzymes⁶.

Pour assurer le renouvellement de ces cellules (2-5 jours)^{7,8,10,14} et l'intégrité de la barrière, un seul type de cellules souches localisé dans les cryptes¹⁴ migre jusque dans les villis pour remplacer toutes les cellules de l'épithélium endommagées, nécrosées ou en cours d'apoptose (Figure 4). La différenciation des cellules souches en CEI commence dans les cryptes. Au fur et à mesure de leur maturation en CEI (entérocytes, cellules de Globets et endocrines principalement retrouvées dans les villis)⁸, ces cellules souches migrent vers les villis pour acquérir leur forme différenciée^{1,10,16}. A leur arrivée dans les villis, ces cellules (nouvellement différenciées) entrent dans le cycle de la mort cellulaire^{1,10}. Les cellules de Paneth demeurent dans les cryptes pour exercer leur activité de sécrétion des AMP^{8,10,16,17}. Ces cellules ont la durée de vie la plus longue dans l'épithélium (20-23 jours)^{1,8}.

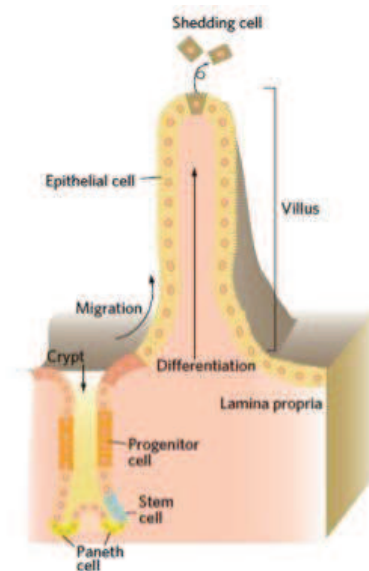


Figure 4. Représentation schématique de la différenciation/maturation de CEI au travers de l'épithélium intestinal (Extrait de Hiroshi Ashida et al, 2011). Les cellules souches se localisent dans les cryptes. La différenciation s'initie dans les cryptes et les cellules souches mûrissent au cours de leur migration vers les villis. A leur arrivée dans les villis, les CEI sont différenciées et effectuent leur activité biologique (absorption des nutriments, sécrétion du mucus,...).

Les entérocytes sont des cellules hyper-polarisées ¹. Leur surface apicale forme des microvillis (Figure 5). Ces cellules sont en contact avec le compartiment luminaire et recouvertes de mucus ¹⁶. Cette substance visqueuse riche en mucine ¹⁶ constitue une première barrière réduisant les flux d'Ag qui peuvent aller à la rencontre des CEI (immuno-surveillance) ¹⁹. Les entérocytes présentent quelques propriétés immunologiques, mais ne peuvent être considérés à part entière comme des cellules immunitaires. Ces cellules peuvent procéder à la capture de molécules comme des sucres, des acides aminés ou encore des Ag via des mécanismes d'endocytose exercés par un récepteur ou pinocytose ¹⁶ pour les molécules les plus petites et solubles. Cette capacité de capture des Ag lumineux est très faible. Les CEI ne peuvent pas alors être qualifiées de cellules présentatrices d'Ag (APC) comme les DC. Ces mécanismes restent encore méconnus et impliquent des récepteurs comme le récepteur Fc néonatal (FcRn) ou des protéines similaires aux récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC I). Ces Ag sont ainsi capturés puis présentés aux lymphocytes T (CD4⁺/CD8⁺) ¹. Les entérocytes sont des cellules sécrétrices de nombreuses protéines comme les lysozymes, la phospholipidase A2, les défensines, les RNases ¹⁶. Elles sont responsables du transport des IgA et IgM polymériques (pIgA, pIgM) de la LP vers la lumière intestinale par des récepteurs spécifiques aux pIg appelés le récepteur aux pIg (pIgR). Les CEI expriment à leur surface des récepteurs aux cytokines (interleukine (IL) IL-22) et produisent des chimiokines. Ces sécrétions permettent aux CEI d'être réactives aux substances immunogènes et leur confèrent un rôle dans la conduction de la réponse immunitaire ¹⁶.

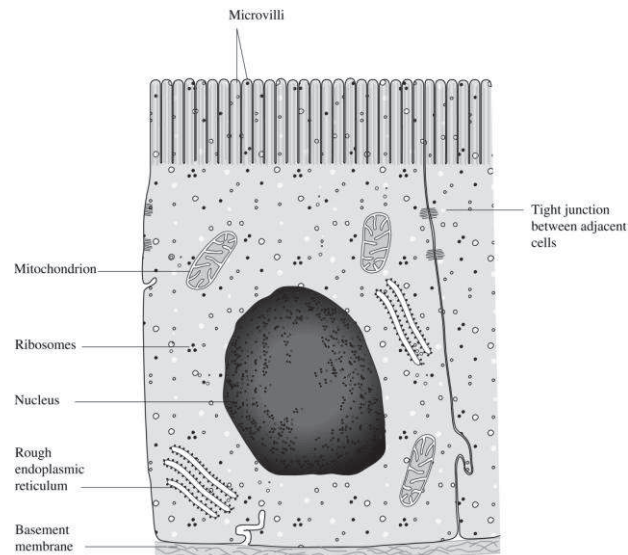


Figure 5. Représentation d'un entérocyte humain (Extrait de J. M. DeSesso et al, 2001). Les entérocytes sont des cellules en forme de colonne polarisées avec une surface apicale en bordure en brosse et une surface basolatérale orientée vers la LP.

Les cellules M sont des cellules épithéliales atypiques²⁰ et spécialisées dans le transport des Ag dans les follicules associés à l'épithélium¹. En plus des DC, les cellules M effectuent l'échantillonnage direct des Ag de la lumière intestinale, ce qui permet d'assurer l'immuno-surveillance, la protection de la barrière épithéliale et d'instaurer la tolérance vis-à-vis de la flore commensale. Les cellules M permettent le passage des Ag directement dans les agrégats lymphoïdes^{20,21} c'est-à-dire les PP situées dans la LP. Ce sont les portes d'entrée du système immunitaire muqueux¹⁶. Ces cellules ont une forte capacité de transcytose des Ag, des macromolécules solubles et des pathogènes²².

La LP se compose de tissus conjonctifs comme les vaisseaux sanguins et lymphatiques qui délivrent les substances absorbées⁶ dans les tissus périphériques. Elle assure le transport des hormones sécrétées par les cellules endocriniennes de l'épithélium. La LP est infiltrée des lymphocytes et des nœuds lymphoïdes (GALT) qui assurent la protection contre les bactéries de la flore commensale ou les pathogènes ingérés⁶.

B. Les cellules épithéliales intestinales, rôle de barrière

Pour compartimer les deux milieux interne et externe ², les CEI forment une monocouche imperméable ²¹ et polarisée délimitant la lumière intestinale (la surface apicale) de la LP (la surface basolatérale) ^{2,23}. Cette imperméabilité est assurée par des protéines qui joignent les CEI entre elles et forment la barrière ²⁴. Ces protéines se classent en trois types suivants les jonctions serrées (tight junctions, TJ) ²⁵, les jonctions adhérentes (AJ) et les desmosomes (DM) ^{1,16,21,23,26} (Figure 6). Ces trois types de protéines s'établissent dans l'espace para-cellulaire entre deux cellules adjacentes pour former le complexe des protéines des jonctions.

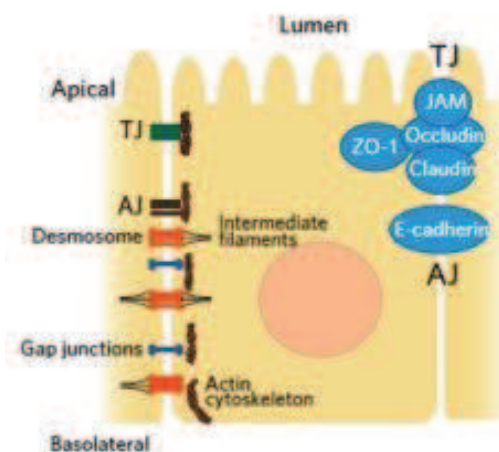


Figure 6. Représentation schématique des protéines des jonctions serrées entre les CEI (Extrait de Hiroshi Ashida et al, 2011). Chaque entérocyte est connecté aux cellules adjacentes via les différents types de protéines des jonctions : les TJ, les AJ et les DM de la surface apicale à la surface basolatérale.

Les TJ sont fondamentales et les plus exprimées à proximité de la surface apicale ²³. Les TJ se composent de différentes protéines : les occludines, les claudines, l'actine, les zonula ocludens (ZO) ^{21,25}, et les molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM) ²³. Ces protéines assurent la polarité des cellules ²³ et contrôlent le passage de l'eau, des électrolytes, des lipides et des protéines au travers des CEI ¹⁶. Elles préviennent et contrôlent de la diffusion paracellulaire ²³.

Les AJ sont exprimées entre deux cellules voisines et sont sous-jacentes aux TJ²³. Elles sont indispensables à l'intégrité des TJ²³. Composées essentiellement d'interactions cadherines-catenines²¹, ce type de protéines assure aussi la polarité des cellules et intervient dans la différenciation cellulaire¹⁶. Elles comprennent les E-cadherines^{21,23}.

A proximité de la surface basolatérale des CEI, les DM forment un réseau de kératine et forment des protéines intercellulaires qui connectent les cytosquelettes de deux cellules adjacentes par des protéines d'adhésion appelées desmogline, plakoglobuline, desmocolline, plakophiline et desmoplakine¹⁶.

Cet ensemble de protéines des jonctions serrées augmente l'imperméabilité épithéliale¹⁶. Dans les cas des maladies inflammatoires chroniques, les patients présentent souvent un défaut dans l'expression ou l'assemblage de l'une de ces protéines ce qui entraîne une perte de la perméabilité. L'épithélium n'assure plus la fonction barrière et ne filtre plus les substances ou les microorganismes qui peuvent traverser et rentrer dans l'organisme.

III. L'immunité des muqueuses

A. Structure et organisation de la fonction barrière intestinale

Pour maintenir la fonction et l'intégrité de la barrière intestinale, l'épithélium intestinal est associé à des mécanismes de défense innée et adaptative qui incluent les CEI et les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse (MALT)¹⁵. Le GALT représente la structure lymphoïde la plus abondante du corps humain^{25,19}. Elle induit la réponse immunitaire et contrôle la tolérance vis-à-vis de la flore commensale. Le GALT se divise en deux parties les sites inducteurs et les sites effecteurs¹⁵, qui comprennent tous les tissus qui s'apparentent au système immunitaire de la muqueuse¹⁹ (Figure 7). Les sites inducteurs sont les lieux de capture des Ag et d'activation de la réponse immunitaire. Ces sites comprennent les PP²¹ de

l'intestin grêle, et les ILF ^{21,27}. Les sites effecteurs sont les lieux de maturation des cellules immunitaires (cellules T et B) et de production de la réponse immunitaire (différenciation des cellules B en plasmocytes et sécrétion de l'IgA). Ces sites incluent la LP et l'épithélium ¹⁵.

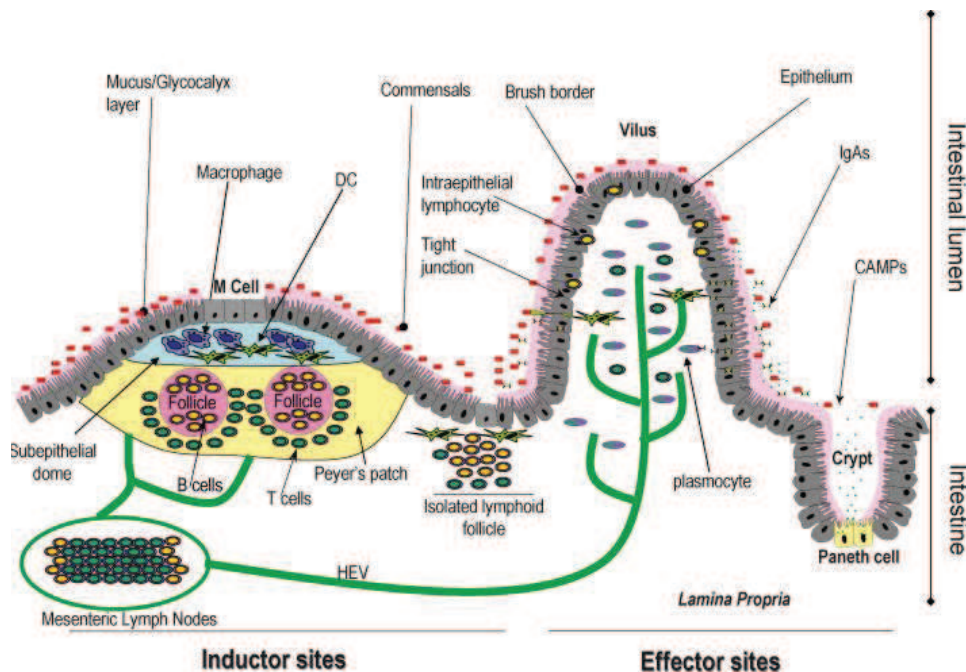


Figure 7. Représentation schématique du système immunitaire intestinal (Extrait de J.G. Magalhaes, 2007). Le contenu de la lumière intestinale est séparé de la LP par une monocouche de CEI recouverte par une couche protectrice de mucus contenant les AMP, les IgA de sécrétion (SIgA). Le système immunitaire intestinal se divise en deux parties : les sites inducteurs et les sites effecteurs. Le compartiment inducteur inclut les PP, et les ILF. Dans les follicules associés à l'épithélium, les Ag de la lumière intestinale sont transportés dans les dômes sub-épithéliaux (SED) par les cellules M/DC. Les DC induisent la réponse immunitaire dans les PP, ILF ou nœuds lymphoïdes mésentériques (MLN). Le compartiment effecteur comprend la LP et l'épithélium. La LP contient de nombreuses cellules T, les plasmocytes, les macrophages et les DC intra-épithéliales qui peuvent échantillonner la lumière intestinale.

Les cellules M recouvrent les SED qui regroupent les DC et les macrophages résidents. Ces dômes surplombent les PP contenant les follicules ¹⁵.

Les PP sont les structures immunitaires macroscopiques ²⁸ au niveau de l'intestin grêle dans la muqueuse et se regroupent en agrégats lymphoïdes qui se superposent sur les follicules contenant les cellules T et les SED renfermant les DC ¹⁹. Les cellules M sont retrouvées dans

les follicules et permettent l'entrée des Ag luminaires et des microorganismes dans les tissus lymphoïdes adjacents¹⁹ (Figure 7).

B. Muqueuse intestinale : un rôle central dans le système immunitaire

Les muqueuses sont perpétuellement exposées à l'environnement extérieur. Ces tissus muqueux sont associés à différents mécanismes de défense apparentés au système immunitaire non spécifique dits innés et adaptatifs^{2,29}. Dans le tractus GI, la muqueuse intestinale représente la plus grande frontière du corps humain face aux agressions extérieures. Il est indispensable au système immunitaire d'assurer l'intégrité de la barrière ainsi que le bon déroulement de la fonction digestion².

Le premier rempart est constitué de mécanismes de protection non spécifiques physiques et chimiques dont le but est d'empêcher l'accès à la muqueuse aux pathogènes¹⁵. Il s'agit d'acteurs du système immunitaire inné comme le mucus, le glycocalyx, la lactoferrine, les peroxydases, les défensines, le lysozyme, et le péristaltisme^{2,15,30}. Ces mécanismes sont connus pour inhiber l'activité pathogénique² c'est-à-dire empêcher l'initiation de l'infection : l'adhésion et la colonisation de la muqueuse. Ce mucus constitue une barrière de protection qui prévient l'infiltration des pathogènes dans l'épithélium²¹. Le mucus constitue un gel fortement glycosylé⁸ constitué principalement de la mucine *Muc2*. Il constitue un réseau protéique compact, visqueux et perméable⁷. Il représente une première frontière prévenant le contact, l'adhésion, l'attachement et l'invasion de la muqueuse par les pathogènes et des commensaux^{8,24}. La barrière de mucus se compose deux couches dans le côlon et seulement d'une couche dans l'intestin grêle³¹.

Des mécanismes plus sous-jacents du système immunitaire adaptatif prennent le relais si les mécanismes innés ne parviennent pas à maintenir le pathogène à l'extérieur de la barrière. Ces mécanismes incluent l'immunité cellulaire avec les lymphocytes T² et la réponse

humorale médiée par les sécrétions des IgG, IgM et IgA² par les cellules B des tissus lymphoïdes systémiques. Ces Ac traversent l'épithélium et préviennent des infections².

Au niveau de la muqueuse intestinale, la réponse immunitaire produite est de type IgA. Cette réponse est obtenue par différentes voies d'activation qui produisent une seule et unique étape finale l'activation des cellules B pour la production des IgA^{2,32}. La production de l'IgA spécifique à un Ag est dépendante de l'échantillonnage par les cellules M^{28,32}. En effet, les Ag luminaux d'origine alimentaire et les microorganismes entériques traversent la barrière épithéliale via les cellules M et sont conduits dans les PP/SED où les cellules du système immunitaire³² comme les DC immatures²⁰ et les macrophages qui exercent la phagocytose. Une faible part des Ag luminaux ou microorganismes peuvent traverser l'épithélium sous forme de complexes immuns avec les SIgA. Les cellules M peuvent capturer les SIgA (ou complexes immuns SIgA-Ag) mais ces mécanismes impliquent la présence de récepteurs³². Certains de ces récepteurs ont été identifiés comme le DC SIGN et le Siglec-5 (à partir de modèles *in vitro* et *in vivo* humains et murins). En effet, ils reconnaissent les IgA2 et SIgA (interaction avec domaines α 1, 2 et 3) et les conduisent dans les PP²². Dans la LP, les Ag peuvent aussi être pris en charge par les APC comme les DC³² et aux macrophages localisés dans les SED²³. Ensuite les DC mûrissent et migrent jusque dans les zones riches en cellules T dans les PP pour présenter l'Ag et initier la réponse immunitaire humorale spécifique à l'Ag par activation des cellules B et production d'IgA spécifique à cet Ag²⁰ (Figure 8).

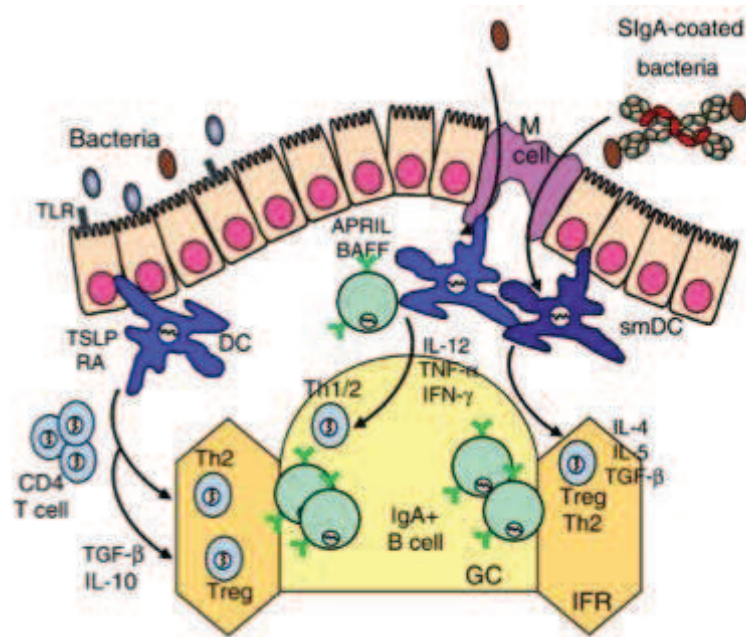


Figure 8. Induction de la réponse immune IgA dans l'épithélium intestinal (Extrait de Blaise Corthésy, 2013). Les Ag sont échantillonnés par les DC résidentes de la LP soit directement dans la lumière ou via les cellules M. Les cellules T se différencient en cellules Th2, T reg ou folliculaires Th. Ces cellules secrètent des cytokines induisant la production de l'IgA (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et Tumor growth factor β (TGF- β)) qui induisent l'activation des cellules B des centres germinaux. Les Toll like receptors (TLR) contribuent aussi à la détection des pathogènes et commensaux de la lumière intestinale. Ils peuvent aussi activer les cellules B directement par sécrétion du B cells activating factor (BAFF) et du prolifération inducing ligand (APRIL).

Les DC intra-épithéliales (Figure 7) peuvent aussi échantillonner directement les Ag luminaux en émettant des prolongations au travers de la muqueuse appelées dendrites³³. Une fois les Ag procédés par les DC, ils sont amenés aux cellules T résidentes des régions inter-folliculaires pour activation³². Ces cellules T activées produisent des cytokines telles que IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10 et le TGF- β ^{30,32,27,34} qui vont induire la différenciation des cellules B immatures, le changement de recombinaison (CSR) et de classe isotypique vers IgA des cellules B dans le GALT et les MLN^{32,33,34}. Ce mécanisme d'induction de la production d'IgA est dit dépendant des cellules T²⁷. Les cellules B proviennent de la circulation sanguine et subissent le « B cell homing » vers les tractus GI induit par les sécrétions de chimiokines (CXCL-12) par les DC résidentes du GALT ou de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ exprimé par les cellules B²⁷ (Figure 9).

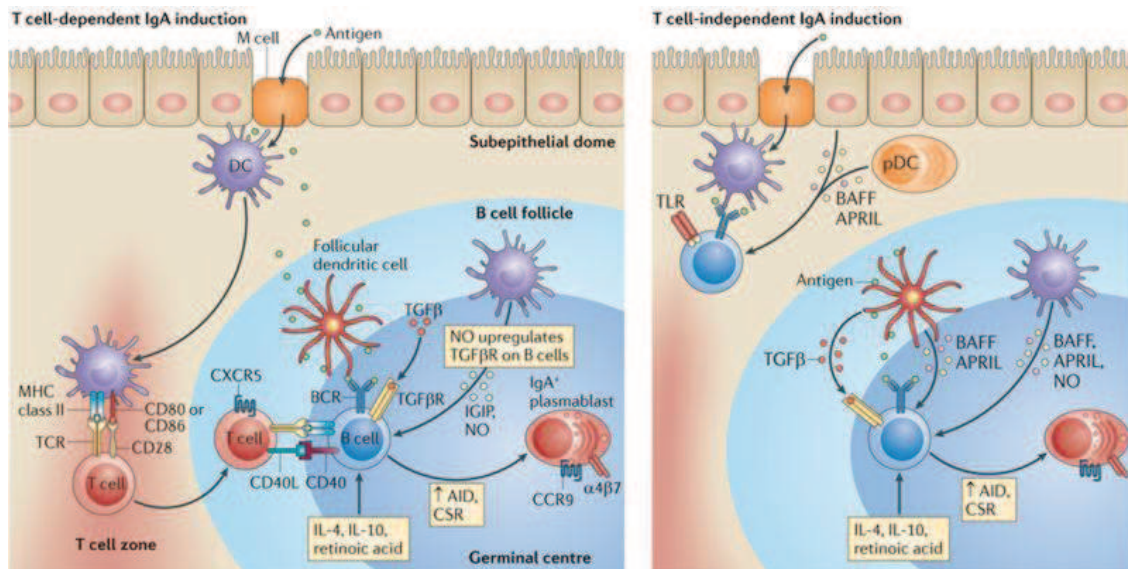


Figure 9. Induction de la réponse IgA (Extrait de Oliver Pabst, 2012). Les PP sont les sites d'induction de la réponse IgA au travers des mécanismes dépendant (gauche) ou indépendant (droite) aux cellules T. L'étape initiale est commune aux deux mécanismes : l'Ag est transcytosé par les cellules M, puis pris en charge par les DC dans les SED. *Pour le mécanisme dépendant* : les DC pénètrent dans les zones des cellules T inter-folliculaires pour induire la différenciation des cellules T naïves en cellules effectrices. Les cellules T activées entrent dans les follicules contenant les cellules B, et sécrètent les cytokines activatrices des cellules B. Les cellules B ainsi stimulées expriment le ligand du CD40 et des cytokines qui induisent l'expression de l'enzyme désaminase AID (activation-induced cytidine deaminase). L'enzyme AID induit le CSR chez les cellules B qui produisent l'IgA. *Pour le mécanisme indépendant* : l'expression de l'enzyme AID est induite par des mécanismes du système immunitaire inné incluant la voie des TLR, le ligand CD40 et les facteurs BAFF-APRIL sécrétés par les DC folliculaires et plasmocytoïdes.

Les cellules B peuvent aussi être différenciées en plasmocytes sécréteurs de l'IgA sans l'activation intermédiaire des cellules T. Cette voie de production de l'IgA est nommée mécanisme indépendant aux cellules T²⁷ (Figure 9). Les Ag lumineux sont détectés par des récepteurs dits TLR qui reconnaissent des séquences antigéniques particulières et conservées par un grand nombre de pathogènes³³. Les cellules B sont directement activées par sécrétion des facteurs d'activation BAFF et de prolifération APRIL³³ sécrétés par les DC résidentes du GALT et les CEI^{27,34} (Figure 10).

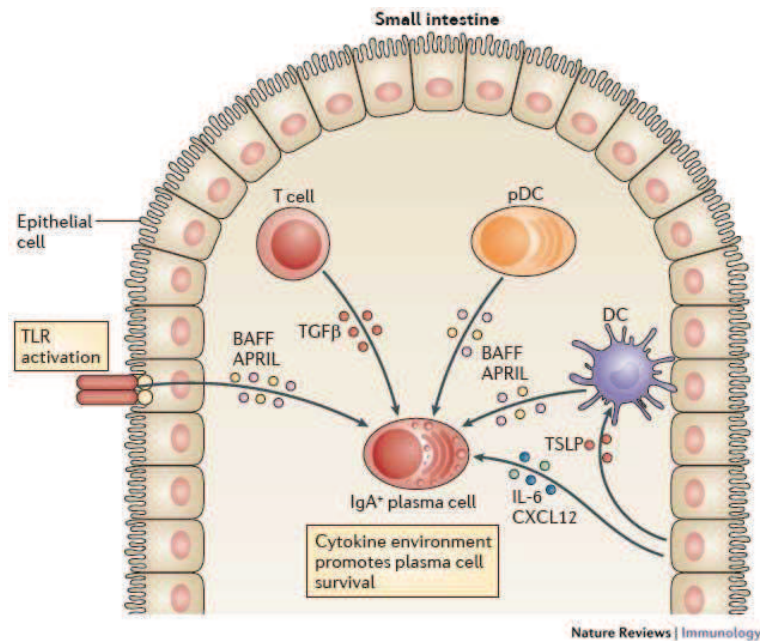


Figure 10. Le micromilieu des cytokines inductrices des cellules B (Extrait de Oliver Pabst, 2012). Les DC sécrètent des facteurs activateurs des cellules B comme BAFF et APRIL. Les cytokines peuvent être aussi produites par les CEI comme l'IL-6 et la chimiokine CXCL-12. Les CEI sécrètent aussi de la thymic stromal lymphopoietin (TSLP) qui induit l'expression du facteur APRIL par les DC. Les cellules T activent les cellules B par sécrétion du TGF-β.

C. Muqueuse intestinale : équilibre entre tolérance et immunité l'homéostasie

Le corps humain est perpétuellement exposé à des multitudes de microorganismes⁸. Parmi eux, il y a des germes infectieux qui endommagent la barrière intestinale et colonisent le corps humain et d'autres qui sont qualifiés de commensaux. Ces derniers vivent en symbiose avec l'hôte qu'ils colonisent^{24,35}. Cette flore du tractus GI aide par exemple à la digestion³⁶ et inhibe la colonisation par les microorganismes pathogènes en occupant le terrain^{14,24,37} : compétition par l'absorption des nutriments, blocage des récepteurs cellulaires, ou bien la sécrétion de molécules antimicrobiennes ciblant la flore non commensale⁸. Cette flore apporte aussi des bénéfices énergiques, et aide au développement tissulaire et à la réparation des tissus²⁴. Il est essentiel de discriminer les commensaux des pathogènes invalidants^{7,38}. Après la naissance (stérile *in utero*), le corps est exposé aux microorganismes^{25,32,36} présents dans l'environnement extérieur et

maternel, par conséquent il accoutume aux commensaux ingérés. Ils s'implantent progressivement dans le tractus GI et y demeurent en permanence ³⁶. Il s'agit de l'homéostasie, c'est-à-dire un équilibre entre la tolérance orale ²⁸ des commensaux et l'immunité pour les pathogènes ²⁴.

L'immunité contre les microorganismes pathogènes :

La distinction entre commensaux et pathogènes se base sur l'expression de gènes codant pour les facteurs de virulence chez les microorganismes pathogènes ¹⁵. Ces facteurs de virulence sont des molécules d'adhésion exprimées à la surface des pathogènes, des systèmes d'invasion, des enzymes et des toxines ¹⁵. Ces facteurs de virulence permettent aux bactéries d'entrer en contact avec les cellules de la muqueuse, d'invalider ces cellules, de coloniser les tissus et produire une infection localisée dans le tissu infecté ou systémique si le pathogène atteint le système circulatoire ¹⁵. Ces facteurs de virulence miment les protéines eucaryotes, ce qui permettent aux pathogènes d'être assimilés comme du soi et d'induire ou d'interférer avec les voies de signalisation dans les cellules infectées ¹⁵. Les effecteurs qui sont imités interagissent avec les enzymes des cellules hôtes telles que les kinases, les phosphatase, les phospholyses ou les sérines ou thréonine acétylases ³⁹ qui ont toutes un rôle important dans les voies de signalisation cellulaires.

Les SIgA (naturelles ou spécifiques) peuvent être associées avec les bactéries, ces complexes sont ensuite conduits aux DC via un passage sélectif par les cellules M dans le SED ³⁷. Les DC produisent ensuite l'IL-10 qui induit la différenciation des cellules T productrices de l'IL-4, IL-10 et du TGF- β qui favorisent le changement de classe isotypique des cellules B en plasmocytes sécréteurs de l'IgA ³⁷.

Les bactéries qui traversent le mucus et échappent aux AMP et aux IgA, sont reconnus par des récepteurs du système immunitaire inné exprimés par les cellules de l'épithélium ¹⁵. Ces

récepteurs nommés PRR^{7,9,24,25,40} reconnaissent des motifs constitutifs conservés et invariants chez les pathogènes, appelées les PAMP ou MAMP^{7,15,25}. Ces récepteurs sont exprimés à la surface des cellules ou dans le cytosol. Les PRR sont exprimés par les macrophages, les neutrophiles, les DC et les autres cellules immunitaires^{7,25,24}. Ces PRR recrutent une batterie de protéines adaptatrices contenant les domaines récepteurs Toll-interleukine (TIR) comme le gène réponse induisant la différenciation myéloïde 88 (My88)²⁴ qui ont pour finalité l'activation de la voie de signalisation du facteur nucléaire κ B (NF- κ B) induisant l'immunité cellulaire^{24,25} (Figure 11). Cette voie NF- κ B contrôle l'induction des cytokines^{9,18} et des chimiokines pro-inflammatoires^{9,24} qui induisent une réponse inflammatoire et l'activation de la réponse adaptative cellulaire contre le pathogène²⁴. Ils comprennent des nombreux systèmes de reconnaissance. Dans le tractus GI, les PRR les plus abondants sont les TLR^{9,25} et les Nod like receptors (NLR).

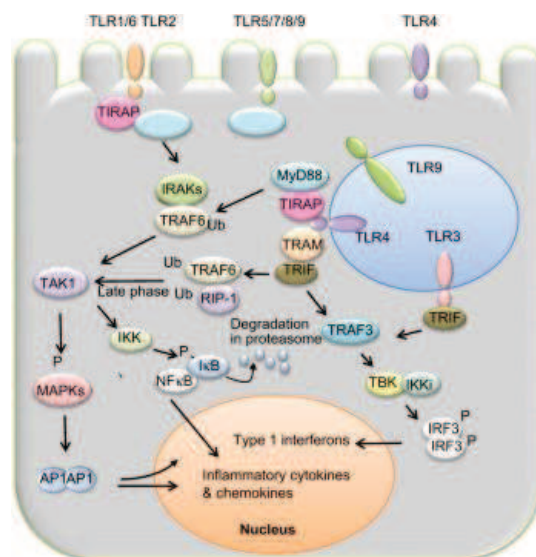


Figure 11. Représentation schématique de la voie de signalisation des TLR/NF- κ B (Extrait de J. M. Wells et al, 2009). Tous les TLR utilisent comme adaptateur protéique My88, excepté le TLR-3. Le My88 recrute ensuite les membres de la famille des kinases associées au récepteur à l'IL-1 (IRAK) et les facteurs associés aux tumor necrosis factor 6 (TNF-6) (TRAF). Ces dernières protéines vont activer le complexe TAF (TATA binding protein -associated factors) par ubiquitination. Le complexe TAF active le complexe des kinases I κ B (IKK) qui va bloquer les facteurs d'inhibition (I κ B) de la voie NF- κ B par phosphorylation. Ces I κ B sont dégradés. Le facteur NF- κ B est ensuite transloqué dans le noyau de la cellule où il active l'expression génique des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires. Il y a d'autres mécanismes secondaires d'activation de cette voie via les protéines TIRAP (TIR domain-containing adapter protein) ou TRAM (TRIF-related adaptor molecule) (voie du TLR4) ou TRIF (TIR domain-containing adapter inducing IFN-beta) (TLR-3).

Les TLR sont exprimés à la fois dans la membrane plasmatique des cellules et sous forme intracellulaire dans cytosol (Figure 12). Les TLR exprimés par les cellules myéloïdes et lignées lymphoïdes^{9,24}, détectent un large répertoire de PAMP^{9,13,15} comme le lipopolysaccharide, les lipoprotéines, la flagelline, l'acide ribonucléique (ARN/RNA) double brin viral et l'acide désoxyribonucléique (ADN/DNA) non méthylé bactérien^{15,40}. Les TLR interviennent dans la prolifération des CEI, la production de l'IgA, la maintenance des TJ et l'expression des AMP¹³. Les TLR induisent la voie NF- κ B ce qui permet l'activation de l'immunité innée et adaptative donc la production de cytokines et chimiokines pro- inflammatoires^{13,15,24,40}. Les TLR peuvent induire une réponse cellulaire de type T et B au travers de l'activation de DC¹⁵.

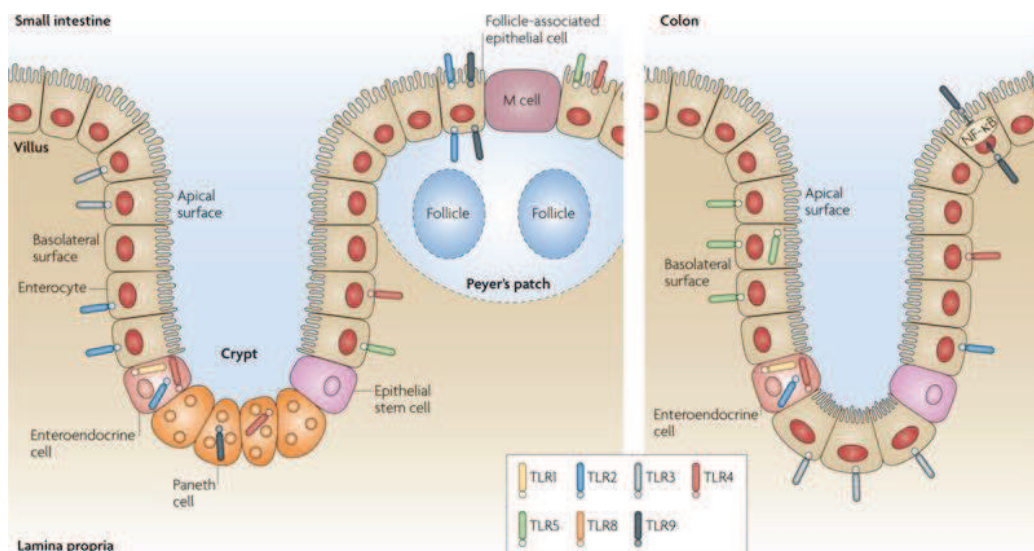


Figure 12. Distribution des TLR au niveau de la barrière intestinale (Extrait de Maria T. Abreu, 2010). La distribution des TLR se répartit de façon stratégique au sein des CEI polarisées. Les cellules humaines CEI expriment les TLR-2, 4, 5 et 9. Les TLR-2, 4, 5 et 9 reconnaissent des éléments de la structure des bactéries et des champignons et les TLR-3, 7 et 8 viraux.

Les NLRs sont retrouvés uniquement sous forme cytosolique et reconnaissent le peptidoglycane des bactéries. Ils vont recruter les récepteurs interagissant avec les thréonine et sérine kinases (RIP-2) qui induisent la voie NF- κ B et des JNK (c-Jun kinases N-

terminal)¹⁵ (Figure 13). Ces NLR induisent les sécrétions des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et l'activation des DC.

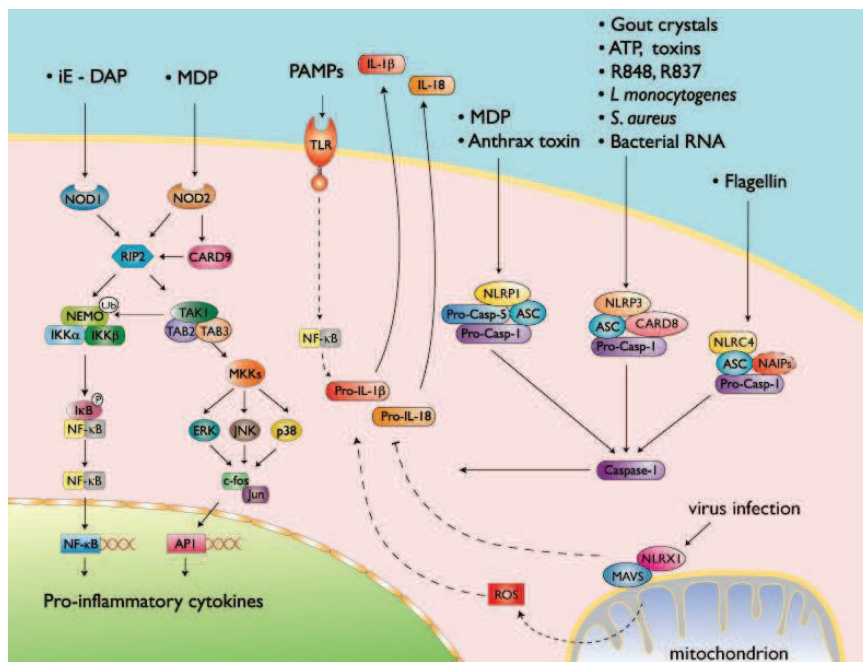


Figure 13. Représentation schématique de l'induction des voies des TLR/NLR (Poster proposé par InvivoGen <http://www.invivogen.com/review-nlr>). Les PAMP lient les récepteurs membranaires ou cytosoliques et induisent les voies NF-κB et JNK par l'activation d'une cascade de différents facteurs protéiques. La réponse finale de ces deux voies est la production de cytokines pro-inflammatoires.

Tolérance face à la flore commensale :

La flore commensale du tube digestif est constituée d'un écosystème bactérien hétérogène comprenant entre 500 et 1000 espèces différentes²⁴ représentant pas moins de 10^{14} bactéries^{7,13,15,23} pour 10^{13} cellules eucaryotes²⁵. La flore commensale se répartit entre l'estomac et le duodénum 10^3 à 10^5 bactéries par mL de contenu luminaire et 10^9 à 10^{12} dans l'iléum et le côlon²⁴. Des travaux sont toujours en cours pour identifier les espèces de cette flore, mais cela constitue un travail fastidieux car il s'agit d'un mélange de bactéries dont 50% sont sensibles à l'oxygène^{15,25} (anaérobie) et appartiennent aux genres suivants : *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium* et *Lactobacillus*^{8,35}. Il

est difficile de reconstituer des conditions de culture *in vitro* similaires à l'environnement intestinal.

La reconnaissance des commensaux est réalisée par les TLR exprimés par les CEI. Cette reconnaissance induit la production de facteurs de protection. La réponse immunitaire induite est de type immunosuppresseur impliquant le blocage de la voie NF- κ B par les protéines et les facteurs inhibiteurs I κ B α ¹⁵. La tolérance face aux commensaux est contrôlée par la sécrétion du TGF- β et de l'IL-10 requis pour le maintien de la tolérance et l'établissement du lien entre la production des IgA, l'immunité et l'homéostasie ³². Les mécanismes de reconnaissance par des systèmes de «sensors» innés (PRR/PAMP) induisent une réponse immunitaire peu réactive, non spécifique, non inflammatoire et la production d'IgA.

La SIgA influence sur la composition du microbiote intestinal car elle exerce la capture et la présentation des Ag lumineux aux DC dans le GALT, par conséquent cet Ac active la réponse inflammatoire ³². Les SIgA spécifiques et naturelles dans le lait maternel sont capables de reconnaître les microorganismes commensaux. Par conséquent, ces Ac contrôlent l'établissement progressif de la colonisation du tractus GI par les commensaux dès le plus jeune âge ³². Une fois installé dans le tractus GI, le microbiote influe et stimule la maturation du GALT et induit la production des IgA anti-commensaux ³² par activation des cellules T et B dans les follicules lymphoïdes et la production des IgA ⁴¹ avec une affinité limitée pour les commensaux .

En conclusion, les mécanismes qui maintiennent la balance entre la tolérance des commensaux et l'immunité face aux pathogènes, demeurent encore mal compris. La SIgA contrôle le contenu de la flore commensale intestinale dès son implantation dans le tractus GI ⁴² et inversement la flore commensale module la réponse IgA immuno-toléro-gène. Il y a

de nombreuses hypothèses, de paradigmes... Par exemple, Charlotte S. Kaetzel propose l'hypothèse suivante : la flore commensale et la SIgA sont en parfaite coopération selon la boucle proposée (Figure 14) dans laquelle le récepteur pIgR a aussi un rôle important car ce récepteur transcytose l'IgA dans la lumière intestinale.

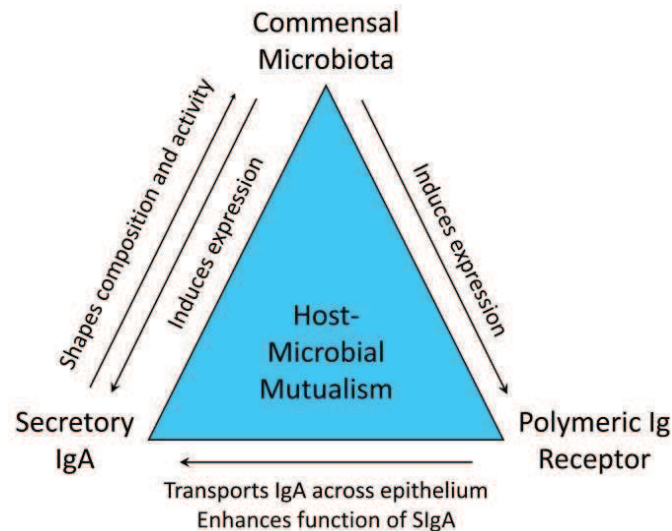


Figure 14. Schéma représentant les interactions entre la flore commensale, la SIgA et le récepteur pIgR (Extrait de C. S. Kaetzel, 2014). Ce schéma est proposé pour justifier la coopération qui est établit entre la SIgA, le récepteur pIgR et la flore commensale intestinale. Le microbiote intestinal envoie un signal aux cellules épithéliales et les cellules immunitaires pour induire la surexpression du récepteur pIgR et le changement de classe isotypique des cellules B pour produire l'IgA. Les molécules d'IgA seront conduites dans la lumière intestinale par pIgR où la SIgA régule la composition et l'activité du microbiote.

IV. Immunoglobuline A de sécrétion

A. Généralités

L'IgA est l'Ac le plus abondant dans le corps humain (production hebdomadaire pour un adulte de 66 mg/kg)⁴³. Thomas B. Tomasi fut le premier à mettre en évidence la présence des IgA sous la forme sécrétoire (SIgA) dans les muqueuses^{2,44} avec une production hebdomadaire de 2-5 g dans l'intestin^{25,34}. Cette IgA est l'Ac le plus abondant au niveau des muqueuses. La SIgA est constituée d'un dimère d'IgA (320 kDa) relié par la chaîne J (15 kDa) et de la pièce sécrétoire (SC, 80 kDa)⁴⁵. Les IgA sont l'isotype le plus hétérogène des Ig chez

l'homme, comprenant deux sous-classes IgA1 et IgA2 ^{27,46} et plusieurs stades oligomériques ^{47,48}. Selon le site de sécrétion des IgA, elle peut être sous forme monomérique ou polymérique. Les plasmocytes de la moelle osseuse sécrètent des IgA1 monomériques qui est la forme prédominante des IgA sériques alors que dans les compartiments muqueux l'IgA2 est la sous-classe prédominante ⁴⁵. Ces sous-classes se différencient seulement par l'ajout d'une séquence de 13 acides aminés avec des sites de glycosylation dans la région charnière de l'IgA1 ⁴³ au niveau du domaine $\alpha 1$ pour former l'IgA2. L'IgA1 est sensible aux protéases bactériennes de *Streptococcus pneumonia*, de *Haemophilus influenza* et de *Neisseria meningitides* qui clivent l'IgA au niveau de la région charnière ⁴⁹. L'IgA2 présente trois allotypes : IgA2m (1), (2) et (3) ^{46,50}, et constitue la sous-classe la plus abondante dans les sécrétions ^{43,51}. Chez la souris, l'IgA est présente seulement sous une forme similaire à la sous-classe des IgA2 humaines (structure et glycosylation) ⁵². L'IgA2 est la sous-classe la plus abondante dans les sécrétions intestinales ²⁷.

Les IgA sont produites sous forme de polymères (pIgA, dimère d'IgA associé à la chaîne J) par les plasmocytes résidents dans la LP ^{20,33,53}. La chaîne J est l'élément fondamental dans la polymérisation de la molécule de pIgA ^{52,54}, elle lie les deux molécules d'IgA par les liaisons covalentes ^{27,52} de type ponts disulfures au niveau des fragments Fc ³⁸ des Ac. Les pIgA sont transcytosées dans la lumière par le récepteur pIgR ^{27,55,56}. Ce récepteur est omniprésent à la surface basolatérale des entérocytes ². Lorsque les pIgA sont capturées par le pIgR, les complexes pIgA-récepteur sont ensuite endocytosés par les CEI ² puis transportés jusqu'à leur surface apicale ⁵⁷. Les pIgA transportées sont libérées dans la lumière, associées à la partie SC (polypeptide extracellulaire) ^{2,52} du récepteur pIgR qui reste lié à l'Ig par clivage protéolytique ^{2,57,58} pour former la SIgA ² (Figure 15).

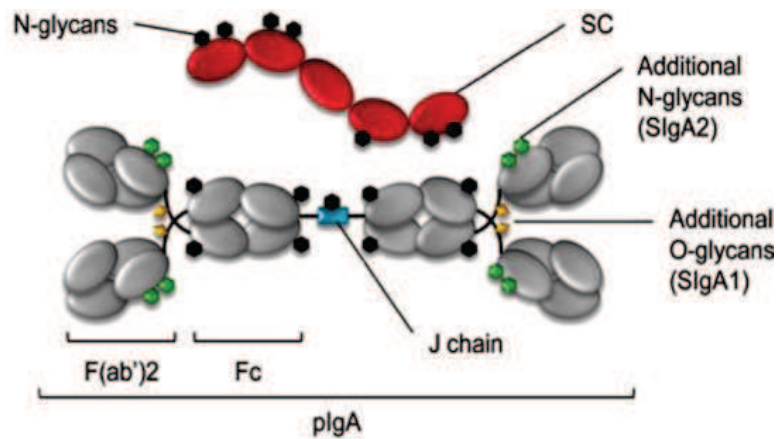


Figure 15. Représentation schématique de la SigA (Adapté de Blaise Corthésy, 2013). La pIgA est représentée en gris, la chaîne J en bleu, et la SC en rouge. Les N-glycans sont colorés en noir ou vert et les O-glycans de la région charnière de l'IgA1 en jaune.

Cette forme sécrétoire est stable et résistante aux protéases bactériennes ^{25,51}. La protection contre la dégradation protéolytique est conférée par la présence de la SC dans la forme de sécrétion ⁵⁹. La SC est liée à la pIgA de manière covalente et non-covalente ³⁸, au niveau de la région charnière où la chaîne J s'associe. L'interaction pIgA-SC est de forte affinité et s'établit avec les domaines intrinsèques de l'IgA ⁵⁰. La chaîne J possède un rôle important dans le maintien de l'interaction entre la pIgA et le site de liaison (SC) du pIgR ⁵² et la transcytose (de la surface basolatérale à la surface apicale).

B. SigA, rôle central dans la protection intestinale

La SigA constitue une première ligne de défense ^{27,60,42} prévenant les infections par les microorganismes pathogènes ^{32,61} et assure l'équilibre afin de préserver la flore commensale ^{33,62}. Le principal rôle de cet Ac est la neutralisation des Ag luminaux ou microorganismes entériques afin d'inhiber le contact avec les CEI. La SigA est un Ac à la fois pro- et anti-inflammatoire ^{43,61} car elle prévient de l'adhésion des microorganismes aux cellules, de l'invasion virale dans le tractus GI et neutralise les toxines mais induit une réponse immunitaire spécifique.

Le premier mécanisme de protection de la barrière intestinale est l'exclusion immunitaire^{32,27,52} (Figure 16). Les SIgA peuvent ainsi séquestrer les microorganismes et macromolécules ingérées^{27,32,52} afin de prévenir leur attachement aux CEI³³. Ces complexes sont ensuite facilement éliminés par péristaltisme³³. Ce processus préserve de l'adhésion des bactéries, virus, toxines⁵² et parasites à l'épithélium², par conséquent limiter les dommages cellulaires, la colonisation de la muqueuse par les pathogènes, une invasion massive de la cavité interne et la transmission des pathogènes dans le compartiment systémique. Ce mécanisme met en évidence la capacité des SIgA à reconnaître un très large répertoire d'épitopes antigéniques exprimés à la surface des bactéries et des virus, afin de prévenir l'adhésion et la pénétration dans la muqueuse⁵².

D'autres mécanismes apparentés à l'exclusion immunitaire permettent l'opsonisation des Ag dans le compartiment intracellulaire²⁷ ou dans la LP (Figure 16). Dans la LP, la pIgA peut lier les Ag et les excréter dans la lumière via la transcytose par le pIgR^{2,19} ou les récepteurs Fc α ²⁷. Lors du transit vers la lumière, la pIgA peut inhiber la production d'un parasite intracellulaire comme un virus² ou neutraliser un Ag inflammatoire et le reconduire dans la lumière où il sera éliminé par péristaltisme³³.

Les SIgA ont la capacité de prévenir les infections en liant les microorganismes contenus dans la lumière intestinale et les neutralisent. Afin de développer une réponse immunitaire contre ces microorganismes, les SIgA adhèrent de manière sélective à la surface apicale des cellules M. Chez les humains et les souris, les cellules M recouvrent des follicules qui s'organisent en PP³³. Ce mécanisme de transcytose est non spécifique ou médié par un récepteur qui capture les SIgA seules ou associées avec un Ag dans la lumière et les transporte dans la LP⁶³. Des études ont permis d'identifier que le DC-SIGN⁶⁴ et la Dectin-1²² exprimés par les cellules M, peuvent constituer des récepteurs aux IgA chez la souris.

Après la capture, les Ag luminaux sont transportés dans les PP puis pris en charge par les DC ou les macrophages résidentes du SED³³. Ensuite les DC ainsi activées peuvent à leur tour activer les cellules T sécrétrices de l'IL-10 et les cellules B naïves productrices des IgA.

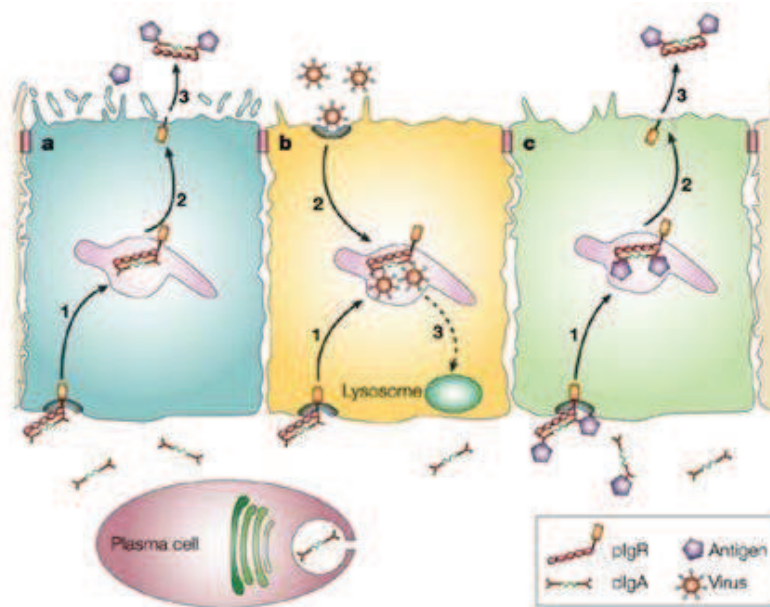


Figure 16. Fonctions des IgA dans le tractus GI (Adapté de Raul Rojas et Gerard Apodaca, 2002). A) Formation de la SIgA : les pIgA sont produites par les plasmocytes dans la LP puis capturées par le récepteur pIgR exprimé à la surface basolatérale des CEI pour exercer la transcytose vers la lumière intestinale. Au moment de relargage dans la lumière, le polypeptide extracellulaire (SC) du pIgR reste associé à la pIgA. L'association de la pIgA et du SC forme la SIgA sécrétée dans la lumière intestinale. Dans les sécrétions, la SIgA neutralise les Ag. B) Neutralisation des pathogènes intracellulaires : les complexes pIgA-pIgR neutralisent les virus présents dans la cellule. Cette association pIgR-pIgA-virus inhibe la production de nouvelles particules virales. Le virus est ensuite conduit dans les vésicules lysosomales pour dégradation. C) Sécrétion des Ag : les Ag qui ont pénétrés la LP sont capturés par les pIgA nouvellement produites. Les pIgA complexées au Ag sont pris en charge par le pIgR pour exercer la transcytose et l'excrétion dans la lumière intestinale.

La SIgA assure en permanence la communication entre la lumière intestinale et le système immunitaire où les Ag sont capturés et présentés aux DC afin d'activer la réponse immunitaire³⁷.

C. Les récepteurs aux IgA/SIgA

Au sein de la muqueuse intestinale, la SIgA a de nombreuses propriétés immunologiques anti-inflammatoires⁴³ et interagit avec les CEI, les DC ou encore les cellules M. La liaison

entre les SIgA et les cellules est médiée par des récepteurs spécifiques aux IgA. Ces récepteurs aux IgA n'ont pas encore été tous identifiés et référencés. A l'heure actuelle, il y a sept différents types de récepteurs aux IgA⁶⁵ (Figure 17). Ces récepteurs sont exprimés par différents types cellulaires (Tableau 1).

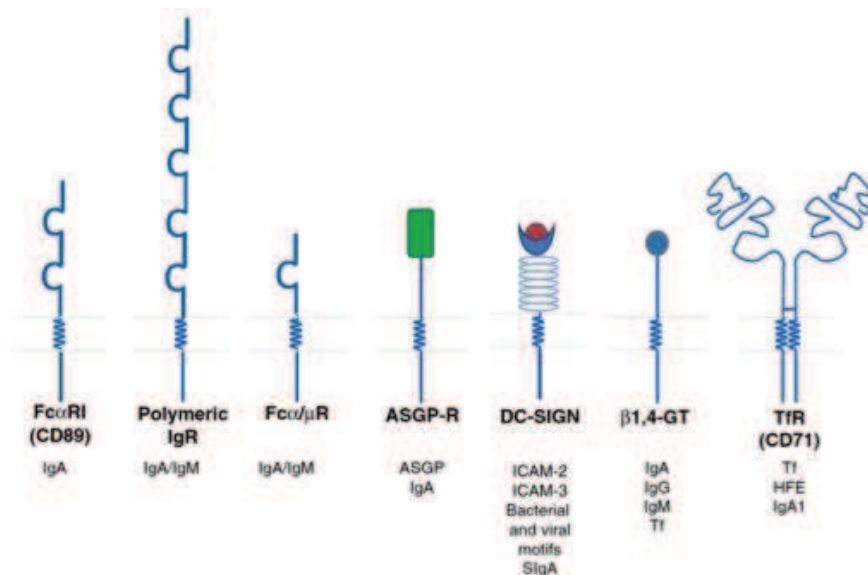


Figure 17. Représentation schématique des principaux récepteurs aux SIgA/IgA (Extrait de Jürgen Floege et al, 2014).

La plupart de ces récepteurs interagissent avec les sites appartenant à la séquence peptidique de l'IgA comme les récepteurs Fc et d'autres avec la chaîne J ou la SC⁴³ (Tableau 1). La liaison de la SIgA ou de l'IgA avec l'un de ces récepteurs a une fonction bien particulière. La liaison avec les récepteurs Fc (liaison avec les carbohydrates contenant dans les chaînes Fc des IgA) permet l'endocytose des complexes capturés, la phagocytose des Ag, l'activation de la cyto-toxicité cellulaire (ADCC), la présentation des Ag ou la production de médiateurs inflammatoires⁴³. Ces Fc récepteurs jouent un rôle capital dans l'induction de la réponse immunitaire humorale et cellulaire⁶⁶.

Récepteur	Site de liaison	Localisation cellulaire
pIgR ^{2,43, 61,65}	IgA/IgM	Cellules mésengiales, épithéliales et glandes
FcαRI/CD89 ^{61,65,67}	IgA ^{61,67}	Cellules mésengiales, du sang, monocytes, macrophages, neutrophiles, DC, cellules de Kupffer, éosinophiles ^{61,67,68,69}
Fcα/μR ^{43,61}	IgA/IgM ⁶¹	Cellules mésengiales et hématopoïétiques, cellules B et macrophages ^{61,69}
ASGP-R ^{43,65}	ASGP/IgA2 ⁶¹	Cellules mésengiales, du sang et hépatiques ^{46,61,69}
DC SIGN ⁶⁵	SIgA/ICAM2-3	DC et macrophages
SC receptor ⁶¹	SIgA (SC)	Eosinophiles ⁶⁹
M cell IgA receptor ⁴³	SIgA	Cellules M
TfR/CD71 ⁶²	Tf/HFE/IgA1 ⁶²	Cellules mésengiales, épithéliales et hématopoïétiques ^{62,70}
Dectin-1 ²²	SIgA/IgA2 ²²	Cellules intestinales murines et humaines ²²
SIglec-5 ²²	SIgA/IgA2 ²²	Cellules intestinales murines et humaines ²²

Tableau 1. Liste des récepteurs aux SIgA/IgA chez l'Homme.

D. Le récepteur à la transferrine, nouveau récepteur aux IgA

Le récepteur à la transferrine (Tf) (hTfR chez l'homme) a été récemment identifié et référencé comme un récepteur à l'IgA. En effet, dans le cas des personnes souffrant de néphropathies aux IgA, il y a une déposition des pIgA1 dans les cellules mésengiales. Ce dépôt des pIgA1 dans les cellules mésengiales des glomérules active la prolifération des cellules, la production de cytokines pro-inflammatoires et la perte de la fonction rénale⁶¹. Il a été identifié qu'un récepteur au fragment Fc des IgA est responsable de cette déposition⁶¹. D'après les travaux de I.C. Moura et R.C. Monteiro et al^{62,71,72}, le hTfR (hTfR1 ou CD71 et hTfR2) exprimé à la surface des cellules mésengiales est incriminé dans ce phénomène pro-inflammatoire.

Le hTfR est un récepteur qui interagit avec plusieurs ligands la Tf, la protéine de l'hémochromatose humaine (HFE) et les pIgA1⁶⁵, ce qui implique qu'il possède des rôles multiples dans le métabolisme ou assimilation du fer et interagit avec le système immunitaire. Le hTfR est une glycoprotéine membranaire de type II⁷³ de 190 kDa⁷⁴, constituée d'un homodimère⁷⁵ (les monomères sont liés entre eux par des liaisons covalentes de type ponts disulfures) composé de deux sous-unités transmembranaires⁷⁶. L'ecto-domaine ou le peptide globulaire extracellulaire^{74,77} du hTfR est composé de trois différents domaines : un « protease like domain », un domaine apical et un domaine hélicoïdal⁷⁵ (Figure 18). La Tf se lie sur le domaine extracellulaire⁷⁷. Le hTfR comprend deux formes différentes le hTfR1 et le hTfR2⁷⁸. Le hTfR1 est la forme plus connue et responsable du métabolisme du fer⁷⁷. Le hTfR2 ne présente qu'une affinité faible pour lier la Tf⁷⁵. Les fonctions biologiques du hTfR2 ne sont pas encore définies. Le hTfR1 est l'acteur principal de l'assimilation du fer⁷⁰ et responsable de la déposition des pIgA1 dans les reins.

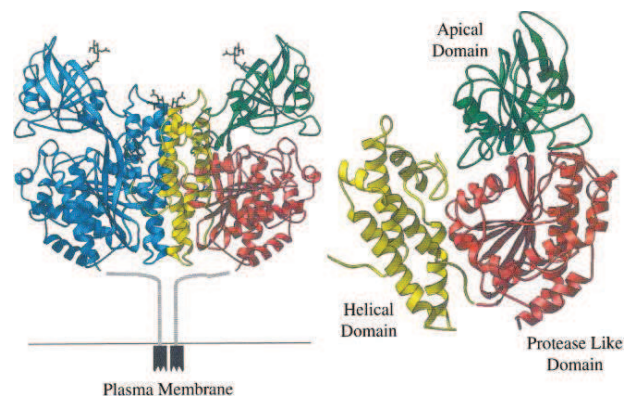


Figure 18. Représentation de la structure du hTfR (Extrait de P. Aisen, 2004). A gauche : représentation du hTfR et à droite : représentation du domaine extracellulaire du hTfR (en vert le domaine apical, en rouge le protéase like domain et en jaune le domaine hélicoïdal).

Dans les conditions normales physiologiques, ce récepteur hTfR est omniprésent dans de nombreux tissus présentant un fort taux de renouvellement cellulaire tels que les précurseurs érythrocytaires dans le foie mais aussi dans le système nerveux et l'épithélium intestinal⁷⁵. Concernant les CEI, l'expression du hTfR est variable selon la localisation dans la

muqueuse. En effet, le récepteur est omniprésent à la surface apicale et basolatérale des CEI localisées dans les cryptes et uniquement à la surface basolatérale des CEI localisées dans les villis ^{79,80}.

Le rôle principal et premier du hTfR est l'assimilation du fer ⁶¹. Un adulte contient environ 3 à 5 g de fer ⁸¹ circulant sous forme de complexe avec la Tf et seulement 1 g est stocké dans les cellules ⁸². La régulation de ce ratio fer circulant/fer stocké est contrôlée par l'expression du récepteur. Selon la teneur en fer, le hTfR est surexprimé ou sous-exprimé. Le fer ³⁺ s'associe à la Tf qui se lie au hTfR ^{73,77}. La Tf est une glycoprotéine ⁷⁴ de 76-81 kDa ⁸¹ qui se compose de deux domaines globulaires homologues reliés par une chaîne peptidique courte et linéaire ⁷⁵. La Tf est un fort chélateur du fer et lie les ions ferrique Fe ³⁺ dans le compartiment extracellulaire (pH 7.4) ⁸¹. Le pH extracellulaire favorise l'interaction de forte affinité entre l'hTfR1 et l'HoloTf (forme chargée en fer ou HoloTf) ⁸² en comparaison avec la forme non chargée en fer (ApoTf) ^{75,77,80}. A pH acide (exemple du pH endosomal), les ions fer se dissocient de la Tf ⁸¹. Le hTfR1 peut lier une ou deux molécules de Tf ⁷³. Après liaison avec le hTfR1, la molécule de l'HoloTf subit un changement de conformation ⁷⁸ et le domaine apex ou apical du récepteur reste accessible pour la fixation d'un autre ligand ⁷⁸ (Figure 19).

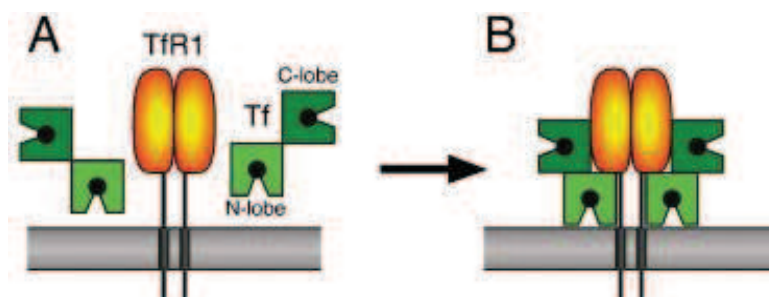


Figure 19. Représentation schématique de la liaison de l'HoloTf au récepteur hTfR (Extrait de D.R. Richardsdon). A) Initiation du contact avec l'HoloTf et le hTfR1. B) Etablissement de la liaison de forte affinité pour l'HoloTf et changement de conformation de l'HoloTf

L'absorption du fer s'accomplit dans le duodénum et la partie supérieure du jéjunum⁸¹. Le fer ingéré peut traverser les entérocytes de la surface apicale à la basolatérale. Le complexe hTfR1-Tf est ensuite endocytosé via des vésicules de clathrine^{73,77,81} (Figure 20). Au sein de la vésicule d'endocytose contenant le complexe Tf-hTfR1, le pH est acidifié (pH 5.5-5.6) via les pompes à proton/ATPases (adénosines triphosphatases) exprimées dans la membrane de la vésicule⁸¹. L'acidification du pH induit un changement de conformation de la Tf et le relargage des ions ferriques Fe^{3+} ^{73,74,75,81}. Le Fe^{3+} ainsi libéré est réduit en Fe^{2+} par le transporteur de métal divalent (DMT-1) dans le compartiment intracellulaire^{77,81}. La Tf non chargée en fer (ApoTf) reste liée au hTfR1. Le complexe hTfR1-ApoTf est ensuite reconduit à la membrane cellulaire pour recyclage du hTfR1 afin d'être réutilisé dans un autre cycle^{77,81} et relargage de l'ApoTf qui pourra re-capturer des ions Fe^{3+} ^{74,75,81}. Le foie est le site principal de production et du catabolisme du Fe^{3+} ^{75,82}. La Tf a une demi-vie de 8 jours dans le corps ce qui permet à la molécule d'accomplir le cycle d'assimilation du fer une centaine de fois, et le cycle de délivrance des ions ferriques par la voie hTfR1-Tf s'effectue en 5-20 min selon le type cellulaire⁸¹.

En plus de la voie classique d'assimilation du fer (Figure 20), des modèles *in vitro* de cellules polarisées (Madin-Barby Canine Kidney, MCDK)⁷⁵ ont montré que le hTfR peut traverser les cellules c'est-à-dire que le récepteur capture un ligand comme la Tf dans un compartiment et le délivre dans l'autre compartiment. G. Odorizzi et al⁸³ ont mis en évidence, au travers de ce modèle, la présence du hTfR dans des vésicules endosomales à la fois à la surface apicale et basolatérale. Ces modèles *in vitro* ont permis de montrer deux voies de recyclage⁷⁵. D.R. Sheff et al^{84,85} ont décrit deux mécanismes distincts de recyclage du hTfR à partir du modèle MCDK, prouvant le transport d'un ligand dans un compartiment à l'autre. Ce mécanisme fait intervenir différentes populations de vésicules endosomales : les

endosomes précoces (EEA-1) et les protéines guanosine tri-phosphatases (GTPases) Rab4, Rab5, et Rab11⁷⁵.

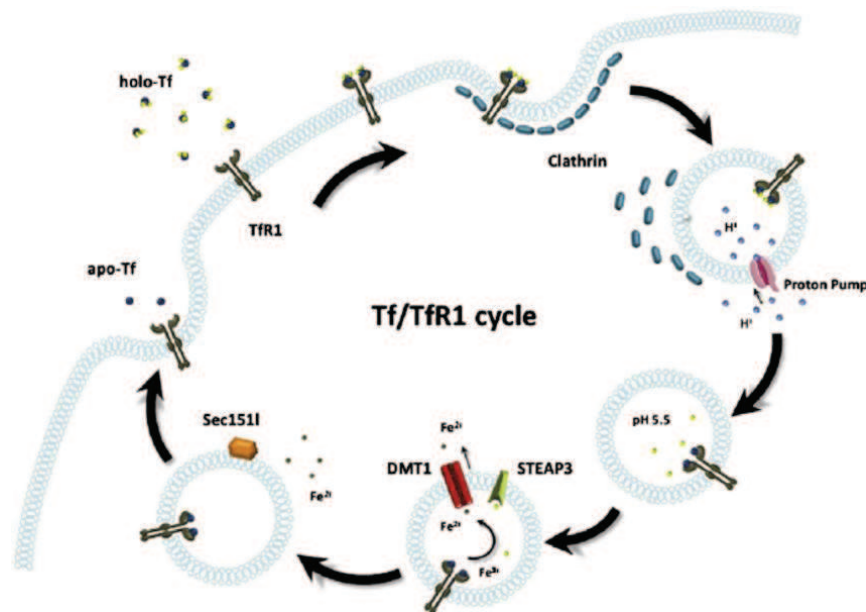


Figure 20. Représentation schématique de l'assimilation du fer par le récepteur hTfR1 dans les cellules des mammifères (Extrait de K. Gkouvatsos et al, 2012).

V. Etude sur le transport anormal des IgA au travers des épithéliums dans le cas de maladies inflammatoires rénales et intestinales

A. Cas des néphropathies aux IgA

La néphropathie aux IgA ou maladie de Berger est la glomérulonéphrite la plus commune et fréquente dans le monde. Cette pathologie est responsable de défaillances rénales et se caractérise par des hématuries et protéinuries. Les biopsies rénales de personnes souffrant de cette pathologie montrent une déposition des IgA dans les cellules mésangiales et une forte prolifération du mésengium glomérulaire^{86,87}. Cette pathologie est caractéristique de la sous-classe des IgA1 dont la structure est altérée par la présence anormale de O-glycan au niveau de la zone charnière.

Les investigations de Ivan C. Moura ⁶² ont permis de mettre en évidence l'interaction entre le hTfR (CD71) et les IgA1 à partir de plusieurs modèles *in vitro*. En effet le hTfR est surexprimé dans les tissus rénaux dans le cas des néphropathies aux IgA ce qui peut corrélérer avec la déposition mésengiale des IgA1. Les travaux de I. C. Moura ⁶² ont démontré au travers de modèles avec des lignées humaines épithéliales HT29 et monocytaires U937 et Daudi cells, que le hTfR lie les IgA1 monomériques avec une meilleure affinité que la forme polymérique ou de la sous-classe IgA2. Ils ont aussi démontré que la Tf contenue dans le sérum n'intervient pas dans la liaison de l'IgA1 avec le hTfR. Ces résultats ont permis d'identifier le hTfR comme un nouveau récepteur aux IgA. Ce hTfR exprimé par les cellules mésengiales est impliqué dans le phénomène de déposition des IgA.

I. C. Moura et al ⁷² ont démontré l'importance de la polymérisation et le degré de glycosylation de l'IgA dans l'interaction avec le hTfR. En effet, les IgA transportées dans les le mésengium sont hypo-galactosylées et peuvent s'agréger pour former de complexes immuns. A partir d'un modèle *in vitro* de cellules humaines mésengiales, I. C. Moura ont démontré que la pIgA1 lie le hTfR exprimé par les cellules mésengiales. Des tests d'inhibition en présence de hTfR1 et hTfR2 solubles ont montré le blocage de la liaison de la pIgA1 avec les cellules mésengiales humaines et les Daudi cells (les formes solubles du hTfR lient les IgA). La pIgA se lie au hTfR et induit l'internalisation par endocytose des complexes hTfR-pIgA1. Les expériences complémentaires de I. C. Moura et al ont aussi démontré que l'IgA2 ne lie pas le hTfR exprimé par les cellules mésengiales, ce qui peut impliquer que la séquence peptidique intrinsèque de l'IgA1 joue un rôle dans l'interaction avec le hTfR. L'observation des échantillons des biopsies des personnes souffrant de néphropathies aux IgA indique que les IgA sont sous forme polymérique et que le hTfR est surexprimé et co-localise avec les dépôts d'IgA.

I. C. Moura et al⁸⁸ ont prouvé que les pIgA1 induisent l'expression du récepteur hTfR selon un effet temps et dose-dépendant dans les cellules mésengiales. La déposition de la pIgA1 a pour conséquence la prolifération des cellules mésengiales et la sécrétion de l'IL-6 et TGF- β .

B. Cas des maladies céliaques actives

Dans le cas des maladies céliaques actives (MCA), les patients souffrent d'entéropathologies inflammatoires dérivant des prédispositions génétiques à des peptides alimentaires tels que la gliadine ou le gluten. L'inflammation intestinale résulte d'une synergie entre l'immunité adaptative et innée en réponse aux peptides alimentaires non digérés de type gliadine ou gluten. Ces peptides présents dans la lumière intestinale sont conduits de l'autre côté de l'épithélium intestinal dans la LP. Ce transport permet le relargage de la gliadine sous une forme intacte et complexée avec les SIgA anti-gliadine, dans le compartiment basolatéral. Ce transport anormal des complexes SIgA-gliadine s'accompagne d'une perte de l'intégrité de l'épithélium détectée par l'analyse de l'entrée de molécules comme le mannitol au travers des CEI.

Les travaux de T. Matysiak-Budnik et al⁷⁹ ont mis en évidence une surexpression du hTfR au niveau de CEI (biopsies des duodénum) chez les personnes souffrant de MCA. Le hTfR est exprimé par les CEI localisées dans les cryptes de l'épithélium alors que dans le cas des MCA, le hTfR est exprimé à la fois dans les cryptes et les villis. Cette surexpression serait induite par la sécrétion de l'IL-15. Sur les échantillons des biopsies intestinales de personnes souffrant de MCA, l'IgA est co-localisée avec le hTfR à la surface apicale et basolatérale des CEI, à l'inverse des biopsies des personnes saines. A partir de Daudi cells, T. Matysiak-Budnik et al⁷⁹ ont mis en évidence l'interaction entre la SIgA et le hTfR. Ils ont aussi montré une co-localisation entre les IgA et les peptides gliadines. Grâce aux investigations effectuées à partir des biopsies, il est possible d'affirmer que les SIgA transcytosées dans la lumière

intestinale, forment des complexes immuns avec la gliadine non digérée, puis permettent l'interaction avec le hTfR exprimé par les CEI, ainsi que l'internalisation des complexes SIgA-gliadine-hTfR et le relargage des complexes SIgA-gliadine intacts dans la compartiment basolatéral. Les résultats de T. Matysiak-Budnik et al ⁷⁹ ont démontré que la Tf n'est pas un inhibiteur du transport anormal de la SIgA. Ils proposent le schéma suivant (Figure 21) pour illustrer leur hypothèse concernant le transport anormal des peptides gliadines dans la LP chez les personnes souffrant de MCA.

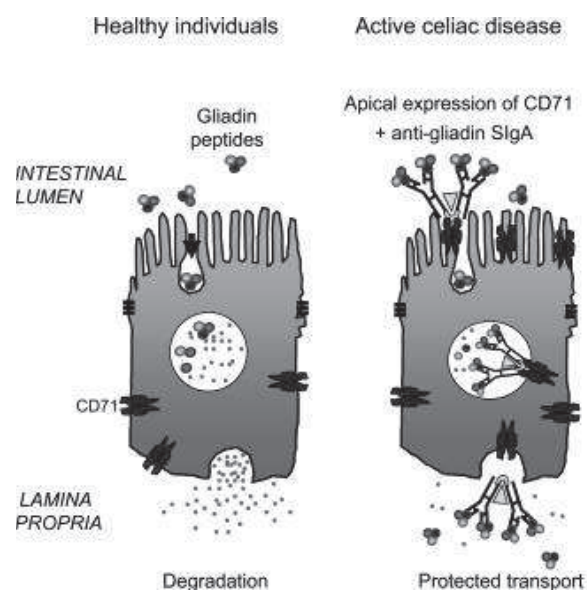


Figure 21. Représentation schématique du mécanisme de rétrotransport des peptides gliadines dans la LP chez les personnes souffrant de MCA (Extrait de T. Matysiak-Budnik et al, 2007). Dans le cas des personnes saines (à gauche), les peptides gliadines sont internalisés et dégradés dans les vésicules endosomales des CEI. Ensuite les peptides gliadines fractionnés sont libérés dans la LP. Dans le cas de personnes souffrant de MCA (à droite), les peptides gliadines sont complexés avec les SIgA anti-gliadine. Les complexes SIgA-gliadine sont capturés par le hTfR puis endocytosés dans les CEI via des vésicules endosomales. Les complexes SIgA-gliadine sont ensuite libérés dans la LP sous forme intacte.

Les travaux C. Lebreton et al ⁸⁹ ont confirmé les hypothèses précédemment émises sur le rétrotransport des SIgA libre ou sous forme de complexes avec la gliadine au travers des CEI. En effet, la SIgA et le hTfR interagissent sans présence de médiateurs à la surface des CEI dans les épithéliums des personnes souffrant de MCA. La transglutaminase 2 (Tgase 2) est une protéine qui permet l'internalisation et l'endocytose du hTfR complexé avec son ligand.

Dans le cas du rétrotransport des SIgA ou SIgA-gliadine, la Tgase 2 co-localise avec le hTfR mais n'interagit pas avec la SIgA. Cette information montre que la Tgase 2 aide à une endocytose rapide des complexes hTfR-SIgA ou hTfR-SIgA-gliadine. A partir de lignées cellulaires épithéliales Caco-2 et HT29-19A, C. Lebreton et al ont montré la présence du hTfR à la surface des cellules et une interaction directe avec la SIgA. Leurs investigations prouvent aussi la présence du complexe Tgase 2-hTfR-SIgA (-gliadine) en surface des cellules Caco-2 (en suspension et polarisées). Les complexes hTfR-SIgA sont détectés dans les vésicules EEA-1 ou de recyclage (GTPase Rab-11) mais le complexe semble être dissocié dans les vésicules plus internes (Lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP-1). Cette protéine Tgase 2 est aussi impliquée dans le phénomène de déposition des IgA1 dans le mésangium dans le cas des néphropathie aux IgA ⁹⁰.

Ce mécanisme de transport des SIgA par le hTfR au travers des CEI a été observé chez un modèle murin ⁹¹. Ce rétrotransport a pour conséquence le dépôt des complexes SIgA-gliadine dans la LP mais aussi l'activation de cellules T CD4⁺ contre l'Ag transporté et l'induction de la production de l'interféron γ (IFN- γ)⁹¹. Ces constatations corrélerent avec la pathogénèse des MCA, en effet le rétrotransport des complexes SIgA-gliadine induit une activation anormale des cellules T intestinales ⁹¹.

C. Etablissement d'un rétrotransport des IgA au travers des épithéliums

En conclusion, ces investigations sur le rétrotransport des pIgA ou des SIgA au travers des cellules épithéliales intestinales ou mésangiales, permettent d'affirmer que le hTfR a des rôles biologiques différents selon le ligand capturé. La pIgA1 ou SIgA (seule ou associée avec la gliadine) et la Tf partagent le même récepteur mais la réponse biologique induit par la liaison de l'un ou l'autre ligand est différente (assimilation du fer ou transport des IgA ou complexes immuns au travers des muqueuses). Ces études mettent en évidence un

transport anormal des pIgA et SIgA dans les tissus intestinaux et mésengiaux via le hTfR exprimé par ces cellules épithéliales dans le cas des deux maladies inflammatoires.

Intérêt du projet

Après transcytose dans la lumière intestinale, la SIgA reconnaît les Ag d'origine alimentaire ou les microorganismes entériques afin d'effectuer l'exclusion immunitaire pour prévenir des infections. La SIgA est un élément clé de l'immuno-surveillance du tractus GI. Il paraît donc important de comprendre et de connaître tous les mécanismes qui s'apparentent aux SIgA. Dans le cas des néphropathies aux IgA et des MCA, la SIgA capture les peptides alimentaires non digérés et les conduit grâce aux hTfR au travers de la barrière intestinale dans la LP où le système immunitaire est activé et induit une inflammation qui entraîne une diminution de l'étanchéité de la barrière.

L'hypothèse de ce travail de thèse est de mettre en évidence dans les conditions de l'homéostasie à partir de cellules Caco-2, que ce rétrotransport des SIgA via le hTfR1 s'effectue afin de conduire et présenter des Ag aux cellules du système immunitaire de type DC qui sont localisées sous la barrière épithéliale intestinale dans la LP en dehors des PP et ILF. Ce mécanisme peut constituer un nouveau système de capture, de présentation des Ag ingérés (exemple d'une bactérie) et d'activation du système immunitaire en cas d'infection en plus du passage sélectif des Ag lumenaires par les cellules M ou par l'échantillonnage via les DC.

Pour confirmer cette hypothèse sur ce rétrotransport des SIgA dans les conditions de l'homéostasie, deux modèles *in vitro* à partir d'une lignée de cellules épithéliales intestinales Caco-2 ont été développés. Le premier modèle, à partir des cellules en suspension, a permis de confirmer l'établissement d'une interaction entre la SIgA et le hTfR1 exprimé par la lignée Caco-2. Le second modèle à partir des cellules polarisées cette

fois-ci, a permis de mimer la barrière intestinale et d'observer le rétrotransport des SIgA qui se met en place entre le compartiment apical et basolatéral. Ce modèle a permis de déterminer l'établissement du rétrotransport des SIgA (ou sous forme de complexes avec un Ag de type bactérie) déposées en contact avec la surface apicale des CEI dans le milieu basolatéral.

Ce rétrotransport des SIgA libres ou complexées avec une bactérie a été mis en évidence à l'aide du modèle de cellules Caco-2 polarisées. Afin d'affirmer que ce rétrotransport constitue un nouveau système de capture, de présentation des Ag et d'activation d'une réponse immunitaire spécifique, il serait intéressant de déterminer le devenir des complexes immuns rétrotransportés dans le milieu basolatéral. Afin de mimer une éventuelle activation du système immunitaire dans la LP par transport et apprêtement des Ag à la surface de DC c'est-à-dire prise en charge des Ag par les DC, il pourrait être envisagé d'intégrer la culture de DC dans le modèle de CEI polarisées (dans le milieu basolatéral).

Matériel biologique

I. Molécule de l'IgA de sécrétion

L'IgA murine nommée IgAC5, qui est spécifique du LPS de l'espèce bactérienne *Shigella flexneri* du sérotype 5a, est obtenue à partir de cellules hybridomes comme indiqué par A. Phalipon et al, en 1995 ⁹². Les plgAC5 sont extraites et purifiées des formes IgA monomériques comme indiqué par A. Mathias et al, en 2013 ⁹³. (Pour des raisons de simplicité la plgAC5 sera notée plgA dans la suite de ce mémoire)

200 µg de plgA sont conjuguées avec l'indocyanine 5 (Cy5) pour les expériences de détection en cytométrie de flux ou l'indocyanine 3 (Cy3) pour les marquages pour l'observation des cellules au microscope confocal. Le couplage plgAC5-Cy3 ou plgAC5-Cy5 est réalisé selon les indications du fournisseur du kit (Lightning Link™, Innova Biosciences). Ensuite les plgA purifiées, plgA-Cy3 ou plgA-Cy5 sont couplées avec la hSC de manière *in vitro* selon un ratio 5:1 comme indiqué par P. Crottet et al, 1998 ⁹⁴.

L'intégrité des molécules de plgA et SIgA purifiées ou marquées avec la Cy3 ou Cy5 a été vérifiée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en condition non réductrice et dénaturante couplée à un immuno-marquage spécifique aux chaînes α des IgA murines et de la hSC par transfert sur membrane PVDF (Polyvinylidene Difluoride) (Figure 22).

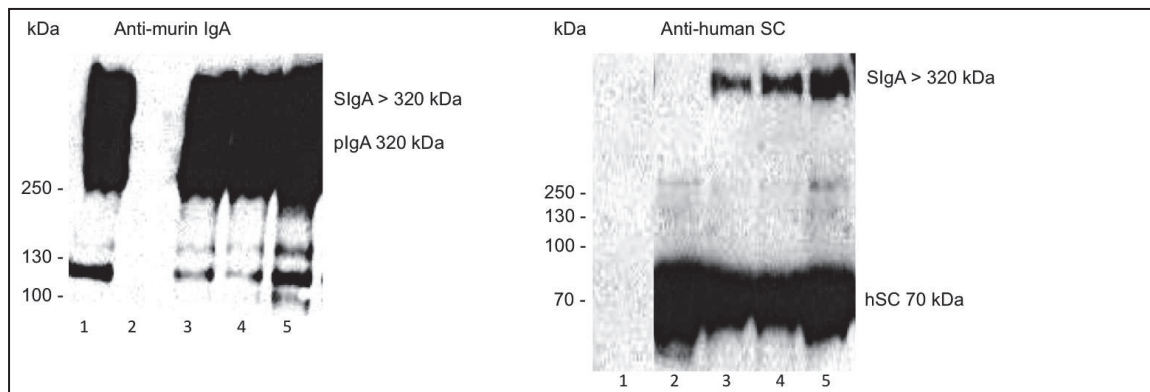


Figure 22. Immuno-détection de la SIgA reconstituée *in vitro* (chaines α murines à gauche et la hSC à droite). (Condition dénaturante et non réductrice). Pour l'immuno-détection des chaines α murines, il est observé des spots à 320 kDa correspondant à la pIgA et les spots dont le poids moléculaire est supérieur à 320 kDa correspondant à la SIgA. Pour l'immuno-détection de la hSC, il est observé une bande à un poids moléculaire supérieur à 250 kDa qui correspond à la SIgA et les spots à 70 kDa correspondent à la hSC libre. Le traitement par SDS dénature les liaisons non covalentes entre la pIgA et la SC.

1: pIgAC5 purifié 500 ng, 2: hSC purifiée 100 ng, 3: SIgA reconstituée 500 ng, 4: SIgA reconstituée couplée à la Cy3 500 ng et 5 : SIgA reconstituée couplée à la Cy5 500 ng

II. Molécule de transferrine

La molécule d'HoloTf (chargée en ions fer) a été fournie par CSL Behring (Berne, Suisse) dans une solution de PBS. L'intégrité de la molécule d'HoloTf a été vérifiée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en condition non réductrice et dénaturante (Figure 23). Ensuite la molécule d'HoloTf est couplée avec le fluorochrome isothiocyanate de fluorescéine (FITC, Sigma) selon les indicateurs du fournisseur.

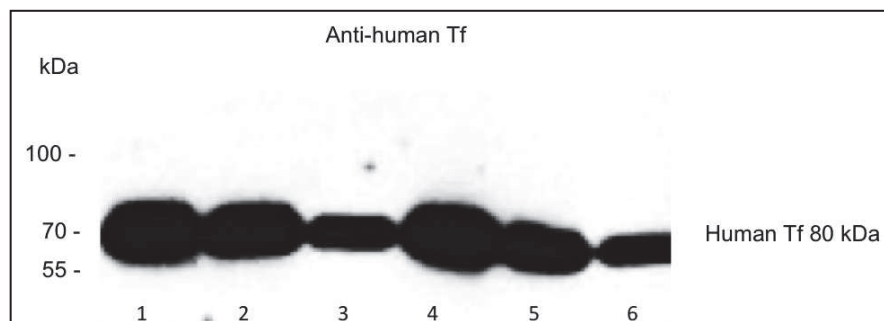


Figure 23. Immuno-détection de la Tf humaine purifiée (anti-human Tf 1:300 et rabbit anti-mouse IgG HRP 1:5000). (Condition dénaturante non réductrice).

1: HoloTf 1 μ g, 2: HoloTf 500 ng, 3: HoloTf 100 ng, 4: ApoTf 1 μ g, 5: ApoTf 500 ng et 6: ApoTf 100 ng.

III. Lignée de cellules épithéliales intestinales : Caco-2

La lignée humaine d'adénocarcinome du côlon cellules Caco-2 (HTB-37) sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's-modified Eagle's medium) complet (cDMEM) comme indiqué par C. Perrier et al, 2006 ⁹⁵.

Pour reconstituer la monocouche intestinale qui mime la barrière intestinale, les cellules Caco-2 (3.10^5 cellules/Snapwell) sontensemencées sur des inserts dits Snapwell (membrane de polyester, diamètre de 12 mm, porosité de $0.4 \mu\text{m}$, 3801 Clear, Costar) comme indiqué par S. Cottet et al, 2002 ⁹⁶. Les cellules sont polarisées après 21 jours de culture en milieu DMEM complet (Figure 24).

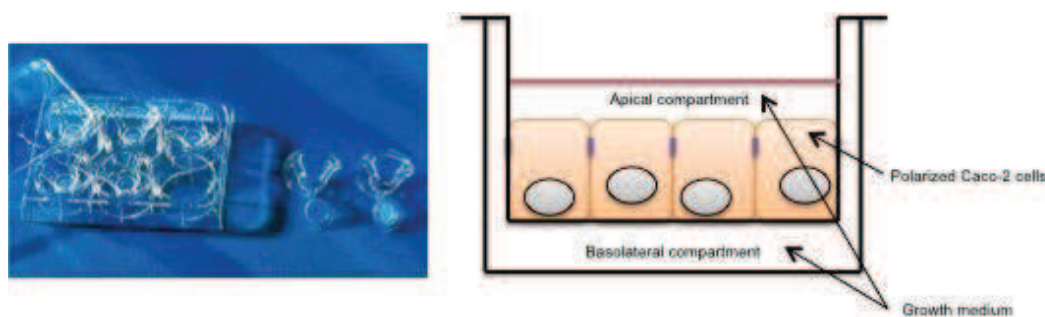


Figure 24. Modèle de culture sur Snapwell. A gauche : photographie des inserts de culture Costar Snapwell. A droite : culture des cellules sur Snapwell. Les cellules sont déposées sur un filtre de polyester monté sur un dispositif amovible qui permet de pouvoir changer le milieu et découper les filtres.

L'intégrité des monocouches est évaluée par mesure de la résistance trans-épithéliales (TER) qui sont comprises entre 350 et $600 \Omega/\text{cm}^2$ avec un Millicel-ERS apparatus (Millipore, Bedford, MA) ⁹⁶, par détermination du transport de billes fluorescentes (FP) au travers des cellules polarisées (yellow-green fluorescent, diamètre de $0.2 \mu\text{m}$, carboxylate modified FluoSpheres beads) ²² et par marquage des protéines des jonctions serrées (ZO-1) entre les cellules (Figure 25).

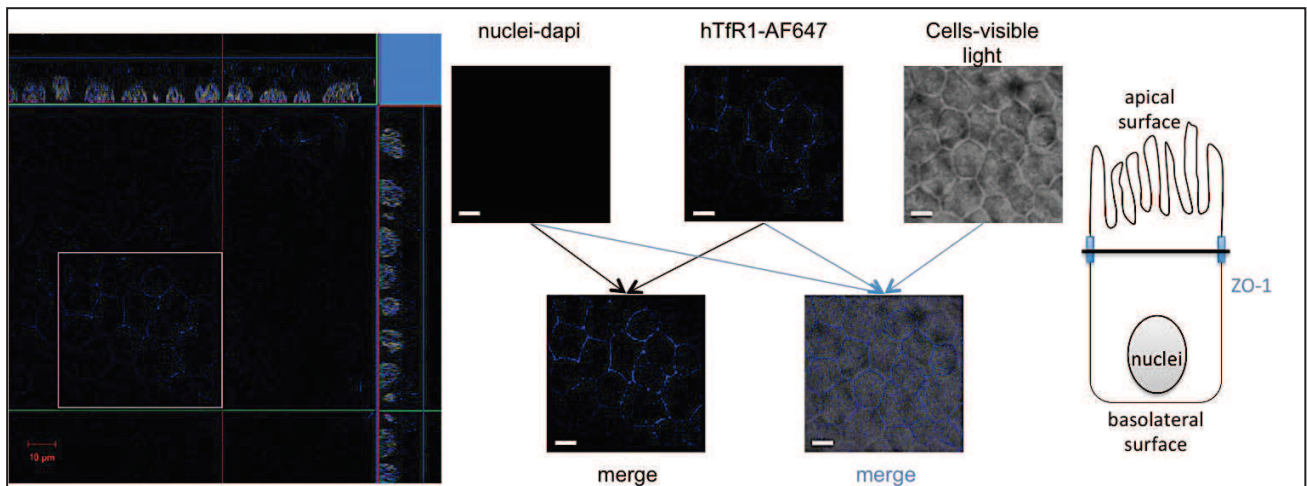


Figure 25. Marquage des protéines ZO-1 des cellules Caco-2 polarisées sur filtres Snapwell. Le marquage est réalisé comme indiqué S. Longet et al, en 2013. Sur ce plan à proximité de la surface apicale des cellules polarisées (image de gauche), le marquage ZO-1 (en bleu) montre le pourtour de chaque cellule. Une fraction de ce plan a été découpée et agrandie sur la droite de ce panneau où l'on peut voir chacun des marquages : les noyaux avec dapi (plan au dessous des noyaux), les protéines ZO-1 en bleu, et les cellules par la lumière visible. Deux merges sont proposés, le premier est composé des signaux des noyaux et des protéines ZO-1 et le second des signaux des noyaux, les protéines ZO-1 et de la lumière visible. Le marquage des protéines ZO-1 se superpose avec le pourtour des cellules visible avec la lumière blanche.

Le transport des FP montre que les filtres des inserts Snapwell (pores de 0.4 µm) sont perméables à ces billes (diamètre de 0.2 µm) (Figure 26). Ensuite, les essais de transport au travers des cellules Caco-2 à 37°C et 4°C ont montré un transport actif au travers des cellules polarisées d'un certain nombre des FP par pinocytose par exemple (Figure 26). Le nombre de FP transportées en 90 min à 4°C est significativement inférieur à celui des FP transportées en 90 min à 37°C.

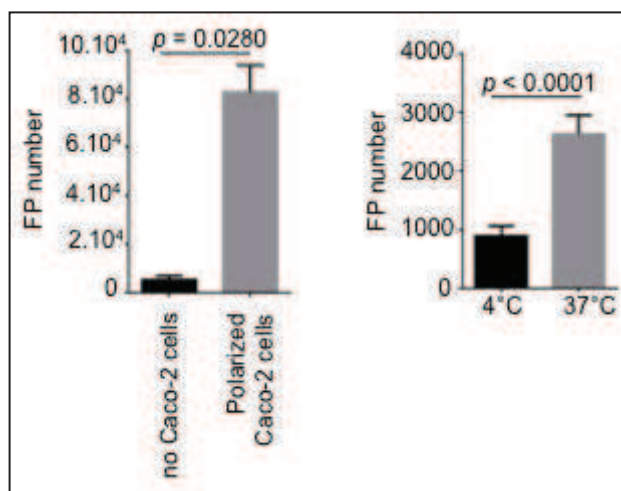


Figure 26. Transport des FP au travers des monocouches des cellules Caco-2 polarisées sur inserts Snapwell. Les expérimentations sont réalisées selon le protocole de Rochereau et al, en 2013. Le graphique de gauche représente la différence entre le nombre de FP qui traverse les filtres des inserts Snapwell du milieu apical au milieu basolatéral en 90 min à 37°C et celui des FP qui sont transportées dans le milieu basolatéral au travers les cellules Caco-2 polarisées en 90 min à 37°C (n = 4). Le graphique de droite représente la comparaison entre le nombre de FP transportées au travers de cellules Caco-2 polarisées du milieu apical au milieu basolatéral après une incubation de 90 min à 4°C ou à 37°C (n = 9).

VI. Extinction génique/silence de l'expression du hTfR1

Les petits ARN interférant (siRNA) ciblant le hTfR1 (ON-TARGETplus human TFRC SMARTpool ; séquence 5'-GAAUGGAUCUAUAGUGAUU-3', 5'-GAUAAGAACGGUAGAUC-3', 5'-GUAACUGGUCCAUGCUAA-3', 5'-CUGAAUGGCUAGAGGGAUA-3') ont été obtenus auprès de la société Dharmacon-GE Life Sciences. Le but de cette expérience est d'inhiber partiellement l'expression du hTfR1 à la surface des cellules Caco-2. La resuspension des siRNAs a été réalisé comme indiqué par le fournisseur avec l'eau RNase free (GE Healthcare) à une concentration finale de 20 µM.

VII. Expression du TfR1 humain par des cellules CHO

La production du hTfR1 a été réalisée avec un modèle *in vitro* de cellules de Chinese Hamster Ovaries (CHO) Flp-In fournies par le Dr Bénédicte Baisse du laboratoire du Dr Olivier Spertini (Service d'Hématologie, CHUV, Lausanne, Suisse). Ces cellules ont été

choisies car elles présentent un niveau d'expression du hTfR1 relativement faible. Elles sont cultivées dans un milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) complété de 10% de sérum de veau fœtal (FCS) (Sigma), 10 mM d'HEPES (Amined), 2 mM de Glutamine (Sigma) et 1% de pénicilline - streptavidine (Sigma) (cRPMI).

Le plasmide recombinant exprimant le hTfR1 pcDNA3-hTfR1 a été fourni par les collaborateurs du laboratoire du Dr Susan Ross (Université de Pennsylvanie, Philadelphie, États-Unis)⁹⁷.

VIII. Liste des principaux réactifs biologiques

Anticorps	Fournisseur	Utilisation / dilution
goat anti-murine IgA	Abcam ab97231	ELISA coating 1:500
mouse anti-human TfR1	BD clone M-A721	immuno-marquage 5 µg/mL
mouse anti-human Tf	ThermoFisher HFT-14	immuno-détection 1:3000
rabbit anti-human SC	Labmade	immuno-détection 1:3000

Tableau 1. Liste des AC utilisés avec nom du fournisseur et principale utilisation dans ce projet.

Les démarches expérimentales et les résultats détaillés sont regroupés dans l'article Margaux-Sarah Delaloix et Blaise Corthésy en cours de rédaction, joint en appendice à ce mémoire de thèse.

Concernant cet article, j'ai réalisé les expériences et généré les résultats sous la supervision du Dr Blaise Corthésy, directeur de thèse. J'ai rédigé la première version de cet article qui a ensuite été reprise et retravaillée par le Dr Blaise Corthésy, directeur de thèse.

Ce rapport présente les travaux réalisés sur ce projet pendant mes trois ans de thèse, sous quatre grands chapitres. Il ne sera reporté dans ce manuscrit de thèse uniquement les expériences entreprises sous forme de schémas accompagnés des résultats, des conclusions sur des expériences et des hypothèses.

Chapitre I : caractérisation de l'interaction entre la SIgA et le hTfR1 exprimé à la surface des cellules Caco-2

I. Présentation

Après transcytose par le pIgR, la SIgA est libérée dans la lumière intestinale pour exercer l'exclusion immunitaire des Ag alimentaires ou microorganismes entériques et interagit avec les protéines de surface des CEI pour activer le système immunitaire. De nombreuses études^{79,89} (détaillées précédemment dans l'Introduction sous-chapitre V) ont confirmé dans le cas des MCA que la SIgA (ou les complexes SIgA-Ag) lie au hTfR1 exprimé par les CEI comme les cellules Caco-2. Une fois capturée, la SIgA est transportée au travers des CEI dans le compartiment basolatéral sous forme intacte seule ou en complexe avec un Ag. Cependant, il n'a pas été encore identifié si cette interaction SIgA-hTfR1 a lieu dans un contexte de l'homéostasie ou steady-state par exemple dans un modèle de cellules Caco-2 polarisées. Cette interaction SIgA-hTfR1 pourrait mettre en évidence un nouveau ligand du hTfR1 et une nouvelle fonction de ce récepteur associée à la SIgA qui participe à l'immuno-surveillance du tractus GI. Pour déterminer l'établissement de cette liaison SIgA-hTfR1 dans un contexte non infectieux et ni inflammatoire, les cellules Caco-2 qui expriment le hTfR1, ont été exposées à une SIgA reconstituée *in vitro* dans le milieu de culture. L'interaction entre la SIgA et le hTfR1 est observée par des marquages fluorescents du récepteur et des ligands via cytométrie de flux et microscopie.

II. Procédures expérimentales et résultats

Le premier objectif de cette partie du projet était de mettre en évidence que la SIgA reconstituée *in vitro* interagit avec le clone de cellules Caco-2 du laboratoire cultivé en flask dans le milieu cDMEM.

Mise au point du modèle d'étude de l'interaction entre la SIgA et les cellules Caco-2

Des travaux précédents par A. Mathias et B. Pais (non publiés) ont montré l'établissement d'une liaison entre les cellules Caco-2 et la SIgA. A partir de ces données, il a été construit, développé et optimisé un modèle *in vitro* d'étude de l'interaction entre les SIgA et les cellules (2.5 µg de SIgA-Cy5 exposé à 10^5 cellules Caco-2 à 37°C pendant 30 min dans le milieu DMEM complété seulement de 10 mM HEPES).

Il a été décidé d'observer uniquement les signaux relatifs à l'interaction de surface, par conséquent les expériences de cytométrie de flux ont été réalisées à 4°C pour limiter la dynamique de la membrane cellulaire et minimiser l'internalisation ou l'endocytose des complexes hTfR1-SIgA. De plus, il n'a pas été obtenu aucune différence significative pour la détection du hTfR1 en surface des cellules Caco-2 et pour la liaison de l'HoloTf et SIgA entre une incubation de 30 min à 37°C ou 4°C (données non publiées). Il a été choisi de réaliser les expériences en condition saturante en présence de FCS (DMEM complété de 10 mM HEPES et de 2.5% FCS) (iDMEM) pour limiter les interactions non spécifiques. Pour la détection du hTfR1 à la surface des cellules, le signal de détection n'a pas varié de manière significative entre les conditions non saturantes et saturantes. Les signaux de liaison de l'HoloTf et de la SIgA ont été affectés, ce qui montre que des liaisons non spécifiques s'établissent entre les deux ligands et la surface des cellules. Les signaux obtenus dans les conditions saturantes sont relativement forts afin de pouvoir utiliser les quantités choisies pour chacun des ligands ou Ac pour conclure sur la suite des expériences.

Les cellules Caco-2 ont été exposées à la SIgA-Cy5 dans le milieu d'incubation selon un gradient en SIgA (0,625 à 5 µg) et un gradient de temps (30 à 180 min) (voir article en appendice). La liaison entre la SIgA-Cy5 et les cellules Caco-2 a été mise en évidence par cytométrie de flux. Ces tests de liaison montrent qu'une interaction s'établit entre la SIgA et les cellules Caco-2 de manière temps et dose dépendant à 4°C. Les incubations avec les quantités faibles en SIgA (0,625 et 1.25 µg) montrent des intensités de liaison similaires après 30, 60 ou 180 min d'incubation, ce qui suggère que toute la SIgA a été liée aux cellules dès les temps les plus courts d'exposition c'est-à-dire 30 min. À l'inverse pour les quantités plus élevées en SIgA (2.5 et 5 µg), il y a établissement d'un gradient d'intensité de la liaison entre la SIgA et les cellules Caco-2 selon le temps d'incubation. Ces résultats indiquent que la quantité de 1.25 µg de SIgA exposées à 10^5 cellules permet de pouvoir obtenir un signal suffisant pour étudier l'interaction entre la SIgA et les cellules dans la suite des expériences. La SIgA reconstituée *in vitro* combine une pIgAC5 de nature murine et une SC d'origine humaine. Pour déterminer lequel des domaines de la SIgA soit la pIgA ou la SC est impliqué dans cette interaction, des tests de liaison avec la pIgAC5 (1.25 µg) ou la SC purifiée (0.25 µg) ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment en comparaison aux essais de liaison de la SIgA (voir article en appendice). Ces données de cytométrie de flux montrent que la liaison de la pIgA et de la SIgA pour les cellules Caco-2 sont d'intensité similaire (pas de différence significative entre les deux ligands). À l'inverse, la liaison de la SC pour les cellules est d'intensité plus faible comparée à celle de la SIgA. Ces résultats suggèrent que l'interaction avec les CEI se fait via les domaines spécifiques de l'IgA.

Il a été entrepris d'étudier la cinétique de liaison de la SIgA pour les cellules Caco-2 à 30, 60, 90, 120 et 180 min par cytométrie de flux. Ces expériences n'ont pas permis de générer une courbe cinétique reproductible (établissement d'un plateau). En effet, pour la majorité des

expériences, il a été obtenu une liaison maximale après 60 min d'incubation et ensuite il a été constaté une perte dans la liaison de la SIgA. Il a été obtenu un plateau après 60 min d'incubation avec la SIgA seulement dans le cas de deux expériences. Parallèlement à ces tests de cinétique de la liaison de la SIgA, il a été effectué des tests de cinétique de la liaison de l'HoloTf pour les cellules Caco-2 afin de s'assurer de la fiabilité des tests pour la SIgA et de la fonctionnalité du hTfR1 au cours de ces tests. Il a été généré (pour toutes les expériences) une courbe cinétique où un plateau s'établit après 30 min d'incubation ce qui montre que le hTfR1 prend en charge rapidement la Tf et le système de capture est rapidement saturé (établissement d'un maximum et d'un plateau) mais la liaison est maintenue et conservée à son intensité maximale.

Mise en évidence de l'implication du hTfR1 exprimé par les cellules Caco-2

L'étape suivante était de caractériser l'interaction entre la SIgA avec les cellules Caco-2 donc avec le hTfR1. Avant tout, l'intégrité et la fonctionnalité du hTfR1 exprimé par les cellules Caco-2 du laboratoire ont été vérifiées par cytométrie de flux et immuno-détection par blot (voir article en appendice). Pour mettre en évidence la présence du hTfR1 à surface de ce clone de cellules Caco-2, il a été exploré deux techniques de marquage de ce récepteur : une technique qui était utilisé par le laboratoire auparavant avec un Ac goat anti-hTfR (R&D system, 1:50) associé à un Ac secondaire anti-goat IgG couplé au fluorochrome phycoérythrine (PE) (Abcam, 1:500) et une technique directe avec un Ac murin anti-hTfR1 couplé directement à la PE (BD Sciences, 5 µg/mL pour 10⁵ cellules selon indications du fournisseur) (Figure 26). La technique de marquage indirecte s'est présentée peu reproductible à long terme et concluant pour les expériences concernant la caractérisation de l'interaction ente la SIgA et le hTfR1. Il a été choisi d'utiliser uniquement la technique de marquage directe qui montre un meilleur signal pour le récepteur en cytométrie de flux et

en microscopie (Figure 27). Ces contrôles ont révélé que les cellules Caco-2 du laboratoire expriment abondamment un hTfR1 fonctionnel qui lie la Tf.

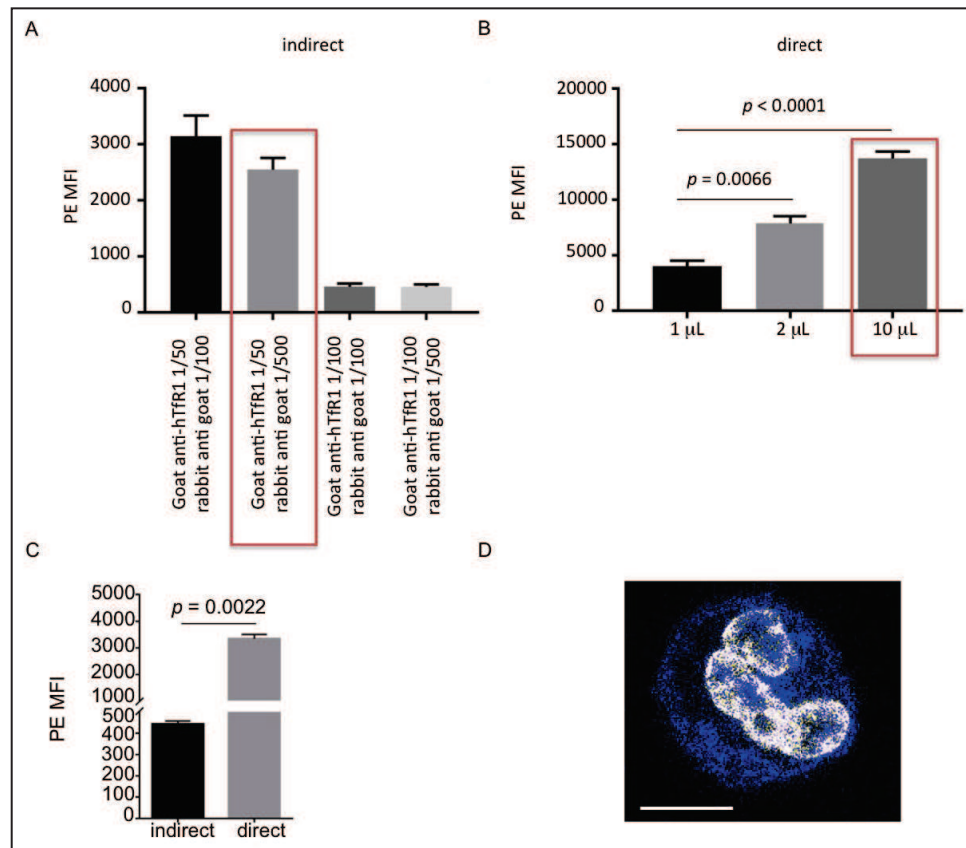


Figure 27. Mise en évidence du récepteur hTfR1 à la surface des cellules Caco-2. Les deux graphiques A et B indiquent l'intensité du fluorochrome PE relative à l'expression de surface du hTfR1 des cellules Caco-2. En A méthode de marquage indirecte et en B méthode marquage direct. (En encadré les dilutions ou volumes choisis) Le graphique C représente l'intensité du fluorochrome PE relative à l'expression de surface du hTfR1 sur les cellules Caco-2 par les deux techniques de marquage expliquées précédemment indirecte pour la colonne de gauche et directe pour la colonne de droite (n = 7). La photographie en D représente le hTfR1 exprimé par les cellules Caco-2 non polarisées, mis en évidence par un marquage indirect avec l'Ac murin anti-hTfR1 (5 µg pour 10⁵ cellules) et un Ac goat anti mouse IgG couplé à un AlexaFluor 647 1:1000 en condition saturante et de perméabilisation (PBS 1X - 5% FCS - 0.2% saponine). Les cellules sont observées avec un microscope confocal Zeiss LSM 710 Quasar (objectif 63x) et les images sont acquises et générées avec le logiciel Zen Black edition version (scale bar 10 µm).

Il a été effectué les tests d'expression du hTfR1 à la surface des cellules Caco-2 cultivées dans un milieu de culture riche ou pauvre en Tf rajoutée ainsi que des tests de liaison de l'HoloTf et la SIgA (Figure 28). Ces expériences ont permis de déterminer les conditions

optimales de culture et d'étude de caractérisation de l'interaction SigA-hTfR1. Il a été retenu de réaliser les cultures des cellules Caco-2 en présence de Tf rajoutée (4 µg/mL) dans le milieu de culture, cela permet d'augmenter l'expression du récepteur hTfR1. Il n'a pas été observé une meilleure liaison (aucune différence significative) de l'HoloTf ou de la SigA pour les cellules Caco-2 cultivées en présence ou absence de Tf rajoutée dans le milieu (Figure 28). Ceci suggère que les quantités choisies pour les deux ligands (1.25 µg pour la SigA et 250 ng pour l'HoloTf pour 10⁵ cellules) sont suffisantes et permettent une liaison optimale avec les cellules (tout le ligand est capturé/lié aux cellules). Ces tests ont été réalisés sur d'autres lignées cellulaires épithéliales (HT29 et T84 provenant d'adénocarcinome colorectal humain) (Figure 28) afin de valider le choix de la lignée cellulaire, et les conditions de culture et de caractérisation.

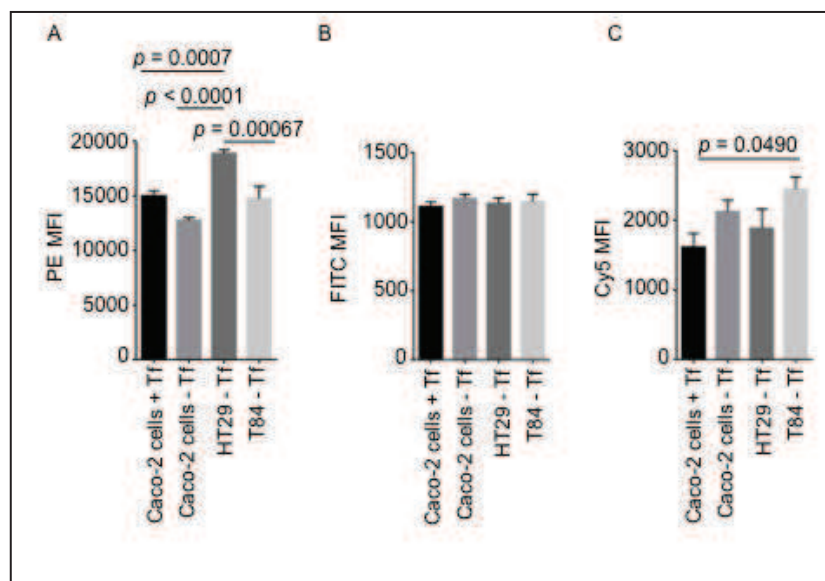


Figure 28. Etude de l'expression du hTfR1 et la liaison de l'HoloTf et la SigA à la surface de différentes lignées cellulaires épithéliales. Les cellules Caco-2 sont cultivées en milieu cDMEM en présence ou absence de 4 µg/mL d'ApoTf. Les lignées HT29 et T84 ont été cultivées en milieu cDMEM sans Tf ajoutée. L'expression du récepteur hTfR1 et la liaison de l'HoloTf et de la SigA en surface des cellules sont détectées par analyse de cytométrie de flux. L'intensité mesurée par le cytomètre de flux pour chacun des fluorochromes est relative à l'intensité d'expression du récepteur hTfR1 (PE) en A ou de la liaison de l'HoloTf (FITC) en B et la SigA (Cy5) en C à la surface des cellules Caco-2. (n = 6)

Un premier test de liaison de la SIgA-Cy5 a été réalisé avec des cellules Caco-2 préalablement pré incubées avec 5 µg de l'Ac monoclonal anti-hTfR1 couplé au PE (voir article en appendice). Cette expérience montre que la SIgA murine lie le hTfR1 exprimé par la lignée de cellules humaines Caco-2 même si ce dernier est masqué partiellement par un anti-hTfR1. Ceci suggère que l'Ac ne masque pas les sites de reconnaissance et de liaison de la SIgA sur le récepteur.

Co-localisation entre la SIgA et le hTfR1 en surface des cellules Caco-2

Ces cellules Caco-2 ont été préparées de la manière suivante pour l'observation au microscope confocal : 1.25 µg SIgA-Cy3 ont été exposées à la surface des cellules pendant 30 min à 4°C dans iDMEM, après lavage et fixation au paraformaldéhyde (4%), le hTfR1 est marqué de façon indirecte avec l'Ac murin anti-hTfR1 (5 µg pour 10⁵ cellules) et un Ac anti-murine IgG couplé AlexaFluor 647 (1:1000, BD Biosciences) en condition saturante et de perméabilisation (PBS 1X – 5% FCS – 0.2% saponine). Les noyaux ont été colorés par le dapi (200 ng/mL) (voir l'article en appendice). L'observation de ces cellules non polarisées au microscope a permis de mettre en évidence une co-localisation entre la SIgA-Cy3 et le hTfR1 (spot jaune).

Extinction partielle du hTfR1 exprimé par les cellules Caco-2

L'extinction partielle de l'expression du hTfR1 (blocage partielle de la traduction des RNAs en protéine) par un pool de siRNAs ciblant le RNA du récepteur hTfR1 consiste à montrer la spécificité de l'interaction hTfR1 et SIgA par diminution conjointe de l'expression du récepteur à la surface des cellules Caco-2 et l'intensité de liaison de la SIgA pour les cellules transfectées (voir article en appendice). 10⁵ cellules Caco-2 sontensemencées dans des plaques 24 puits. 10 nM de siRNAs en présence de 1 µL de SilentFect sont déposés sur les cellules 24h après ensemencement. Après 72h, l'expression du hTfR1 et la liaison de la SIgA

et Tf sont évaluées par cytométrie de flux. L'expression du récepteur a été diminuée de manière significative et reproductible chez les cellules Caco-2 (facteur de 2 environ) comparé au niveau normal d'expression du récepteur par les cellules Caco-2 non transfectées. En plus de la diminution de l'expression du hTfR1, la liaison de l'HoloTf est aussi affectée de manière significative et reproductible. La fonctionnalité du hTfR1 n'est pas altérée par la transfection des siRNAs car l'interaction entre l'HoloTf et le récepteur est maintenue. Concernant la SIgA, la liaison est aussi diminuée de façon significative et reproductible, ce qui démontre que la SIgA lie le hTfR1 exprimé par les cellules Caco-2.

Génération d'une lignée de cellules recombinantes exprimant le hTfR1

En dernier temps, il a été établi une lignée de cellules CHO recombinantes et stables qui expriment le hTfR1 par transfection génique. Cette lignée n'exprime le récepteur hTfR1 qu'à de faible intensité dans les conditions de culture normale (voir article en appendice). Cette expérience mettra en évidence l'implication majeure du hTfR1 dans l'interaction entre la SIgA et les cellules transfectées. Les expériences de transfection ont d'abord été réalisées de manière transitoire. $2 \cdot 10^5$ cellules CHO sontensemencées dans des plaques 12 puits. 2 μg pDNA3-hTfR1 en présence de 4 μL de TurboFect sont déposés sur les cellules 24h après ensemencement. L'expression du récepteur et des tests de liaison des ligands HoloTf et SIgA ont été vérifiés 48h après transfection mais il a été difficile de pouvoir générer des résultats significatifs et reproductibles (expériences effectuées 6 fois en triplicata) (données non présentées). Il a été envisagé de réaliser une lignée de cellules CHO recombinantes exprimant le hTfR1 de manière stable selon le protocole précisé (voir article en appendice). Les CHO transfectées qui avaient exprimé le meilleur signal d'expression pour le hTfR1 et de fortes interactions avec les deux ligands SIgA et HoloTf, ont été cultivées et amplifiées en milieu de culture cRPMI en condition sélective en présence de l'antibiotique G418. La

sélection s'établit progressivement selon un gradient croissant et progressif de G418 (plasmide d'expression contenant le gène de résistance de la G418). Ensuite les cellules transfectées sont « triées » par FACS. Chaque cellule ainsi retenue est amplifiée en condition de culture normale (cRPMI) dans un puits d'une plaque 96 puits. Après amplification en flask T25, le niveau d'expression du hTfR1 de surface et la liaison pour l'HoloTf et la SlgA avec les cellules transfectées ont été déterminés par analyse de cytométrie de flux. L'intégrité du récepteur a été évaluée par immuno-détection (en condition dénaturante) sur blot en comparaison au hTfR1 de référence exprimé par les cellules Caco-2. La fonctionnalité du récepteur a été vérifiée par des tests de liaison avec l'HoloTf. L'interaction entre l'HoloTf et les cellules CHO transfectées est augmentée de manière significative par rapport aux cellules CHO non transfectées. Ces deux expériences contrôles permettent de certifier que le hTfR1 exprimé par ces cellules CHO transfectées est intègre et fonctionnel. Les tests de liaison de la SlgA pour ces cellules transfectées indiquent que la liaison de la SlgA est augmentée de manière significative par rapport aux cellules CHO non transfectées. Cette expérience de transfection montre que la SlgA lie hTfR1.

III. Discussion

Cet ensemble d'expériences indique que la SlgA lie la lignée de cellules épithéliales intestinales humaines Caco-2. Cette liaison s'établit avec un effet dose et temps dépendant du ligand, ce qui suggère la présence d'un récepteur. Nos investigations pour l'identification du récepteur qui médie cette interaction SlgA-CEI, ont été orientées vers le récepteur à la Tf. Ce récepteur hTfR1 a été identifié comme récepteur aux IgA dans un contexte inflammatoire au niveau des épithéliums intestinal et rénal d'après les travaux de I. C. Moura et al, C. Lebreton et al,... (résumés dans le sous-chapitre V de l'Introduction). Les

tests de liaison entre la SIgA et les cellules Caco-2 pré-incubées avec un anti-hTfR1 montrent une perte dans la liaison de la SIgA pour les cellules. Le récepteur a la capacité de lier son ligand naturel la Tf sous forme chargée et non chargée en fer et la pIgA/SIgA. C'est un récepteur multi-ligand. La liaison ne se restreint pas aux spécificités inter-espèces car l'interaction s'établit entre les domaines extracellulaires du hTfR1 d'une lignée cellulaire humaine et les domaines intrinsèques à la molécule de la pIgA murine qui constitue la super-molécule de SIgA. La littérature scientifique indique que les IgA murines sont similaires à la sous-classe des IgA2 humaines qui sont principalement retrouvées dans les sécrétions des muqueuses. Les observations des cellules au microscope montrent une co-localisation entre la SIgA et le hTfR1 ce qui confirme l'existence d'une liaison entre les SIgA et le récepteur à la Tf. Les expériences de biologie moléculaire indiquent que le hTfR1 est le récepteur majeur dans l'interaction entre les cellules Caco-2 et la SIgA, mais aucune expérience n'a été entreprise pour identifier un possible corécepteur ou cofacteur. C. Lebreton et al ont mis en évidence le rôle de la Tgase 2 dans l'internalisation des complexes SIgA-Ag par le hTfR1 dans le cas des MCA. Cet aspect n'a pas été étudié car il ne s'agissait pas du but de ce projet de thèse.

En conclusion, le hTfR1 qui est exprimé par les CEI, est un récepteur aux SIgA au niveau de l'épithélium intestinal dans un contexte normal comme celui de notre modèle de cellules Caco-2 et inflammatoire comme il a été démontré chez les patients souffrant de MCA.

Chapitre II : identification du rôle de la transferrine dans la liaison

SIgA-hTfR1

I. Présentation

Le hTfR1 a été récemment identifié comme un récepteur aux IgA dans la littérature scientifique (résumée dans le sous-chapitre V de l'Introduction). Cette interaction SIgA-hTfR1 a été observée sur le modèle *in vitro* de CEI développé dans ce projet à partir de la lignée humaine des cellules épithéliales intestinales Caco-2 et d'une SIgA reconstituée avec une pIgA murine et une SC humaine. Dans les conditions de l'homéostasie, la SIgA se retrouve dans la lumière intestinale en présence de la Tf qui est le ligand naturel du hTfR1. Il était capital de déterminer le rôle de la Tf dans l'interaction de la SIgA et du hTfR1. Est-ce que la Tf est un compétiteur ou un inhibiteur de la liaison de la SIgA pour son récepteur ? Afin de déterminer la nature du rôle de la Tf, des expériences de compétition et l'inhibition avec la SIgA et l'HoloTf à partir des cellules Caco-2 cultivées en flask, ont été réalisées afin de pouvoir reprendre à nos interrogations.

II. Procédures expérimentales et résultats

Les expériences de compétition et d'inhibition ont été réalisées dans les mêmes conditions que les tests de liaison de la SIgA (1.25 µg pour 10⁵ cellules) ou de l'HoloTf (250 ng pour 10⁵ cellules). Le déroulement des expériences est détaillé dans les schémas (présentés ci dessous). Ces schémas sont inspirés du modèle de liaison de la Tf pour le hTfR1 proposé par D. R. Richardson ⁷⁸.

La forme HoloTf a été choisie comme inhibiteur ou compétiteur de la SIgA car il s'agit de la forme chargée en fer donc préférentiellement capturée par le hTfR1 pour l'assimilation du

fer et parce qu'elle présente une meilleure liaison pour le modèle du laboratoire par rapport à l'ApoTf (Figure 29).

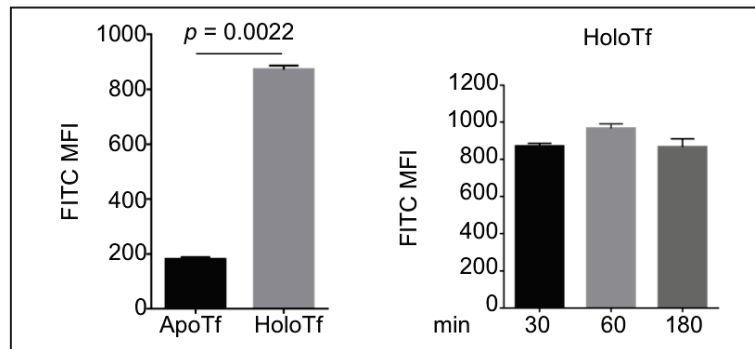


Figure 29. Etude de l'importance du fer dans l'interaction entre la Tf et le hTfR1 exprimé en surface des cellules Caco-2. Le graphique de gauche montre l'étude de comparaison entre la liaison de l'HoloTf et l'ApoTf pour les cellules Caco-2. L'intensité du signal FITC est relative à l'intensité de la liaison de la Tf pour les cellules. Le graphique de droite montre la liaison de 250 ng d'HoloTf pour 10^5 cellules Caco-2 selon un gradient de temps. (n = 6)

Compétition entre la SigA et l'HoloTf pour le hTfR1 exprimé par les cellules Caco-2

Les essais de compétition sont décrits dans le schéma suivant (Figure 30), les deux ligands la SigA et l'HoloTf sont incubés simultanément (30 min à 4°C) (voir article en appendice).

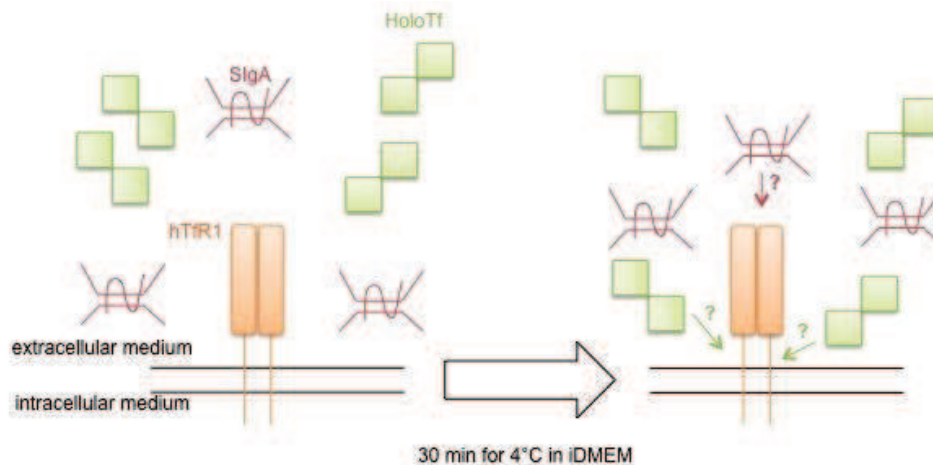


Figure 30. Protocole pour les tests de compétition entre la SigA et l'HoloTf pour le hTfR1 exprimé par les cellules Caco-2. (Le schéma n'est pas à l'échelle.) Inspiré du schéma proposé par D. R. Richardson, 2004.

Cette expérience indique que :

- Les deux ligands se lient sur les cellules Caco-2 exposées simultanément aux deux ligands
- La liaison de l'HoloTf pour les cellules Caco-2 n'est pas affectée et reste inchangée dans le cas des tests des compétitions par rapport aux tests de liaison contrôle de l'HoloTf
- La liaison de la SIgA est favorisée dans le cas des tests des compétitions comparé aux tests de liaison contrôle de la SIgA
- Les analyses des quadrants des cellules incubées simultanément avec les deux ligands (Figure 31) montrent une population double positive pour l'HoloTf et la SIgA.

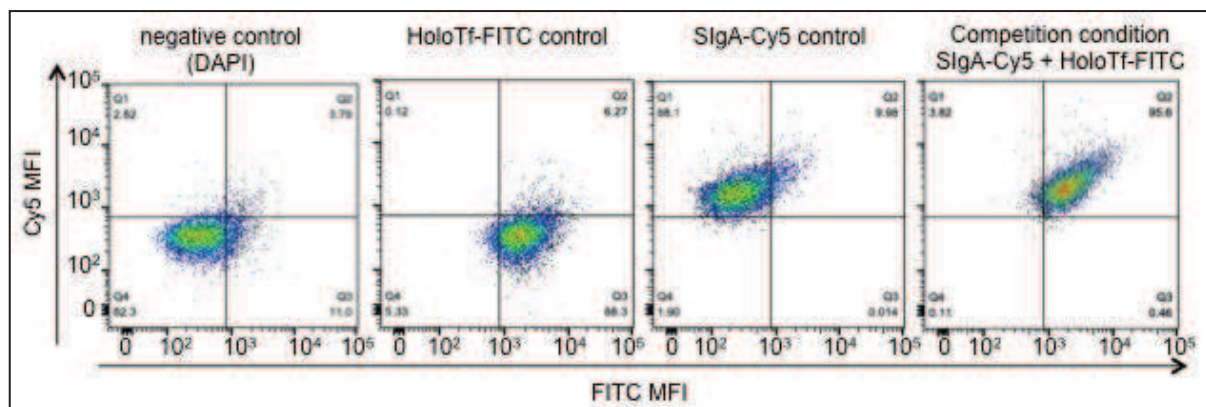


Figure 31. Profil des cellules Caco-2 incubées simultanément avec 1.25 µg de SIgA-Cy5 et de 250 ng d'HoloTf-FITC pendant 30 min à 4°C. Ensuite l'intensité de la Cy5 et du FITC est mesurée par cytométrie de flux. L'intensité des fluorochromes est relative de l'intensité de la liaison de la SIgA (Cy5) ou de l'HoloTf (FITC).

Inhibition de la liaison de la SIgA pour les cellules Caco-2

Les essais d'inhibition sont décrits dans le schéma suivant (Figure 32). Les cellules Caco-2 sont pré-incubées avec l'un des deux ligands dans un premier temps (30 min à 4°C), après lavage (ou non), les cellules Caco-2 sont exposées au second ligand (30 min à 4°C) (voir article en appendice).

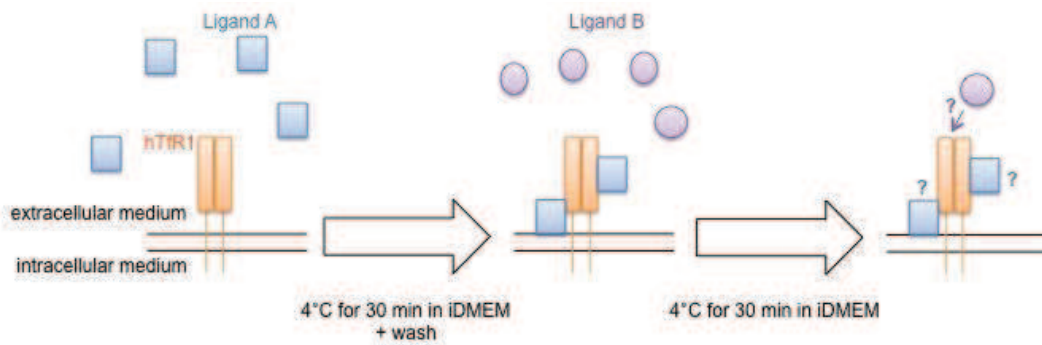


Figure 32. Protocole pour les tests d'inhibition de la liaison d'un ligand sur les cellules Caco-2 par pré incubation de l'autre ligand. (Le schéma n'est pas à l'échelle.) Inspiré du schéma proposé par D. R. Richardson, 2004.

Ces expériences montrent pour le cas de l'inhibition de la liaison de la SIgA suite à une pré-incubation des cellules Caco-2 avec l'HoloTf :

- La liaison de la SIgA n'est pas affectée par la présence de l'HoloTf sur le hTfR1 et reste inchangée par rapport aux tests de liaison de contrôle de la SIgA
- La liaison de l'HoloTf est diminuée de manière significative et reproductible par rapport aux tests de liaison contrôle de l'HoloTf
- L'analyse des profils des cellules (Figure 33) montre une population de cellules Caco-2 positives pour la liaison de la SIgA et de l'HoloTf.

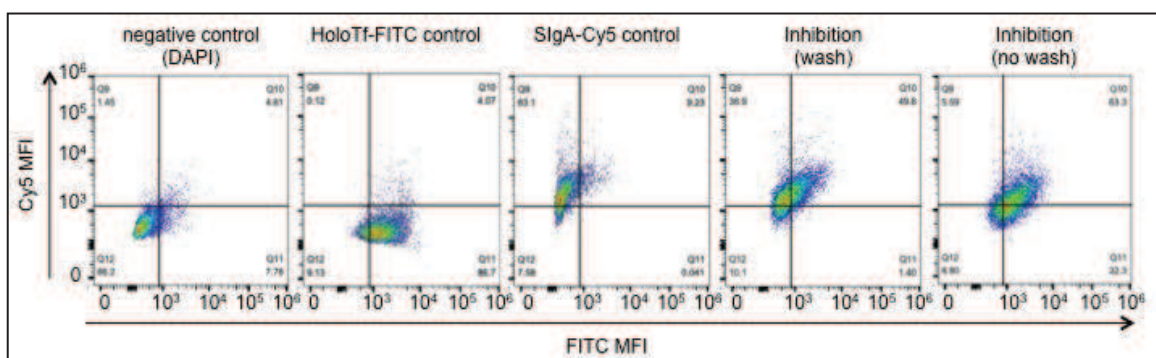


Figure 33. Profil des cellules Caco-2 préalablement exposées à 250 ng d'HoloTf-FITC (30 min à 4°C) puis incubées avec 1.25 µg de SIgA-Cy5 (30 min à 4°C). Ensuite l'intensité de la Cy5 et du FITC est mesurée par cytométrie de flux. L'intensité des fluorochromes est relative de l'intensité de la liaison de la SIgA (Cy5) ou de l'HoloTf (FITC).

Ces expériences montrent pour le cas de l'inhibition de la liaison de l'HoloTf suite à une pré-incubation des cellules Caco-2 avec la SIgA :

- La liaison de l'HoloTf n'est pas affectée par la présence de la SIgA sur le hTfR1 et reste inchangée par rapport aux tests de liaison de contrôle de l'HoloTf
- La liaison de la SIgA est diminuée de manière significative et reproductible par rapport aux tests de liaison contrôle de la SIgA
- L'analyse des profils des cellules (Figure 34) montre une population de cellules Caco-2 positives pour la liaison de la SIgA et de l'HoloTf.

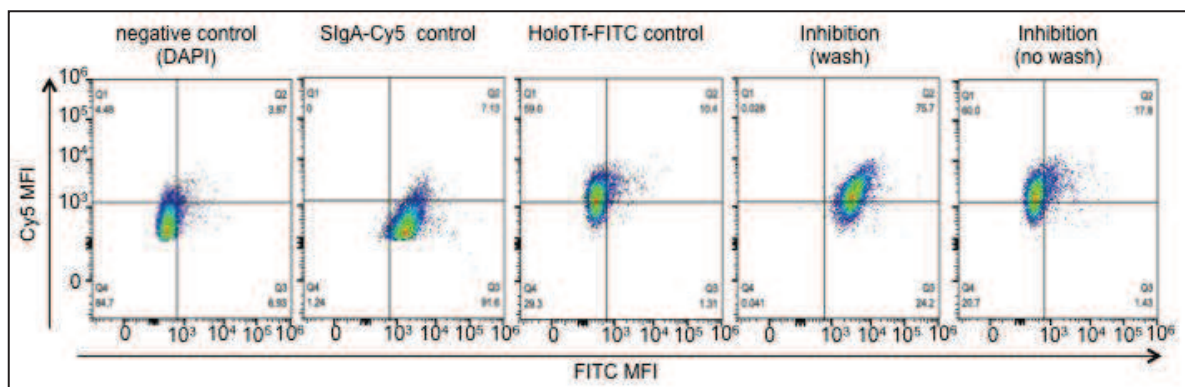


Figure 34. Profil des cellules Caco-2 préalablement exposées avec 1.25 µg de SIgA-Cy5 (30 min à 4°C) puis incubées avec 250 ng d'HoloTf-FITC (30 min à 4°C). Ensuite l'intensité de la Cy5 et du FITC est mesurée par cytométrie de flux. L'intensité des fluorochromes est relative de l'intensité de la liaison de la SIgA (Cy5) ou de l'HoloTf (FITC).

Ces essais d'inhibition de la liaison d'un ligand par pré incubation des cellules avec l'autre ligand ont été effectués sans l'étape de lavage, c'est-à-dire que le second ligand est incubé en présence d'un excès du premier ligand non lié aux cellules. Cette expérience constitue à la fois une inhibition de liaison et une compétition de liaison. Les résultats obtenus sont similaires aux tests d'inhibition de liaison présentés précédemment.

Immuno-précipitation de complexe SIgA-Tf

Il a été entrepris de réaliser des immuno-précipitations (IP) (données non présentées) afin de déterminer si la SIgA et la Tf peuvent interagir directement entre elles sans présence du hTfR1.

L'établissement des « complexes SIgA-Tf » est réalisée dans les conditions suivantes : 5 µg SIgA + 1 µg HoloTf dans 2.5mL de DMEM complété de 10mM HEPES et de 2.5% FCS (iDMEM) incubé 30 min à 37°C. Ensuite les « complexes SIgA-Tf » sont traités de la façon suivante :

- Incubation avec l'Ac d'IP un goat anti-chaîne α murine dilué à 1:500 dans le milieu iDMEM pendant 60 min à température ambiante sous agitation
- Ajout de 50 µL de protéine G plus agarose (Calbiochem, Millipore). Incubation pendant 60 min à température ambiante sous agitation
- Lavage des culots de précipitation par une succession de 3 lavages avec 1mL tampon TENT (Tris-HCl – EDTA – NaCl – Tween 20) (150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7-7.3) alterné de centrifugation à 5 min à 20°C 1'000 x g.
- Re-suspension des culots dans 50 µL de tampon de chargement (SDS sample buffer).

Ensuite les « complexes » précipités (par la méthode TCA/MeOH et lyophilisation) par les chaînes α ont révélés par immuno-détection de la chaîne α murine, de la hSC et de la Tf par blot.

La SIgA a été détectée via la présence de la chaîne α et la hSC. La Tf n'a jamais été détectée sur les blots ce qui implique que la SIgA et la Tf n'interagissent pas entre elles.

III. Discussion

Cet ensemble de données prouve que la SlgA et l'HoloTf peuvent lier le hTfR1. Dans les expériences de compétition, la SlgA et l'HoloTf lient simultanément le récepteur hTfR1. La liaison de la SlgA est même favorisée par rapport aux tests de liaison contrôle de la SlgA et la liaison de l'HoloTf présente une intensité similaire aux tests de liaison contrôle. La liaison de l'un de ces deux ligands n'abolit pas la liaison du second ligand. Dans le cas de l'inhibition, la liaison du premier ligand que ce soit la SlgA ou l'HoloTf est inhibée de manière significative mais persiste alors que la liaison du second ligand est maximale comparé aux tests de liaison contrôle du ligand. Ces deux expériences tendent à dire que le hTfR1 possède deux sites de liaison distincts pour la SlgA et l'HoloTf. Le scénario de formation d'un complexe triple entre la SlgA-Tf-hTfR1 est possible car la SlgA est présente dans le lumière intestinale avec la Tf. Les deux ligands peuvent compéter l'un contre l'autre pour le récepteur hTfR1. D'après D. R. Richardson, le domaine extracellulaire du hTfR1 présente plusieurs sites de fixation. Le hTfR1 possède deux sites de fixation à la Tf (un site sur chacun des monomères) et le domaine apex/apical reste accessible à tout autre ligand. Nous pouvons proposer le schéma suivant pour l'interaction SlgA-HoloTf-hTfR1 et la formation d'un complexe triple (figure 35).

De plus, la Tf n'inhibe pas la liaison de la SlgA. Elle présente un effet bénéfique à la liaison de la SlgA. L'HoloTf change de conformation après sa liaison sur le hTfR1⁷⁸ ce qui peut engendrer une conformation du récepteur favorable à l'établissement de l'interaction avec la SlgA. Ce changement de conformation n'établit pas que la liaison entre l'HoloTf et le hTfR1 est bloquée et indissociable. Les tests d'inhibition ont été réalisés à 4°C afin de minimiser les mécanismes d'internalisation et limiter la dynamique de la membrane des cellules. D'après ces derniers tests, la liaison entre l'HoloTf et l'hTfR1 est dissociable

partiellement, car il y a une perte dans l'intensité de la liaison par rapport aux tests de liaison contrôles de l'HoloTf, quand la SlgA est incubée dans un second temps. Cette observation est aussi faite pour la liaison de la SlgA. L'interaction entre l'HoloTf et le hTfR1 ou la SlgA et le hTfR1 est réversible et dissociable.

Aucune expérience n'a permis de mettre en évidence une interaction directe entre les deux ligands donc la SlgA et l'HoloTf interagissent entre elles uniquement par l'intermédiaire du récepteur hTfR1.

En conclusion, le hTfR1 possède deux sites distincts de liaison à la SlgA et l'HoloTf (Figure 35). Il serait donc multi-ligand. Les deux ligands ne sont pas inhibiteurs ni compétiteurs de l'autre pour l'établissement de la liaison avec le hTfR1. Le hTfR1 semble privilégier la liaison avec le ligand qui est présent dans le milieu dans lequel les cellules sont incubées (effet ligand).

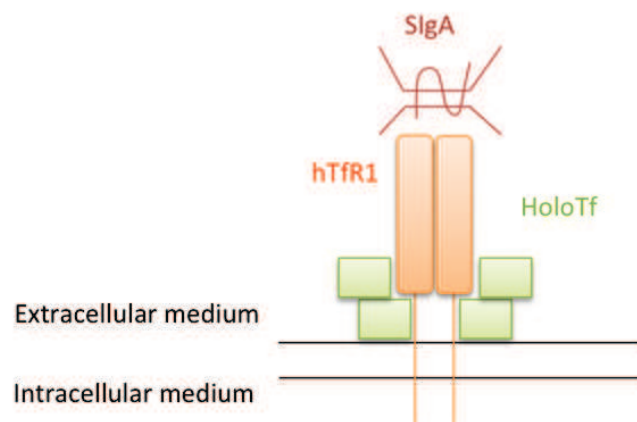


Figure 35. Représentation schématique proposée pour l'interaction entre SlgA-HoloTf-hTfR1. (Le schéma n'est pas à l'échelle.) Inspiré du schéma proposé par D. R. Richardson, 2004.

Chapitre III : rétrotransport de la SIgA au travers d'un modèle *in vitro* des cellules épithéliales intestinales polarisées

I. Présentation

Précédemment dans ce projet, il a été observé que la SIgA lie le hTfR1 exprimé par le modèle de cellules Caco-2 développé. La littérature scientifique^{62,79,89,91} affirme que le hTfR1 est responsable de la déposition des IgA dans le mésengium dans le cas d'inflammation des tissus rénaux de type néphropathie. De plus, ce même récepteur exprimé par les CEI a la capacité de capturer la SIgA (seule ou sous forme de complexe avec un peptide alimentaire) dans la lumière intestinale et d'exercer une rétro-transcytose des SIgA pour les déposer dans le compartiment basolatéral dans le cas des MCA. L'étape suivante de ce projet était de déterminer si l'interaction SIgA-hTfR1 est maintenue dans un modèle de cellules polarisées de cellules Caco-2 et de prouver le rétrotransport des SIgA capturées par le hTfR1 dans le milieu basolatéral. Il a été établi un modèle d'étude du rétrotransport des SIgA dans les conditions de l'homéostasie. Avec ce modèle de cellules Caco-2 polarisées, il a été déterminé l'existence d'un rétrotransport des SIgA du milieu apical au compartiment basolatéral.

II. Procédures expérimentales et résultats

Le modèle de CEI polarisées est obtenu à partir des mêmes cellules Caco-2 qu'utilisées précédemment. Ces cellules Caco-2 sont déposées sur des filtres de culture (Snapwell) permettant l'établissement de la monocouche après 21 jours de culture dans le milieu cDMEM.

Après contrôle de l'intégrité des monocouches (voir dans chapitre Matériel biologique), l'expression du récepteur a été détectée par marquage indirect (mouse anti-hTfR1 / anti-mouse IgG couplé AlexaFluor 647).

Afin de déterminer l'établissement du rétrotransport des SIgA par le hTfR1, des marquages pour mettre en évidence la co-localisation entre la SIgA (-Cy3, incubées à la surface apicale des cellules 30 min à 37°C) et le hTfR1 (marqué de manière indirecte avec un fluorochrome AlexaFluor 647) ont été réalisés (voir article en appendice). L'observation des monocouches ainsi marquées a permis d'affirmer que l'interaction SIgA-hTfR1 est maintenue dans un contexte CEI polarisées (homéostasie). Les spots de co-localisation ont été détectés en surface des cellules Caco-2 et dans le compartiment intracellulaire à proximité de la membrane apicale des cellules.

Pour déterminer l'établissement du rétrotransport des SIgA, les cellules Caco-2 polarisées sont exposées à 2.5 µg de SIgA au niveau de leur surface apicale pendant 2h à 37°C. Après 2h de culture en présence de la SIgA, les milieux apicaux et basolatéraux sont collectés afin de déterminer par ELISA la concentration en IgA contenue de part et d'autre de la monocouche (voir article en appendice). Des essais de rétrotransport en condition de compétition où la SIgA est incubée simultanément avec 25 µg HoloTf, ont été aussi réalisés afin de pouvoir mimer au mieux les conditions physiologiques en présence de Tf. Les dosages en ELISA ont révélé la présence de l'IgA dans le compartiment basolatéral de manière significative et reproductible sur plusieurs expériences par conséquent il y a établissement d'un transport des SIgA du compartiment apical au milieu basolatéral. La quantité de SIgA transportée est augmentée lorsque celle-ci est incubée simultanément avec l'HoloTf.

Ensuite afin d'apprécier l'intégrité des molécules transportées au travers des CEI polarisées (dégradation ou formation de complexe), des immuno-détections (en condition dénaturante) des chaînes α , de la SC et de la Tf ont été réalisées à partir des milieux basolatéraux après expositions de la SIgA ou SIgA + HoloTf pendant 120 min à 37°C. Les milieux basolatéraux sont préalablement précipités (TCA (10%) et lavages au méthanol). Ces blots nous indiquent :

- La présence de l'IgA à des poids moléculaires supérieurs à 320 kDa donc sous forme de SIgA.
- La détection de la SC indique uniquement la présence de SC humaine sous forme non liée à 70 kDa. Cette information ne peut nous permettre d'affirmer avec certitude que la SIgA est transportée sous la forme de SIgA de manière intacte au travers du modèle développé. Il se peut que les liaisons qui se mettent en place lors de la reconstitution de la SIgA *in vitro*, entre la hSC et la pIgA murine soient de nature non covalente et donc dégradées lors du blot car ce dernier est réalisé en condition dénaturante.
- La présence de la Tf est détectée dans le milieu basolatéral majoritairement sous forme de monomère (80 kDa) et dimère.

III. Discussion

Cet ensemble d'expériences permet d'affirmer sur l'existence d'un rétrotransport des SIgA au travers d'un modèle de CEI polarisées qui miment la barrière intestinale constituées essentiellement d'entérocytes. Les observations des monocouches indiquent que l'interaction entre la SIgA et le hTfR1 s'établit dans un modèle polarisé où les CEI acquièrent une surface apicale en bordure de brosse. Dans ce contexte de polarisation, la distribution du hTfR1 est différente que sur le modèle de cellules Caco-2 en suspension où le récepteur

est facilement accessible pour les ligands. Le hTfR1 se localiserait au niveau des microcryptes des CEI polarisées. L'interaction SlgA-hTfR1 est maintenue dans le modèle polarisé. Cela indique que l'interaction SlgA-hTfR1 est d'intensité forte et il semblerait que le récepteur a une forte affinité pour la SlgA.

A partir de ce modèle de CEI polarisées, nous avons pu conclure sur l'établissement du rétrotransport des SlgA au travers des cellules de la surface apicale au compartiment basolatéral dans un contexte d'homéostasie. Après 2h d'exposition à la surface apicale des CEI, la SlgA est capturée par le hTfR1, internalisée, transportée au travers des cellules et libérée dans le compartiment basolatéral. Ces mécanismes de reconnaissance, de capture, d'internalisation et de transport se réalisent de manière rapide. Les résultats obtenus par les immuno-détections ne permettent pas d'affirmer si la SlgA transportée est toujours sous forme intacte dans le compartiment basolatéral. Lors du rétrotransport des complexes SlgA-gliadine, les Ac sont libérées dans le compartiment basolatéral sous forme de complexes intacts, ce qui nous permet de suggérer que la SlgA dans ce modèle est toujours sous forme intègre après le rétrotransport.

Concernant la Tf, celle-ci est transportée dans le milieu basolatéral. La Tf est retrouvée sous forme monomérique et dimérique dans le milieu basolatéral, ce qui suggère une dimérisation de la Tf. Nous savons que le hTfR1 possède deux sites de liaison à la Tf, et peut capturer deux molécules de Tf et les transporter simultanément. Il est difficile de déterminer s'il y a un transport simultané de la Tf et de la SlgA dans les mêmes vésicules endosomales. Les précédents résultats ont indiqué la présence de cellules porteuses à la fois de la SlgA et de l'HoloTf, lorsque celles-ci sont incubées simultanément avec les deux ligands. Il a été émis l'hypothèse que le hTfR1 peut capturer simultanément les deux ligands. Lors de l'incubation simultanée de la SlgA et de la Tf, la quantité de SlgA

transportée est augmentée par rapport à la quantité transportée lorsque la SIgA est incubée seule. Le rétrotransport de la SIgA est favorisé en présence de l'HoloTf, ce qui corrèle avec les résultats précédents. Il se peut que la Tf accélère les mécanismes de reconnaissance des SIgA, de capture, d'internalisation et de transcytose. En effet, le cycle de la Tf s'exécute en 5 à 20 min selon le type cellulaire ⁸¹.

L'implication du hTfR1 dans ce rétrotransport n'a pas été clairement montrée à part par les images de microscopie.

En conclusion, ce rétrotransport des SIgA peut constituer un nouveau mécanisme de reconnaissance, de capture, et de transport des SIgA dans le compartiment basolatéral (Figure 36). Ce transport anormal de la SIgA par le hTfR1 peut constituer un nouveau système d'immuno-surveillance du contenu luminaire car la SIgA a la capacité de reconnaître et lier les Ag lumineux. Le hTfR1 se révèle multi-ligand et multi-fonction. De plus, ce transport par le hTfR1 peut représenter en un nouveau système d'échantillonnage et de transport des microorganismes ou des Ag lumineux au travers de la muqueuse intestinale.

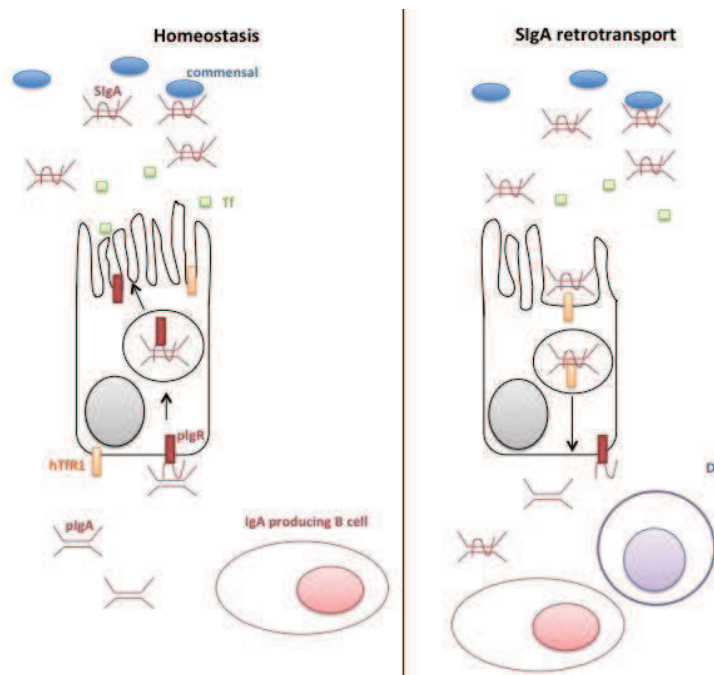


Figure 36. Représentation schématique de l'établissement du rétrotransport des SIgA au travers d'une monocouche de CEI polarisées, par le hTfR1 de surface. (Le schéma n'est pas à l'échelle.)

Chapitre IV : aspect immunologique du rétrotransport des SIgA au travers d'un modèle *in vitro* des cellules épithéliales intestinales polarisées

I. Présentation

Précédemment dans ce mémoire, il a été déterminé que la SIgA est transportée au travers des CEI polarisées dans le compartiment basolatéral dans les conditions de l'homéostasie. Dans le cas du « steady-state », la SIgA patrouille dans la lumière intestinale et lie les Ag alimentaires et/ou les microorganismes entériques. De plus dans le cas des MCA, la SIgA complexée avec un Ag alimentaire est transcytosée au travers des CEI sous la forme de complexes avec l'Ag puis est libérée dans le compartiment basolatéral. Donc la dernière question relative à ce projet était de déterminer si le hTfR1 peut médier la reconnaissance, la capture, l'internalisation et le transport au travers des CEI polarisées des complexes immuns SIgA-bactérie préalablement reconstitués *in vitro*. Le but est de libérer ce complexe de manière intacte dans le compartiment basolatéral qui mime la LP où se localisent les sites inducteurs et effecteurs de la réponse immunitaire.

La pIgAC5 utilisée pour reconstituer la SIgA est spécifique au LPS exprimé par la souche virulente de *Shigella flexneri* du sérotype 5a, ce qui permet de pouvoir reconstituer *in vitro* facilement des complexes immuns.

Shigella spp est une bactérie de Gram négatif, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. *Shigella* est un pathogène intracellulaire facultatif de l'homme et des primates. Cette bactérie est responsable de shigellosis, ce sont des infections intestinales dont les symptômes sont des crampes intestinales, de la fièvre et des selles sanglantes

pouvant contenir du mucus. Cette infection est transmise par la voie oro-fécale, c'est-à-dire l'ingestion d'aliments souillés par la bactérie. C'est une bactérie très virulente, une petite charge bactérienne suffit pour engendrer une infection chez l'homme (10-100 cellules)⁹⁸. Le facteur de virulence principal des *Shigella* spp est le T3SS, c'est un système de sécrétion qui permet d'intégrer dans les cellules hôtes des protéines bactériennes⁹⁹ et d'interférer dans les mécanismes cellulaires. *S. flexneri* résiste aux pH acides de l'appareil digestif¹⁰⁰ et inhibe l'expression des AMP¹⁰¹. *S. flexneri* a la capacité de traverser la barrière intestinale par capture via les cellules M. Ensuite dans la LP, la bactérie échappe aux cellules phagocytaires comme les macrophages et peut invalider les CEI par contact avec la surface basolatérale et s'en suit le développement d'une réponse fortement inflammatoire.

De précédents travaux menés dans le laboratoire dans un contexte inflammatoire afin de comprendre la réponse des CEI face à cette bactérie *S. flexneri* complexée avec une SigA, ont permis d'affirmer que l'intégrité des monocouches de cellules Caco-2 polarisées est maintenue jusqu'à 8 h d'incubation en présence de la bactérie associée à la SigA^{93,102} (polarité et TJ maintenues). D'après ces informations, il a été facile de développer un modèle d'étude *in vitro* de rétrotransport d'Ag de type bactérie complexé avec une SigA.

II. Procédures expérimentales et résultats

La souche virulente *S. flexneri* M90T sérotype 5a exprime constitutivement la protéine fluorescente verte (GFP), ce qui permet de pouvoir détecter la bactérie facilement au microscope (voir article en appendice).

La souche bactérienne *S. flexneri* est rendue virulente par culture sur gélose LB (lysogeny broth ou Luria Bertoni) Agar, 50 µg/mL Ampicilline et en présence de 0.001% rouge congo. Ensuite les bactéries virulentes (colonies avec un point rouge en son centre) sont amplifiées

en milieu liquide LB 50 µg/mL Ampicilline. Après lavages des cultures et détermination de la concentration en bactéries/mL, les complexes SIgA-*S. flexneri* est reconstitué *in vitro* ($5 \cdot 10^8$ bactéries + 2.5 µg SIgA-Cy3 dans 500 µL de PBS). $2 \cdot 10^7$ bactéries (MOI = 20) seules ou liées avec les SIgA-Cy3 sont incubées sur les monocouches de Caco-2 polarisées (surface apicale). Après 2h d'incubation à 37°C, les milieux basolatéraux sont collectés et les filtres sont découpés des inserts afin de lyser les cellules (avec ou sans traitement préalable avec 50 µg/mL de gentamycine afin de dissocier les bactéries qui auraient adhérees à la surface des monocouches) pour récupérer le compartiment intracellulaire. Le nombre de bactéries contenu dans les différents compartiments est déterminé par ensemencement de LB Agar 50 µg/mL Ampicilline selon un gradient de dilution des échantillons (incubations à 37°C over night).

Cette expérience a été réalisée avec différents temps d'incubation afin de pouvoir observer au mieux une différence entre la condition *S. flexneri* seule et *S. flexneri* associée à la SIgA. Cette expérience a été reproduite quatre fois au total en conservant toujours une durée d'incubation minimale de 2h afin de pouvoir comparer les résultats obtenus avec les essais de rétrotransport présentés précédemment et d'assurer l'intégrité de la monocouche cellulaire. Plusieurs essais de rétrotransport avec différentes durées d'incubation de la bactérie seule ou des complexes de 5, 7 et 8 h (avant l'installation de l'infection et détérioration la monocouche) ont été réalisées (données non présentées). Ces expériences montrent une préservation des cellules polarisées sur les filtres Snapwell comme il a été prouvé par A. Mathias et al et S. Longet et al pour les incubations jusqu'à 8 h en présence de *S. flexneri*. Ces résultats ont permis de générer une tendance pour l'incubation à 37°C avec *S. flexneri* libre ou associée avec la SIgA pendant 2 h.

Les résultats sélectionnés et présentés dans l'article joint montrent un transport efficace des bactéries dans le milieu basolatéral dans le cas de l'incubation avec les complexes immuns *S. flexneri*-SIgA, alors que la bactérie seule n'a pu traverser la monocouche en 2 h.

Concernant les résultats des compartiments intracellulaires, les résultats montrent que :

- Pour les bactéries totales (adhérées à la surface des cellules et internalisées), la concentration bactérienne est plus élevée dans le cas de l'incubation avec la *S. flexneri* libre par rapport à la bactérie complexée avec la SIgA.
- Pour les bactéries internalisées, la concentration bactérienne est plus importante dans le cas de l'incubation avec la bactérie complexée avec la SIgA que pour la bactérie libre (nulle).

III. Discussion

Ces résultats mettent en évidence un transport des bactéries sous forme de complexes immuns avec la SIgA, au travers du modèle de CEI polarisées. En effet, *S. flexneri*-SIgA est retrouvée dans le milieu basolatéral après 2 h d'incubation dans le compartiment apical à l'inverse de l'incubation de bactérie seule. Dans les deux cas libre ou complexée avec la SIgA, il a été détecté un grand nombre de bactéries totales en contact avec les cellules, aucune différence significative n'a été observée entre les deux conditions d'incubation. Une différence statistiquement non significative, a été observée pour le nombre de bactéries internalisées entre les deux conditions. En effet, il y a beaucoup plus de bactéries dans le compartiment intracellulaire dans le cas de l'incubation sous forme de complexe que dans le cas des bactéries seules.

Ces résultats montrent que les cellules ont une tendance à favoriser le contact et l'internalisation avec les bactéries sous forme de complexes immunes avec la SIgA et de les

transporter dans le milieu basolatéral. Ce compartiment basolatéral représente la LP où le système immunitaire est induit après contact avec un Ag. Le rétrotransport de cet Ag via la SIgA et le hTfR1 s'exécute rapidement (en moins de 2 h) ce qui corrèle avec les résultats précédents sur l'interaction entre la SIgA et le hTfR1 et de rétrotransport des SIgA. Le cycle de la Tf véhiculé par son récepteur hTfR1 s'effectue de manière rapide ainsi que le transport des Ag alimentaire dans le cas des MCA.

En conclusion de cette dernière partie de ce projet de recherche, un rétrotransport des bactéries complexées avec la SIgA se met en place via le hTfR1 (Figure 37).

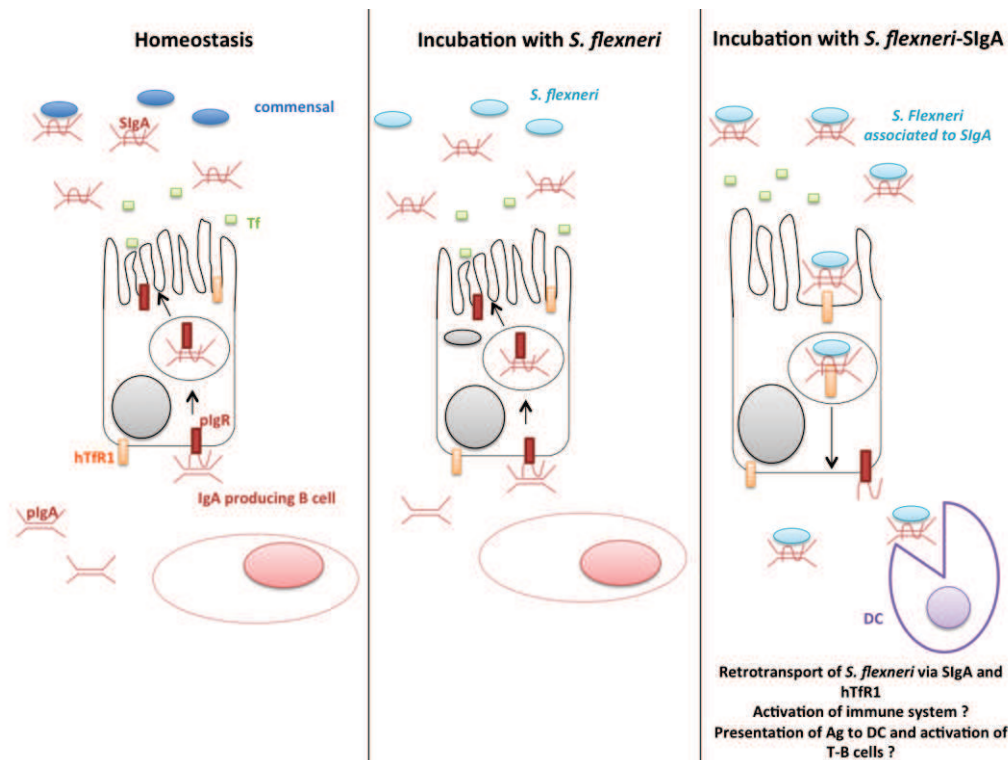


Figure 37. Représentation schématique de l'établissement du rétrotransport de *S. flexneri* complexée avec la SIgA au travers d'une monocouche cellulaire, par le hTfR1 exprimé par les CEI polarisées. (Le schéma n'est pas à l'échelle.)

Discussion – Conclusion - Perspectives

La muqueuse intestinale est imperméable aux microorganismes et molécules alimentaires de grande taille, seulement certaines substances comme les nutriments, les électrolytes et l'eau s'infiltrent au travers de la monocouche. L'échantillonnage des Ag alimentaires ou des microorganismes entériques est réalisé par adhésion ou capture directe par les cellules M ou les DC sous jacentes à la barrière intestinale ou bien par la formation des complexes immunitaires qui sont trappés par les cellules M. Ces grands mécanismes de sélection et passage des Ag ou microorganismes induisent ensuite la réponse immunitaire.

Au travers de ce projet de recherche, il a été mis en évidence un nouveau mode de communication entre le contenu luminaire et la LP via les SIgA qui lient le hTfR1 exprimé par les entérocytes. En effet, la SIgA est transportée de manière intacte dans la LP en dehors des PP ou ILF. Ce transport permet la délivrance d'un Ag (test dans ce projet avec bactérie infectieuse) en association avec cette SIgA dans la LP sous forme intacte et vivante qui pourrait être présenté aux cellules immunitaires résidentes de la LP telles que les DC. Les SIgA et les DC ont un rôle à la fois dans le développement d'une réponse immunitaire pro- et anti-inflammatoire selon la nature du microorganisme transportés : commensal ou pathogènes.

Le hTfR1 est l'acteur principal de l'assimilation du fer. Ce récepteur est aussi impliqué dans la pathogénèse de deux maladies auto-immune rénale et intestinale associé aux IgA et contribue à l'exacerbation de l'inflammation et la détérioration des épithéliums. Le hTfR1 constitue un nouveau récepteur au IgA qui participe à l'immuno-surveillance, l'induction du système immunitaire et maintenance de la tolérance et du « steady-state » d'après les

résultats présentés dans ce mémoire. Ce hTfR1 est omniprésent au niveau des épithéliums et est modulés selon le taux de Tf circulante et stockée.

Dans une première partie de ce projet, il a été démontré une interaction de surface forte entre la SIgA et le hTfR1 exprimés par les cellules Caco-2. Cette interaction prend place entre le domaine apex du hTfR1 et les domaines spécifiques de l'IgA. En effet, dans la littérature spécialisée, il a été affirmé que la partie apex du hTfR1 reste indisponible à la liaison d'un ligand supplémentaire en plus de son ligand naturel la Tf. Cette information a été vérifiée par les expériences de compétition où il a été observé que les deux ligands peuvent fixer simultanément le hTfR1. D'une autre part, le hTfR1 interagit avec la SIgA via les domaines spécifiques de l'IgA. La hSC ne se lie que faiblement aux cellules Caco-2 en comparaison avec la SIgA ou pIgA. L'interaction peut-être médié par les domaines C α 1 ou 2 ou bien par les fragments Fc ou Fab ou encore par les glycanes de la SIgA. En effet, il a été montré que dans le cas de maladies néphropathies aux IgA l'importance de la glycosylation de l'IgA dans les mécanismes de capture, transport et déposition des pIgA1 dans le mésengium. Les pIgA1 des patients de cette pathologie présentent une altération dans les sites de glycosylation de l'Ac (déficiences en galactose) qui provoque leur agrégation et leur déposition dans les tissus. La présence de ces sites dans l'IgA a un rôle capital dans la liaison avec le hTfR1. Il est fort probable que l'interaction s'établit avec les domaines C α 1 ou 2 du fragment Fc de la SIgA qu'au niveau du fragment Fab qui comprend le site de liaison avec l'Ag. En plus, les domaines C α 1 ou 2 sont impliqués dans de nombreux processus de reconnaissance et de transport des SIgA tels que l'exemple du transcytose par les cellules M¹⁰³. Il serait intéressant de voir l'intensité de liaison de l'IgA monomérique murine pour le hTfR1 afin de pouvoir déterminer l'implication de la chaîne J dans l'interaction avec le

récepteur et de réaliser ces tests d'interaction avec une SIgA murine présentant des altérations dans ces sites de glycosylations (O ou N glycans).

L'interaction hTfR1-SIgA est inter-espèce car le hTfR1 est exprimé par une lignée humaine de cellules intestinale épithéliales et la SIgA est constitué à partir d'une pIgA murine. La littérature indique l'homme présente deux sous-classes d'IgA et la souris seulement une sous classe qui se rapproche de la sous-classe IgA2 (similitudes de structure et glycosylation). Cette sous-classe est la plus abondante dans les sécrétions humaines ¹⁰⁴. Il peut être considéré que le modèle développé mime les conditions physiologiques humaines. D'après les travaux qui ont été résumés en Introduction concernant les pathologies néphropathies et MCA, il a été démontré que le hTfR1 est un récepteur seulement pour les pIgA de la sous-classe 1 et la SIgA. Il serait intéressant de pouvoir comparer dans des conditions établies dans ce travail de thèse, les intensités de liaison obtenues pour cette SIgA murine avec l'intensité de liaison d'une SIgA strictement humaine de la sous-classe 1 et 2 et avec une IgA1 ou IgA2 humaines sous forme polymérique et monomérique.

Dans un deuxième temps, il a été entrepris d'essayer de comprendre la mécanistique de l'interaction hTfR1-SIgA en présence de Tf. En effet, ce récepteur a un rôle premier dans l'assimilation du fer. Il reconnaît et capture la Tf afin de libérer les ions fer dans le compartiment intracellulaire (comme expliqué dans l'Introduction) ce qui justifie que ce récepteur est omniprésent au niveau de la muqueuse intestinale (induction de l'expression du hTfR1 favorisée par les conditions de culture cellulaire riche en Tf). De nombreuses études ainsi que ce projet de thèse ont montré que ce hTfR1 lie aussi la SIgA. Le hTfR1 peut lier simultanément la SIgA et la Tf ce qui tente à soutenir l'hypothèse que chacun des deux ligands possède des sites de liaison différents sur le domaine extracellulaire du hTfR1. La Tf

ne masque pas les sites d'interaction de la SIgA pour le hTfR1 et inversement. Il n'a pas pu être mis en évidence une interaction directe entre les deux ligands seuls en absence du hTfR1. En plus, aucune expérimentation n'a été réalisée pour indiquer la présence d'un éventuel corécepteur ou cofacteur indispensable à la liaison de la SIgA au hTfR1. Les expériences de génétiques (extinction partielle et génération du hTfR1) ont indiqué la contribution majeure du hTfR1 dans la liaison entre les CEI et la SIgA. Concernant, la Tf qui est le ligand naturel du hTfR1, la liaison SIgA-hTfR1 se réalise en absence de Tf et se voit favorisée en présence de Tf. La Tf n'est pas un inhibiteur de la SIgA car la littérature indique qu'après capture de la Tf par le hTfR1, le ligand change de conformation donc cela pourrait entraîner un verrouillage du hTfR1 ou l'inhibition de la liaison de la SIgA. Afin de prendre en compte ces potentiels changement de conformation suite à la liaison d'un ligand, des tests d'inhibition ont été réalisés où les cellules sont mises en présence d'un premier ligand SIgA ou Tf puis après lavage ou non, les Caco-2 sont incubées avec le second ligand. Il a été observé une perte de la liaison du premier ligand dans le cas de la SIgA et de l'HoloTf alors que la liaison du second ligand incubé après lavage demeure d'intensité similaire que pour la liaison du ligand dans les conditions normales. Ces expériences d'inhibition avec un lavage montre que l'établissement de la liaison d'un ligand n'empêche pas la liaison d'un autre ligand incubé dans un second ligand. L'établissement de la liaison entre l'HoloTf et le hTfR1 n'inhibe pas l'attachement de la SIgA dans un second temps. La liaison de l'HoloTf est même abrogée pour favoriser l'établissement de la SIgA. Cette constatation est observée dans le cas inverse où la SIgA est incubée en premier puis l'HoloTf après lavage. Ces tests d'inhibition montre qu'il y a un mécanisme de liaison qui favorise la liaison selon le ligand présence dans le milieu. En effet, ces expériences d'inhibition de liaison ont été réalisées sans lavage c'est-à-dire que le second ligand est incubé dans un second temps en présence

de l'excès du premier ligand non lié aux cellules. Dans les deux cas, les intensités de liaison des ligands sont similaires aux tests de liaison simple. Ces deux types d'expériences ne montrent pas de changement de conformation du récepteur hTfR1 après liaison de l'un des deux ligands. Cependant, la littérature indique que la Tf subit un changement de conformation après sa liaison avec son récepteur. Les résultats indiquent que la liaison de l'HoloTf est réversible, ainsi que pour la SIgA. Il est difficile de statuer sur l'établissement d'un éventuel changement de conformation du récepteur ou des ligands suite à leur liaison au hTfR1 afin de stabiliser l'interaction. En conclusion de ces deux premières étapes de ce projet de thèse, la SIgA murine se lie sur le hTfR1 via les domaines spécifiques de l'IgA. Le hTfR1 possède deux sites différents de liaison pour la Tf et la SIgA. La Tf a un effet bénéfique sur l'interaction entre la SIgA et le hTfR1.

Dans la dernière partie de ce projet de thèse, il a été mis en évidence le rétrotransport de la SIgA au travers des cellules intestinales épithéliales polarisées sur des filtres Snapwell. Les expériences de marquage ont montré une co-localisation de surface des monocouches de cellules Caco-2 entre le hTfR1 et la SIgA après une exposition de 30 min à 37°C en surface apicale. L'interaction entre la SIgA et le hTfR1 est maintenue dans un modèle polarisé (plus proche des conditions physiologiques). En effet, dans le contexte physiologique, les CEI sont polarisées et la surface apicale décrit une bordure en brosse où le récepteur peut être masqué et moins accessible au ligand.

Il a été observé un rétrotransport de la SIgA du milieu apical au milieu basolatéral après une exposition de 2 h à 37°C. Le rétrotransport permet la délivrance de la SIgA dans le milieu basolatéral sous forme intacte d'après le profil des Ac en immuno-détection des chaînes α et hSC. Lorsque la SIgA est incubée simultanément avec de la Tf, la quantité de SIgA transporté dans le milieu basolatéral est augmenté en rapport au transport de la SIgA seule.

Ces essais de rétrotransport montre l'établissement d'un transport de la SIgA du milieu apical au milieu basolatéral spécifique. Il a été essayé d'observer une co-localisation de la SIgA en cours de transport dans les cellules polarisées avec le hTfR1. En augmentant le temps d'exposition de la SIgA avec la surface apicale des monocouches, il a été observé des signaux de la SIgA à proximité des noyaux des cellules. Le hTfR1 capture la SIgA dans le milieu apical et peut médier l'internalisation et le transport de la SIgA car en présence de Tf il y a une plus grande quantité de SIgA délivrée dans le milieu basolatéral. Le cycle de la Tf étant assez court l'exécution et permet un recyclage rapide du récepteur et de la Tf appauvrie en Fer, il est facile de pouvoir conclure que la Tf favorise l'internalisation du hTfR1 et de la SIgA liée à son récepteur et son rétrotransport selon les résultats obtenus. Il serait intéressant de produire ces tests de rétrotransport en présence d'un Ac anti-hTfR1 afin de confirmer l'implication du récepteur dans ces mécanismes de transport des Ac.

La SIgA constitue une première ligne de défense dans les sécrétions intestinales, en effet dans la lumière intestinale, elle exerce l'exclusion immunitaire et la clearance de ces Ag entériques ou alimentaires. En plus de cette propriété d'exclusion immunitaire, la SIgA induit la réponse immunitaire par transport des Ag directement dans les PP via les cellules M ou directement par les DC. Dans la littérature, T. Matysiak-Budnik et al ont prouvé que le hTfR1 contribue au rétrotransport de la SIgA. La SIgA ayant un fort pouvoir de liaison aux Ag luminaux, il a été réalisé des expériences de rétrotransport de complexes SIgA- *S. flexneri*. Les résultats indiquent la SIgA médie l'internalisation et le transport de *S. flexneri* dans le milieu basolatéral sous forme intacte. Il est capital que les complexes immunes soient toujours intacts après le rétrotransport afin de maintenir séquestrer *S. flexneri* et d'inhiber l'invasion des cellules par leur surface basolatérale et la présentation des Ag aux DC résidentes de la LP. Il est intéressant de montrer l'intégrité des complexes après délivrance

dans le milieu basolatéral et l'implication du hTfR1 par réalisation de ces tests en présence d'un Ac anti-hTfR1.

Kadaoui et Corthésy ont démontré que les complexes SigA-*S. flexneri* sont délivrées dans les régions SED présentes dans les PP via les cellules M. Les complexes interagissent avec les DC CD11c⁺ et CD11b⁺ contenues dans les régions SED. Ces DC sont tolérogène car elles n'induisent pas une réponse inflammatoire. En effet, ces DC inhibent les sécrétions des facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α et IFN- γ . Cette interaction DC-complexe SigA-*S. flexneri* est médié par des récepteurs de type lectine C telles que DC-SIGN ou le récepteur au mannose (des récepteurs aux IgA). Il se peut que ce rétrotransport de la SigA ou complexes SigA-Ag au travers des CEI polarisées par le hTfR1 permet la délivrance d'un Ag tel que *S. flexneri* dans le milieu basolatéral, donc dans la LP. Ce mécanisme permet représenter une très large porte d'entrée des Ag car les CEI sont les cellules majoritaires de la muqueuse intestinale à l'inverse des cellules M qui ne sont retrouvées que de manière dispersée le long des intestins au niveau des PP. Ensuite, le hTfR1 délivre directement dans la LP l'Ag associé avec la SigA. La LP est riche en cellules immunitaire résidentes tels que les cellules B et T et les DC ¹⁰⁵. La LP constitue un site effecteur de la réponse immunitaire à l'inverse des PP qui sont des sites inducteurs par capture des Ag. Les cellules B, T et DC résidentes dans la LP répondent de manière pro- ou anti-inflammatoires à des stimuli spécifiques émis par l'environnement luminaire par exemple reconnaissance d'un Ag ou son transport au travers de la muqueuse. La bactérie ainsi transportée peuvent être reconnues et internalisées par les DC afin d'être digérée. Ensuite, les fragments antigéniques sont apprêtés à leur surface des DC. Il peut être supposé qu'il y a une activation directe des cellules B en plasmocytes ¹⁰⁴ producteurs de l'IgA via les sécrétions des facteurs APRIL ou

BAFF ou par l'intermédiaire des cellules T¹⁰⁴. Les cellules T présentent des marqueurs d'activation tels que CD69 et CD25 et sécrètent l'IL-4 et l'IFN- γ .

Les DC peuvent exercer directement l'échantillonnage des Ag luminaux via CX3CR1¹⁰⁵. Il y a deux sous types de DC (CD103⁺ ou CD103⁻) qui induiront une réponse inflammatoire ou anti-inflammatoire. Les DC CD103⁺ induit l'activation des cellules T reg par sécrétion de l'acide rétinoïque et TGF- β . Les DC CD103⁻ induit une réponse inflammatoire par sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que le TNF- α et l'IL-6 après stimulation par les TLR. Ces trois types de cellules B, T et DC peuvent répondre au transport des Ag associés à la SIgA via le hTfR1 au travers des CEI. Il serait intéressant de pouvoir démontrer l'activation des DC dans ce modèle de rétrotransport d'un Ag associé à la SIgA. Pour déterminer cette stimulation, des DC peuvent être cultivées simultanément avec les cellules Caco-2, dans le milieu basolatéral et observer l'activation des DC par cytométrie de flux : présence de l'Ag en surface des DC ou marqueurs d'activation des DC tels que MHC II ou CD80 ou CD86 ou CD103 ou CD11b ou CD11c ...

Ce mécanisme de rétrotransport peut s'appliquer dans le cas d'induction et de la maintenance de la tolérance ou bien dans l'induction d'une réponse immunitaire spécifique à un Ag sans production d'une réponse inflammatoire (ou minimisée) car l'Ag est maintenu séquestré en permanence par la SIgA et peut être rapidement pris en charge dans le système immunitaire afin de bloquer l'invasion de l'épithélium intestinal et la dissémination. La SIgA est l'élément clé dans la modulation de la réponse inflammatoire ou de la tolérance par conséquent la SIgA est un bio-marqueur spécifique de la diversité microbienne intestinale (présence de SIgA anti-commensaux). Chaque individu possède une flore commensale différente et spécifique, donc développe un répertoire de IgA spécifique et unique contre sa population microbienne. En effet depuis la naissance, l'Homme est exposé

au microbiote de la mère (flore vaginale, flore cutanée et flore du lait maternel) ce qui permet une sélection et une occupation précoce des intestins par les certains microorganismes. Il y a transmission de l'immunité de la mère à l'enfant par le lait maternel, ce qui permet d'implanter des SIgA maternelles et spécifiques exogènes. Ces SIgA maternelles peuvent reconnaître et lier les bactéries commensales. Ces SIgA maternelles modulent et contrôlent l'installation progressive de la flore intestinale, la production des IgA endogènes (voir dans l'Introduction) et la maturation du GALT. La reconnaissance des commensaux par la SIgA peut induire des changements génétiques ou métaboliques ou de survie dans la bactérie reconnue ¹⁰⁶ et inversement la SIgA subit des changement de conformation ³² ce qui favorise l'interaction avec les Fc récepteurs. Il y a différentes sources des SIgA dans les sécrétions intestinales : les SIgA exogènes et les endogènes produites via les mécanismes dépendant ou indépendant des cellules T. Il est difficile de pouvoir discerner lesquelles de ces SIgA interviennent dans un type de réponse en particulier ou lient un tel type Ag mais la majorité provient des PP ^{104,106}. Les SIgA de type cellules T indépendantes interagissent essentiellement avec la flore commensale ³².

Dans les sécrétions intestinales, en plus des SIgA, les SIgM peuvent prendre le relais et exercer l'exclusion immunitaire ¹⁰⁴ mais ils ne peuvent délivrer des Ag dans les PP car ils ne lient pas les cellules M ¹⁰³. Le changement de classe isotypique induit les modifications des IgG en IgA. Les IgG favorisent la phagocytose et la clearance des bactéries via activation coordonnée du complément et interaction avec le Fc des macrophages ou neutrophiles ³².

En conclusion, le rétrotransport des SIgA complexées à un Ag par le hTfR1 au travers des CEI constitue un nouveau mode de détection et de transport des Ag dans la LP en dehors des PP qui sont les principaux sites d'induction du système immunitaire de la muqueuse intestinale. En effet, ces complexes sont transportés dans la LP qui est le lieu effecteur de la

réponse immunitaire donc l'Ag peut-être en charge plus rapidement dans un contexte non inflammatoire et induit une protection. L'interaction hTfR1-SIgA(-Ag) peut constituer en un plus grand système d'immuno-surveillance car le récepteur est omniprésent tout le long des intestins ainsi que dans l'induction du système immunitaire intestinal, et la maintenance de la tolérance et du steady-state.

Concernant les perspectives de ce projet, beaucoup de points ont été abordés dans la discussion mais il apparaît fondamental d'éclaircir les points suivants :

- L'intégrité des molécules de SIgA post rétrotransport : les résultats présentés ne montrent aucune dégradation lors du processus de transport intracellulaire mais les immuno-détections par Western Blot ne prouvent pas avec certitude que la SIgA est toujours sous forme de sécrétion et intacte. Il est envisagé d'analyser par chromatographe de taille les SIgA transportées.
- La présence du hTfR1 tout le long du processus de transport : il n'a pas été observé de vésicules endosomales (EEA-1) circulant entre la surface apicale et basolatérale contenant la SIgA et le hTfR1. Dans le cas de MCA, le hTfR1 n'a été détecté que dans les vésicules d'endocytose à proximité de la membrane apicale des CEI. Par exemple, il pourrait être entrepris des essais de rétrotransport des SIgA et des complexes avec des CEI polarisées préalablement incubées avec l'anti-hTfR1 (le monoclonal).
- L'intégrité des complexes immuns entre la *S. flexneri* et la SIgA post transport au travers des CEI : il est capital que les complexes soient libérés sous forme intacte afin que les Ag ou bactéries soient toujours séquestrés (et non libre dans la LP) afin d'être présentés aux cellules du système immunitaire. Il pourrait être entrepris d'observer post transport les complexes au microscope confocal. La souche de *S. flexneri* utilisée au laboratoire sécrète la GFP et la SIgA est directement couplée au fluorochrome Cy3, il peut-être mis

au point une technique d'observation de ces complexes au microscope confocal (amas de bactéries vertes qui co-localiseront avec le signal Cy3 des SIgA rouges). Ensuite, il peut être entrepris de développer une monocouche de CEI polarisées avec la présence de DC dans le milieu basolatéral des cellules Caco-2 afin d'observer le devenir des complexes immuns transportés : la dégradation et l'apprêtement des peptides antigéniques à la surface des DC.

Il n'a pas pu être envisagé de réaliser des expériences *in vivo* car il n'existe pas de souris déficientes pour le hTfR1. Ce récepteur est l'acteur principal de l'assimilation du fer, par conséquent les souris déficientes pour le hTfR1 ne dépassent pas le stade embryonnaire.

En conclusion, ce projet a mis en évidence un mécanisme de transport des Ag complexés avec la SIgA au travers des CEI polarisées via le récepteur hTfR1 dans la LP pour induire le système immunitaire. A ce stade du projet, il devient intéressant de déterminer toutes potentialités immunologiques de ce rétrotransport via le hTfR1 des SIgA complexées avec un peptide alimentaire ou un autre microorganisme entérique ou un commensal afin de pouvoir intégrer ce mode d'induction de la réponse immune dans la complexité du système immunitaire.

Points à retirer

- Interaction SigA-hTfR1 à la surface des cellules Caco-2
- hTfR1 récepteur multi-ligand, liaison simultanée de la Tf et de la SigA
- Rétrotransport des SigA au travers des cellules Caco-2 polarisées
- Tf favorise l'interaction SigA-hTfR1 et le retrotransport de la SigA au travers des cellules Caco-2 polarisées
- SigA médie le rétrotransport d'un Ag de type bactérie au travers des CEI polarisées

Références

1. Snoeck, V., Goddeeris, B. & Cox, E. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect.* **7**, 997–1004 (2005).
2. Rojas, R. & Apodaca, G. Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 944–955 (2002).
3. Betton, G. R. A review of the toxicology and pathology of the gastrointestinal tract. *Cell Biol. Toxicol.* **29**, 321–338 (2013).
4. Zhang, K., Hornef, M. W. & Dupont, A. The intestinal epithelium as guardian of gut barrier integrity. *Cell. Microbiol.* (2015). doi:10.1111/cmi.12501
5. DeSesso, J. M. & Jacobson, C. F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 209–228 (2001).
6. Reed, K. K. & Wickham, R. Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro. *Semin. Oncol. Nurs.* **25**, 3–14 (2009).
7. Kim, Y. S. & Ho, S. B. Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **12**, 319–330 (2010).
8. R. Mahida, Y. Epithelial cell responses. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **18**, 241–253 (2004).
9. Sansonetti, P. J. War and peace at mucosal surfaces. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 953–964 (2004).
10. Van der Flier, L. G. & Clevers, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* **71**, 241–260 (2009).
11. Simon-Assmann, P., Turck, N., Sidhoum-Jenny, M., Gradwohl, G. & Kedinger, M. In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol. Toxicol.* **23**, 241–256 (2007).
12. Muniz, L. R., Knosp, C. & Yeretssian, G. Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Front. Immunol.* **3**, 310 (2012).
13. Abreu, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 131–144 (2010).
14. Bevins, C. L. & Salzman, N. H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 356–368 (2011).
15. Magalhaes, J. G., Tattoli, I. & Girardin, S. E. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin. Immunol.* **19**, 106–115 (2007).
16. Henderson, P., van Limbergen, J. E., Schwarze, J. & Wilson, D. C. Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **17**, 382–395 (2011).
17. Chu, H. *et al.* Human α -defensin 6 promotes mucosal innate immunity through self-assembled peptide nanonets. *Science* **337**, 477–481 (2012).
18. Gallo, R. L. & Hooper, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 503–516 (2012).
19. Min, Y. W. & Rhee, P.-L. The Role of Microbiota on the Gut Immunology. *Clin. Ther.* (2015). doi:10.1016/j.clinthera.2015.03.009
20. Hase, K. *et al.* Uptake through glycoprotein 2 of FimH(+) bacteria by M cells initiates mucosal immune response. *Nature* **462**, 226–230 (2009).
21. Turner, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev.*

Immunol. **9**, 799–809 (2009).

22. Rochereau, N. *et al.* Dectin-1 Is Essential for Reverse Transcytosis of Glycosylated SIgA-Antigen Complexes by Intestinal M Cells. *PLoS Biol* **11**, e1001658 (2013).
23. Sousa, S., Lecuit, M. & Cossart, P. Microbial strategies to target, cross or disrupt epithelia. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 489–498 (2005).
24. Wells, J. M., Loonen, L. M. P. & Karczewski, J. M. The role of innate signaling in the homeostasis of tolerance and immunity in the intestine. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **300**, 41–48 (2010).
25. Tlaskalová-Hogenová, H. *et al.* Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol. Lett.* **93**, 97–108 (2004).
26. Huang, X.-Z., Zhu, L.-B., Li, Z.-R. & Lin, J. Bacterial colonization and intestinal mucosal barrier development. *World J. Clin. Pediatr.* **2**, 46–53 (2013).
27. Pabst, O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 821–832 (2012).
28. Mowat, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 331–341 (2003).
29. Neish, A. S. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes Infect.* **4**, 309–317 (2002).
30. Corthésy, B. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 27–32 (2007).
31. Schulz, O. & Pabst, O. Antigen sampling in the small intestine. *Trends Immunol.* **34**, 155–161 (2013).
32. Mantis, N. J., Rol, N. & Corthésy, B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* **4**, 603–611 (2011).
33. Corthésy, B. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis. *Autoimmun. Rev.* **12**, 661–665 (2013).
34. Macpherson, A. J., Geuking, M. B. & McCoy, K. D. Homeland security: IgA immunity at the frontiers of the body. *Trends Immunol.* **33**, 160–167 (2012).
35. Sansonetti, P. J. To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. *Mucosal Immunol.* **4**, 8–14 (2011).
36. Guarner, F. & Malagelada, J.-R. Gut flora in health and disease. *Lancet Lond. Engl.* **361**, 512–519 (2003).
37. Rol, N., Favre, L., Benyacoub, J. & Corthésy, B. The role of secretory immunoglobulin A in the natural sensing of commensal bacteria by mouse Peyer's patch dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 40074–40082 (2012).
38. Brandtzaeg, P. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front. Immunol.* **4**, 222 (2013).
39. Grishin, A. M., Beyrakhova, K. A. & Cygler, M. Structural insight into effector proteins of Gram-negative bacterial pathogens that modulate the phosphoproteome of their host. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **24**, 604–620 (2015).
40. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **118**, 229–241 (2004).
41. Eberl, G. Immunity by equilibrium. *Nat. Rev. Immunol.* **advance online publication**, (2016).
42. Kaetzel, C. S. Cooperativity among secretory IgA, the polymeric immunoglobulin

- receptor, and the gut microbiota promotes host-microbial mutualism. *Immunol. Lett.* **162**, 10–21 (2014).
43. Otten, M. A. & van Egmond, M. The Fc receptor for IgA (FcalphaRI, CD89). *Immunol. Lett.* **92**, 23–31 (2004).
 44. Tomasi, T. B. The discovery of secretory IgA and the mucosal immune system. *Immunol. Today* **13**, 416–418 (1992).
 45. Mestecky, J. & Russell, M. W. Mucosal immunoglobulins and their contribution to defence mechanisms: an overview. *Biochem. Soc. Trans.* **25**, 457–462 (1997).
 46. Yoo, E. M. & Morrison, S. L. IgA: an immune glycoprotein. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **116**, 3–10 (2005).
 47. Woof, J. M. & Kerr, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* **208**, 270–282 (2006).
 48. Bidgood, S. R., Tam, J. C. H., McEwan, W. A., Mallery, D. L. & James, L. C. Translocalized IgA mediates neutralization and stimulates innate immunity inside infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 13463–13468 (2014).
 49. Lechner, S. M. *et al.* IgA1 Protease Treatment Reverses Mesangial Deposits and Hematuria in a Model of IgA Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* (2016). doi:10.1681/ASN.2015080856
 50. Corthésy, B. in *eLS* (ed. John Wiley & Sons Ltd) (John Wiley & Sons, Ltd, 2013).
 51. Jerry, L. M., Kunkel, H. G. & Adams, L. Stabilization of dissociable IgA2 proteins by secretory component. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **109**, 275–283 (1972).
 52. Corthésy, B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front. Immunol.* **4**, 185 (2013).
 53. Brandtzaeg, P. Two types of IgA immunocytes in man. *Nature. New Biol.* **243**, 142–143 (1973).
 54. Zikan, J. *et al.* Secondary structure of the immunoglobulin J chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 5905–5909 (1985).
 55. Strugnell, R. A. & Wijburg, O. L. C. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 656–667 (2010).
 56. Asano, M. & Komiyama, K. Polymeric immunoglobulin receptor. *J. Oral Sci.* **53**, 147–156 (2011).
 57. Mostov, K. E., Kraehenbuhl, J. P. & Blobel, G. Receptor-mediated transcellular transport of immunoglobulin: synthesis of secretory component as multiple and larger transmembrane forms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 7257–7261 (1980).
 58. Kühn, L. C. & Kraehenbuhl, J. P. Role of secretory component, a secreted glycoprotein, in the specific uptake of IgA dimer by epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **254**, 11072–11081 (1979).
 59. Phalipon, A. & Corthésy, B. Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends Immunol.* **24**, 55–58 (2003).
 60. Woof, J. M. & Russell, M. W. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol.* **4**, 590–597 (2011).
 61. Wines, B. D. & Hogarth, P. M. IgA receptors in health and disease. *Tissue Antigens* **68**, 103–114 (2006).
 62. Moura, I. C. *et al.* 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 (2001).
 63. Kraehenbuhl, J. P. & Neutra, M. R. Epithelial M cells: differentiation and function.

Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **16**, 301–332 (2000).

64. Baumann, J., Park, C. G. & Mantis, N. J. Recognition of secretory IgA by DC-SIGN: Implications for immune surveillance in the intestine. *Immunol. Lett.* **131**, 59–66 (2010).
65. Floege, J., Moura, I. C. & Daha, M. R. New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin. Immunopathol.* **36**, 431–442 (2014).
66. Ben Mkaddem, S., Rossato, E., Heming, N. & Monteiro, R. C. Anti-inflammatory role of the IgA Fc receptor (CD89): from autoimmunity to therapeutic perspectives. *Autoimmun. Rev.* **12**, 666–669 (2013).
67. Bakema, J. E. *et al.* Signaling through mutants of the IgA receptor CD89 and consequences for Fc receptor gamma-chain interaction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 3603–3610 (2006).
68. Reterink, T. J. *et al.* Size-dependent effect of IgA on the IgA Fc receptor (CD89). *Eur. J. Immunol.* **27**, 2219–2224 (1997).
69. Monteiro, R. C. & Winkel, J. G. J. van de. Iga Fc Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 177–204 (2003).
70. Marsee, D. K., Pinkus, G. S. & Yu, H. CD71 (transferrin receptor): an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* **134**, 429–435 (2010).
71. Moura, I. C. *et al.* 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. JASN* **16**, 2667–2676 (2005).
72. Moura, I. C. *et al.* Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **15**, 622–634 (2004).
73. Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C. & Walz, T. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* **116**, 565–576 (2004).
74. El Hage Chahine, J.-M., Hémadi, M. & Ha-Duong, N.-T. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 334–347 (2012).
75. Widera, A., Norouziyan, F. & Shen, W.-C. Mechanisms of TfR-mediated transcytosis and sorting in epithelial cells and applications toward drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 1439–1466 (2003).
76. Ponka, P. & Lok, C. N. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 1111–1137 (1999).
77. Aisen, P. Transferrin receptor 1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 2137–2143 (2004).
78. Richardson, D. R. Mysteries of the transferrin-transferrin receptor 1 interaction uncovered. *Cell* **116**, 483–485 (2004).
79. Matysiak-Budnik, T. *et al.* Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J. Exp. Med.* **205**, 143–154 (2008).
80. Núñez, M. T., Núñez-Millacura, C., Beltrán, M., Tapia, V. & Alvarez-Hernandez, X. Apotransferrin and holotransferrin undergo different endocytic cycles in intestinal epithelia (Caco-2) cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 19425–19428 (1997).
81. Gkouvatsos, K., Papanikolaou, G. & Pantopoulos, K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 188–202 (2012).
82. Anderson, G. J. & Frazer, D. M. Hepatic Iron Metabolism. *Semin. Liver Dis.* **25**, 420–432 (2005).
83. Odorizzi, G., Pearse, A., Domingo, D., Trowbridge, I. S. & Hopkins, C. R. Apical and

- basolateral endosomes of MDCK cells are interconnected and contain a polarized sorting mechanism. *J. Cell Biol.* **135**, 139–152 (1996).
84. Sheff, D. R., Daro, E. A., Hull, M. & Mellman, I. The Receptor Recycling Pathway Contains Two Distinct Populations of Early Endosomes with Different Sorting Functions. *J. Cell Biol.* **145**, 123–139 (1999).
 85. Sheff, D., Pelletier, L., O’Connell, C. B., Warren, G. & Mellman, I. Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes. *J. Cell Biol.* **156**, 797–804 (2002).
 86. Conley, M. E., Cooper, M. D. & Michael, A. F. Selective deposition of immunoglobulin A1 in immunoglobulin A nephropathy, anaphylactoid purpura nephritis, and systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **66**, 1432–1436 (1980).
 87. Montenegro, V. & Monteiro, R. C. Elevation of serum IgA in spondyloarthropathies and IgA nephropathy and its pathogenic role. *Curr. Opin. Rheumatol.* **11**, 265–272 (1999).
 88. Harel, E. *et al.* Enhanced transferrin receptor expression by proinflammatory cytokines in enterocytes as a means for local delivery of drugs to inflamed gut mucosa. *PLoS One* **6**, e24202 (2011).
 89. Lebreton, C. *et al.* Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology* **143**, 698–707.e1–4 (2012).
 90. Berthelot, L. *et al.* Transglutaminase is essential for IgA nephropathy development acting through IgA receptors. *J. Exp. Med.* **209**, 793–806 (2012).
 91. Abed, J. *et al.* Abnormal apical-to-basal transport of dietary ovalbumin by secretory IgA stimulates a mucosal Th1 response. *Mucosal Immunol.* **7**, 315–324 (2014).
 92. Phalipon, A. *et al.* Monoclonal immunoglobulin A antibody directed against serotype-specific epitope of *Shigella flexneri* lipopolysaccharide protects against murine experimental shigellosis. *J. Exp. Med.* **182**, 769–778 (1995).
 93. Mathias, A., Longet, S. & Corthésy, B. Agglutinating Secretory IgA Preserves Intestinal Epithelial Cell Integrity during Apical Infection by *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **81**, 3027–3034 (2013).
 94. Crottet, P. & Corthésy, B. Secretory component delays the conversion of secretory IgA into antigen-binding competent F(ab’)₂: a possible implication for mucosal defense. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **161**, 5445–5453 (1998).
 95. Bonner, A., Perrier, C., Corthésy, B. & Perkins, S. J. Solution structure of human secretory component and implications for biological function. *J. Biol. Chem.* **282**, 16969–16980 (2007).
 96. Cottet, S., Corthésy-Theulaz, I., Spertini, F. & Corthésy, B. Microaerophilic Conditions Permit to Mimic in Vitro Events Occurring during in Vivo *Helicobacter pylori* Infection and to Identify Rho/Ras-associated Proteins in Cellular Signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 33978–33986 (2002).
 97. Wang, E., Albritton, L. & Ross, S. R. Identification of the Segments of the Mouse Transferrin Receptor 1 Required for Mouse Mammary Tumor Virus Infection. *J. Biol. Chem.* **281**, 10243–10249 (2006).
 98. DuPont, H. L., Levine, M. M., Hornick, R. B. & Formal, S. B. Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J. Infect. Dis.* **159**, 1126–1128 (1989).
 99. Handa, Y. *et al.* *Shigella* IpgB1 promotes bacterial entry through the ELMO-Dock180 machinery. *Nat. Cell Biol.* **9**, 121–128 (2007).
 100. Gorden, J. & Small, P. L. Acid resistance in enteric bacteria. *Infect. Immun.* **61**, 364–

367 (1993).

101. Islam, D. *et al.* Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat. Med.* **7**, 180–185 (2001).

102. Longet, S. *et al.* Reconstituted human polyclonal plasma-derived secretory-like IgM and IgA maintain the barrier function of epithelial cells infected with an enteropathogen. *J. Biol. Chem.* **289**, 21617–21626 (2014).

103. Corthésy, B. Secretory immunoglobulin A: well beyond immune exclusion at mucosal surfaces. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **31**, 174–179 (2009).

104. Macpherson, A. J., Köller, Y. & McCoy, K. D. The bilateral responsiveness between intestinal microbes and IgA. *Trends Immunol.* **36**, 460–470 (2015).

105. McDermott, A. J. & Huffnagle, G. B. The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology* **142**, 24–31 (2014).

106. Sutherland, D. B., Suzuki, K. & Fagarasan, S. Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by Immunoglobulin A. *Immunol. Rev.* **270**, 20–31 (2016).

Appendice

Ci-joint le manuscrit de l'article scientifique associé à ce projet :

Transport of SigA via the hTfR1 across polarized Caco-2 cell monolayer: an alternative gate for antigen delivery across the epithelial barrier

Margaux-Sarah DELALOIX and Blaise CORTHESEY

Article en tant que premier auteur.

Article dans l'état actuel en attente de la réalisation d'expérimentations mentionnées dans la partie Discussion-Conclusion-Perspectives.

Prévision de soumission en décembre 2016 ou au plus tard Janvier-Février 2017.

Transport of SIgA via the hTfR1 across polarized Caco-2 cell monolayer: an alternative gate for antigen delivery across the epithelial barrier

Margaux-Sarah DELALOIX¹ and Blaise CORTHESEY¹

¹R&D Laboratory, Division of Immunology and Allergy, University State Hospital (CHUV), CLE-D2-204, chemin des Boveresses 155, 1066 Epalinges, Switzerland

ABSTRACT

The intestinal epithelium constitutes a dynamic barrier separating the internal sterile compartment from the luminal content. A selective passage allows regulating the assimilation of the nutrients and maintaining the balance between tolerance and adaptive immune responses. Antigen trans-epithelial transport occurs via the microfold cells, the dendritic cells or paracellular leak. In persons suffering from active celiac diseases, SIgA allows the protected retrotransport of undigested gliadin peptide across the enterocytes via the human transferrin receptor. Under non-pathological conditions, not much is known as to the possible function of apical-to-basolateral SIgA retrotransport. SIgA has diverse regulatory roles in the gut immune system, the primary one being immune exclusion. Our investigations confirm the existence of SIgA retrotransport across a polarized Caco-2 cell monolayer. The transport of SIgA is mediated by the transferrin receptor. We first demonstrated a strong interaction between SIgA and Caco-2 cells that we could inhibit through anti-human transferrin receptor antibody, but not via transferrin. This apical-to-basolateral transport of SIgA across Caco-2 mediated the transport of a large payload such as a bacterium. In conclusion, SIgA can serve as a delivery vehicle across the intestinal barrier via the human transferrin receptor.

Key words: Secretory Immunoglobulin A, human transferrin receptor, intestinal epithelial cell, retrotransport, antigen delivery

INTRODUCTION

The intestinal epithelium is a dynamic barrier separating the internal compartment of the gut from the luminal content comprising a variety of resident endogenous microorganisms and transiting exogenous antigens (food, pathogens). Selective passage of luminal antigens of different nature across the permeable intestinal barrier leads to maintenance of tolerance or generation of aggressive immune responses, a balance referred to as homeostasis. Several paths for antigen trans-epithelial transport have been identified to date, including: microfold (M) cells in the Peyer's patches and isolated lymphoid follicles, villous M cells, goblet cell associated antigen passage (GAP), transepithelial dendrites (TEDs), and paracellular leak ¹. In the context of active celiac disease, luminal gliadin bound to secretory IgA (SIgA) can traverse enterocytes, but it is unknown whether such a SIgA-mediated route is functional in the steady-state and for other antigens.

SIgA is the most abundant antibody found at mucosal surfaces covering the gut ². SIgA is a multimeric structure made of polymeric IgA (pIgA) produced by plasma cells ³ in the mucosal lamina propria and of secretory component (SC), which is derived from the polymeric Ig receptor (pIgR) that ensures transcytosis of pIgA across the epithelial cells of mucous membranes ⁴. In addition to canonical immune exclusion, SIgA fulfills several functions including: control of inflammation, sampling of antigens via M cell targeting, sensing of commensal bacteria, and is able to serve as a delivery vehicle for immunization. Apical interaction of SIgA in a model of polarized intestinal epithelial cells induces different degrees of responsiveness as a function of the bound antigen ⁵. As far as transport is considered, it remains unexplored whether such an interaction leads to the passage of antibody across the cell barrier, and whether this can additionally drive a bound sizeable payload across.

In order to address this issue, we used a mouse monoclonal SIgA (SIgAC5) specific for *Shigella flexneri*. We first demonstrated that interaction between murine SIgAC5 and human epithelial Caco-2 cell polarized monolayers devoid of cell partners (M cells⁶, DCs^{7,8}, goblet cells⁹ that can bias appraisal of transport occurs similarly as with human SIgA¹⁰. We found that interaction of SIgA with Caco-2 cell transferrin receptor 1 (TfR1) participates in the antibody's apical to basolateral transcytosis. Specific recognition of SIgAC5 by TfR1 was not abolished by competition with holotransferrin (hTf), suggesting that two distinct, spatially not overlapping, binding sites are involved. Intact SIgA is detected post-transcytosis in the basolateral environment, indicating that non-degradative routing takes place. SIgA facilitates transport of the bacterium cargo, which is detected alive in the basolateral compartment. The sum of the data adds to the notion that at homeostasis, SIgA plays an important role to deliver antigens along the luminal to serosal axis, not only in PPs, but in the diffuse lamina propria as well.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Proteins

Mouse IgAC5, which is specific for *Shigella flexneri* serotype 5a LPS, was obtained as described previously ¹¹. IgAC5 polymeric and monomeric forms were separated by size exclusion chromatography ¹¹. pIgA was combined with equimolar amounts of human SC in PBS for 30 min at room temperature to generate SIgAC5 ¹². Holo-transferrin (hTf) in PBS solution was provided by CSL Behring, Bern, Switzerland.

Caco-2 cells and culture conditions

Human colonic adenocarcinoma Caco-2 cells (HTB-37) were grown in complete DMEM (Dulbecco's-modified Eagle's-medium as described ¹³. For establishment of polarized monolayers, Caco-2 cells cultivated to 80% confluency were seeded on clear Snapwell inserts (membrane diameter: 12 mm; pore size: 0.4 μm ; Corning Costar Corporation, Cambridge, MA) at a density of 2×10^5 cells/cm². The integrity of the polarized Caco-2 cell monolayer at week 3 was verified by morphology and monitoring of the transepithelial electrical resistance (TER) using a Millicell-ERS apparatus (Millipore, Bedford, MA) ¹⁴, by immunostaining of zonula occludens-1 specific tight junctions ¹⁵ and limited transport of fluorescent beads (yellow-green fluorescent, 0.2 μm carboxylate-modified FluoSpheres beads, Life Technologies) ¹⁶ (data not shown).

Flow cytometry experiments

Caco-2 cells cultivated to 80% confluency were detached from the culture dish by treatment with trypsin-EDTA (Life Technologies), and washed with DMEM containing 10 mM HEPES and 2.5% fetal calf serum (FCS; iDMEM). 1×10^5 cells were incubated

with 1.25 µg SIgAC5 labeled with indocyanin 5 (IgA-Cy5) or 250 ng hTf labeled with FITC (hTf-FITC) at 4°C for 30 min in iDMEM. Expression of hTfR1 at the Caco-2 cell surface was detected by direct staining with 5 µg of mouse monoclonal antibody (mAb, clone M-A712, BD Sciences) labeled with phycoerythrin (PE). After washing with PBS-5% FCS, cells were resuspended in the same solution and cell-associated fluorescence intensity was measured by flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter). Data processing was performed by using the FlowJo software v10 from Tree Star Inc.

In blocking experiments, Caco-2 cells recovered as above were preincubated with 5 µg of PE-labeled anti-hTfR1 mAb at 4°C for 30 min. Following washes with PBS, cells were exposed to 1.25 µg SIgA-Cy5 or 250 ng hTf-FITC at 4°C for 30 min. Cell-associated fluorescence intensity of bound mAb and the SIgA or hTf ligands was evaluated by flow cytometry. For competition assays, Caco-2 cells were exposed to 1.25 µg SIgA-Cy5 and 250 ng HoloTf-FITC added simultaneously at 4°C for 30 min.

Expression of hTfR1 in CHO cells

The Flp-In CHO cells were selected for transfection, because this clone expresses a very lower level of hTfR1. Flp-In CHO cells were grown in complete RPMI-1640 (Sigma) complemented with 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM glutamine (Sigma) and 1% penicillin-streptomycin (cRPMI). Flp-In CHO cells cultivated to 80% confluency were processed for transfection via TurboFect (Thermo Scientific) as indicated by the supplier. Briefly, 2×10^5 cells/well in a 12 well plate were combined with 4 µl Turbofect reagent and 2 µg of pcDNA3-hTfR1 coding for the full-length receptor¹⁷ or empty pcDNA3 as a control. Transfected cells were immediately returned to cRPMI to recover. Flow cytometry analysis to assess expression of

hTfR1 was performed 48 h post-transfection. To generate CHO clones stably-expressing hTfR1, cells were exposed to escalating doses of G-418 (Geneticin, 50-500 µg/ml). Cell clones were isolated at one cell per well in 96-well culture dishes by using a cell sorter (MoFlo Astrios^{EQ} Beckman Coulter). Selection was continued for 2 more weeks. Emerging clones were amplified based on the level of surface expression of hTfR1, and used to confirm binding of SIgA-Cy5 and hTf-FITC by flow cytometry in conditions defined for Caco-2 cells.

hTfR1 silencing in Caco-2 cells

Small interfering RNAs (ON-TARGETplus human TFRC SMARTpool ; sequences: 5'-GAAUGGAUCUAUAGUGAUU-3', 5'-GAUAAGAACGGUAGACUUG-3', 5'-GUAAACUGGUCCAUGCUGAA-3', 5'-CUGAAUGGCUAGAGGGGAUA-3') were obtained from Dharmacon-GE Life Sciences. Caco-2 cells cultivated up to 80% confluency were seeded in a 24-well plate at a density to 1×10^5 cells/well in cDMEM. Transfection was carried out using the SilentFect reagent (ThermoFisher) according to the supplier's indications. Briefly, Caco-2 cells were incubated with 50 µl of serum-free medium containing 1 µl SilentFect and 10 nM siRNAs prepared in RNase-free water. 72 h post-transfection, hTfR1 expression level and binding intensity of SIgAC5 or hTf were measured by flow cytometry.

Incubation of SIgA with polarized Caco-2 cell monolayers

Complete DMEM in the apical and basolateral compartments of Snapwell inserts was replaced by DMEM supplemented with 10 mM HEPES (pDMEM). After 1 h, 2.5 µg SIgAC5 labeled with indocyanin 3 (IgAC5-Cy3) in 500 µl of pDMEM was added, as such or in the presence of 25 µg hTf. For surface labeling, monolayers were

incubated for 30 min. For assessment of retro-transport, Snapwell inserts were incubated at 37°C for 2 h.

Anti-Mouse IgA ELISA

Quantitation of SIgA in either the basolateral or the apical compartment was determined by ELISA with the following combination of Abs: coating: goat anti-mouse IgA (Sigma, 1/500); detection: goat anti-mouse IgA biotinylated IgG (KPL, 1/1000) and Extravidin-HRP (Sigma, 1/5000). Ab dilutions were carried in PBS-0.5% Tween-20, and the incubation time was for 1 or 2 h at 37°C.

Concentration of basolaterally recovered SIgA

Basolateral contents were mixed with trichloroacetic acid to a final concentration of 10%. Following overnight precipitation at -80°C, samples were centrifuged for 20 min at 13'000 x *g* at 4°C washed twice with methanol, and dried in a speed vacuum device (Jouan RC10.09 concentrator). Samples were directly used for immunodetection.

Immunodetection

The standard protocol steps are described ¹⁵. For detection of IgA, goat anti-alpha chain (Abcam) at a dilution of 1/3000 was used, followed by rabbit anti-goat IgG conjugated to HRP (Thermo Fisher Scientific, 1/5000). SC is detected with primary rabbit antiserum diluted 1/3000 ¹⁸ and secondary goat anti rabbit IgG coupled to HRP (1/5000). Tf was analyzed with a combination of a specific mouse mAb (Thermo Fisher Scientific, 1/3000) and rabbit anti-mouse IgG-HRP conjugate

(Sigma, 1/5000). Mouse mAb anti-TfR1 (BD Biosciences, 1/3000) followed by rabbit anti-mouse IgG-HRP conjugate (1/5000) were used to identify the receptor.

Laser scanning confocal microscopy

Caco-2 cell monolayers were washed with pDMEM, and exposed to 2.5 µg of SIgAC5-Cy3) as such or in the presence of 25 µg hTf-FITC. Monolayers were fixed with 4% paraformaldehyde overnight at 4°C. After 3 PBS washes, filters were treated with PBS containing 5% FCS and 0.2% saponin for 30 min at RT. Monolayers were incubated with 5 µg of anti-human TfR1 mAb in PBS containing 5% FCS for 2 h at RT, followed by AlexaFluor 647-coupled goat anti-mouse IgG (Life technologies, 1/100) for 90 min at RT. After 3 PBS washes, the inserts were incubated with 200 ng/ml DAPI to stain cell nuclei, the membranes cut out, and mounted in Vectashield (Vector Laboratories) for observation using a Zeiss LSM 710 Meta Confocal Microscope (Carl Zeiss, Germany) equipped with a 63x objective. Pictures were acquired and processed using the Zeiss Zen 2012 Black edition software.

Bacterial strain and incubation with SIgA

The virulent strain of serotype 5a LPS *Shigella flexneri* M90T constitutively expressing green fluorescent protein (GFP)¹⁹ was used. Conditions for culture and selection have been described²⁰. 5x10⁸ bacteria in PBS were mixed with 2.5 µg SIgAC5-Cy3 in a final volume of 500 µl for 1 h at RT under gentle agitation. Unbound SIgA was removed by centrifugation and 3 washes with PBS. SIgA-*S. flexneri* complexes were used freshly for transport experiments.

Apical-to-basolateral bacterial transport across Caco-2 cell monolayers

The apical medium of polarized Caco-2 cell monolayers was replaced by pDMEM one hour prior to addition of 2×10^7 *S. flexneri* in a free form, or in association with SIgA, in a final volume of 400 μ l. Exposure to the apical surface of the Caco-2 cell monolayer was performed for 2 h at 37°C; such incubation times do not induce any *S. flexneri*-mediated damage to the monolayer¹⁵, and are thus adequate to compare SIgA-mediated transport of the bacterium with bacterium alone.

The content of the basolateral compartment was directly recovered to determine the number of retro-transported bacteria. To evaluate internalized bacteria and total bacteria associated with Caco-2 cells, the inserts were washed twice with PBS, and the membrane cut into two pieces. The first half was directly incubated in 500 μ l cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 0.2% Nonidet P-40, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA in PBS) for 5 min on ice, whereas the other half was pre-treated with 50 μ g/ml gentamycin (to eliminate the adherent bacteria) prior to incubation in lysis buffer as just above. *S. flexneri* in the various samples were numerated from serial dilutions seeded on LB agar plates containing 50 μ g/ml ampicillin.

Statistical analysis

The results are given as means +/- the standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the one-way ANOVA applied between all samples and Student's *t* test when two experimental groups were assessed. Differences were considered as significant when *p* values < 0.05. Graph generation and statistical analyses were performed using GraphPad Prism software version 7.

RESULTS

Murine SIgA binds to Caco-2 cells

Interaction of murine and human SIgA with the intestinal epithelium is well documented, both in *in vitro* and *in vivo* conditions^{10,15,21,22}, yet in different and thus not strictly comparable contexts. This prompted us to first examine whether murine SIgAC5 interacts with the human epithelial Caco-2 cells as this is known for human SIgA. Figure 1A shows that SIgAC5-Cy5 interacts with Caco-2 cells in a time and dose-dependent manner. Similar MFIs were obtained for low amounts of SIgA, irrespective of the time of incubation, indicating that all Ab molecules had bound to the cells present early after incubation. In contrast, higher amounts of SIgA led to increased binding as a function of time. Using equivalent molar amounts of polymeric IgA or free SC as those found in 2.5 µg of SIgA, we identified the IgA moiety as the structure responsible for most of the interaction with Caco-2 cells (Figure 1B).

Murine SIgA binds to human TfR1

We then examined whether SIgAC5 is specifically recognized by human TfR1. In addition to the expected detection of pIgR, the Caco-2 cell clone used expresses substantial level of TfR1, as confirmed by flow cytometry and immunodetection (Figure 2A). In control experiment, we show that the receptor binds its “natural” ligand, hTf, with high efficiency (Figure 2A). Blocking of TfR1 with a specific mAb results in a statistically significant reduction of SIgAC5-Cy5 binding; however, the partial decrease in MFI suggests that binding of the anti-TfR1 mAb does not fully prevent recognition of SIgA (Figure 2B). By taking advantage of this characteristic, we detected by LSCM imaging co-localization of TfR1 and SIgAC5-Cy5 on the surface of Caco-2 cells (Figure 2C). Caco-2 cells transfected with TfR1-specific

siRNAs display reduced surface expression of the receptor, with concomitant decrease of SIgA and hTf binding (Figure 2D). Confirmation of the direct interaction between SIgA and TfR1 was obtained through overexpression of TfR1 in CHO cells, as analyzed by flow cytometry and immunodetection (Figure 3A). Stably transfected cells exhibit a 3-fold increase in SIgA binding, similar to that observed in control experiments with hTf (Figure 3B). The sum of these overlapping data indicates that hTfR1 expressed at the Caco-2 cells is capable to recognize murine SIgA5, and thus ensures that subsequent retro-transport experiments with the Ab can be carried out in the Caco-2 model.

Concomitant recognition of SIgA5 and hTf by TfR1

Experiments in Figures 2 and 3 argue for the capacity of TfR1 to associate SIgA on the top of hTf. Hence, how the receptor can cope with the presence of the two ligands as this happens in the physiological context is an open issue. Incubation of Caco-2 with SIgA and hTf added simultaneously showed that binding of SIgA was slightly enhanced, while the interaction of hTf remains stable (Figure 4A). This indicates that TfR1 binds both SIgA and hTf, and suggests that the binding site of each protein ligand is different. As subtle changes mediated by hTf in TfR1 favors anchoring of SIgA, we performed blocking assays (see Materials and Methods for details) to gain further insight in the manner a ligand can impact on the other's binding properties. Initial incubation with hTf did not affect SIgA binding as compared to control Caco-2 cells, yet the presence of SIgA displaced close to two thirds of initially bound hTf within 30 min (Figure 4B). Following initial addition of SIgA, hTf binds to the same level as in the absence of blocking SIgA, while a significant part of this latter is pushed away by incoming hTf (Figure 4C). The data confirm co-binding

of the two ligands, and suggests that the abundance of each of them in the vicinity of the cells governs their relative binding.

SlgA is retro-transported intact across polarized Caco-2 cell monolayers

As a first step to examine SlgAC5-mediated transepithelial transport of antigens, binding of the Ab to polarized Caco-2 cell monolayer was assessed. 3D reconstruction images show co-localization of TfR1 and SlgAC5-Cy3 at the site of application of the Ab, i.e. the apical surface of the monolayer (Figure 5A). Having established that the couple SlgAC5-TfR1 is formed in this experimental context, we next determined whether the Ab can cross the epithelial mimic. ELISA revealed the presence of α -chain reactive material in the basolateral compartment after a 2-hour incubation at 37°C (Figure 5B). Consistent with the increased binding of SlgAC5 in the presence of hTf, more Ab was retro-transcytosed (Figure 5B). Barely detectable basolateral SlgAC5 was present when transport was assayed at 4°C (data not shown). Immunodetection with anti- α chain and anti-SC indicated that the constituents of the Ab are released intact in the basolateral compartment (Figure 5C). This is true for SlgAC5 incubated alone or in the presence of hTf (Figure 5C). Along the same line, hTf is efficiently transported in the presence of the Ab, and is similarly recovered as an integral protein, with some dimers formed (Figure 5D). We conclude that retro-transcytosis of the two TfR1 ligands occurs simultaneously, and that they escape degradation in the lysosomal compartment, consistent with the trafficking of the receptor in the recycling pathway.

SIgA allows carrying bacteria across the Caco-2 cell monolayer

Given that small gliadin peptides have shown to be retro-transcytosed by SIgA recovered from ACD patients across Caco-2 cell monolayers (Lebreton et al), we found of interest to investigate whether SIgA can promote the transport of a sizeable antigen, *i.e.* a bacterium. As a model, we used SIgAC5 in combination with the bacterium the Ab is specific for, *i.e.* *S. flexneri*. Incubation of the bacterium with polarized Caco-2 cell monolayers does not affect the tightness of the epithelial barrier for up to 10 hours (Longet et al, 2013), and is thus appropriate to determine the contribution of SIgA in short-term retro-transport. Based on kinetics data (Figure 5), *S. flexneri* alone or in complex with SIgAC5 was incubated for 2 hours in the apical compartment of the Caco-2 cell monolayer. Cell-associated bacteria yielded similar count values per filter in the two conditions, indicative of a non-limiting amount of bacteria in the assay (Figure 6 A). Internalized bacteria measured at 2 hours after treatment of Caco-2 cells with gentamycin were increased by a factor of 8 in the presence of SIgAC5 (Figure 6B). When combined with SIgAC5, close to 5000 bacteria were accumulated during the 2-hour incubation, whereas barely detectable counts were obtained for *S. flexneri* alone (Figure 6C). This allows us to conclude that SIgA has the capacity to convey bacteria across a tight reconstituted epithelium, and this happens in the absence of any additional cellular or molecular contributor.

DISCUSSION

Herein, we provide evidence that murine SIgA interacts with human TfR1 present at the apical surface of polarized epithelial Caco-2 cell monolayers, and that this allows transport of intact Ab molecules into the basolateral environment. We further show that hTf, the “natural” ligand of TfR1 does not interfere with the apical-to-basolateral of SIgA, but rather promotes it, indicating that the receptor can accommodate the two ligands in a non-competitive manner. Additionally, complexes made of SIgA and Sf enhance transport of the bacterium, suggesting that this pathway may be relevant in the physiological context.

To date, hTfR1 has been identified as the principal actor of the transport of SIgA or SIgA-gliadin complexes across the intestinal epithelium in ACD patients. Transcellular passage is more pronounced in ACD than in healthy controls. In vitro, transport across polarized Caco-2 cell monolayers requires that IgA from patients are used to permit detectable transcytosis of partly intact gliadin peptides¹⁰. Our data provide evidence that this pathway is functional in the presence of a bacterium-specific SIgA, and that it can well serve to deliver large payloads in the underlying lamina propria. Of note, Sf transport was ensured in the presence of 10 µg/ml specific SIgA, while as high as 100-250 µg/ml of ACD-derived IgA were necessary to convey gliadin peptides across the reconstituted Caco-2-based epithelium layer. As the presence of highly glycosylated SC does not improve binding of IgA to hTfR1 (Figure 1), the rationale for such a discrepancy must be found elsewhere.

The concomitant binding of hTf and SIgA to TfR1 suggests that each ligand possesses its own binding site. Of note, N-glycosylation of TfR1 is important for Tf binding, and SIgA interacts with several of its known receptor via glycans as well. hTfR1 exists as an integral membrane homodimer that binds one hTf molecule per

monomer²³. The molecular structure of the hTf-TfR1 complex shows that hTf binds laterally to the dimer, and leaves the apical part of the receptor accessible to interaction with other proteins²⁴. For example, the TfR1 molecule can accommodate ferrireductase and/or DTM1 on the top of hTf following conformational changes²⁵. It is thus plausible that free areas on the surface of TfR1 dimer are available to interact with SIgA without preventing association with hTf. In support of this, immunoprecipitation experiments with Abs directed against either SIgA or hTf did not permit to demonstrate a direct interaction between the two partners, although both proteins co-localize on TfR1 (Figure 5A). In contrast to hTf, apoTf did not improve binding of SIgA to, nor transcytosis across Caco-2 cells (data not shown); this can be explained by the different position of bound hTf and apoTf on the TfR1²⁶, resulting in differential structural alterations having as a consequence to modify the interaction with SIgA. Blocking and chase experiments (Figure 4) argue for levels of interaction dependent on the relative abundance of ligands in the vicinity of the receptor, thus reflecting flexibility as far as transport is concerned.

In biopsies of ACD patients and in Caco-2 cells the formation of a trimeric complex between SIgA, TfR1 and transglutaminase 2 (Tg2) has been detected at the surface of enterocytes, yet a direct interaction between Tg2 and IgA was not established¹⁰. Consistent with this, treatment of Caco-2 cells with siRNA specific for hTfR1 reduced both the expression of the receptor and binding of mouse SIgA. Direct interaction between mouse SIgA and TfR1 was confirmed by the use of CHO cells stably transfected with an expression vector coding for human TfR1. Of note, control experiments performed with hTf as a “natural” ligand yielded similar pattern of binding modulation (Figure 1).

The apical cytoplasm of polarized Caco-2 cells contains a population of multivesicular bodies, known as common recycling endosomes, capable of receiving membrane proteins trafficking in from both apical and basolateral surfaces and then routing them to a variety of cell surface and intracellular destinations ²⁷. The unique internalization and recycling functions of epithelial TfR1 makes it an ideal candidate to account for the observation that intact SIgA are transported from the apical to the basolateral compartment, as detected in immunoblot analyses. Both pIgA and free SC are recovered after retro-transcytosis, suggesting that the Ab molecule indeed follows a non degradative pathway, and that the disulfide bridge covalently linking pIgA and SC is lost during the process. The maintenance of the Ab structure is consistent with its preserved capacity to facilitate the transport of the Sf along the apical-to-basolateral axis (Figure 6), and a corollary, to keep recognizing TfR1 when bound to the bacterial antigen. In the absence of other cell population in the assay, and in the presence of polarized Caco-2 cell monolayer with guaranteed tightness, our data demonstrate that SIgA is involved in retro-transcytosis of a large payload across intestinal epithelial cells.

Recognition of hTf by TfR1 has made it an attractive choice for drug targeting and delivery of protein conjugates for vaccination, and also for delivery of therapeutics to nasal and vaginal mucosae ^{28,29}. The intrinsic stability of SIgA in the gastrointestinal tract ³⁰ suggests that it can be serve as a valid delivery vehicle targeting epithelial TfR in addition to M cells in Peyer's patches. While the M cell pathway is prone to engender protective immune responses against a variety of antigens ^{16,31,32}, TfR-mediated enterocyte transcytosis may selectively direct SIgA-bound cargos to lamina propria prone to targeting tolerogenic CD103+ DCs. Such a pathway may account for the non-inflammatory properties of SIgA in the gut, for which mechanistic

evidences are lacking. In the absence of viable TfR knock-out mice, deciphering such a working hypothesis will require that PP-lacking animals will have to be used. Together, our data identify a novel path for transepithelial antigen transport relying on retro-transcytosis of SIgA, either in a free form or in association with a bacterium. This suggests that multiple delivery routes by which an antigen crosses the epithelium are necessary to appropriately direct the outcome of the subsequent immune response. In ACD patients displaying overexpression of TfR1 at the apical surface of the epithelial cells ³³, administration of SIgA carrying blocking agents may be seen as a specific noninvalidating treatment given the noninflammatory properties of SIgA ³⁴.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Swiss Science Research Foundation, grant 3100-156806. Purified holotransferrin was kindly provided by CSL Berhing, Bern, Switzerland. The plasmid pcDNA3-hTfR1 was a gift from Dr. Susan R. Ross (Pennsylvania University, USA). Flp-In CHO cells were obtained from Dr. Bénédicte Baisse (CHUV, Lausanne, Switzerland).

CONFLITS OF INTEREST DISCLOSURE

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Knoop, K. A., Miller, M. J. & Newberry, R. D. Transepithelial antigen delivery in the small intestine: different paths, different outcomes. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **29**, 112–118 (2013).
2. Tomasi, T. B. The discovery of secretory IgA and the mucosal immune system. *Immunol. Today* **13**, 416–418 (1992).
3. Brandtzaeg, P. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front. Immunol.* **4**, 222 (2013).
4. Kaetzel, C. S. Cooperativity among secretory IgA, the polymeric immunoglobulin receptor, and the gut microbiota promotes host-microbial mutualism. *Immunol. Lett.* **162**, 10–21 (2014).
5. Mikulic, J., Longet, S., Favre, L., Benyacoub, J. & Corthesy, B. Secretory IgA in complex with *Lactobacillus rhamnosus* potentiates mucosal dendritic cell-mediated Treg cell differentiation via TLR regulatory proteins, RALDH2 and secretion of IL-10 and TGF- β . *Cell. Mol. Immunol.* (2016). doi:10.1038/cmi.2015.110
6. Kraehenbuhl, J. P. & Neutra, M. R. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 301–332 (2000).
7. Niess, J. H. *et al.* CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* **307**, 254–258 (2005).
8. Lelouard, H., Fallet, M., de Bovis, B., Méresse, S. & Gorvel, J.-P. Peyer's patch dendritic cells sample antigens by extending dendrites through M cell-specific transcellular pores. *Gastroenterology* **142**, 592–601.e3 (2012).
9. McDole, J. R. *et al.* Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature* **483**, 345–349 (2012).
10. Lebreton, C. *et al.* Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71,

and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology* **143**, 698–707.e1–4 (2012).

11. Favre, L. I., Spertini, F. & Corthésy, B. Simplified procedure to recover recombinant antigenized secretory IgA to be used as a vaccine vector. *J. Chromatogr. B* **786**, 143–151 (2003).

12. Phalipon, A. *et al.* Monoclonal immunoglobulin A antibody directed against serotype-specific epitope of *Shigella flexneri* lipopolysaccharide protects against murine experimental shigellosis. *J. Exp. Med.* **182**, 769–778 (1995).

13. Perrier, C., Sprenger, N. & Corthésy, B. Glycans on secretory component participate in innate protection against mucosal pathogens. *J. Biol. Chem.* **281**, 14280–14287 (2006).

14. Cottet, S., Corthésy-Theulaz, I., Spertini, F. & Corthésy, B. Microaerophilic Conditions Permit to Mimic in Vitro Events Occurring during in Vivo *Helicobacter pylori* Infection and to Identify Rho/Ras-associated Proteins in Cellular Signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 33978–33986 (2002).

15. Longet, S. *et al.* Human plasma-derived polymeric IgA and IgM antibodies associate with secretory component to yield biologically active secretory-like antibodies. *J. Biol. Chem.* **288**, 4085–4094 (2013).

16. Rochereau, N. *et al.* Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol.* **11**, e1001658 (2013).

17. Wang, E., Albritton, L. & Ross, S. R. Identification of the Segments of the Mouse Transferrin Receptor 1 Required for Mouse Mammary Tumor Virus Infection. *J. Biol. Chem.* **281**, 10243–10249 (2006).

18. Rindisbacher, L., Cottet, S., Wittek, R., Kraehenbuhl, J. P. & Corthésy, B.

Production of human secretory component with dimeric IgA binding capacity using viral expression systems. *J. Biol. Chem.* **270**, 14220–14228 (1995).

19. Rathman, M. *et al.* The development of a FACS-based strategy for the isolation of *Shigella flexneri* mutants that are deficient in intercellular spread. *Mol. Microbiol.* **35**, 974–990 (2000).

20. Longet, S. *et al.* Reconstituted human polyclonal plasma-derived secretory-like IgM and IgA maintain the barrier function of epithelial cells infected with an enteropathogen. *J. Biol. Chem.* **289**, 21617–21626 (2014).

21. Rey, J., Garin, N., Spertini, F. & Corthésy, B. Targeting of secretory IgA to Peyer's patch dendritic and T cells after transport by intestinal M cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **172**, 3026–3033 (2004).

22. Mathias, A. *et al.* Potentiation of Polarized Intestinal Caco-2 Cell Responsiveness to Probiotics Complexed with Secretory IgA. *J. Biol. Chem.* **285**, 33906–33913 (2010).

23. Richardson, D. R. & Ponka, P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1331**, 1–40 (1997).

24. Lebrón, J. A., West, A. P. & Bjorkman, P. J. The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J. Mol. Biol.* **294**, 239–245 (1999).

25. Richardson, D. R. Mysteries of the transferrin-transferrin receptor 1 interaction uncovered. *Cell* **116**, 483–485 (2004).

26. Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C. & Walz, T. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* **116**, 565–576 (2004).

27. Knight, A., Hughson, E., Hopkins, C. R. & Cutler, D. F. Membrane protein

trafficking through the common apical endosome compartment of polarized Caco-2 cells. *Mol. Biol. Cell* **6**, 597–610 (1995).

28. Qian, Z. M., Li, H., Sun, H. & Ho, K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.* **54**, 561–587 (2002).

29. Mann, J. F. S. *et al.* Transferrin conjugation confers mucosal molecular targeting to a model HIV-1 trimeric gp140 vaccine antigen. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **158**, 240–249 (2012).

30. Crottet, P. & Corthésy, B. Secretory component delays the conversion of secretory IgA into antigen-binding competent F(ab')₂: a possible implication for mucosal defense. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **161**, 5445–5453 (1998).

31. Rochereau, N. *et al.* Delivery of antigen to nasal-associated lymphoid tissue microfold cells through secretory IgA targeting local dendritic cells confers protective immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**, 214–222.e2 (2016).

32. Rochereau, N. *et al.* Secretory IgA as a vaccine carrier for delivery of HIV antigen to M cells. *Eur. J. Immunol.* **45**, 773–779 (2015).

33. Heyman, M. & Menard, S. Pathways of gliadin transport in celiac disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1165**, 274–278 (2009).

34. Boullier, S. *et al.* Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 5879–5885 (2009).

FIGURES

Figure 5. SIgAC5 interacts with Caco-2 cells.

(A) Caco-2 cells (1×10^5 cells) were exposed to increasing amounts of SIgAC5 coupled to Cy5 for 30, 60, and 180 min respectively, at 4°C . Dots show the mean fluorescence intensity (MFI) of individual measurements performed in hexaplicates.

(B) Caco-2 cells (10^5) were exposed to $1.25 \mu\text{g}$ of SIgA or equimolar amounts of pIgA or human SC, all coupled to Cy5, for 30 min at 4°C . Dots corresponds to the MFI of individual measurements ($n=9$).

Figure 6. SIgAC5 associates with TfR1 expressed at the surface of Caco-2 cells.

(A) Functional hTfR1 is expressed by Caco-2 cells. Flow cytometry analysis of Caco-2 cells labeled with anti-human TfR1 coupled to PE (grey) compared to control (dashed line). Caco-2 cell lysate displays TfR1 reactivity by immunodetection under nonreducing conditions (lane 1); lane 2: specific anti-TfR1 mAb omitted. Flow cytometry analysis of hTf binding by Caco-2 cell. (B) Blocking by preincubation with anti-TfR1, followed by incubation with IgAC5-Cy5; binding was assessed by flow cytometry. Results correspond to three independent experiments performed in triplicates ($n=9$). (C) Co-localization of TfR1 and SIgAC5 on Caco-2 cell, as illustrated by laser scanning confocal microscopy. (D) Analysis by flow cytometry of Caco-2 cells labeled with anti-TfR1, or SIgAC5, or hTf respectively, after transfection with TfR1-specific siRNA (grey bars); Fluorescence intensity of controls are depicted as black bars.

Figure 7. Heterologous production of TfR1 in CHO cells allows SIgAC5 binding

(A) Flow cytometry analysis of stably transfected Flp-In CHO cells labeled with anti-human TfR1 coupled to PE (grey) compared to controls (dashed line: irrelevant Ab; black line: transfection with plain pcDNA3); a representative histogram is shown, together with an immunoblot comparing TfR1 expressed by Caco-2 cells (lane 1) and the recombinant receptor produced in CHO cells (lane 2). (B) Interaction of SIgAC5 or hTf with untransfected (black bars) or TfR1-expressing Flp-In CHO cells determined by flow cytometry analysis. Results correspond to two independent experiments performed in triplicates (n=6).

Figure 4. Concomitant interaction of SIgAC5 and hTf with Caco-2 cells.

(A) Incubation of Caco-2 cells with SIgAC5-Cy5, or hTf-FITC, or with a mixture of the two TfR1 labeled ligands was performed at 4°C, prior to analysis by flow cytometry. Mean fluorescence intensities from 7 independent measurements are depicted. (B) Left plot, blocking by preincubation with hTf-FITC, followed by incubation with SIgAC5-Cy5; right plot, displacement of hTf following SIgAC5 chase. Binding of each ligand was assessed by flow cytometry. Results correspond to two independent experiments performed in triplicates (n=6). (C) Same as in (B), with blocking conducted with SIgAC5 and chase carried out with hTf.

Figure 5. SIgA is retro-transcytosed from the apical surface of polarized Caco-2 cell monolayers.

(A) Visualization by laser scanning confocal microscopy of the interaction between SIgAC5-Cy3, respectively hTf, and TfR1 at the apical surface of polarized Caco-2 cell monolayer stained with DAPI. Co-localization of the red ligand and green

receptor results in the appearance of yellow spots (arrowheads). A representative 3D reconstruction of 10 observed fields is depicted. Scale bars represent 10 μm . (B) Quantitation by ELISA of SIgAC5 recovered in the basolateral medium (n=9 individual measurements). (C) Immunoblots depicting the aspect of transported SIgAC5 in the basolateral compartment using detection with anti- α chain and anti-SC antisera. (D) Same as in (C), but with immunodetection carried out for retro-transcytosed hTf.

Figure 6. SIgA-facilitated retro-transport of a bacterium cargo across polarized Caco-22 cells monolayers.

Adhesion/internalization of *S. flexneri* alone or associated with SIgAC5 to polarized Caco-2 cell monolayers as determined after a 2-hour incubation in the absence (A) or presence (B) of gentamicin treatment for 30 min. Data are expressed on a per-filter basis and correspond to one representative experiment (n=3) for each tested condition performed in triplicates. (C) Measurement of retro-transported *S. flexneri* alone or associated with SIgAC5 recovered in the basolateral compartment; values correspond to bacteria accumulated over a 2-hour period.

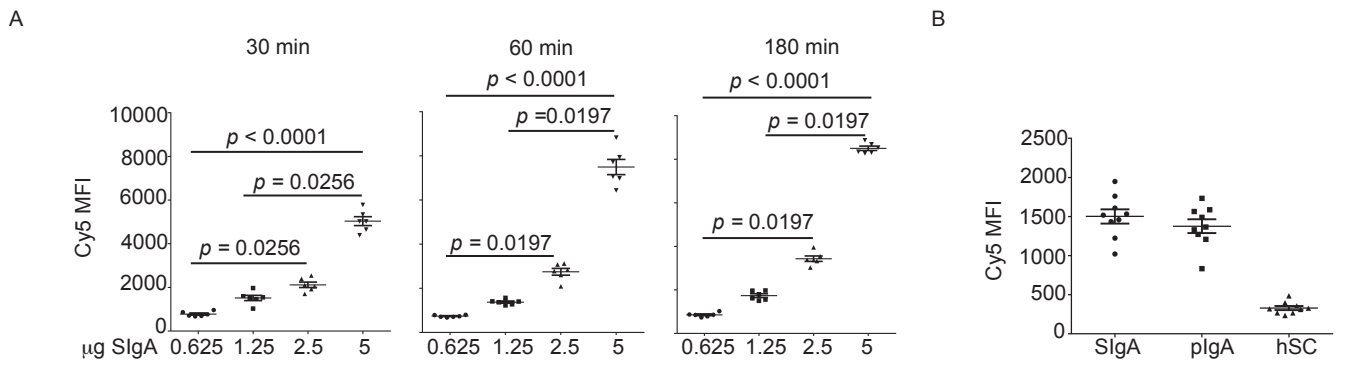


Figure 1

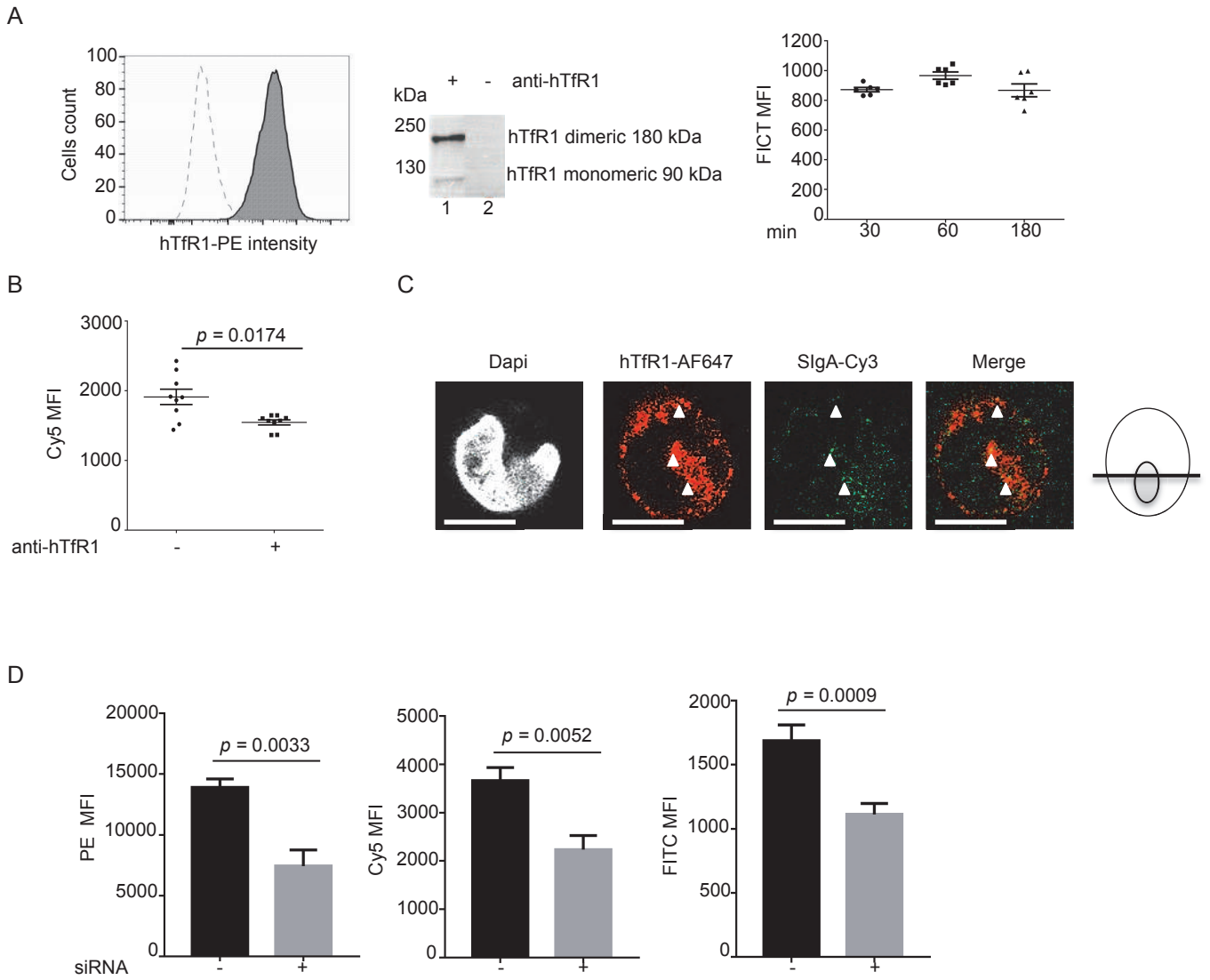


Figure 2

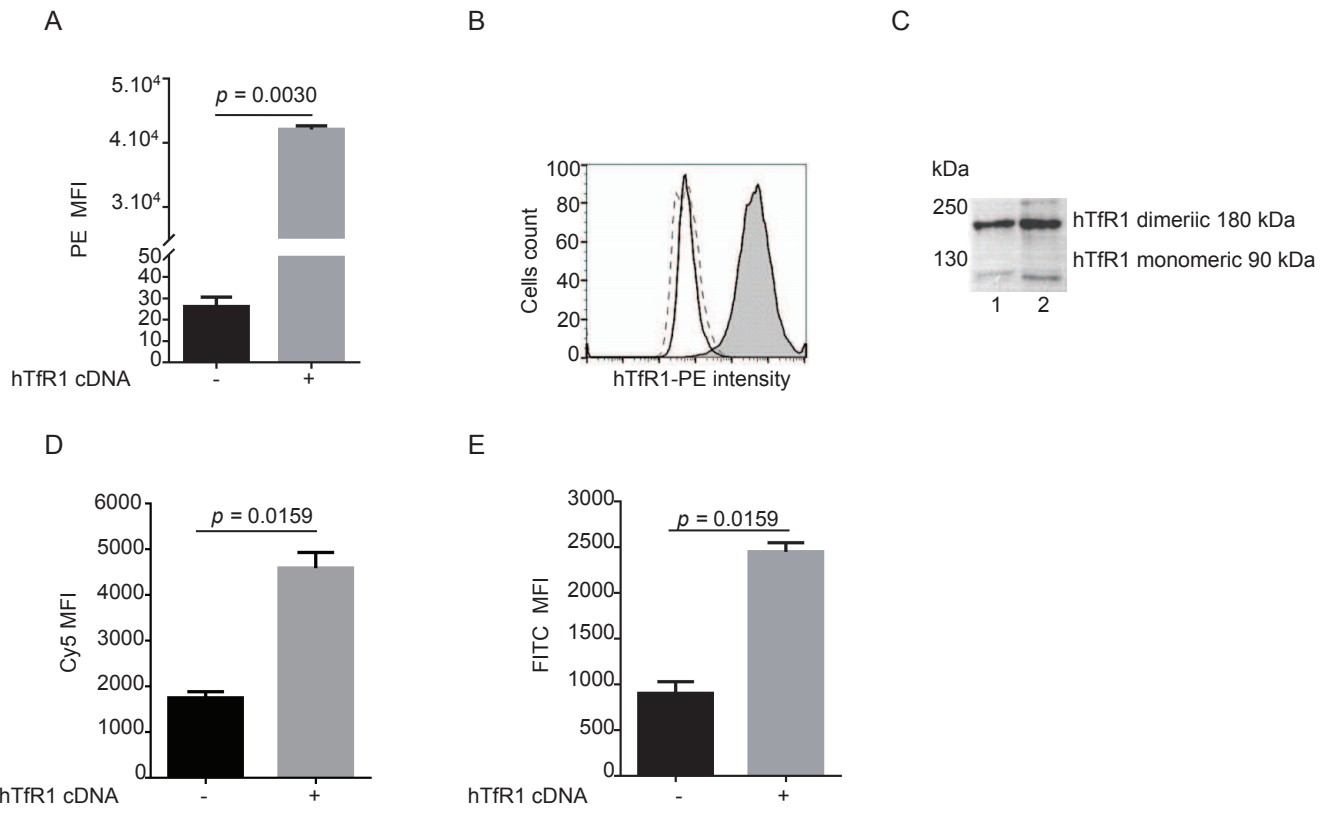
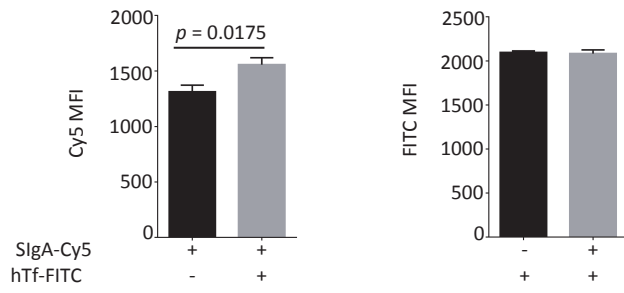
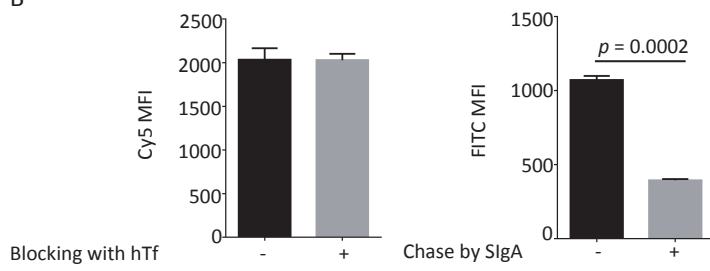


Figure 3

A



B



C

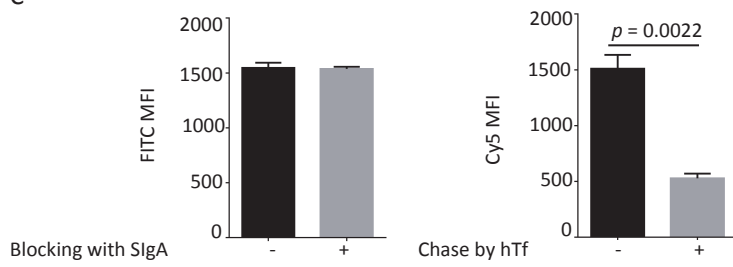


Figure 4

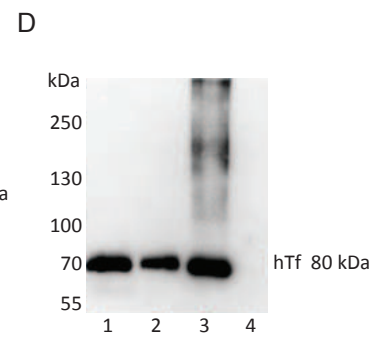
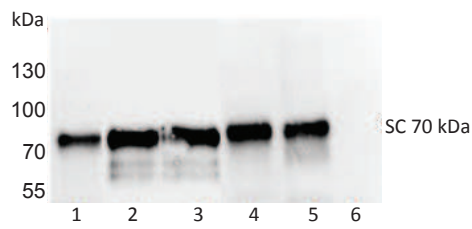
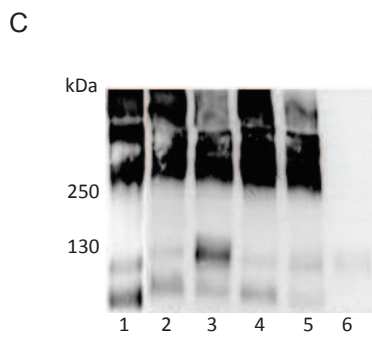
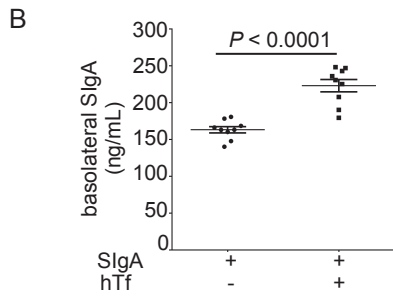
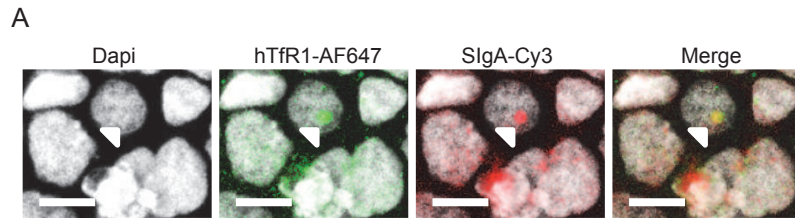
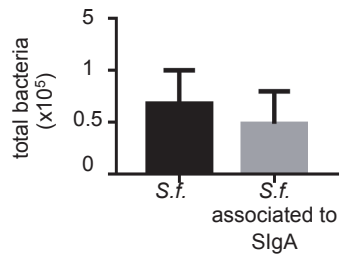
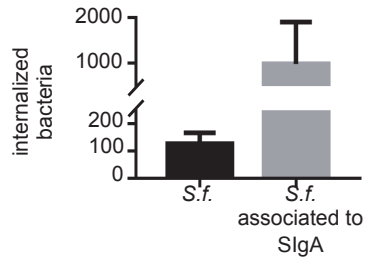


Figure 5

A



B



C

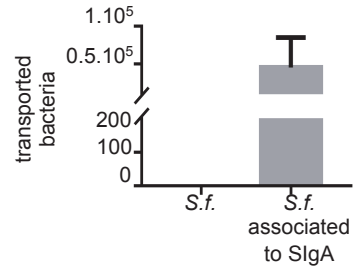


Figure 6