

Sommaire

<i>Remerciements.....</i>	<i>I</i>
<i>Sommaire.....</i>	<i>V</i>
<i>Liste des figures.....</i>	<i>IX</i>
<i>Liste des tableaux.....</i>	<i>XII</i>
<i>Abréviations.....</i>	<i>XIII</i>
<i>Abréviations utilisées pour les acides aminés.....</i>	<i>XVI</i>
<i>AVANT-PROPOS.....</i>	<i>1</i>
<i>Chapitre 1: Introduction générale au projet de thèse.....</i>	<i>2</i>
I. L'immunité	3
I.1. Présentation générale.....	3
I.2. L'immunité innée	4
I.3. Le système du complément	6
I.3.1. La cascade du complément.....	7
I.3.2. La régulation du complément	10
I.4. Pathologies associés au complément et thérapies.....	12
I.5. Connections avec d'autres processus biologiques.....	14
I.6. Mécanismes de subversion de la voie du complément	15
II. Les collagènes de défense activant le complément.....	16
II.1. Généralités.....	17
II.1.1. C1q	17
II.1.2. Les collectines	19
II.1.3. Les ficolines L, H et M.....	22
II.2. Double facette pour les collagènes de défense	24
II.2.1. Les motifs activant le complément	24
II.2.2. Les récepteurs des collagènes de défense	25
II.3. Implication fonctionnelle de l'interaction avec les récepteurs	26
II.3.1. Phagocytose de pathogènes	26
II.3.2. Elimination de cellules apoptotiques	27
II.3.3. Synthèse de cytokines.....	28
II.3.4. Autres contributions	28
II.4. Pathologies associées	29
III. TcCRT, la calréticuline de Trypanosoma Cruzi	31
III.1. Structure et fonctions de la calréticuline humaine (HuCRT)	31
III.1.1. Structure.....	31
III.1.2. Fonctions	32
III.2. La TcCRT et son implication dans la maladie de Chagas	36
III.2.1. La maladie de Chagas	36
III.2.2. La TcCRT, homologue de la calréticuline humaine	37
III.3. La TcCRT, facteur de virulence de <i>T. cruzi</i>	39
III.3.1. Pénétration dans les cellules de l'hôte	39
III.3.2. Inactivation de la voie du complément	41
IV. CR1(CD35), récepteur pour C3b et C4b	42
IV.1. Généralités.....	42
IV.1.1. Localisation	42
IV.1.2. Régulation de l'expression.....	44
IV.1.3. Génétique et polymorphisme	45
IV.2. Structure	48
IV.2.1. Généralités	48
IV.2.2. Structures résolues de CR1	50
IV.2.3. CR1, une molécule glycosylée.....	51

IV.3.	Ligands connus de CR1	52
IV.3.1.	C3b/C4b/iC3b	52
IV.3.2.	C1q et MBL	54
IV.3.3.	Autres ligands identifiés	55
IV.4.	Activités biologiques	56
IV.4.1.	Protection des cellules du soi	56
IV.4.2.	Elimination des complexes immuns	59
IV.4.3.	Activation des lymphocytes	60
IV.4.4.	Phagocytose	63
IV.4.5.	Signalisation cellulaire	64
IV.4.6.	Et CR1 soluble ?	65
IV.5.	Pathologies et thérapies associées à CR1	65
IV.5.1.	Paludisme	65
IV.5.2.	Maladies neurodégénératives – Cas d’Alzheimer	69
IV.5.3.	Maladies auto-immunes – Cas du SLE	70
IV.5.4.	Invasion des pathogènes – Cas du VIH et de <i>M. tuberculosis</i>	72
IV.5.5.	CR1 comme molécule thérapeutique	73
V.	Le projet de thèse	75
Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES		77
I.	Biologie moléculaire	78
I.1.	Souches et milieux de culture	78
I.1.1.	Souches bactériennes utilisées	78
I.1.2.	Milieux de culture	79
I.2.	Purification et quantification de l’ADN	79
I.2.1.	Gel d’agarose	79
I.2.2.	Purification de l’ADN	80
I.2.3.	Quantification de l’ADN	80
I.3.	Construction des vecteurs d’expression	80
I.3.1.	Plasmides utilisés	81
I.3.2.	Amplification par PCR	83
I.3.3.	Mutagenèse dirigée	83
I.3.4.	Vérification des plasmides modifiés	87
I.3.5.	Construction des plasmides pET28b(+) TcCRT Clean, pET 28b(+) TcCRT ΔN et pET 28b(+) TcCRT ΔN/ΔC34	88
I.3.6.	Construction des plasmides pNT-Bac-CR1 CCP 22-30 et pFastBac1–CR1	90
I.3.7.	Construction des plasmides pNT-Bac CR1 CCP 22-30 Δ22-23, Δ 22-25, Δ 27-30, Δ 29-30, Δ 26-30, Δ 25-26 et pNT-Bac CR1 CCP CCP 25-26	92
I.3.8.	Construction des plasmides pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 et pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 TM93	92
I.4.	Transposition	97
II.	Méthodes d’analyse des protéines – Biochimie	98
II.1.	Détermination des paramètres biophysiques intrinsèques des protéines	98
II.1.1.	Détermination <i>in silico</i>	98
II.1.2.	Détermination de la masse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	99
II.1.3.	Détermination de la séquence N-terminale des protéines	99
II.1.4.	Analyse par spectrométrie de dichroïsme circulaire	99
II.1.5.	Détermination de la masse apparente par chromatographie d’exclusion	100
II.2.	Analyse des échantillons protéiques	102
II.2.1.	Quantification des échantillons protéiques	102
II.2.2.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)	103
II.2.3.	Transfert sur membrane de nitrocellulose (Western Blot)	104
II.2.4.	Transfert sur membrane de PVDF	106
III.	Production des protéines recombinantes	106
III.1.	Protéases et collagènes de défense	106
III.1.1.	C1q	107
III.1.2.	C1r ₂ C1s ₂	107
III.1.3.	MBL	107
III.1.4.	Ficolines L, H et M	107

III.1.5.	MASP-3	107
III.1.6.	CR1	108
III.2.	Production en système bactérien de la TcCRT et de ses variants	108
III.2.1.	Souches d'expression et milieu de culture	108
III.2.2.	Production des différentes formes recombinantes de la TcCRT	109
III.3.	Production en cellules d'insectes	111
III.3.1.	Cellules et milieux de culture	111
III.3.2.	Transfection et amplification virale	112
III.3.3.	Expression des protéines recombinantes en cellules High Five	113
III.3.4.	Purification de CR1 CCP 22-30 produit en cellules High Five TM	115
III.3.4.1.	Purification de CR1 CCP 22-30 His et de ses fragments produits en cellules High Five TM	115
III.4.	Production en cellules de mammifères	116
III.4.1.	Cellules et milieux de culture	116
III.4.2.	Transfection transitoire	116
III.4.3.	Purification de CR1 CCP 22-30 produit en HEK 293-F TM	116
IV.	Caractérisation des interactions	117
IV.1.	Résonance Plasmonique de Surface (SPR)	117
IV.1.1.	Principe de la détection	118
IV.1.2.	Préparation de la surface	120
IV.1.3.	Injections des protéines	121
IV.1.4.	Détermination des paramètres cinétiques	122
IV.1.5.	Comparaison de la fixation de C1q, MBL et ficoline L sur les différents variants de CR1 CCP 22-30	123
IV.2.	ELISA	123
IV.2.1.	Principe	123
IV.2.2.	Détermination de la constante d'affinité de C1q pour CR1 et CR1 CCP 22-30	124
IV.2.3.	Evaluation de la fixation de C1q sur CR1 CCP 22-30 et ses fragments	125
IV.3.	Microscopie électronique à transmission (MET)	126
IV.4.	Biologie cellulaire	127
IV.4.1.	Cellules, milieux et anticorps	127
IV.4.2.	Analyse de l'expression de CR1 CCP 22-30 TM/Cyto par Western BLOT	128
IV.4.3.	Analyse en cytométrie en flux de l'expression de CR1 CCP 22-30 et de la fixation des collagènes de défense	128
IV.4.3.1.	Analyse en immunofluorescence de l'expression de CR1 CCP 22-30	129
Chapitre 3 : Production d'une forme soluble et cristallisable de la calréticuline de Trypanosoma cruzi..... 130		
Préambule.....		131
I.	Purification de la TcCRT de A. Ferreira (TcCRT AF)	132
II.	Vers une TcCRT soluble et monomérique ?	135
II.1.	Réflexions sur les optimisations à apporter	135
II.1.1.	Le calcium, élément stabilisateur	135
II.1.2.	L'extrémité C-terminale, aimant à chaperonne	136
II.1.3.	Du protozoaire à la bactérie, quand l'ARN s'en mêle	137
II.2.	Purification de la TcCRT « Clean »	138
II.3.	Formation du pont disulfure intramoléculaire	139
III.	Vers un fragment de TcCRT soluble, monomérique et cristallisable ?	142
III.1.	Evaluation de l'expression et de la solubilité des constructions	144
III.2.	Production de la TcCRT ΔP	146
IV.	Abandon du projet et perspectives	148
Chapitre 4 : CR1, Récepteur des collagènes de défense 150		
Préambule.....		151
I.	Obtention du fragment CR1 CCP 22-30	152

I.1.	Production et caractérisation de la forme recombinante de CR1 CCP 22-30 produite en cellules d'insectes High Five™	152
I.1.1.	Purification de CR1 CCP 22-30	152
I.1.2.	CR1 CCP 22-30 est une molécule N-glycosylée	155
I.1.3.	Confirmation du bon repliement de la molécule	156
I.1.4.	Optimisation de la purification (CR1 CCP 22-30 His)	158
I.2.	Production et caractérisation de la forme recombinante de CR1 CCP 22-30 produite en cellules de mammifères HEK 293-F (CR1 CCP 22-30 HEK)	160
II.	CR1 CCP 22-30 : Site potentiel d'interaction pour les collagènes de défense	162
II.1.	C1q et la MBL, ligands du fragment CR1 CCP 22-30 ?	162
II.2.	Les ficolines, nouveaux ligands de CR1	169
II.3.	Influence du tampon sur la fixation des collagènes de défense	171
III.	Vers une définition du site potentiel d'interaction dans les collagènes de défense.....	173
III.1.	Domaine globulaire vs domaine collagénique	174
III.2.	MASPs et CR1, même site de liaison ?	176
IV.	CCP 24-25, site principal d'interaction avec les collagènes de défense.....	179
IV.1.	Production des formes tronquées recombinantes de CR1 CCP 22-30	179
IV.2.	Localisation des sites N-glycosylés	181
IV.3.	Caractérisation par SPR	182
IV.3.1.	Cas de la MBL et de la ficoline L	183
IV.3.2.	Cas de C1q	184
V.	Visualiser l'interaction.....	186
V.1.	Par microscopie électronique	186
V.2.	Un modèle cellulaire pour l'interaction	190
V.2.1.	Expression de CR1 CCP 22-30 à la surface des cellules	190
V.2.2.	Interaction avec les collagènes de défense	193
	Chapitre 5 : Discussion et perspectives	195
	Contexte	196
I.	TcCRT, quand l'homologie ne fait pas tout.....	197
II.	CR1, récepteur des collagènes de défense	198
II.1.	C1q et la MBL se fixent bien au niveau des CCP 22 -30 de CR1	198
II.2.	Les ficolines, nouveaux ligands de CR1	198
III.	Vers une meilleure compréhension de ces interactions	199
III.1.	Quand le choix du partenaire immobilisé compte	199
III.2.	Du côté des collagènes de défense	200
III.3.	CCP 24-25, un site potentiel de fixation	203
III.4.	Quelles hypothèses pour l'interaction ?	204
IV.	Conclusion générale et perspectives	207
V.	Le mot de la fin	209
	Liste des publications et présentations	210
	Bibliographie	211

Liste des figures

FIGURE 1.1 : MECANISMES GENERAUX DE L'IMMUNITE INNEE	5
FIGURE 1.2 : VOIES D'ACTIVATION DU COMPLEMENT	8
FIGURE 1.3 : LES REGULATEURS DU COMPLEMENT COMPOSES DE MODULES CCP	11
FIGURE 1.4 : ASSEMBLAGE ET REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES COLLAGENES DE DEFENSE ET DES PROTEASES ASSOCIEES	20
FIGURE 1.5 : STRUCTURE DES COLLAGENES DE DEFENSE ET ASSOCIATION AVEC LES PROTEASES.....	23
FIGURE 1.6 : ORGANISATION ET STRUCTURE DE LA CALRETICULINE.....	33
FIGURE 1.7 : LA CALRETICULINE EST IMPLIQUEE DANS DIFFERENTS MECANISMES MOLECULAIRES	34
FIGURE 1.8 : CYCLE DE VIE DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	36
FIGURE 1.9 : MECANISME DE SUBVERSION DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> – CAS DE C1Q.....	40
FIGURE 1.10 : ORGANISATION GENETIQUE DE CR1	46
FIGURE 1.11 : ORGANISATION ET STRUCTURE DE CR1/CD35.....	49
FIGURE 1.12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SITES DE FIXATION DE C3b, C4b, C1q ET MBL SUR CR1/CD35.....	53
FIGURE 1.13 : ROLE DE CR1/CD35 DANS DIFFERENTS PROCESSUS CELLULAIRES.....	62
FIGURE 1.14 : POSSIBLE IMPLICATION DE CR1 DANS LA MALARIA CEREbraLE (HYPOTHESE DANS LE CAS D'UNE SOUCHE DE <i>P. FALCIPARUM</i> FORMANT DES ROSETTES).....	68
FIGURE 2.1 : CARTES VECTORIELLES DES PLASMIDES D'EXPRESSION UTILISES.....	82
FIGURE 2.2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA METHODE DE MUTAGENESE DIRIGEE DU KIT QUIKCHANGE II XL.....	84
FIGURE 2.3 : SCHEMA DE LA CONSTRUCTION DES VECTEURS pFASTBAC1 CR1 ET pNT-BAC CR1 CCP 22-30 His ₆	91
FIGURE 2.4 : SCHEMA DE LA CONSTRUCTION DES VECTEURS pCDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 ET pCDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 TM/CYTO.....	94
FIGURE 2.5 : FRAGMENT D'ADN SYNTHETIQUE CONÇU POUR L'INSERTION DES PARTIES TRANSMEMBRANAIRE ET CYTOPLASMIQUE DE CR1.	97
FIGURE 2.6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ETAPES DE LA TRANSPOSITION (ADAPTE DU MANUEL D'UTILISATEUR DU SYSTEME BAC-TO-BAC)	98
FIGURE 2.7 : CALIBRATION DE LA COLONNE SUPEROSE 12 10/300 GL.....	101
FIGURE 2.8 : SCHEMA DE MONTAGE EN VUE DE LA REALISATION D'UN TRANSFERT SUR MEMBRANE DE NITROCELLULOSE	105
FIGURE 2.9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ETAPES DE LA TRANSFECTION DU BACMIDE ET DE L'AMPLIFICATION VIRALE (ADAPTE DU MANUEL D'UTILISATEUR DU SYSTEME BAC-TO-BAC)	112
FIGURE 2.10 : PRINCIPE DE LA RESONANCE PLASMONIQUE (DES PLASMONS) DE SURFACE (INSPIRE DU « BIACORE SENSOR SURFACE HANDBOOK », EDITION DU 05/2008 VERSION AB).....	118
FIGURE 2.11 : DIFFERENTES PHASES DU SIGNAL DE RESONANCE PLASMONIQUE DE SURFACE (ADAPTE DU « BIACORE SENSOR SURFACE HANDBOOK », EDITION DU 05/2008 VERSION AB)	119
FIGURE 2.12 : MISE AU POINT D'UN TEST ELISA POUR LA FIXATION DE C1q A CR1 ET CR1 CCP 22-30.....	124

FIGURE 3.1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA TcCRT ISSUE DE LA CONSTRUCTION D'A. FERREIRA	132
FIGURE 3.2 : PURIFICATION DE LA TcCRT AF	133
FIGURE 3.3 : PURIFICATION SUR COLONNE SUPEROSE 12 10/300 GL DE LA TcCRT AF.....	135
FIGURE 3.4 : ANALYSE DE LA PRESENCE DE CODONS RARES DANS LA SEQUENCE CODANTE DE LA TcCRT D'A. FERREIRA A L'AIDE DU LOGICIEL « RARE CODON CALCULATOR »	137
FIGURE 3.5 : PURIFICATION DE LA TcCRT « CLEAN »	139
FIGURE 3.6 : EVALUATION DE L'EXPRESSION ET DE LA SOLUBILITE DE LA TcCRT CLEAN EXPRIME EN SHUFFLE TM ET EN ORIGAMI 2 TM	140
FIGURE 3.7 : PURIFICATION DE LA TcCRT « CLEAN » PRODUITE EN SOUCHE SHUFFLE	141
FIGURE 3.8 : CONSTRUCTION DU DOMAINE GLOBULAIRE DE LA TcCRT.....	143
FIGURE 3.9 : EVALUATION DE L'EXPRESSION ET DE LA SOLUBILITE DES CONSTRUCTIONS DE LA TcCRT.....	145
FIGURE 3.10 : PRODUCTION DE LA TcCRT ΔP	147
FIGURE 4.1 : TEST D'EXPRESSION DE CR1 CCP 22-30 EN CELLULES HIGH FIVE TM	153
FIGURE 4.2 : PURIFICATION DU FRAGMENT CR1 CCP 22-30 PRODUIT EN CELLULES D'INSECTES HIGH FIVE	154
FIGURE 4.3 : CARACTERISATION DU FRAGMENT CR1 CCP 22-30 PRODUIT EN CELLULES D'INSECTES HIGH FIVE TM	157
FIGURE 4.4 : CARACTERISATION DU FRAGMENT CR1 CCP 22-30 (AVEC ETIQUETTE POLY-HISTIDINE) PRODUIT EN CELLULES D'INSECTES HIGH FIVE TM	159
FIGURE 4.5 : PURIFICATION ET CARACTERISATION DE CR1 CCP 22-30 PRODUIT EN CELLULES HEK 293-F.....	161
FIGURE 4.6 : INTERACTION DE C1Q ET DE LA MBL AVEC CR1 ET CR1 CCP 22-30	164
FIGURE 4.7 : DETERMINATION PAR SPR DES CINETIQUES DE FIXATION DE C1Q ET DE LA MBL SUR CR1 ET CR1 CCP 22-30	166
FIGURE 4.8 : DETERMINATION DE LA CONSTANCE D'AFFINITE APPARENTE (K_D) DE C1Q POUR CR1 ET CR1 CCP 22- 30.....	167
FIGURE 4.9 : INTERACTION DES FICOLINES L, H ET M AVEC CR1 ET CR1 CCP 22-30	170
FIGURE 4.10 : CARACTERISATION DE LA FIXATION DE LA FICOLINE L SUR CR1 ET CR1 CCP 22-30	171
FIGURE 4.11 : INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU TAMPON SUR LA FIXATION DE C1Q, MBL ET FICOLINE L A CR1 CCP 22-30	172
FIGURE 4.12 : ANALYSE PAR SPR DE LA FIXATION DES DIFFERENTS COMPOSANTS DES COLLAGENES DE DEFENSE C1Q, MBL ET FICOLINE L	175
FIGURE 4.13 : IDENTIFICATION DU SITE D'INTERACTION DE CR1 SUR LES COLLAGENES DE DEFENSE.....	178
FIGURE 4.14 : PRODUCTION ET CARACTERISATION DES FRAGMENTS DE DELETION DE CR1 CCP 22-30	180
FIGURE 4.15 : FIXATION DE LA MBL ET DE LA FICOLINE-L SUR LES DIFFERENTES CONSTRUCTIONS DE CR1 CCP 22-30.....	184
FIGURE 4.16 : FIXATION DE C1Q SUR LES DIFFERENTES CONSTRUCTIONS DE CR1 CCP 22-30	185
FIGURE 4.17 : OBSERVATION PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE C1Q, DE LA MBL, DE LA FICOLINE L ET DE CR1 CCP 22-30	187
FIGURE 4.18 : OBSERVATION PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU COMPLEXE C1Q/CR1 CCP 22-30	189
FIGURE 4.19 : OBSERVATION PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU COMPLEXE MBL /CR1 CCP 22-30 ET FICOLINE L / CR1 CCP 22-30	189

FIGURE 4.20 : MISE AU POINT DU MODELE CELLULAIRE POUR LA MESURE DE L'INTERACTION CR1 CCP22-30R / COLLAGENES DE DEFENSE.....	192
FIGURE 4.21: INTERACTION DE C1Q ET DE LA MBL AVEC CHO-K1 OU HEK 293-F EXPRIMANT CR1 CCP22-30 A LEUR SURFACE.....	194
FIGURE 5.1 : ALIGNEMENT DES SEQUENCES DES TIGES COLLAGENES DE C1Q, DE LA MBL, DE CL-K1 ET DES FICOLINES.....	202
FIGURE 5.2 : ALIGNEMENT ENTRE LES MODULES CCP DE CR1	204
FIGURE 5.3 : REPRESENTATION STRUCTURALE DES MODULES CCP 24-25 DE CR1.....	206

Liste des tableaux

TABLEAU 1.1 : LISTE DES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS LA PHAGOCYTOSE ET DE LEURS LIGANDS RESPECTIFS	6
TABLEAU 1.2 : REGULATEURS DE LA VOIE DU COMPLEMENT.....	10
TABLEAU 1.3 : POLYMORPHISMES ET DEFICITS DES MOLECULES DU COMPLEMENT ASSOCIES A DES PATHOLOGIES	13
TABLEAU 1.4 : LIGANDS DES DOMAINES GLOBULAIRES DES COLLAGENES DE DEFENSE.....	25
TABLEAU 1.5 : RECEPTEURS DES COLLAGENES DE DEFENSE	26
TABLEAU 1.6 : EXPRESSION DE CR1 A LA SURFACE DE DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES	43
TABLEAU 1.7 : VARIANTS ALLELIQUES DE CR1	46
TABLEAU 1.8 : SYSTEME DU KNOPS – POLYMORPHISMES ASSOCIES A CR1/CD35	47
TABLEAU 2.1 : RESUME DES CONDITIONS DE MUTAGENESE DIRIGEE UTILISEES.....	86
TABLEAU 2.2 : AMORCES DE MUTAGENESE DIRIGEE UTILISEES POUR LA CONSTRUCTION DES VECTEURS pET28B+ TCCRT CLEAN, pET28B+ TCCRT ΔP, pET28B+ TCCRT ΔP ΔC21, ΔC29, ΔC32 ET ΔC34.....	89
TABLEAU 2.3 : AMORCES DE MUTAGENESE DIRIGEE UTILISEES POUR LA CONSTRUCTION DES VECTEURS pFASTBAC1 – CR1, PNT-BAC CR1 CCP 22-30 ET PNT-BAC CR1 CCP 22-30 His ₆	92
TABLEAU 2.4 : AMORCES DE MUTAGENESE DIRIGEE UTILISEES POUR LA CONSTRUCTION DES VECTEURS PNT-BAC CR1 CCP 22-30 His ₆ Δ22-23, Δ22-25, Δ29-30, Δ27-30, Δ25-26, Δ26-30 ET PNT-BAC CR1 CCP 25-26 His ₆	93
TABLEAU 2.5 : AMORCES DE PCR POUR L'AMPLIFICATION ET L'INSERTION DU PEPTIDE SIGNAL DE CR1 ET AMORCES DE MUTAGENESE DIRIGEE UTILISEE POUR L'AJOUT DE L'ETIQUETTE POLY-HISTIDINE (His ₆) SUR LA CONSTRUCTION pCDNA 3.1(-) CR1 CCP 22-30.....	96
TABLEAU 2.6 : ANTICORPS ET DILUTIONS UTILISES POUR L'IMMUNOREVELATION PAR WESTERN BLOT	105
TABLEAU 2.7 : PROTEINES RECOMBINANTES UTILISEES DANS CE PROJET	108
TABLEAU 2.8 : DIFFERENTES FORMES RECOMBINANTES DE LA TCCRT PRODUITES EN SYSTEME BACTERIEN.....	111
TABLEAU 2.9 : PROTEINES RECOMBINANTES EXPRIMEES EN CELLULES D'INSECTES ET DE MAMMIFERES	117
TABLEAU 2.10 : CONDITIONS D'IMMOBILISATION DES PROTEINES TESTEES.....	121
TABLEAU 2.11 : COMPOSITION DES TAMPONS UTILISES POUR LES EXPERIENCES DE SPR.	122
TABLEAU 2.12 : ANTICORPS ET DILUTION UTILISES POUR L'IMMUNOFLOUORESCENCE ET LA CYTOMETRIE EN FLUX	127
TABLEAU 2.13 : MARQUAGES ET TEMOINS REALISES POUR L'ETUDE DE LA FIXATION DE C1Q ET DE LA MBL A DES CELLULES EXPRIMANT CR1 CCP 22-30 EN SURFACE	129
TABLEAU 4.1 : DETERMINATION DES CONSTANTES CINETIQUES POUR LA LIAISON DE C1Q ET DE LA MBL SUR CR1 ET CR1 CCP 22-30.....	166
TABLEAU 4.2 : TABLEAU RECAPITULATIF DES MASSES MOLECULAIRE THEORIQUES ET EXPERIMENTALES POUR L'ENSEMBLE DES FRAGMENTS PRODUITS.....	182

Abréviations

ACAMPs	Apoptotic cell-associated molecular patterns
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN _m	Acide ribonucléique messenger
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumine de sérum de bovin)
CAM	Complexe d'attaque membranaire
CD	Cluster of Differentiation
CM	Cerebral malaria
CCP	Module de type "Complement Control Protein"
CCD	Charge-Coupled Device
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CUB	Module retrouvé dans complément C1r/C1s, Uegf, et Bmp1
Da	Dalton
DAMPs	Damaged associated molecular patterns
DFP	Di-isopropylfluorophosphate
DTT	Dithiothréitol
EGF	Module de type "Epidermal Growth Factor"
FBG	Domaine fibrinogène
Fcn	Ficoline
GalNac	N-acétyl-galactosamine
GlcNac	N-acétyl-glucosamine
GWAS	Genome-wide association study
HBS	Hepes-Buffered Saline
HBS-EP	Hepes-Buffered Saline 3 mM EDTA 0,005%(v/v) Surfactant P20
HEK	Human Embryonic Kidney
HF	Cellules d'insectes High Five TM
HRP	Horseradish Peroxidase (Peroxydase de Raifort)
IgA, E, G, M	Immunoglobulines de type A, E, G ou M
IL	Interleukine
IPTG	Isopropylthio-β-D-galactopyrannoside
LB	Luria-Bertani

LPS	Lipopolysaccharide
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight (source de désorption/ionisation laser assistée par une matrice couplée à un analyseur à temps de vol)
ManNac	N-acétyl-mannosamine
MASP	MBL-Associated Serine Protease (protéase à serine associée à la MBL)
MBL	Lectin Binding Mannan (lectine reconnaissant le mannose)
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NHS	N-hydroxy-succinimide
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
p/v	Rapport poids/volume
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reaction en chaîne de la polymérase)
PFA	Paraformaldehyde
pI	Point isoélectrique
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RCA	Regulator of complement activation
RE	Réticulum Endoplasmique
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RU	Unité de résonance (Resonance Unit)
SLE	Systemic Lupus Erythematosus (Lupus systémique érythémateux)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodécylsulfate de sodium)
SDS-PAGE	SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS)
Sf	Cellule d'insecte <i>Spodoptera frugiperda</i>
SMA	Severe malarial anemia
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (polymorphisme nucléotidique)
SP-A	Surfactant Protein A (protéine du surfactant A)
SP-D	Surfactant Protein D (protéine du surfactant D)
SPR	Surface Plasmon Resonance (résonance plasmonique de surface)
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TCA	Trichloroacetic Acid (acide trichloroacétique)
TEMED	N,N,N,N'-tétraméthyléthylènediamine
TLR	Toll-Like Receptor (récepteur Toll-like)

TNF α	Tumor Necrosis Factor α
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-amino-méthane
T _m	Température de fusion
v/v	Rapport volume/volume

Abréviations utilisées pour les acides aminés

Nom	Code 3 lettres	Code 1 lettre
Alanine	Ala	A
Cystéine	Cys	C
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Phénylalanine	Phe	F
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Méthionine	Met	M
Asparagine	Asn	N
Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été effectuée entre Octobre 2009 et Septembre 2012 à l’Institut de Biologie Structurale (IBS) à Grenoble et financée grâce à une bourse CFR du CEA (programme IRTELIS). Ce travail a été supervisé par Nicole Thielens en qualité de directrice de thèse, Christine Gaboriaud en qualité de co-directrice de thèse et de Véronique Rossi en qualité de co-encadrante. Il a été financé par le programme ANR PIRIBIO.

Chapitre 1: Introduction générale au projet de thèse

I. L'immunité

I.1. Présentation générale

On regroupe sous le terme d'immunité l'ensemble des mécanismes mis en œuvre par un organisme pour se défendre contre des éléments étrangers ou « non soi » (bactéries, virus, parasites), mais également contre des éléments du « soi modifié ou altéré » (cellules apoptotiques, nécrotiques). Cette notion et la discipline associée, l'immunologie ou immunobiologie, remontent à la fin du 18^e siècle et à Edward Jenner, mais il faudra attendre le 19^e siècle avec les découvertes de Ehrlich, Pasteur, Koch, Von Behring/Kitasato et Elie Metchnikoff pour que celle-ci prenne réellement son essor. L'immunité d'un organisme est assurée par son système immunitaire qui regroupe l'ensemble des effecteurs (organes, cellules, molécules) travaillant de concert pour assurer l'élimination des éléments étrangers ou modifiés. Historiquement, la réponse immune est divisée en deux composantes principales :

- **L'immunité innée** permettant une réponse immédiate contre une large gamme de pathogènes ou d'éléments du soi modifié au travers de motifs spécifiques (PAMPs ou « Pathogen-Associated Molecular Patterns », ACAMPs ou « Apoptotic Cells-Associated Molecular Patterns, DAMPs ou « Damage-Associated Molecular Patterns »)
- **L'immunité adaptative** se mettant en place plus tardivement mais possédant une spécificité supérieure avec notamment la production d'anticorps dirigés contre des épitopes précis des pathogènes.

Comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre, bien que l'immunité innée soit aussi qualifiée d'immunité « non spécifique » par opposition avec l'immunité adaptative ou spécifique, cette appellation n'a pas lieu d'être puisque certains de ses composants reconnaissent spécifiquement des motifs à la surface des pathogènes. En fonction de l'importance et de la durée de la stimulation immunitaire, l'immunité innée et/ou adaptative seront mises à contribution. Compte-tenu de la thématique abordée dans ce projet de thèse, nous ne détaillerons ici que les mécanismes associés à l'immunité innée.

I.2. L'immunité innée

Afin de simplifier la présentation des mécanismes de l'immunité innée, nous ne traiterons ici que le cas de pathogènes (virus, bactérie, parasites), des événements similaires se produisant lors de la reconnaissance du soi modifié. Une vue générale simplifiée des mécanismes mis en place est donnée dans la *figure 1.1*.

L'immunité innée est la première ligne de défense rencontrée par les agents infectieux et est initiée dès les premières phases de la stimulation immunitaire. Elle est tout d'abord composée d'une barrière physique constituée des épithéliums muqueux (muqueuse pulmonaire, gastro-intestinale, génitale) et externes (peau). Ceux-ci, en plus d'empêcher la pénétration dans l'organisme (dans les tissus et dans la circulation sanguine), produisent des substances (peptides antimicrobiens, enzymes), modulent le pH du milieu ou sont associés avec une flore bactérienne protectrice. Ces éléments permettent de limiter le développement et la fixation des pathogènes. Si ces barrières physiques sont brisées (lésions), les agents infectieux peuvent pénétrer au sein des tissus ou dans la circulation sanguine. Ils peuvent alors être pris en charge par les macrophages résidant dans les tissus et les neutrophiles circulant dans le sang. Ces cellules possèdent à leur surface un arsenal de récepteurs qui interagissent avec des motifs présents sur les pathogènes (PAMPs), soit directement, soit par l'intermédiaire de molécules pontantes appelées opsonines. Elles peuvent également reconnaître des motifs à la surface des cellules apoptotiques (ACAMPs) ou des motifs associés à la dégradation de cellules du soi (DAMPs). Certaines de ces opsonines, les collagènes de défense, sont également impliquées dans l'activation de la cascade du complément, un élément essentiel de l'immunité innée qui sera décrit plus en détail dans les parties suivantes. Une partie de ces récepteurs participent au phénomène de phagocytose (*tableau 1*) pour éliminer les pathogènes tandis que d'autres agissent à la manière de détecteurs comme les récepteurs de la famille Toll-like (TLR) en alertant le système immunitaire de la présence d'un danger. A ce titre, nous nous intéresserons par la suite à deux de ces récepteurs, CR1 (le récepteur pour C3b et C4b) et la calréticuline, pour leur capacité à lier certains collagènes de défense. La fixation du pathogène à la surface de ces cellules effectrices est également associée à la libération de molécules comme les cytokines (TNF- α , IL-1, IL-6) qui modulent le comportement des cellules à proximité ou à distance, ou comme les chimiokines (IL-8, IP-10, Eotaxine) qui sont libérées pour recruter par chimiotactisme d'autres types cellulaires (neutrophiles, monocytes) dans les foyers d'infection et amplifier ainsi la réponse immunitaire.

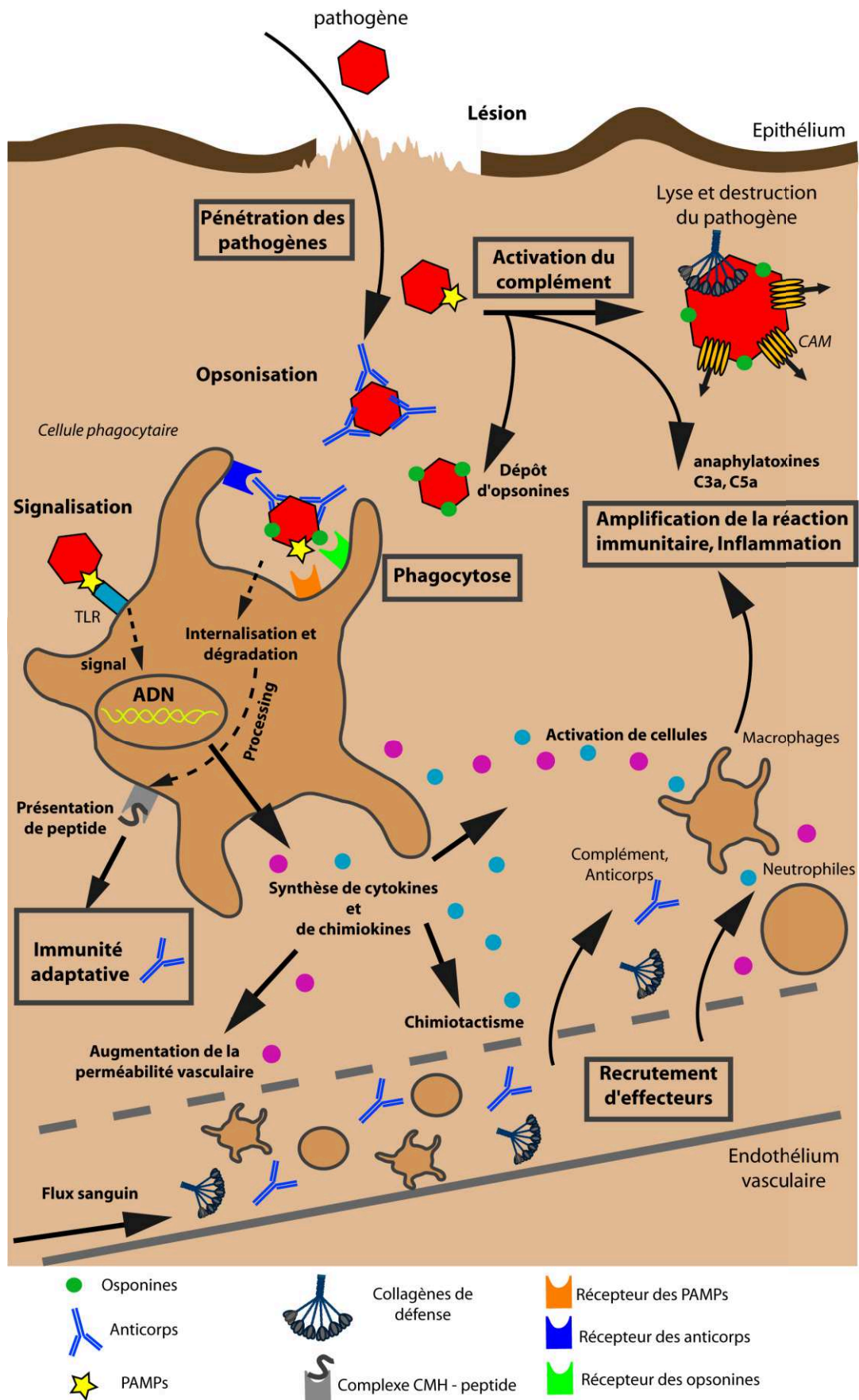


Figure 1.1 : Mécanismes généraux de l'immunité innée
Adaptée de l'ouvrage Immunobiologie, Janeway, 5^e édition

Ces deux classes de molécules contribuent ensemble à l'établissement du processus d'inflammation. Lorsque les mécanismes de l'immunité innée s'avèrent insuffisants, la réponse adaptative peut prendre le relais. Plus longue à se mettre en place, elle nécessite tout de même l'implication de l'immunité innée. En effet, l'internalisation des pathogènes, leur dégradation par des phagolysosomes et la présentation des peptides correspondants (ou « processing ») à la surface de cellules dendritiques (un type de macrophage) en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I ou II), est une étape primordiale pour activer les effecteurs de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B). Cette dernière nécessite cependant que les cellules dendritiques migrent vers d'autres compartiments (organes lymphoïdes secondaires).

Récepteurs	Ligands
Récepteurs des motifs à la surface des pathogènes (fixation directe)	
Récepteur du mannose (CD206)	Mannose
Dectin-1 (CLEC7A)	β 1,3-glucane
CD14	LBP (« LPS binding protein »)
Récepteur Scavenger A (CD204)	lipopolysaccharide (LPS), acide lipoteichoïque
CD36	phospholipides oxydés, érythrocytes infectés par <i>P. falciparum</i>
MARCO	Bactéries à Gram positif et négatif
$\alpha_v\beta_5$	cellules apoptotiques
Récepteurs des opsonines (fixation indirecte)	
Fc γ RI (CD64)	IgG1 = IgG3 > IgG4
Fc γ RIIa (CD32a)	IgG3 \geq IgG1 = IgG2
Fc γ RIIc (CD32c)	IgG
Fc γ RIIIa (CD16a)	IgG
Fc α RI (CD89)	IgA1, IgA2
Fc ϵ RI	IgE
CR1 (CD35)	iC3b, C4b, C3b, C1q, MBL
CR2	iC3b, C3d, C3d,g
CR3 (CD11b/CD18)	iC3b
CR4(CD11c/CD18)	iC3b
$\alpha_5\beta_1$	fibronectine, vitronectine
CRlg	C3b, iC3b, C3c
calreticuline/CD91	C1q, MBL
P33 (gC1qR)	C1q

Tableau 1.1 : Liste des récepteurs impliqués dans la phagocytose et de leurs ligands respectifs

Adapté de (Jaumouille and Grinstein, 2011) et de (Ricklin et al., 2010)

I.3. Le système du complément

Tout d'abord considéré comme une réponse complémentaire à l'action des anticorps, le système du complément s'est rapidement imposé comme un acteur essentiel du système immunitaire. Son rôle dès les premières phases de la stimulation immunitaire permet de détecter les premiers signaux de dangers et de les signaler, de recruter les effecteurs de

l'immunité innée (chimiotactisme), de participer à l'élimination des pathogènes (lyse, phagocytose, inflammation) et de conduire à l'établissement d'une réponse immunitaire pérenne (immunité adaptative). Le complément est composé de nombreuses protéines plasmatiques circulantes ou membranaires (plus d'une quarantaine) capables de s'associer entre elles et dont certaines peuvent s'activer séquentiellement. Ces protéines sont majoritairement synthétisées par le foie mais peuvent également être produites localement par certains types cellulaires. Ce système en cascade permet d'amplifier localement un signal conduisant à l'établissement d'une réaction plus importante et à l'élimination du pathogène.

I.3.1. La cascade du complément

Bien que partageant un tronc commun, les premières étapes d'activation de la cascade du complément sont classiquement composées de trois voies d'activation distinctes. Ces trois voies sont associées à des molécules initiatrices différentes possédant des propriétés de reconnaissance propres :

- La voie **classique** et la voie **lectine** sont déclenchées par la reconnaissance de motifs spécifiques à la surface des pathogènes. Cette reconnaissance est assurée par des opsonines de la classe des collagènes de défense, respectivement C1q pour la voie classique ou la MBL et les ficolines L, M et H pour la voie lectine.
- La voie **alterne** est associée à l'activation spontanée (hydrolyse) de C3 à proximité de la surface des pathogènes et au dépôt de l'opsonine C3b.
- Une **quatrième voie**, associée aux mécanismes de la coagulation, semble actuellement émerger (Amara et al., 2008). En effet, des protéases impliquées dans la cascade de la coagulation (plasmine, thrombine, élastase) pourraient activer des composants de la voie du complément et vice-versa.

Les différents ligands des collagènes de défense impliqués dans l'activation du complément ainsi que leurs structures et leurs activités connues sont détaillées dans le chapitre suivant. La *figure 1.2* donne un aperçu des différentes voies d'activation du complément.

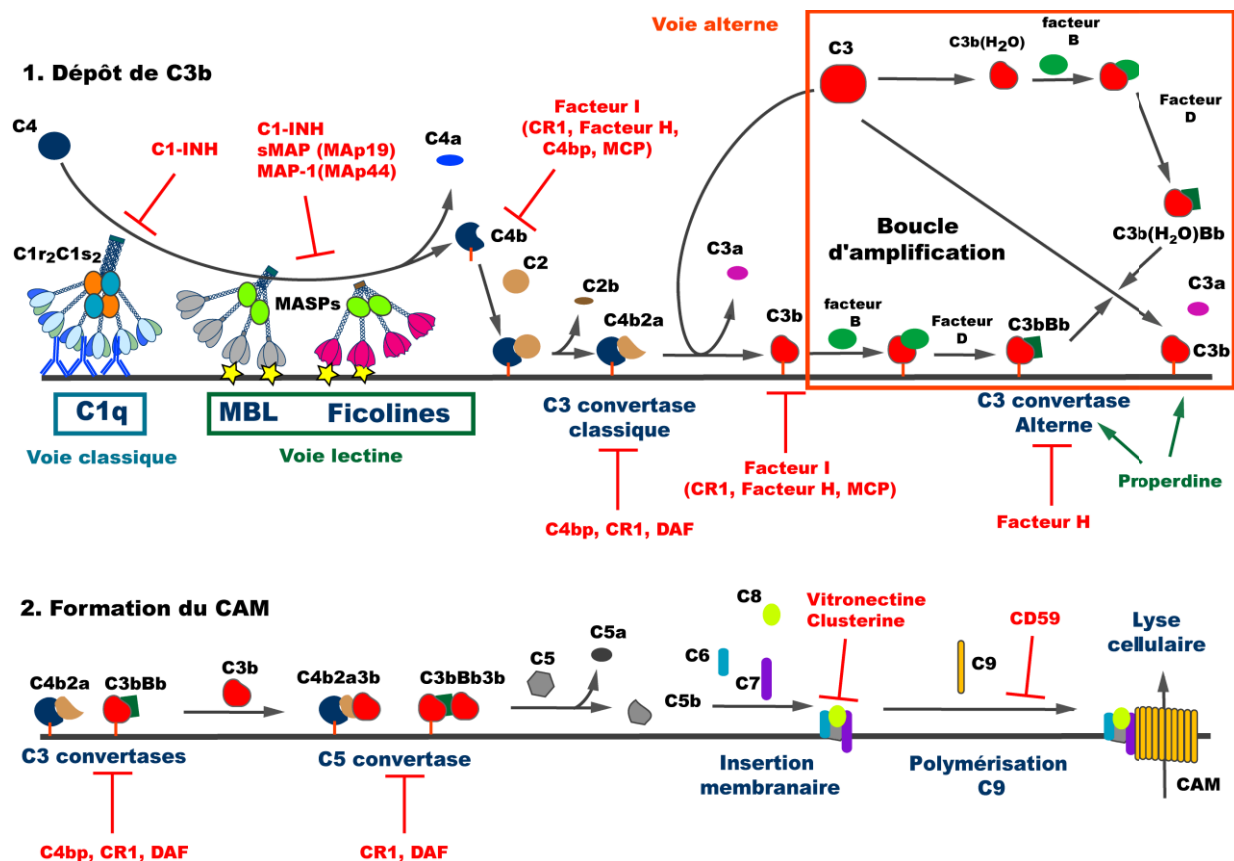


Figure 1.2 : Voies d'activation du complément

L'activation du complément a été divisée en deux phases, la première conduisant au dépôt de C3b et la seconde conduisant à la lyse des cellules par le complexe d'attaque membranaire (CAM). Les inhibiteurs de l'activation du complément sont indiqués en rouge, les activateurs en vert. Les flèches indiquent les étapes successives prenant place lors de cette activation.

Dans le plasma, C1q forme un complexe (C1) avec les protéases C1r₂C1s₂ tandis que la MBL et les ficolines (H, L et probablement M) sont associées à des protéases homologues à C1r₂C1s₂, les MASPs (MASP-1, -2 et -3). Ces protéases sont présentes sous forme zymogène. La fixation des collagènes de défense sur la surface des pathogènes (via des motifs spécifiques) provoque un changement de conformation des protéases conduisant à leur activation. Elles sont alors capables de cliver la protéine C4 en ses fragments C4b et C4a. La coupure de C4 s'accompagne de l'exposition dans C4b d'une liaison thioester très réactive lui permettant de se lier, grâce à une attaque nucléophile, à la membrane du pathogène (liaison covalente). C4b peut rapidement être inactivé par une molécule de H₂O (qui réagit avec la liaison thioester), nécessitant que son activation se produise à proximité immédiate de la membrane. Le C4b immobilisé peut alors recruter sur le lieu de l'activation la protéine C2 qui est clivée en C2b et C2a par les protéases associées aux collagènes de défense. Le complexe C4b2a ou C3 convertase a pour rôle de cliver la protéine C3 en C3a et C3b. C3b porte

également une fonction thioester lui permettant de se fixer de la même manière que C4b à la surface des pathogènes. La voie alterne conduit également à la formation d'une C3 convertase, dite « alterne », mais via un mécanisme d'activation différent. En effet, une faible proportion de C3 est hydrolysée spontanément dans le plasma en C3b(H₂O) qui peut alors s'associer au facteur B. Le facteur B est ensuite clivé par le facteur D en Ba et Bb conduisant à la formation de la forme soluble de la C3 convertase « alterne » (C3b(H₂O)Bb). Le C3b immobilisé à la surface des pathogènes (suite à l'activation de la voie classique et lectine) peut également s'associer au facteur B et conduire de la même manière à la formation d'une C3 convertase « alterne » (C3bBb). Celle-ci peut à son tour cliver la molécule C3, résultant en une boucle d'amplification strictement localisée au niveau du site d'activation du complément. Ce mécanisme est amplifié par la properdine qui est capable d'attirer à la surface de pathogène des molécules de C3b et de stabiliser les C3 convertases « alternes ». C3 étant la molécule du complément la plus concentrée dans le plasma (1-1,5 mg/mL), certains auteurs considèrent que la part de la voie « alterne » dans l'activation du complément serait de 80-90% (Harboe and Mollnes, 2008), la plaçant comme un acteur majoritaire de l'immunité innée. Cette idée est renforcée par l'émergence de la properdine comme une molécule de reconnaissance à part entière, capable d'interagir avec de nombreux motifs à la surface de pathogènes, de cellules apoptotiques et nécrotiques (Kemper et al., 2010). Bien que déclenchées par des molécules et des mécanismes différents, ces voies convergent toutes à la formation d'une C3 convertase qui conduit à une déposition importante de molécules de C3b sur la surface ciblée. Le C3b qui se dépose peut alors, à partir d'une certaine densité, s'associer aux C3 convertases présentes et modifier la spécificité de substrat de C3 vers C5. La C5 convertase ainsi formée (C4b2a3b ou C3bBb3b) peut alors cliver C5 en C5a et C5b, ce dernier interagissant avec C6 et C7 (C5b67) pour former un complexe s'insérant dans la membrane du pathogène. Ce complexe s'associe avec C8 pour recruter plusieurs sous-unités C9 et former le complexe d'attaque membranaire (MAC ou « Membrane Attack Complex ») dont la fonction est de perturber l'intégrité membranaire du pathogène ciblé et de conduire à sa destruction. Certains fragments de protéines issus de l'activation du complément, nommés anaphylatoxines (C3a, C5a et dans une moindre mesure C4a) possèdent une activité pro-inflammatoire locale en se fixant sur des récepteurs (C5aR et C3aR) présents à la surface des cellules proches (cellules de l'endothélium vasculaire, macrophages). Cette activité est tout aussi importante que la formation du MAC puisqu'elle conduit à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et à la synthèse de molécule d'adhérences, permettant le recrutement sur le lieu de l'activation d'autres molécules du complément, d'anticorps et de cellules

(macrophages, neutrophiles) qui amplifient localement la réaction et participent à l'initiation de l'immunité adaptative. Ces réactions pro- inflammatoires contribuent ainsi à l'élimination rapide des pathogènes.

I.3.2. La régulation du complément

Du fait de sa promiscuité avec des éléments du soi, de son amplification rapide et de ses effets destructeurs, le système du complément doit être strictement contrôlé pour éviter une réaction non spécifique dirigée contre les cellules de l'hôte. Cette régulation est assurée par un certain nombre de médiateurs, soit solubles soit fixés aux membranes des cellules de l'hôte. Ces molécules permettent notamment de limiter le dépôt à la surface des cellules saines des opsonines C3b et C4b en les inactivant ou en empêchant leur formation (action au niveau des protéases et des convertases). Elles évitent ainsi que l'activation du complément à proximité des cellules de l'hôte ne conduise à leur lyse. Le *tableau 1.2* récapitule ces différents médiateurs ainsi que leur action. Ces informations sont également reportées sur la *figure 1.2*.

Régulateurs	Molécule ciblée	Action
Soluble		
C1-INH	C1 _{r2} C1s ₂ , MASP-1,-2	Détache C1 _{r2} C1s ₂ de C1q et MASP-1, -2 de MBL/ficolines (H,L).Inhibiteur de protéases (serpine) se liant au niveau du site actif
sMAP (MAp19) MAP-1 (MAp44)	MBL, ficolines	Compétition pour la fixation à la MBL et aux ficolines (H, L)
C4BP	C4b2b, C4b	Déplace C2b et dissocie la C3 convertase, cofacteur pour le facteur I
Facteur H, HL-1	C3b, C3bBb	Dissocie la C3 convertase « alterne », cofacteur pour le facteur I
Facteur I	C3b, C4b	Inactive C3b par clivage en iC3b, C3c et C3d,g Inactive C4b par clivage en C4c et C4d
Properdine	C3b	Stabilise C3bBb
Membranaire		
CR1 (CD35)	C4b, C3b, iC3b	Dissocie les C3 et C5 convertases, cofacteur pour le facteur I
MCP (CD46)		Cofacteur pour le facteur I
DAF (CD55)	C3bBb et C4b2b	Dissocie les C3/C5 convertases
CD59	Complexe C5b678	Empêche le recrutement de C9 et la formation du MAC
Vitronectine, Clusterine	Complexe C5b67	Empêche l'insertion dans la membrane lipidique

Tableau 1.2 : Régulateurs de la voie du complément

Adapté de (Ricklin et al., 2010) et (Carroll and Sim, 2011). C1-INH : C1 inhibiteur ; MASP : mannan binding lectin (MBL) associated serine protease; C4bp : C4 binding protein ; CR1 : complement receptor 1 ; MCP : membrane cofactor protein; DAF : decay-accelerating factor. En bleu : protéines du RCA.

La plupart des molécules citées ici (indiquées en bleu dans le *tableau 1.2*) sont toutes codées par un cluster de gène spécifique, le cluster RCA (« Regulator of Complement Activation »). Ces protéines sont composées entièrement d'une succession d'unités modulaires similaires (*figure 1.3*), les modules CCP, dont la structure sera détaillée plus loin dans ce manuscrit (*Chapitre 1, section IV.2*). Nous nous pencherons également plus spécifiquement sur le récepteur CR1/CD35, qui en plus de ses capacités inhibitrices, participe activement à d'autres processus comme la phagocytose au travers de nombreuses interactions avec les protéines du complément.

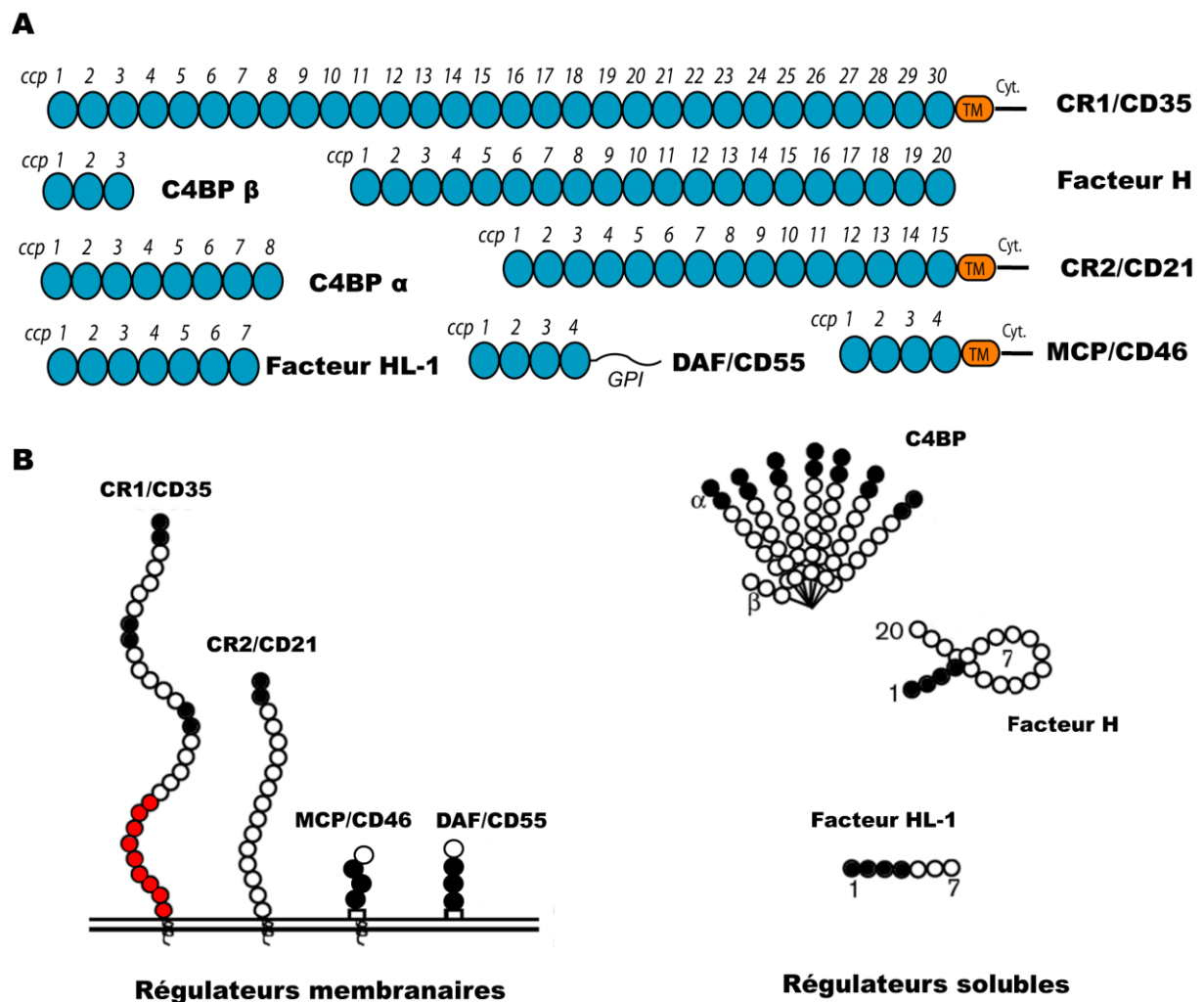


Figure 1.3 : Les régulateurs du complément composés de modules CCP

(A) Représentation modulaire de ces régulateurs. Les modules CCP sont représentés en bleu et sont numérotés. La présence d'un fragment transmembranaire (TM) est indiquée par une boîte orange et la partie cytoplasmique (Cyt.) par un trait noir. L'ancre GPI permettant le maintien de DAF à la membrane est indiquée. Adapté de (Soares et al., 2005). (B) Représentation schématique des différentes protéines régulatrices composées de modules CCPs. Les modules CCP en noir indiquent la position des sites de liaison des différents ligands. Le site potentiel de liaison de C1q et de la MBL dans CR1/CD35 est indiqué en rouge. Adapté de (Lindahl et al., 2000).

I.4. Pathologies associées au complément et thérapies

Lorsque l'activation du complément devient excessive et est dérégulée, elle peut alors initier et contribuer à différentes pathologies (Markiewski and Lambris, 2007). La cascade du complément est, comme nous venons de le voir, un système placé sous le contrôle strict de régulateurs. Des déficits de certains composants du complément peuvent être associées à un dysfonctionnement dans les mécanismes d'activation, de régulation et d'élimination (Ricklin et al., 2010). L'avènement de l'ère des études génomiques à large échelle sur des cohortes de patients sains et malades (GWAS pour « Genome-Wide Association Studies ») a également permis d'identifier de nombreux polymorphismes au niveau des composants du complément, polymorphismes associés à des susceptibilités à certaines pathologies et conduisant aux mêmes effets que les déficits. Ces défaillances sont souvent associées à des pathologies (*tableau 1.3*) de type allergiques, inflammatoires, infectieuses, neurodégénératives et auto-immunes (Ricklin and Lambris, 2007). Par exemple, les déficits en C3 conduisent à une plus grande susceptibilité aux infections bactériennes (Carrol et Sim, 2011). Des maladies telles que le **lupus érythémateux systémique** (SLE) et l'**arthrite rhumatoïde** (RA) sont aussi associées à des déficits en certains composants du complément et sont notamment caractérisées par la présence d'auto-anticorps. Ce serait alors l'incapacité d'éliminer efficacement les complexes immuns (CI), les débris cellulaires issus de la nécrose ou les cellules apoptotiques qui conduirait à des dommages au niveau des membranes et à l'exposition d'auto-antigènes. Une autre hypothèse avancée serait que le complément participe activement à la tolérance du soi en éliminant les lymphocytes auto-réactifs. En présence de déficits de certains éléments du complément, une diminution de la tolérance du soi serait observée conduisant à la synthèse d'auto-anticorps reconnaissant des motifs du soi et initiant une réaction auto-immune chez l'hôte (Ballanti et al., 2011; Katyal et al., 2001). D'autres pathologies peuvent également être associées à une altération des régulateurs du complément, généralement associés à des polymorphismes qui diminuent leur expression. L'activité excessive du complément (dépôt de C3b) consécutive à des défauts de régulation, provoque alors des dommages au niveau des tissus qui peuvent également conduire à la formation d'auto-anticorps. C'est notamment le cas pour la **dégénérescence maculaire liée à l'âge** (AMD), la **glomérulonéphrite membranoproliférative de type II** (MPGN II ou DDD pour « dense-deposit disease ») et le **syndrome hémolytique et urémique atypique** (aHUS) (Ricklin et al., 2010). Dans la maladie d'**Alzheimer** (AD), le rôle du complément semble maintenant clairement établi (Sardi et al., 2011). Les dépôts de plaques β -amyloïdes et de la

protéine Tau dans le cerveau, deux des caractéristiques de cette pathologie, sont notamment capables d'activer la voie classique du complément (Tacnet et al., 2001; Shen et al, 2001). Il n'est cependant pas facile de distinguer entre les effets positifs (élimination) et négatifs (inflammation) d'une telle activation. En effet, l'excès de la réaction immune associée à l'augmentation des dépôts conduit à une inflammation locale et à la destruction des neurones à proximité, contribuant ainsi au développement de cette maladie neurodégénérative. Cette activité excessive pourrait notamment être reliée à certains polymorphismes au niveau de régulateurs du complément (CD59, clusterine, CR1) (Crehan et al., 2012; Veerhuis et al., 2011). D'un autre côté, le dépôt de C3b (s'il est correctement contrôlé) contribue à l'élimination des plaques β -amyloïdes et des neurones morts. A ce propos, il a été montré qu'un déficit en C3 conduisait à une aggravation de la pathologie chez un modèle de souris (Maier et al., 2008), suggérant qu'une mauvaise élimination de ces plaques serait également une cause possible de la maladie d'Alzheimer. Des déficits en CR1, l'un des récepteurs de C3b, pourrait également y être associées. Bien que l'implication du complément dans la maladie d'Alzheimer soit certaine et que le maintien de son homéostasie soit un critère important, la physiopathologie sous-jacente reste encore incertaine et dépend très probablement du stade de la maladie (précoce ou avancée). Le cas de CR1 dans cette pathologie sera repris plus précisément dans la partie consacrée (*chapitre 1, section IV.5.2*).

Pathologies	Molécules du complément associées aux pathologies
SLE	Déficit en C1q, C1r, C1s, C4 ou C2 /auto-anticorps. Polymorphismes MBL (niveau d'expression)
AMD	Polymorphismes dans les facteurs H, B et C3
aHUS	Polymorphismes dans les facteurs H, HR-1, B, I ,dans MCP et dans C3 / auto-anticorps
MPGN II	Polymorphismes dans le facteur H/auto-anticorps contre facteur H et HR-1
RA	Déficit en C1q, C1r, C1s, C2, C4, C7, C9
HAE	Déficit en C1-INH
Infections à méningocoques	Déficit en C2, C5, C6, C7, C8, C9, Properdine et facteur D
PNH	Ancrage impossible de CD59 et CD55 à la membrane
Infections récurrentes bactériennes	Déficit en C2, C3, MASP-2, Facteur I.

Tableau 1.3 : Polymorphismes et déficits des molécules du complément associés à des pathologies

Adapté de (Degn et al., 2011), (Ricklin et al., 2010),(Manderson et al., 2004) ; SLE : lupus érythémateux systémique, MPGN II : glomérulonéphrite membranoproliférative de type II (ou DDD pour « dense-deposit disease »), aHUS : syndrome hémolytique et urémique atypique, AMD : dégénérescence maculaire liée à l'âge , RA : arthrite rhumatoïde, HAE : Angio-oedème héréditaire, PNH : hémoglobinurie paroxystique nocturne.

L'absence ou l'altération des éléments initiateurs de l'activation des voies classique et lectine du complément, c.à.d. les collagènes de défense et leurs protéases respectives, est décrit dans ces pathologies et dans de nombreuses infections provoquées par des bactéries encapsulées (Degn et al., 2011; Skattum et al., 2011). L'origine de ces pathologies et le rôle des collagènes de défense seront discutés de façon plus précise dans la partie leur étant consacrée (*chapitre I, section II.4*).

Malgré le besoin urgent de traitements contre ces maladies, peu sont actuellement disponibles. La principale raison est la difficulté à contrecarrer spécifiquement les effets du complément dans ces pathologies sans compromettre le reste des mécanismes de l'immunité innée. Les traitements existants à l'heure actuelle pour réduire l'activation du complément reposent soit sur l'administration de régulateurs du complément sous forme recombinante (C1-INH), soit sur l'injection d'anticorps dirigés contre certains médiateurs (anticorps anti-C5). Bien que la connaissance sur ce type de maladies progresse et que d'autres traitements soient actuellement en cours d'évaluation clinique (formes recombinantes de CR1, CD59 et du facteur H), les mécanismes sous-jacents de certaines maladies restent encore à déchiffrer notamment à cause de l'interconnexion entre le complément et de nombreuses autres voies, comme c'est le cas pour le SLE (Manderson et al., 2004). L'avènement de la biologie systémique et des « GWAS » permettront peut-être une meilleure compréhension de ces pathologies et aideront à relever les nouveaux défis de l'immunologie.

I.5. Connections avec d'autres processus biologiques

Le complément n'est pas un mécanisme isolé mais est plutôt interconnecté dans un réseau de mécanismes biologiques dont le rôle est de permettre le retour à la normale (homéostasie) suite à une stimulation immunitaire. L'action du complément influence notamment les effecteurs de l'immunité adaptative (lymphocytes B et T) pour conduire à une réponse immunitaire pérenne et les récepteurs « Toll Like » pour augmenter l'efficacité de la phagocytose (Ricklin et al., 2010). Plus récemment, des connections entre le complément et d'autres systèmes biologiques ont été mises en évidence. Des protéases de la cascade de la coagulation (thrombine, FIXa, FXa, FXIa, kallikreine) et la plasmine, impliquées dans le mécanisme de fibrinolyse, sont capables de générer les médiateurs solubles C3a et C5a sous forme fonctionnelle (Amara et al., 2008) et contribuent ainsi à l'activation du complément. D'un autre côté, des éléments du complément comme MASP-2, C3a, C5a ou le complexe d'attaque membranaire (MAC) auraient un effet positif sur l'agrégation plaquettaire

(Oikonomopoulou et al., 2012). Il est également suggéré que les molécules C3a, C5a, C1q et C1s puissent avoir un rôle dans la croissance cellulaire et la régénération en agissant sur les cellules souches hématopoïétiques (Rutkowski et al., 2010). Une implication du complément dans l'angiogénèse (induction par C3a et C5a de l'expression du facteur de croissance endothéliale vasculaire ou « VEGF »), dans la neurogenèse (C3a) ainsi que dans le métabolisme (Hotamisligil, 2006; Ricklin et al., 2010; Veerhuis et al., 2011) est également envisagée au travers de mécanismes pro-inflammatoires.

I.6. Mécanismes de subversion de la voie du complément

Bien que l'activation du complément aboutisse généralement à une élimination rapide et efficace de la plupart des pathogènes, grâce notamment à un réseau d'interactions permettant l'amplification du signal, les nombreuses étapes nécessaires à son activation constituent son talon d'Achille. Ce sont en effet autant d'étapes au niveau desquelles les pathogènes peuvent interférer et perturber l'équilibre, un peu à l'image des pathologies évoquées précédemment. Afin de résister à cette première barrière de défense, certains pathogènes, dont les parasites, ont donc développé au cours de milliers d'années de coévolution des mécanismes de résistance leur permettant d'échapper à l'activation du complément. Certains pathogènes expriment à leur surface des protéines leur permettant de recruter certains régulateurs solubles du complément comme la C4bp, le facteur H ou FHL-1. Ainsi armés, ils peuvent limiter le dépôt de C3b à leur surface ainsi que dans leur environnement proche et échapper à la phagocytose. Ce mécanisme est très répandu chez les pathogènes. Certaines protéines de virus, de bactéries ou de parasites ont même la capacité d'interagir avec différentes protéines régulatrices, probablement du fait de l'homologie entre les modules CCP de ces régulateurs (Lambris et al., 2008). Certains pathogènes recrutent à leur surface certains régulateurs membranaires comme CD55 (Rooney et al., 1996) alors que d'autres vont synthétiser des protéines qui vont inhiber l'action du complément, soit en mimant la structure de certains régulateurs, soit en se fixant sur les protéines du complément pour empêcher leur activation. C'est notamment le cas de *Staphylococcus aureus* qui produit à sa surface des protéines capables de se lier aux fragments constants des immunoglobulines de type G (IgG). Elles empêchent ainsi l'interaction des IgG avec les récepteurs FcR γ présents à la surface des cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages) et avec C1q (Laarman et al., 2010), bloquant la phagocytose et l'activation du complément par la voie classique. Certains parasites, dont la famille des trypanosomes, produisent également des protéines pour échapper au système immunitaire de l'hôte (Oladiran and Belosevic, 2012). Ces parasites (*T. cruzi*, *T.*

carassi, *N. americanus*) synthétisent une calréticuline endogène capable d'inhiber l'activation de la voie classique par C1 (Ferreira et al., 2004a; Ferreira et al., 2004b; Oladiran and Belosevic, 2010). Nous reviendrons sur ce point lorsque nous développerons la partie consacrée à la calréticuline de *T. cruzi* (TcCRT), une protéine à laquelle nous nous sommes intéressés dans ce projet pour sa capacité à interagir avec les collagènes de défense (*Chapitre 1, section III*). Un autre de ces mécanismes d'évasion consiste à cliver localement, grâce à des protéases, les activateurs du complément comme C3, C4, C5 et la properdine (Blom et al., 2009). Certains virus comme le VIH-1, ont au contraire besoin de l'activation du complément pour pouvoir pénétrer dans les cellules de l'hôte et se répliquer (Banki et al., 2005). Ils synthétisent donc à leur surface des protéines leur permettant d'activer la cascade mais utilisent également des mécanismes d'évasion pour éviter la lyse et la phagocytose. Enfin, des parasites comme *Plasmodium falciparum*, l'un des pathogènes causant le paludisme, peuvent interagir à la surface des érythrocytes avec des récepteurs membranaires, facilitant ainsi la pénétration dans la cellule hôte et augmentant la parasitémie. Ce point sera notamment abordé lors de l'étude de l'implication de CR1 dans le paludisme (*Chapitre 1, section IV.5.1*).

La compréhension des mécanismes d'échappement du complément est une étape essentielle pour combattre efficacement les maladies associées à ces pathogènes. Elle représente également une source non négligeable de nouvelles stratégies thérapeutiques pour combattre les maladies auto-immunes et inflammatoires associées à un dérèglement du système du complément.

II. Les collagènes de défense activant le complément

Comme nous venons de le voir, les collagènes de défense C1q, MBL et les ficolines sont des composants essentiels de l'activation des voies classique et lectine du complément. Leur absence ou l'altération de leur fonction peut être associée à différentes pathologies ou susceptibilités aux infections, pointant du doigt leur rôle essentiel chez l'être humain. Dans cette partie, nous décrirons en détails leur structure et leurs activités biologiques, notamment celles associées avec l'interaction avec des récepteurs cellulaires.

II.1. Généralités

Les collagènes de défense qui activent le complément constituent une famille de molécules multimériques (homo- ou hétéromériques) possédant une structure tridimensionnelle similaire composée d'une extrémité N-terminale (contenant des ponts disulfures), de triples hélices de type collagène (interrompues ou non par une charnière) et de domaines globulaires à leurs extrémités C-terminales. La structure d'ensemble en résultant est dite en forme de parachute ou de bouquet (*figure 1.4*). Cette structure est également partagée par d'autres membres de la famille des collagènes de défense (SP-A, SP-D) mais ceux-ci ne s'associent pas à des protéases et n'ont donc pas la capacité d'activer le complément. La partie collagénique est caractérisée par une succession de répétitions d'une même séquence Gly-X-Y, où X est souvent une proline et Y une hydroxyproline ou une hydroxylysine (peut être glycosylée). L'hydroxylation de ces résidus a été montrée comme critique pour l'expression de C1q (Lu et al., 2008). Chacune des trois chaînes collagéniques adopte une structure en hélice de type polyproline II pas à gauche, l'ensemble s'assemblant ensuite en une triple hélice pas à droite (Hakansson and Reid, 2000). La répulsion entre les cycles des prolines et le réseau de liaisons hydrogènes inter-chaînes (entre les N-H des glycines et les carboxyles de la chaîne peptidique) confèrent sa structure à la triple hélice dans laquelle les chaînes latérales sont rejetées vers l'extérieur. Notons que la formation de la triple hélice est un processus lent qui s'initierait à partir de la partie C-terminale du domaine collagénique pour les collectines (Hakansson and Reid, 2000). La partie N-terminale de la protéine serait quant à elle impliquée dans l'assemblage des molécules en oligomères (processus prenant place à l'intérieur de la cellule) grâce à la formation de ponts disulfures (Wallis and Drickamer, 1999). Enfin, les domaines globulaires sont capables de reconnaître des motifs spécifiques (PAMPs, ACAMPs ou DAMPs) ce qui peut conduire à l'activation des protéases associées et à l'initiation de la cascade du complément.

II.1.1.C1q

Initiateur de la voie classique du complément, C1q a été une molécule très étudiée au cours des 40 dernières années. Présente à une concentration de 115 µg/ml dans le plasma, C1q n'est pas synthétisé par les hépatocytes du foie comme la plupart des autres molécules du complément, mais majoritairement par des cellules dérivées des monocytes comme les macrophages et les cellules dendritiques. Cette synthèse est régulée positivement ou négativement en réponse à différents stimuli tels que les cytokines IL-6, IL-1 ou IFN-γ (Lu et

al., 2008). D'autres types cellulaires comme les chondrocytes pourraient également produire C1q (Bradley et al., 1996). C1q est une molécule de 460 kDa composée de 6 sous unités, chacune obtenue par l'assemblage entre 3 chaînes polypeptidiques différentes : A, B et C (18 chaînes polypeptidiques en tout). Les 6 trimères sont maintenus ensemble grâce à la présence dans leur partie N-terminale de ponts disulfures entre les chaînes A-B et C-C. D'abord associées entre elles pour former un pied à la structure en bouquet, les 6 triples hélices de collagène divergent ensuite, au niveau d'une interruption des répétitions Gly-X-Y, pour former 6 tiges bien individualisées délimitant un espace en forme de cône. A l'extrémité de chaque tige se trouve un domaine globulaire C-terminal responsable des propriétés de reconnaissance de C1q (Arlaud et al., 2002). Dans le plasma, C1q est majoritairement (90%) retrouvé sous forme d'un complexe avec le tétramère C1r₂C1s₂ nommé C1, permettant l'activation de la voie classique. C1s et C1r sont deux protéases qui partagent une même structure modulaire composée des modules (dans l'ordre) CUB₁-EGF-CUB₂-CCP₁-CCP₂ (*figure 1.4*) et terminée par un domaine protéase à sérine (SP). C1r peut s'auto-activer et est responsable de l'activation de la protéase C1s qui peut alors cliver C4 puis C2, conduisant à l'activation du complément (Gaboriaud et al., 2007). C1r et C1s s'associent respectivement en homo- et en hétéro-dimères. Le dimère de C1r possède une configuration tête-bêche dans laquelle le domaine protéase à sérine d'un monomère interagit avec le module CCP1 du second, et vice-versa (*figure 1.4*). C1s s'associe à C1r de façon calcium-dépendante par ses modules CUB1-EGF et également selon une configuration tête-bêche (*figure 1.4*), le module CUB1 de C1s interagissant avec le module EGF de C1r et vice-versa. L'écartement des tiges collagènes suite à la reconnaissance de motifs par les têtes globulaires entrainerait alors un rapprochement entre les domaines catalytiques de C1r qui pourraient alors s'auto-activer et ensuite cliver C1s à proximité (Bally et al., 2009; Wallis et al., 2010). Récemment, des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de localiser précisément les résidus de C1s et C1r impliqués dans l'interaction avec C1q (Bally et al., 2009). Dans le modèle proposé (*figures 1.4 et 1.5*), le tétramère C1r₂C1s₂ se fixe dans le cône de C1q au niveau des tiges collagènes grâce à 6 sites potentiels d'interaction (4 sites de haute affinité sur les modules CUB1 et CUB2 de C1r, 2 sites de faible affinité sur le module CUB1 de C1s) mettant en jeu des résidus d'acide glutamique (Glu) et d'acide aspartique (Asp) impliqués dans la liaison du Ca²⁺. Des lysines (prédites comme non modifiées) de chacune des tiges collagènes de C1q sont supposées interagir avec ces résidus, en particulier la Lys⁵⁹ (chaîne A), la Lys⁶¹ (chaîne B) et la Lys⁵⁸ (chaîne C). MASP-1, -2 et -3, les protéases associées à la MBL (ci-après), se

lient également à C1q sans toutefois avoir la capacité d'activer le complément (Phillips et al., 2009).

II.1.2. Les collectines

La famille des collectines peut être subdivisée en deux sous-familles; les collectines dites classiques comprenant les protéines du surfactant A (SP-A), D (SP-D) et la MBL ; les nouvelles collectines, identifiées plus récemment (Ohtani et al., 2012), constituées de CL-L1 (Collectin Liver 1), CL-K1 (Collectin Kidney 1) et CL-P1 (Collectin Placenta 1). Parmi ces collectines, la MBL ou « Mannan-Binding Lectin » est capable de s'associer à des protéases et d'activer le complément. Synthétisée par les hépatocytes, sa concentration dans le plasma varie de 5 ng/ml à 5 µg/ml (concentration médiane à 1,5 µg/ml), dépendant fortement de polymorphismes dans la région promotrice de son gène (Thiel, 2007). Sa synthèse est également contrôlée par certaines hormones et cytokines. La MBL aurait été détectée à la surface de monocytes mais elle serait d'origine plasmatique, se fixant sur ces cellules par des interactions avec des récepteurs membranaires (MacDonald et al., 2008). La MBL est une lectine de type C reconnaissant des sucres de manière calcium dépendante. Elle est composée de plusieurs domaines de reconnaissance de type CRD (« Carbohydrate Recognition Domain ») associés à une région collagénique. Elle adopte une structure similaire à celle de C1q (*figure 1.4 et 1.5*) mais elle provient de l'association en trimère d'une seule et même chaîne polypeptidique. Chaque trimère se décompose en un domaine N-terminal riche en cystéines, une triple hélice collagénique composée de 19 répétitions Gly-X-Y et interrompue au niveau du 7^e triplet (charnière), un domaine « coiled-coil » α -hélicoïdal (impliquée dans l'assemblage de la triple hélice) et une région globulaire (CRD) composée de 3 domaines C-lectine. La MBL s'associe, via la formation de ponts disulfures au niveau de la partie riche en cystéines, en oligomères composés de 2 à 6 unités (de 6 à 18 polypeptides, de 150 à 450 kDa) mais ce sont les formes tri- (MBL-I) et tétramériques (MBL-II) qui sont les plus abondantes (Teillet et al., 2005).

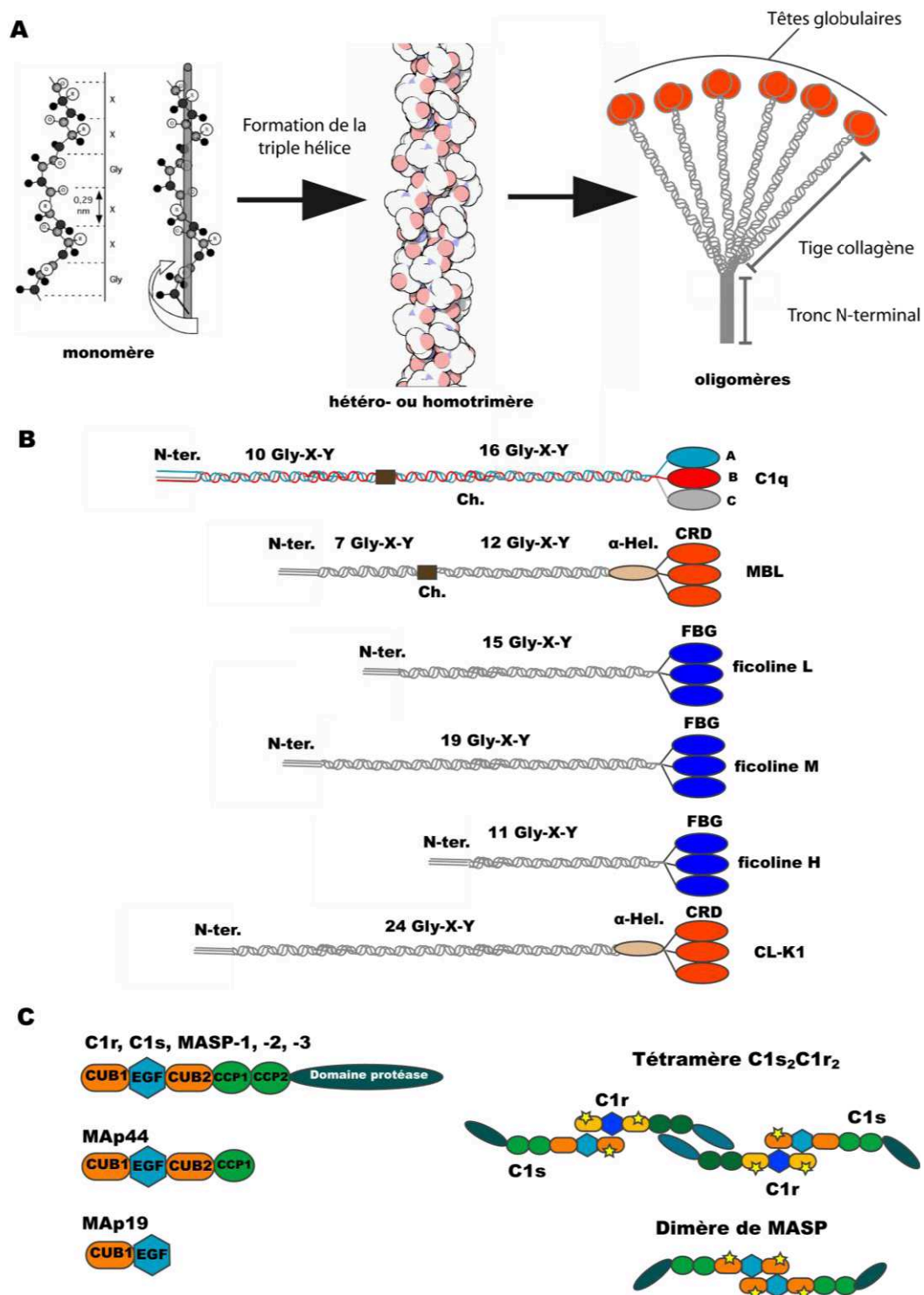


Figure 1.4 : Assemblage et représentation schématique des collagènes de défense et des protéases associées

(A) Formation de la triple hélice de collagène conduisant à une structure en bouquet ; adapté d'après Molecular Cell Biology, 4^e édition, Lodish et al, 1999. (B) Représentation schématique des homo- ou hétéro-trimères rentrant dans la composition des différents collagènes de défense. Sur ce schéma sont indiqués : la partie N-terminale riche en cystéine (N-ter.), les domaines collagéniques avec le nombre de répétitions Gly-X-Y, les régions charnières quand observées (Ch.), les domaines globulaires (CRD Domaine C-lectine; FBG : domaine fibrinogène). Pour la MBL et CL-K1, le domaine « coiled-coil » α -hélicoïdal (α -Hel) est également indiquée; (C) A gauche, représentation modulaire des protéases (et fragments des protéases) s'associant avec les collagènes de défense; à droite, modèle schématique représentant la formation du tétramère C1r₂C1s₂ et du dimère de MASP. La position des résidus impliqués dans l'interaction entre ces protéases et les collagènes de défense est indiquée par une étoile.

La partie N-terminale et les triplets Gly-X-Y jusqu'à la charnière forment un tronc duquel partent les différentes tiges collagéniques. Des modifications de type hydroxylation des lysines et des prolines sont détectées tout comme dans C1q. Dans le plasma, la MBL s'associe avec différentes protéases ou fragments de la famille des MASPs (MASP-1, -2, -3, MAp19 et MAp44) qui sont issus de l'épissage alternatif de deux gènes : *masp1/3* (MASP-1,-3 et MAp44) et *masp2* (MASP-2 et MAp19). MASP-1, -2 et -3 possèdent une structure homologue à celle de C1s ou C1r avec une succession des mêmes modules (*figure 1.4*) et d'un domaine serine protéase (SP) C-terminal. Dans MAp19 et MAp44, le domaine SP et CCP2 sont absents, ainsi que les modules CCP1 et CUB₂ dans le cas précis de MAp19. De façon similaire à ce qui est observé pour C1q et le tétramère C1r₂C1s₂, ces protéines s'associent dans une configuration tête-bêche sous forme d'homo-dimères entre le module CUB₁ d'un monomère et le module EGF de l'autre. Cette interaction est également calcium-dépendante, à la fois pour la formation de l'homo-dimère et pour l'interaction avec la MBL (Thiel, 2007). Bien que les similitudes soient fortes entre les MASPs et C1r/C1s, seule une étude rapporte une interaction possible entre C1r₂C1s₂ et la MBL avec une affinité cependant beaucoup plus faible (Phillips et al., 2009). Ceci peut s'expliquer par la présence majoritaire de formes tri- et tétramériques de la MBL, moins favorables à l'interaction avec un tétramère de protéases qu'avec un dimère. De la même manière, il semble peu probable que deux dimères de MASPs puissent s'associer en même temps à la MBL (Teillet et al., 2005). L'association préférentielle de certaines MASPs avec la MBL n'est à l'heure actuelle pas totalement comprise et dépend notamment de son état d'oligomérisation. MBL-I s'associeraient préférentiellement avec MASP-1 ou MAp19 et MBL-II avec MASP-2 et -3 (Dahl et al., 2001). Certains chercheurs suggèrent la présence d'hétérodimères de MAp19-MASP-1 ou de MASP-2 et -3 mais aucun dimère de MASP-1 et -2 n'a été détecté (Gal et al., 2007). Il semble cependant clair que MASP-2 (clive C2 et C4) et MASP-1 (clive C2 mais pas C4) soient capables de participer à l'activation de la voie lectine du complément. Récemment, il a été montré que MASP-1 activait vraisemblablement MASP-2 et était responsable de 60 % de la formation de C2a, remettant en cause le dogme selon lequel la protéase MASP-2 s'auto-activait seule (Heja et al., 2012). MASP-3, qui est incapable de cliver les composants du complément, MAp19 et MAp44 auraient alors davantage un rôle de régulateur et contribueraient potentiellement à diminuer l'activation du complément en rentrant en compétition avec MASP-1 et -2 (Tang et al., 2012). Le rôle de MAp44 et MASP-3 en tant qu'inhibiteurs est notamment mis en exergue par leur expression dans d'autres organes où ils protégeraient les tissus de la destruction par l'activation du complément (Degn et al., 2010).

Des expériences de mutagenèse dirigée réalisées au laboratoire ont apporté la preuve que MASP-1/-3 interagissent avec la MBL au niveau de leurs modules CUB₁ et CUB₂ (Teillet et al., 2008), majoritairement via des résidus acides impliqués dans la liaison du Ca²⁺ (Glu et Asp). Une autre étude a permis d'identifier dans la MBL un résidu clé pour l'interaction avec les MASPs et Map19, **la lysine 55** (Teillet et al., 2007). Ce résidu (chargé positivement) n'est pas modifié et est accessible pour interagir via une liaison ionique avec les résidus acides (chargés négativement) des protéases. Il n'est pas exclu que d'autres résidus, notamment ceux autour de la lysine 55, puissent stabiliser l'interaction. Dans le modèle proposé, les 4 modules CUB interagissent chacun, dans un même plan, avec une triple hélice de type collagène de la MBL-II au niveau de la Lys⁵⁵. Ce modèle alterne entre une configuration fermée (*figure 1.5*), permettant l'activation des domaines SP, et une configuration ouverte permettant l'accès au substrat. Récemment, une structure du module CUB2 de MASP-1 en association avec un peptide collagénique portant le site de liaison de la MBL a été résolue (Gingras et al., 2011) et confirme les précédentes observations (*figure 1.5*).

La collectine CL-K1 récemment identifiée présente une organisation homologue à celle de la MBL (*figure 1.4 et 1.5*) avec des homotrimères composés d'une partie N-terminale riche en cystéine, d'une longue triple hélice collagénique non interrompue (24 répétitions Gly-X-Y), d'un domaine « coiled-coil » α -hélicoïdal et d'un domaine globulaire de type C-lectine. Secrétée par une large gamme de cellules, elle est retrouvée à une concentration de 0,34-2,1 μ g/mL dans le plasma et sous la forme d'oligomères de 100 et 200 kDa (Yoshizaki et al., 2012). La présence d'un site potentiel de fixation des MASPs dans sa partie collagénique a conduit à l'étude de sa capacité à fixer les MASPs. MASP-1 et MASP-3 sont capables d'interagir avec CL-K1 suggérant sa possible implication dans l'activation du complément. Cependant, aucune preuve n'étaye cette hypothèse à l'heure actuelle (Hansen et al., 2010).

II.1.3. Les ficolines L, H et M

Les ficolines L, H et M sont des protéines de type lectine impliquées dans la même voie d'activation du complément que la MBL. A ce titre, elles partagent de nombreuses similitudes tant en terme de structures que d'activation (même protéases associées). Trois ficolines ont à ce jour été identifiées : la ficoline M (P35 related protein ou ficoline 1), la ficoline L (P35 ou ficoline 2) et la ficoline H (« Hakata » ou ficoline 3).

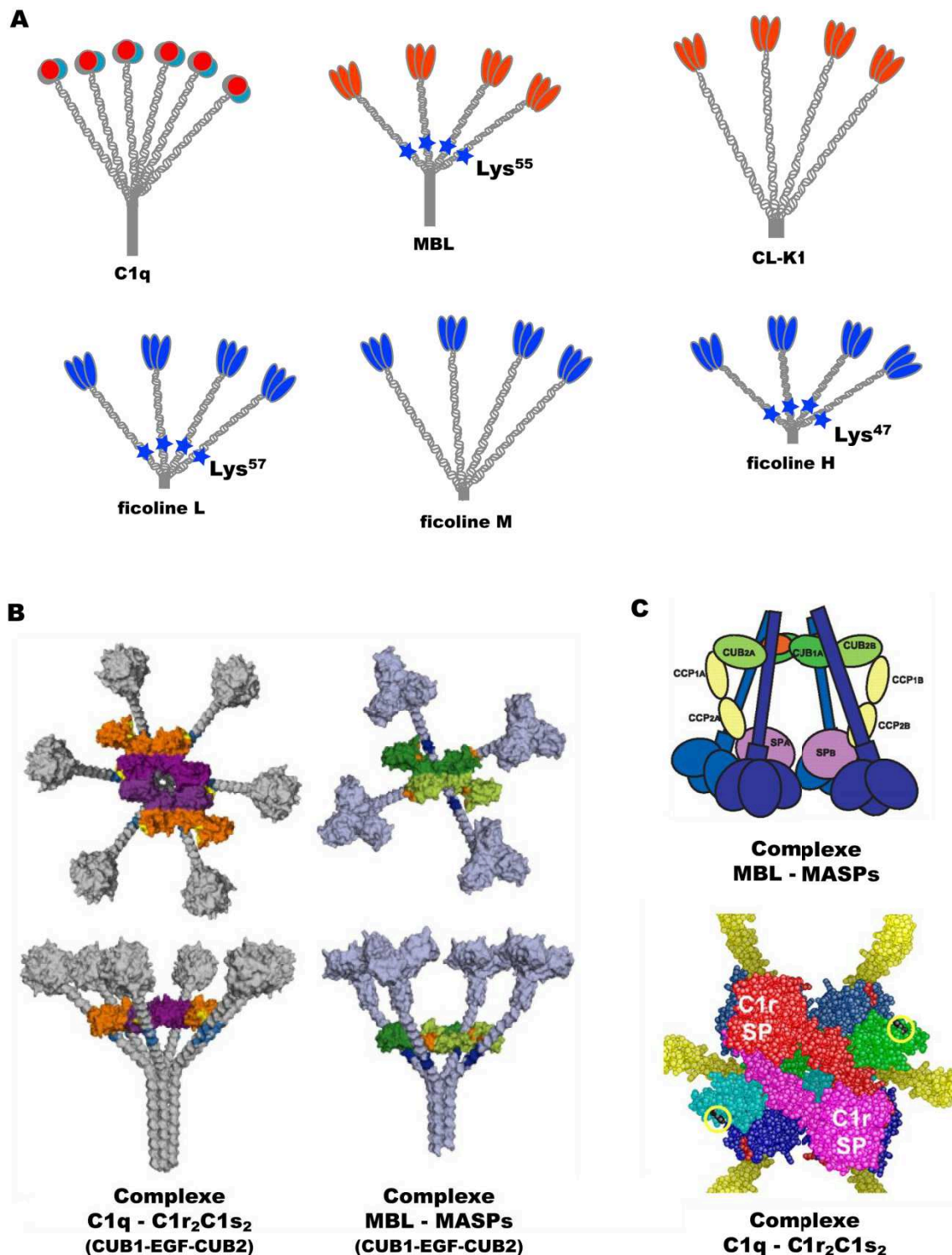


Figure 1.5 : Structure des collagènes de défense et association avec les protéases

(A) Représentation schématique de l'organisation des différents collagènes de défense. La position et la nature des lysines impliquées dans l'interaction avec les protéases est indiquée par une étoile bleue (B) Modèles de C1q ou MBL en complexe avec les modules CUB1-EGF-CUB2 de C1r₂C1s₂ (en orange C1s et en violet C1r) ou MASP (en vert). Les sites de liaisons sur C1q (bleu), MBL (bleu foncé), C1r/C1s (jaune) et MASP (orange) sont indiqués. D'après (Wallis et al., 2010). (C) Modèle de la MBL (haut) ou C1q (bas) en complexe avec respectivement MASP et C1r₂C1s₂. Dans le modèle de C1q, la présence des CCP1/2 et du domaine protéase de C1s n'est pas indiquée pour plus de clarté (représentée par des cercles jaunes). D'après (Bally et al., 2009; Teillet et al., 2008).

La ficoline L et H, produites par le foie, sont retrouvées dans le plasma à des concentrations respectives 3,3 à 4,2 µg/mL et de 7 à 23 µg/ml. La ficoline M est retrouvée en quantité plus faible, de 0,06 à 1,07 µg/ml (Honore et al., 2008; Wittenborn et al., 2010) et est produite dans d'autres tissus (rein, poumons) et par d'autres types cellulaires (monocytes, neutrophiles) (Endo et al., 2011). Elle peut être retrouvée à la surface de monocytes en association à des récepteurs membranaires et a été localisée dans des vésicules sécrétoires de différents types cellulaires (Frederiksen et al., 2005). D'un point de vue structural, les ficolines sont très similaires aux collagènes de défense précédemment évoqués (*figure 1.5*), et notamment à la MBL car il s'agit d'oligomères issus d'une même chaîne polypeptidique. Leur domaine globulaire (en position C-terminale) est constitué par un domaine fibrinogène, reconnaissant de nombreux sucres comme le domaine C-lectine de la MBL (*Chapitre 1, section II.1.2*). Elles ne possèdent cependant pas de région charnière comme C1q ou la MBL (interruption dans les répétitions Gly-X-Y), pas de domaine « coiled-coil » α -hélicoïdal et leur partie N-terminale est davantage réduite. Les ficolines sont retrouvées sous forme de tétramères ou d'oligomères de plus haut poids (Garred et al., 2009). Comme la MBL, elles sont capables d'activer la voie lectine du complément en s'associant avec MASP-2 et d'interagir avec MASP-1 et MASP-3 (Lacroix et al., 2009). Des interactions avec MAP19 et MAP44 ont également été décrites conduisant à l'inhibition de l'activation de la voie lectine par les ficolines (Degen et al., 2009). Sur la base d'alignements de séquence avec la MBL, la Lys⁵⁷ de la ficoline L et la Lys⁴⁷ de la ficoline H ont été mutées (Lacroix et al., 2009). Ces mutations abolissent l'interaction avec MASP-1 et -3 et confirment leur rôle essentiel dans l'interaction avec les ficolines, comme précédemment observé avec la mutation de la Lys⁵⁵ de la MBL. Au vu de ces résultats et de l'alignement entre les 3 ficolines et la MBL, la Lys⁵⁴ de la ficoline M est supposée avoir un rôle similaire.

II.2. Double facette pour les collagènes de défense

II.2.1. Les motifs activant le complément

L'activation du complément fait suite à la reconnaissance à la surface de pathogènes ou de cellules apoptotiques de motifs spécifiques. Cette reconnaissance est principalement assurée par les têtes globulaires des collagènes de défense décrits précédemment (GR de C1q, domaine C-lectine de la MBL et de CL-K1, domaine fibrinogène des ficolines) dont la sélectivité dépend de l'organisation structurale du domaine de reconnaissance. Par exemple, le domaine C-lectine de la MBL est spécifique des cycles pyranoses présentant des groupes

hydroxyle horizontaux en position 3' et 4' (Sorensen et al., 2005). C1q est une molécule versatile qui peut reconnaître un nombre de motifs très variés, le plus souvent chargés négativement, présents à la surface des pathogènes mais également des cellules apoptotiques. A l'inverse, les lectines MBL, CL-K1 et les ficolines reconnaissent davantage des structures de type carbohydrates, notamment celles présentes à la surfaces de microorganismes. Une liste non exhaustive des différents motifs reconnus à ce jour est donnée dans le *tableau 1.4*. Notons que l'affinité de chaque domaine, prise individuellement, est très faible. C'est la structure même des collagènes de défense (oligomères de trimères) qui permet d'augmenter cette affinité grâce au phénomène d'avidité.

Collagène de défense	Ligands reconnus
Ficoline L	GlcNac, GalNac, LTA, glycanes sulfatés, ADN, 1,3-β-D-glucane, CRP, N-acetyl-glycine, PTX3
Ficoline H	GlcNac, GalNac, D-fucose, galactose, CRP
Ficoline M	GlcNac, GalNac, acide sialique, CRP, CD43, PTX3
MBL	D-glucose, D-mannose, L-fucose, GlcNac, ManNac ADN, meprin-α, meprin-β, LPS, LTA, peptides amyloïdes (Aβ 42)
CL-K1	L-fucose>D-mannose>D-glucose, ManNac> GlcNac>D-galactose. PS, LTA
C1q	IgG, IgM, Pentraxines (PTX3, CRP, SAP), peptides amyloïdes (Aβ 42, ABri, ADan), PrP, fucoïdane, calréticuline, p33, LPS, porines des bactéries Gram-négative (OmpK36, protéines d'enveloppe de virus (HAstV-CP, HTLV1 gp21, HIV1 gp41), phosphatidyl-serine, ADN, fibromoduline, chondro- et osteoadherine, SIGN-R1

Tableau 1.4 : Ligands des domaines globulaires des collagènes de défense

Adapté de (Bohlson et al., 2007; Endo et al., 2011; Garred et al., 2009; Kojouharova et al., 2010; Larvie et al., 2012; Ohtani et al., 2012; Sjöberg et al., 2009). GlcNac : N-acétylglucosamine, GalNac : N-acétylgalactosamine, ManNac : N-acétylmannosamine, SAP : serum amyloid protein, LTA : acide lipoteichoïque, CRP : C-reactive protein, LPS : lipopolysaccharides

II.2.2. Les récepteurs des collagènes de défense

Les collagènes de défense sont également capables d'interagir avec un certain nombre de récepteurs présents à la surface des cellules. Ce sont généralement les fragments collagéniques de ces molécules qui sont impliqués dans l'interaction, permettant ainsi aux domaines globulaires d'interagir avec les ligands cités précédemment. L'ensemble des récepteurs des collagènes de défense activant le complément (C1q, MBL, ficolines) identifiés à ce jour est répertorié dans le *tableau 1.5*. Ce type d'interaction pourrait notamment être impliqué dans la phagocytose, l'élimination de cellules apoptotiques ainsi que dans des mécanismes de signalisation. Notons que certains récepteurs peuvent interagir avec les

collagènes de défense à la fois par les parties collagéniques également par les domaines globulaires. Un autre récepteur de C1q avait été précédemment identifié, C1qRp ou CD93, mais de récents résultats semblent indiquer l'absence d'une interaction directe entre ces deux molécules (Ikewaki et al., 2010). Pour CL-K1, aucun récepteur n'a été identifié à ce jour.

Récepteurs	C1q	MBL	Fcn L	Fcn H	Fcn M
calréticuline	C et G (260 nM)	C	C	C	?
CD91	C (4,0 nM) et G	C (3,3 nM)	C (280 nM)	non	?
P33	G (50 nM)	?	?	?	?
CR1 (CD35)	C(3,4 nM)	C (3,0 nM)	?	?	?
Intégrine $\alpha_2\beta_1$	Oui (G ou R ?)	Oui (G ou R ?)	?	?	?

Tableau 1.5 : Récepteurs des collagènes de défense

Quand l'information est disponible, les valeurs de K_D pour les couples collagènes-récepteurs sont indiquées entre parenthèses (en nM). Adapté de (Carroll and Sim, 2011; Duus et al., 2010a; Lacroix et al., 2009; Paidassi et al., 2011). G : interaction par les têtes globulaires ; C : interaction par les fragments collagènes.

L'impossibilité des mutants K55A/K55E de la MBL d'interagir avec CD91 ou la calréticuline et l'inhibition de la fixation de la calréticuline à la MBL par les MASPs suggère que ces récepteurs s'associent au niveau du site de fixation des MASPs ou à proximité (Duus et al., 2010b). Cela laisse également supposer que des charges négatives (résidus de Glu ou d'Asp) présentes au niveau de ces récepteurs pourraient participer à l'interaction, à l'image de ce qui est observé pour les MASPs. L'interaction de C1q avec le tétramère $C1r_2C1s_2$ est inhibée par la présence de la calréticuline, suggérant également un mode de fixation identique (Sim et al., 1998). L'interaction de C1q et de la MBL avec ces récepteurs est bien documentée mais peu d'informations sont disponibles sur une possible interaction avec les ficolines, en lien probablement avec leur découverte plus récente. Dans la suite de cette introduction, nous nous intéresserons particulièrement au cas du récepteur CR1/CD35 dont l'étude a été réalisée au cours de cette thèse.

II.3. Implication fonctionnelle de l'interaction avec les récepteurs

Les collagènes de défense précédemment cités, en plus de leur rôle d'activateurs de la cascade du complément, sont impliqués dans différents mécanismes biologiques de par leur interaction avec des récepteurs présents à la surface de différents types cellulaires.

II.3.1. Phagocytose de pathogènes

Classiquement, la phagocytose des pathogènes a été associée à l'interaction entre des récepteurs présents à la surface des cellules phagocytaires et des opsonines, telles que

C3b/C4b ou les immunoglobulines G (IgG), qui recouvrent la cible à éliminer. Les collagènes de défense reconnaissant de nombreux motifs à la surface des pathogènes, plusieurs éléments semblent indiquer qu'ils participeraient alors au phénomène de phagocytose en complément de l'action de C3b (qu'ils contribuent à déposer) ou des IgG. Cela a été démontré pour C1q et la MBL (Bohlson et al., 2007) et est suggéré pour les ficolines L et M (Endo et al., 2011). La MBL possède une séquence (GEKGEP) au niveau de la partie collagénique nécessaire pour améliorer l'efficacité de la phagocytose par les IgG ou C4b (Arora et al., 2001). Une séquence similaire est également retrouvée dans la chaîne A de C1q (GEQGEP) suggérant une même fonction, d'autant plus que le site responsable du renforcement de la phagocytose semble localisé dans les parties collagéniques de C1q (Bobak et al., 1987) et que C1q en complexe avec la protéase C1r₂C1s₂ ne peut exercer cette même activité. Certains récepteurs des collagènes de défense sont synthétisés par les macrophages, monocytes et les cellules dendritiques, des types cellulaires impliqués dans l'élimination de particules par phagocytose. Ces récepteurs interagissant pour la plupart avec les parties collagéniques, il est possible qu'une interaction au niveau des séquences identifiées sur les collagènes de défense puisse contribuer soit directement (opsonisation) soit indirectement (signalisation) au processus de phagocytose. Notons que la présence de tels sites d'interaction n'a pas encore été évaluée dans les ficolines mais est envisageable. Un rôle potentiel dans l'opsonisation et l'élimination des microbes est également attendu pour CL-K1 (Hansen et al., 2010).

II.3.2. Elimination de cellules apoptotiques

De la même manière que pour la phagocytose, la reconnaissance de signaux spécifiques des cellules apoptotiques ou « eat me signal » (ADN, calréticuline, phosphatidylsérine) permettrait une élimination par les cellules phagocytaires. La fixation de la MBL, de C1q et des ficolines L et H aux cellules apoptotiques a notamment été observée à de nombreuses reprises (Honore et al., 2007; Kuraya et al., 2005; Nauta et al., 2004; Paidassi et al., 2011; Sjoberg et al., 2009). L'interaction entre calréticuline/CD91 et C1q a notamment été proposée comme impliquée dans l'ingestion des cellules apoptotiques. Des résultats récents (Duus et al., 2010a) indiquent cependant que C1q peut se lier directement à CD91 sur des monocytes en l'absence de calréticuline. L'implication de C1q dans ce mécanisme est notamment mise en exergue par son rôle dans certaines maladies auto-immunes comme le SLE dans lequel un déficit en cette protéine conduit à une accumulation et une mauvaise élimination des cellules apoptotiques. L'absence de MBL ou son faible niveau d'expression ne seraient cependant pas

suffisants pour conduire à ce même type de réactions auto-immunes, nécessitant leur association avec d'autres déficits (Bohlson et al., 2007). Un rôle potentiel dans l'élimination des cellules apoptotiques est également attendu pour CL-K1 (Hansen et al., 2010). Il semble clair que la phagocytose et l'élimination des cellules apoptotiques nécessitent la mise en œuvre d'un important faisceau d'interactions. La liaison des collagènes de défenses à leurs récepteurs ne contribuerait cependant que dans une faible mesure à l'opsonisation des particules, le dépôt de C3b ou d'IgM et l'interaction avec leurs récepteurs respectifs étant plus largement impliqués (Peng et al., 2005; Trouw et al., 2008). Les interactions collagènes de défense - récepteurs seraient néanmoins essentielles pour déclencher des voies de signalisation ou d'activation conduisant à une amélioration de l'efficacité de phagocytose.

II.3.3.Synthèse de cytokines

Lors de la phagocytose de pathogènes ou de cellules apoptotiques, la fixation de C1q et de la MBL diminuerait l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α et IL-1 β via l'activation de certains TLRs) et augmenterait celle de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-RA) ainsi que celles favorisant la phagocytose (IL-8 pour le recrutement de cellules phagocytaires, IL-6 pour la différenciation des monocytes en macrophages et MCP-1 pour le recrutement de monocytes) (Fraser et al., 2006). D'autres études ont étendu ces observations à des cellules endothéliales (Kang et al., 2007; van den Berg et al., 1998a). La ficoline L induirait également la synthèse d'IL-6 au niveau de mastocytes et réduirait également l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Kim et al., 2007). Enfin, l'interaction entre des cellules dendritiques et C1q stimulerait une réponse inflammatoire des macrophages en augmentant la synthèse de IL-6, TNF- α , IL-10, MCP (Nauta et al., 2004). Cette production de différentes cytokines pourrait être associée à l'interaction avec différents récepteurs dont CD91, CR1 et la calréticuline.

II.3.4.Autres contributions

L'interaction de C1q avec un récepteur nommé C1qR₀₂ a été identifiée à la surface des neutrophiles et est impliquée dans la libération rapide de radicaux qui contribuent à l'élimination des pathogènes. Une séquence dans la chaîne C de C1q (entre la Gly⁴² et la Lys⁵⁸) et dans la chaîne A (Thr³⁹ à Gly⁴³) semble responsable de cette activité et pourrait constituer un site de liaison potentiel pour ce récepteur (Ruiz et al., 1999; Ruiz et al., 1995). Il semble également qu'une interaction multivalente de C1q avec plusieurs récepteurs soit

nécessaire pour induire une réponse cellulaire (Bohlson et al., 2007; Tenner and Cooper, 1982). Ce récepteur n'a, à ce jour, pas été identifié bien que des soupçons portent sur l'implication de la calréticuline (van den Berg et al., 1998b) au sein d'un complexe avec d'autres récepteurs dans des rafts lipidiques (Bohlson et al., 2007). Un rôle dans le chimiotactisme des neutrophiles et des cellules dendritiques est également attribué à l'interaction entre P33 et C1q (Ghebrehiwet et al., 2001). La ficoline M, via son interaction avec CD43, participerait à l'adhésion des neutrophiles et à leur recrutement (Moreno-Amaral et al., 2012). C1q étant une molécule de reconnaissance versatile, il a également été identifié comme acteur potentiel dans de nombreux autres processus incluant le développement, la coagulation et la grossesse (Nayak et al., 2010).

II.4. Pathologies associées

Comme nous venons de le voir, C1q, la MBL et les ficolines sont impliqués dans de nombreux mécanismes biologiques et notamment dans la phagocytose des pathogènes et l'élimination des cellules nécrotiques et apoptotiques. Un déficit dans l'un de ces collagènes de défense conduit donc à une défaillance dans ces mécanismes pouvant résulter en l'établissement ou l'amplification de pathologies. Des déficits en C1q ont été identifiées comme conduisant dans 90% des cas au développement du lupus érythémateux systémique (SLE) chez les patients porteurs (Degn et al., 2011). Ces carences sont associées à des polymorphismes homozygotes responsables de l'absence de C1q, de niveaux d'expression faible ou de la synthèse d'une molécule de C1q non fonctionnelle. Ces mutations ne sont cependant pas très répandues et ne contribuent que faiblement à l'ensemble des cas de SLE. Elles ont cependant été définies comme des facteurs de risque pour cette maladie. Plus récemment, une nouvelle mutation dans la chaîne B de C1q (GlyB63Ser) a été identifiée chez un patient atteint de lupus et conduit à la synthèse d'une molécule de C1q fonctionnelle (liaison des ligands) mais cependant incapable de former le complexe C1 (Roumenina et al., 2011). Ce nouvel élément vient appuyer les hypothèses faites quant au site de fixation du tétramère C1s₂C1r₂. Ce site pourrait également servir de site de fixation pour les récepteurs de C1q, à l'image de ce qui est observé pour la MBL et les ficolines pour la fixation à la calréticuline ou à CD91. Des déficits en C1q sont aussi associées à une augmentation de la susceptibilité aux infections liées à des bactéries encapsulées (Skattum et al., 2011).

Des mutations résultant en des niveaux plus faibles de MBL dans le sérum (au niveau des résidus Asp⁵⁴, Cys⁵², Glu⁵⁷ et dans la région promotrice du gène) ont aussi été identifiées et

sont assez répandues dans la population. Associées comme causes possibles pour le SLE, elles ont cependant un impact moins fort que celui de C1q (Pickering et al., 2001). La plupart des individus porteurs de ces mutations sont sains mais présenteraient une susceptibilité plus forte à certaines infections. Cette relation a été observée pour des infections à méningocoques, à *M. tuberculosis*, pour le VIH-1 et pour des hépatites. Dans l'ensemble des cas, cette susceptibilité conduit à des infections plus sévères et répétées, probablement lié à un défaut d'opsonisation des pathogènes (Gupta et al., 2008). Un lien avec l'arthrite rhumatoïde a également été évoqué où des déficits en MBL conduiraient à une augmentation de la sévérité de la maladie (Ballanti et al., 2011). Il émerge actuellement un consensus selon lequel les déficits en MBL seules ne déclencheraient pas les pathologies observées mais contribueraient à leur sévérité en présence d'un second élément. De plus, des niveaux élevés de MBL pourraient avoir un effet négatif en réponse à un pathogène, notamment en causant une activation plus importante du complément (effet négatif sur les cellules du soi environnantes) et/ou en favorisant l'internalisation du pathogène (Garred et al., 2009). Des défauts en C1q et MBL pourraient également être associés à l'aggravation de maladies neurodégénératives puisque ces protéines sont capables d'interagir avec des peptides amyloïdes et de participer à leur élimination en activant le complément (Jiang et al., 1994; Larvie et al., 2012; Tacnet et al., 2001). Ces interactions pourraient impliquer les têtes globulaires de C1q ou de la MBL mais également la partie N-terminale de ces collagènes de défense, respectivement au niveau des résidus 14-26 dans la chaîne A de C1q et au niveau du domaine riche en cystéine pour la MBL.

Bien que de nombreux polymorphismes aient été identifiés dans la séquence codante des ficolines, peu de données indiquent à l'heure actuelle un possible lien avec des pathologies. Des carences en ficoline H ou des niveaux faibles de ficoline L ont été rapportés comme possible lien avec l'établissement du SLE ou avec une plus grande susceptibilité aux infections (Endo et al., 2011). Un lien entre des mutations affectant le niveau d'expression de la ficoline L et de la MBL a également été établi dans des cas sévères de malaria (Faik et al., 2011). La découverte récente de CL-K1 a également permis la mise en évidence de plusieurs mutations responsables d'anomalies de cette collectine et causant le syndrome 3MC, une maladie impliquée dans les processus de développement (Rooryck et al., 2011). Trois de ces mutations sont présentes dans le domaine de reconnaissance de type C-lectine (Ser169Pro, Gly204Ser et une délétion de la Ser217), deux introduisent des codons stop au niveau des résidus 83 et 113 (associées respectivement aux mutations Phe16Ser et Gly101Val) et une

délétion conduit à la perte des premiers résidus N-terminaux. Notons que ce syndrome peut également être causé par des mutations dans le domaine protéase à sérine de MASP-3 (Rooryck et al., 2011), ce qui pourrait être mis en rapport avec la capacité de MASP-3 à s'associer à CL-K1 (Hansen et al., 2010).

III. *TcCRT*, la calréticuline de *Trypanosoma Cruzi*

Nous l'avons vu précédemment, certains pathogènes sont capables de synthétiser des protéines capables de les aider à échapper au système immunitaire de l'hôte qu'ils parasitent. Il a été montré que certains organismes comme les trypanosomes exprimaient des protéines fortement homologues à la calréticuline humaine. Certaines de ces calréticulines de pathogènes, dont la calréticuline de *Trypanosoma cruzi*, sont capables d'interagir avec les collagènes de défense et de perturber les mécanismes de l'immunité innée. Pour comprendre comment ces calréticulines de parasites exercent leur fonction, il est nécessaire de détailler les rôles associés à la calréticuline endogène de l'hôte, d'autant plus que celle-ci a été l'un des premiers récepteurs identifiés pour C1q (Malhotra et al., 1993).

III.1. Structure et fonctions de la calréticuline humaine (HuCRT)

III.1.1. Structure

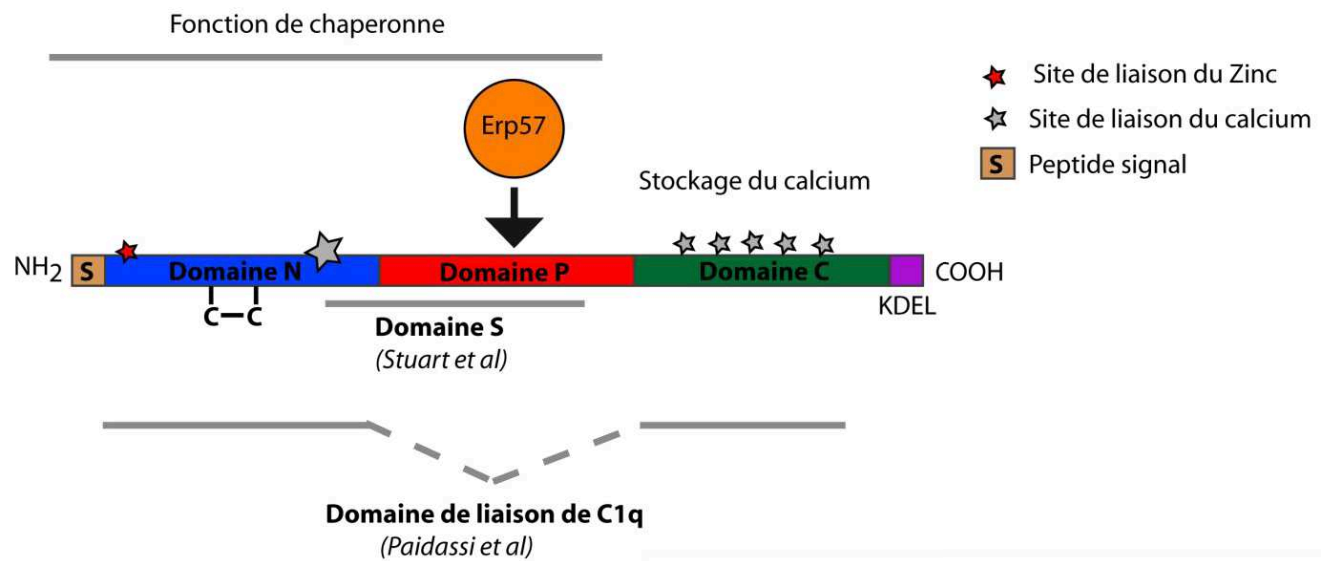
Identifiée chez de nombreux eucaryotes allant des mammifères aux plantes en passant par les protozoaires, la calréticuline est une protéine fortement conservée au niveau de son organisation génétique, de sa séquence d'acides aminés et de sa structure, suggérant des fonctions cellulaires importantes (Johnson et al., 2001). Isolée il y a plus de 35 ans, la calréticuline humaine (HuCRT) est une protéine identifiée initialement dans le réticulum endoplasmique où elle est adressée par un peptide signal spécifique (17 résidus hydrophobes N-terminaux) et maintenue par une séquence C-terminale KDEL. Il s'agit d'une protéine de 46 kDa constituée de 3 domaines structuraux distincts (*figure 1.6*) : un domaine N fortement conservé et contenant un site de liaison du calcium de faible capacité (forte affinité) et un site de liaison au zinc; un domaine P flexible et riche en proline présentant une structure allongée en épingle à cheveux ; un domaine C moins conservé, fortement chargé négativement (nombreux résidus acides) et contenant un domaine (plusieurs sites) de fixation du calcium de grande capacité (faible affinité, environ 20 mol de Ca⁺/mol de HuCRT) (Gelebart et al., 2005). Le domaine N et le début du domaine C forment la partie globulaire de la calréticuline,

dont la structure a été récemment résolue pour la calréticuline de souris (Kozlov et al., 2010) et pour la calréticuline humaine (Chouquet et al., 2011), tandis que le domaine P émerge du domaine globulaire (*figure 1.6*). De par sa structure, la calréticuline est capable d'interagir avec de nombreux partenaires protéiques lui permettant ainsi d'assurer des fonctions cellulaires très variées.

III.1.2. Fonctions

Les différentes fonctions de la calréticuline sont résumées dans la *figure 1.7*. Le premier rôle de la HuCRT est lié à sa qualité de chaperonne dans le réticulum endoplasmique (RE). Elle est impliquée dans ce processus avec la calnexine (CNX), une protéine homologue à la calréticuline mais liée à la membrane, et est capable de se lier par son domaine P avec Erp57, une isomérase des ponts disulfures. La HuCRT participe ainsi au contrôle qualité des polypeptides glycosylés néo-synthétisés et facilite leur repliement en fixant leurs motifs de glycosylations $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, grâce majoritairement à son domaine N, qui porte l'activité lectine, et à des résidus clés du domaine P. Elle exerce également son rôle de chaperonne sur des protéines non glycosylées, probablement via un site favorisant les contacts hydrophobes et situé en bordure du site lectine (Chouquet et al., 2011). L'aide au repliement des protéines étant un élément clé du processus de biosynthèse, il n'est également pas étonnant que la calréticuline soit impliquée dans l'assemblage du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) (Gao et al., 2002). Grâce à sa capacité à lier le calcium, la calréticuline est impliquée dans l'homéostasie de cet ion au niveau du réticulum endoplasmique, l'organelle majeur de stockage du calcium, en tant que protéine de stockage. Cette propriété a été associée à de nombreux processus dépendant de la présence de calcium (stress cellulaire, différenciation des adipocytes) et notamment au développement cardiaque, puisque des souris déficientes en calréticuline présentent un développement anormal du cœur, synonyme de phénotype létal (Nakamura et al., 2001). Notons également que le repliement de la calréticuline est très sensible aux variations de concentration en calcium, puisque celle-ci adopte une structure plus compacte à forte concentration (5 mM) et plus relâchée à faible concentration (Li et al., 2001). Ce phénomène pourrait être impliqué dans les mécanismes de rétro-translocation de la calréticuline vers le cytoplasme (Villamil Giraldo et al., 2010). Enfin, un autre ion, le zinc (Zn^{2+}), déstabilise quant à lui la structure de la protéine (Li et al., 2001).

A



B

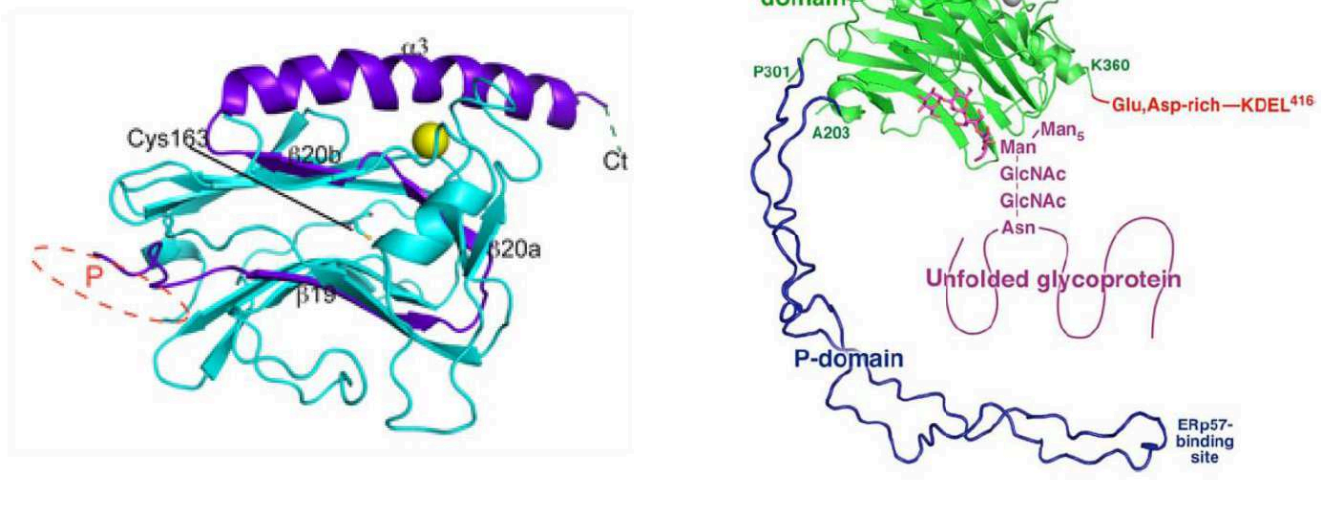


Figure 1.6 : Organisation et structure de la calréticuline

(A) Organisation structurale de la calréticuline humaine et localisation des fonctions associées. (B) (gauche) Structure du domaine globulaire de la calréticuline humaine (Chouquet et al., 2011). Le domaine N est coloré en bleu ciel et le domaine C en violet. (droite) Modèle de la calréticuline entière de souris avec en vert le domaine globulaire (N+C) et en bleu foncé le domaine P. Ce modèle a été construit à partir des structures du domaine globulaire de la calréticuline de souris et du domaine P de la calnexine (Kozlov et al., 2010)

Depuis une dizaine d'années, il est devenu cependant clair que la calréticuline pouvait être localisée dans d'autres compartiments cellulaires et ainsi exercer d'autres fonctions que celles initialement décrites. Les mécanismes expliquant la présence de la calréticuline à l'extérieur du réticulum endoplasmique ne sont pas encore bien compris même si plusieurs hypothèses ont été émises (Gold et al., 2010). Sa présence dans le cytoplasme pourrait être associée à des mécanismes de rétro-translocation dépendant du calcium ou à la présence d'un peptide signal la localisant spécifiquement dans ce compartiment. Elle pourrait alors échapper au mécanisme de dégradation du protéasome en acquérant des modifications post-traductionnelles. Même si sa présence à la surface est fortement corrélée à son niveau d'expression, il est cependant possible que la calréticuline se fixe à la membrane de cellules proches suite à sa libération dans le milieu par des cellules nécrotiques (Basu et al., 2000) ou par des granules des neutrophiles (Ghiran et al., 2003). Son export à la surface et dans le milieu extracellulaire peut être expliqué par différents phénomènes encore actuellement sources de débats : association à des protéines adressée à la membrane (CMH de classe I, α -intégrines, CD59, CD91) et sécrétion via l'appareil de Golgi, présence dans des phagosomes, mobilisation depuis le cytoplasme, clivage du peptide de rétention KDEL.

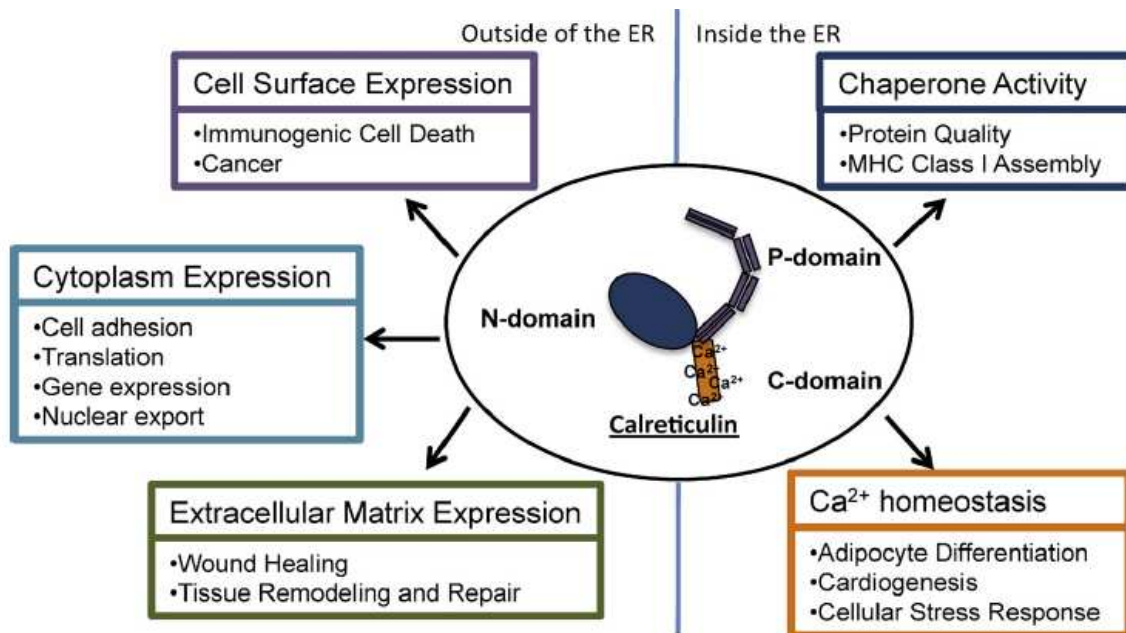


Figure 1.7 : La calréticuline est impliquée dans différents mécanismes moléculaires

Tirée de (Wang et al., 2012).

La présence de la calréticuline dans les matrices extracellulaires (ECM) est renforcée par sa capacité d'interaction avec TSP1, la laminine ou les collagènes fibrillaires, qui sont essentiellement synthétisés au niveau des ECM. Son rôle dans ces matrices n'est cependant pas clairement défini à l'heure actuelle (Gold et al., 2010), même si elle interviendrait probablement dans le processus de cicatrisation en augmentant l'expression de certaines protéines et en favorisant la migration et la prolifération de cellules nécessaires à la réparation des tissus (Wang et al., 2012). Notons également que le domaine N de la calréticuline (résidus 1 à 180), nommé vasostatine, présente des propriétés anti-angiogénique contribuant notamment à l'inhibition de la croissance des tumeurs (Lopez et al., 2010) et à la diminution de l'inflammation (Huegel et al., 2007). A la surface des cellules, elle a été décrite comme étant impliquée dans des processus d'adhésion cellulaire (interaction avec CD91, intégrine $\alpha 2 \beta 1$, laminine), de désassemblage des adhésions focales (interaction avec le domaine N-terminal de TSP-1 favorisant la formation du complexe avec CD91), de migration cellulaire, de phagocytose des cellules apoptotiques et d'élimination des cellules cancéreuses (Gold et al., 2010). Sa capacité à interagir avec les collagènes de défense (C1q, MBL, ficolines), notamment avec C1q au niveau de ses fragments collagéniques (CLF), permettrait d'expliquer son rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques (récepteur de C1q). De façon surprenante, elle est également considérée comme un « eat me signal précoce » (ligand de C1q). Elle est en effet exportée à la surface de cellules apoptotiques en association à la phosphatidylsérine, et est capable de fixer les têtes globulaires (GR) de C1q (Paidassi et al., 2011). L'implication exacte et le rôle de chaque partenaire reste encore à définir avec précision mais il semble clair que la calréticuline participe activement à l'élimination des cellules apoptotiques. D'un point de vue structural, son domaine globulaire (N+C) serait impliqué dans l'interaction avec les GR et les CLF de C1q mais pas son domaine P (Paidassi et al., 2011), à l'inverse des précédentes données qui indiquaient qu'un domaine S, contenant une petite partie du domaine N et la majeure partie du domaine P, était requis pour l'interaction avec C1q (Stuart et al., 1997). Pour rappel, il a également été montré que la calréticuline inhibait la fixation du tétramère C1r₂C1s₂ à C1q (Sim et al., 1998), suggérant que celle-ci se fixerait au niveau du site de fixation des protéases ou à proximité. Ce serait également le cas pour la fixation à la MBL et aux ficolines (Duus et al., 2010b). Elle ne serait cependant pas capable de déplacer le complexe déjà formé.

L'homologie entre les calréticulines de certains parasites, comme celle de *T. cruzi* (TcCRT), et la HuCRT au niveau notamment des domaines fonctionnels, laisse supposer que ces calréticulines exogènes pourraient présenter des fonctions similaires. En plus de permettre au parasite d'échapper au système immunitaire, elles pourraient alors perturber les mécanismes dans lesquels la calréticuline humaine est normalement impliquée.

III.2. La TcCRT et son implication dans la maladie de Chagas

III.2.1. La maladie de Chagas

Trypanosoma cruzi est un parasite protozoaire responsable de la maladie de Chagas, une pathologie affectant plus de 12 millions de personnes en Amérique du Sud qui en est le foyer principal. Cette maladie se manifeste par une phase aiguë lors du premier contact, généralement asymptomatique, pour devenir ensuite chronique sans manifestation de symptômes pendant plusieurs années. Dans 30 % des cas et après plus de dix ans, la phase chronique peut devenir symptomatique avec des manifestations cliniques principalement au niveau du cœur (cardiomyopathie), mais également au niveau du système digestif (dilatation du côlon) et, dans une moindre mesure, au niveau du système nerveux (démence).

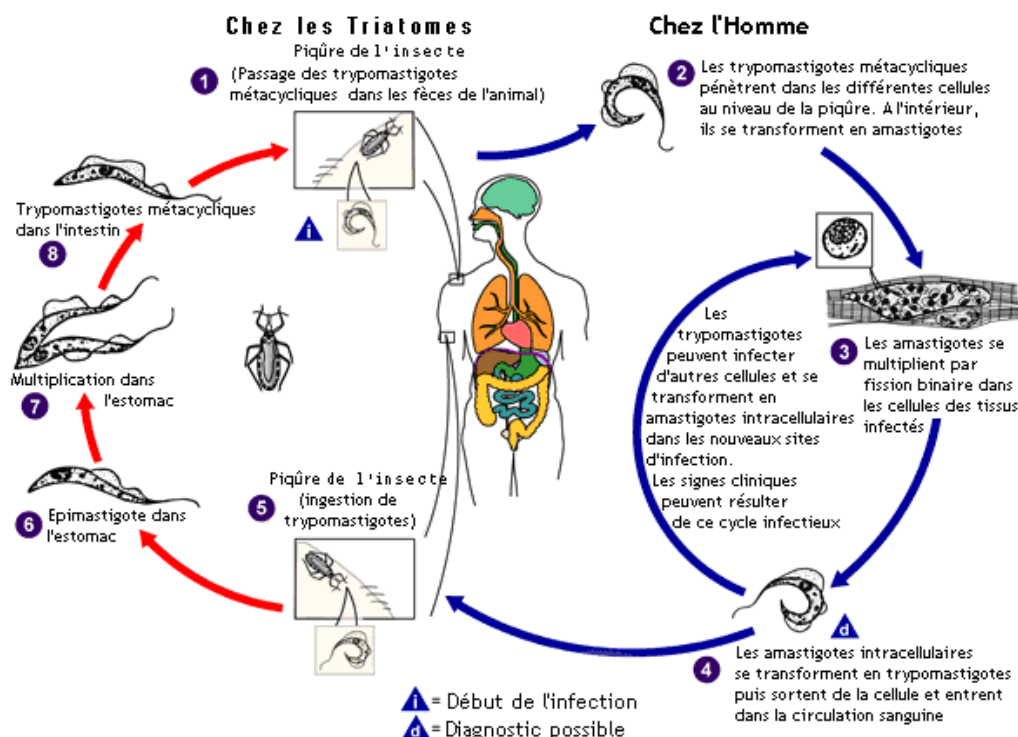


Figure 1.8 : Cycle de vie de *Trypanosoma cruzi*

Source : Center for Disease Control and Prevention (CDC)

Le cycle de vie de ce parasite (*figure 1.8*) est réparti entre deux hôtes, un mammifère (dont l'homme mais il existe plus de 100 espèces de mammifères différentes concernées) et un insecte hématophage (du genre *Triatoma*, dont il existe plus de 150 espèces vectrices du parasite). Le Triatome cohabite généralement dans l'habitat de l'hôte dont il se nourrit. Certaines espèces se sont parfaitement habituées à l'habitat humain et sont notamment présents dans les logements vétustes ou en zone rurale ou sub-urbaine d'Amérique du Sud (toits de chaume, fissures dans les murs). L'urbanisation des populations rurales dans les années 60 a également conduit à l'apparition de contaminations via les transfusions sanguines et les dons d'organes, nécessitant la mise en place d'une politique stricte de contrôle dans les zones endémique. La migration des populations d'Amérique latine et le tourisme conduisent également à une augmentation des cas dans les zones non-endémiques (Amérique du nord, Europe, Asie). Dans les cas de contamination lié au Triatome, le parasite *T. cruzi* est contenu dans les fèces de l'insecte sous forme de trypomastigote. Celui-ci peut alors pénétrer au niveau de lésions de la peau ou par l'alimentation (aliments contaminés). Cette forme du parasite a notamment été la cible de nombreuses études car elle est essentielle à sa survie. En effet, elle lui permet de pénétrer dans les cellules de l'hôte pour se répliquer et de résister à l'action du système immunitaire lorsque le parasite circule dans le sang ou les tissus. A ce titre, la forme trypomastigote est peu sensible à la lyse par le complément, à l'inverse de la forme amastigote, suggérant la mise en place de mécanismes particuliers.

III.2.2. La TcCRT, homologue de la calréticuline humaine

En pénétrant dans les tissus de l'hôte, le trypomastigote va être confronté par le système immunitaire et notamment par les mécanismes effecteurs de l'immunité innée. Comme nous l'avons vu précédemment (*Chapitre 1, section I.6*), les parasites utilisent de nombreuses stratégies pour échapper au système de défense de l'hôte. *T. Cruzi* n'échappe pas à cette règle et possède un arsenal très élaboré de protéines lui permettant d'accomplir cette fonction. La TcCRP (« Complement Regulatory Protein » de *T. cruzi*) et T-DAF (l'homologue DAF de *T. cruzi*) permettent de dissocier les C3-convertases tandis que des lipases décrochent les protéines du complément fixées au parasite (Valck et al., 2010).

D'autres mécanismes d'échappement de *T.cruzi* sont également impliqués dans la parasitémie en facilitant son entrée dans les cellules et sa réplication (DosReis, 2011). Une nouvelle protéine a émergé comme acteur central du mécanisme d'évasion du système immunitaire, la

calréticuline de *T. cruzi* ou TcCRT. Celle-ci a particulièrement retenu l'attention du fait de sa forte identité, environ 50 %, avec la calréticuline humaine. Elle présente une organisation similaire avec des domaines N, P et C qui présentent les mêmes caractéristiques que la HuCRT (Ferreira et al., 2004b). Les domaines N et P sont notamment fortement conservés suggérant que la TcCRT pourrait présenter les mêmes activités que la HuCRT (décrite ci-avant). En effet, elle participe de la même manière à l'homéostasie du calcium et au contrôle qualité des protéines néo-synthétisées dans le RE de *T. cruzi* (Ramirez et al., 2011a). Elle est notamment impliquée dans la maturation de la protéase cruzipaine, une protéine associée à l'augmentation de la réplication du parasite dans les cellules hôtes (DosReis, 2011). Elle ne serait cependant pas capable de prendre en charge les polypeptides non glycosylés. La TcCRT est également retrouvée dans d'autres compartiments et est présente en grande quantité à la surface du trypanomastigote de *T. cruzi*, essentiellement dans la zone d'émergence du flagelle (Souto-Padron et al., 2004). Comme pour la HuCRT, les mécanismes à l'origine de la translocation du RE vers d'autres compartiments sont encore en voie d'élucidation (Villamil Giraldo et al., 2010). Des activités anti-angiogéniques (supérieures à celles de la HuCRT) sont également attribuées à la TcCRT ainsi qu'un rôle dans la diminution de la croissance des tumeurs (Lopez et al., 2010).

L'une des caractéristiques de la maladie de Chagas est la présence d'une forte composante auto-immune avec notamment la synthèse d'anticorps dirigés contre la calréticuline humaine. Il a été proposé que la TcCRT exprimée par *T. cruzi* soit en partie à l'origine de cette réaction auto-immune. En effet, elle présente une forte immunogénicité, conduisant à la synthèse d'anticorps dirigés contre TcCRT potentiellement impliqués dans les processus d'internalisation du parasite (voir plus loin). Ces anticorps sont cependant capables de réagir avec la calréticuline endogène et pourrait alors expliquer les défaillances cardiaques observées chez certains patients chroniques (Hager Ribeiro et al., 2009). Cette hypothèse serait en accord avec les lacunes dans le développement cardiaque observées chez des souris dépourvues de calréticuline et avec l'importance de l'homéostasie du calcium dans ce type d'organe. Plus récemment, il a été suggéré et montré que la TcCRT pouvait interagir avec les collagènes de défense activant le complément, à l'image de son homologue humain (Ferreira et al., 2010; Ferreira et al., 2004b).

L'interaction entre la HuCRT et les collagènes de défense ayant été mise en avant dans les phénomènes de phagocytose et d'inhibition du complément, cela suggérerait que la TcCRT

pourrait également être impliquée dans des mécanismes similaires conduisant à l'évasion du système immunitaire.

III.3. La TcCRT, facteur de virulence de *T. cruzi*

De nombreux éléments suggèrent que la TcCRT serait fortement impliquée dans les mécanismes d'évasion du complément et dans l'augmentation de l'infectiosité de *T. cruzi* (figure 1.9). Lors des phases précoces de l'infection (lors du contact avec les cellules et l'internalisation du parasite), l'expression de l'ARN_m de la TcCRT est fortement amplifiée et corrèle avec une augmentation de l'expression au niveau de la zone d'emergence du flagelle (Ramirez et al., 2011b). Les trypomastigotes, qui expriment une grande quantité de TcCRT, sont relativement insensibles à la lyse par le complément et infectent plus facilement les cellules, à l'inverse des épimastigotes qui expriment peu de TcCRT à leur surface. Le rôle de C1q dans l'infectiosité de *T. cruzi* avait été suggéré par Rimoldi et collaborateurs, sans toutefois identifier la protéine impliquée (Rimoldi et al., 1989). La TcCRT, via son interaction avec les collagènes de défense et notamment avec C1q, serait donc le facteur de virulence contribuant à l'augmentation de l'infectiosité de *T. Cruzi*. Au vu des informations actuellement disponibles, deux mécanismes majeurs impliquant la TcCRT peuvent être dégagés. L'ensemble des points détaillés ici est résumé schématiquement dans la *figure 1.9*, en prenant C1q comme exemple de collagène de défense.

III.3.1. Pénétration dans les cellules de l'hôte

L'interaction de la TcCRT avec les collagènes de défense impliqués dans l'activation du complément a été mise en évidence au début des années 2000, principalement par le travail de Arturo Ferreira et collaborateurs. Les collagènes de défense joueraient alors le rôle de molécules pontantes et faciliteraient l'internalisation du parasite dans les cellules de l'hôte, via une interaction avec des récepteurs présents à leurs surfaces (calréticuline, CR1, CD91). L'internalisation est une étape essentielle dans la vie du parasite car elle lui permet d'échapper aux effecteurs de l'immunité et de se répliquer. Des expériences menées avec une TcCRT recombinante ont montré que celle-ci était capable de se lier, via son domaine S (homologue à 80% avec le domaine S de la HuCRT), au domaine collagénique de C1q (Ferreira et al., 2004b) et à la MBL.

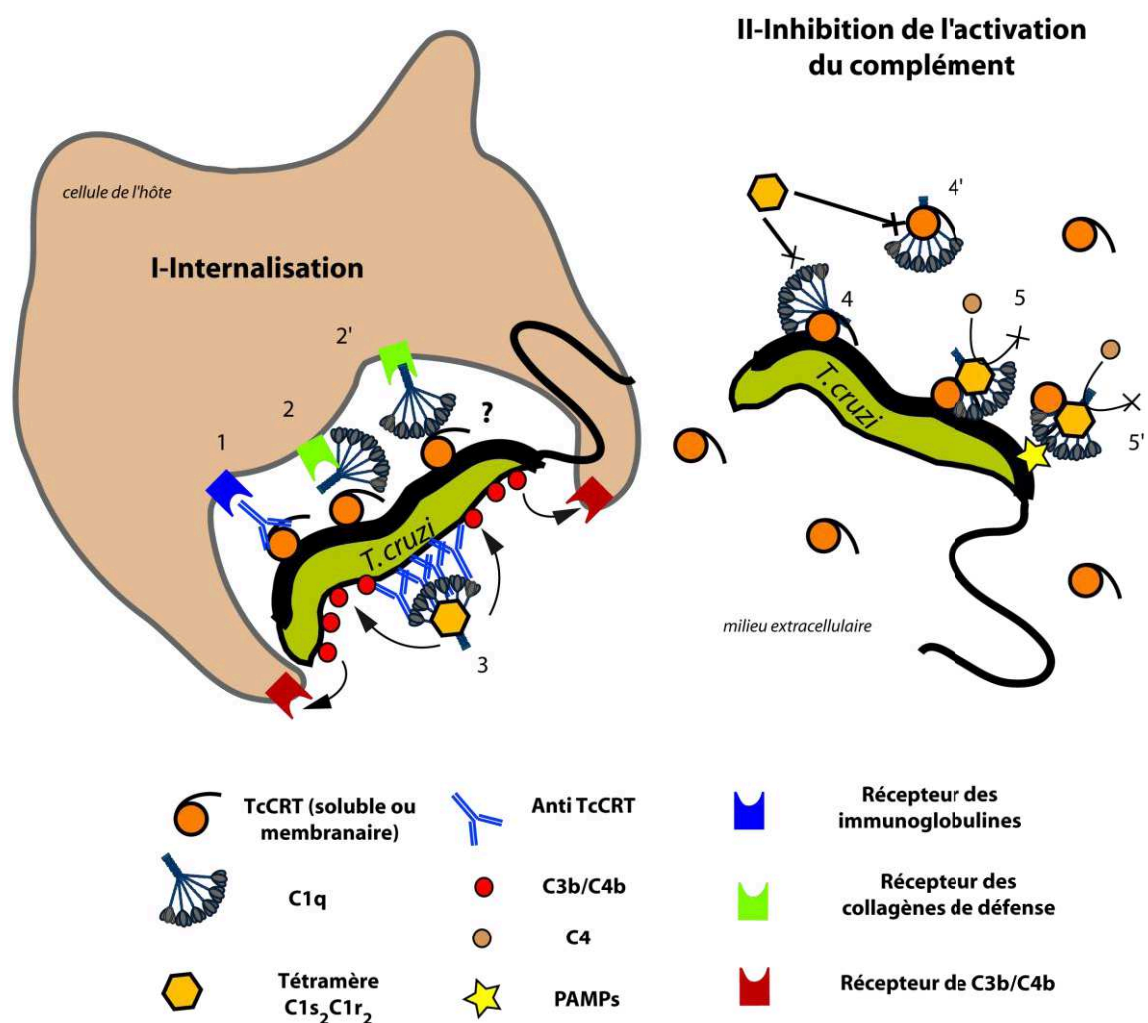


Figure 1.9 : Mécanisme de subversion de *Trypanosoma cruzi* – Cas de C1q

Lié à l'internalisation, 1 : reconnaissance de la TcCRT par des anticorps anti-TcCRT; 2 : interaction des parties collagéniques de C1q avec la calréticuline; 2' : liaison de la TcCRT par les têtes globulaires de C1q; 3 : activation du complément et dépôt de C3b/C4b à la surface de *T. cruzi*. Lié à l'inhibition du complément, 4 et 4' : la TcCRT de surface ou soluble empêche la fixation du tétramère C1r₂C1s₂; 5 et 5' : la TcCRT de surface ou soluble fixe le complexe C1 mais empêche l'activation du complément. Adapté de (Ramirez et al., 2011a)

Au vu des données obtenues avec la HuCRT et de son homologie avec la TcCRT, il semble cependant que le domaine globulaire de la TcCRT (et non le domaine S) soit le site potentiel de fixation de ces collagènes de défense (Paidassi et al., 2011). Des expériences complémentaires sont cependant requises pour confirmer cette hypothèse. Des résultats plus récents (non publiés) suggéreraient également que la TcCRT se fixerait au domaine collagénique de la ficoline L, probablement à proximité du site de fixation des MASPs (Ferreira et al., 2010). Ces résultats sont appuyés par l'observation de la fixation de la ficoline L et de C1q à la surface des trypomastigotes et, dans le cas précis de C1q, par la co-

localisation avec la TcCRT (Ferreira et al., 2004b). Notons qu'aucune information n'est cependant disponible quant à l'implication des têtes globulaires de C1q dans l'interaction, comme observé pour la HuCRT. Cette possibilité reste donc envisageable et devra être évaluée. La forte immunogénicité de la TcCRT favorise également l'infectiosité de *T. cruzi*. Les anticorps générés peuvent se fixer sur les trypomastigotes puis, soit interagir directement avec des récepteurs présents à la surface des cellules de l'hôte (récepteurs des immunoglobulines), soit activer la voie classique (via C1q) conduisant alors au dépôt de C3b et C4b qui seront pris en charge par leurs récepteurs respectifs (CR1, CR3, CR4). L'ensemble de ces phénomènes va alors contribuer au processus d'internalisation de *T. cruzi* et est mis en exergue par l'augmentation de l'infectiosité liée à une précédente immunisation avec la TcCRT (présence d'anticorps anti-TcCRT). Il a également été montré que l'utilisation d'anticorps bloquants (fragments F(ab')₂) contre la TcCRT présente à la surface de *T. cruzi* réduisait l'infectiosité du parasite en présence de C1q, probablement en limitant son internalisation (Ramirez et al., 2011a). Notons à ce titre que ces fragments F(ab')₂, qui ne possèdent pas de partie constante (Fc), sont incapables d'activer le complément ou d'interagir avec les récepteurs des immunoglobulines, suggérant que l'interaction directe entre C1q et la TcCRT (bloquée par le F(ab')₂) joue un rôle prépondérant dans l'infectiosité de *T. cruzi*. Enfin, la présence de plusieurs sites potentiels d'interaction au niveau des tiges collagéniques laisse également entrevoir la possibilité d'avoir plusieurs schémas d'interaction.

III.3.2. Inactivation de la voie du complément

La TcCRT serait également capable d'inhiber, à la surface du trypomastigote ou à proximité (la TcCRT est retrouvée dans le milieu extracellulaire), l'activation de la voie classique (par C1q) et de la voie lectine (par la ficoline L) du complément. Il a été montré que la fixation de C1q à la TcCRT empêchait le recrutement du tétramère C1r₂C1s₂ (Valck et al., 2010), et donc l'activation du complément. De façon troublante, à l'opposé de ce qui est observé avec la HuCRT, le complexe C1 conserverait sa capacité de fixer la TcCRT mais ne pourrait initier la cascade enzymatique (coupure de C4). A ce titre, une interaction avec C1s est suggérée.

La fixation de la TcCRT à proximité ou sur le site de fixation des MASPs de la ficoline L expliquerait également l'inhibition de l'activation de la voie lectine (Ferreira et al., 2010). Pour la MBL, aucune inhibition de l'activation du complément n'a à ce jour été observée en présence de TcCRT et du complexe MBL-MASP, suggérant que la TcCRT n'est pas capable de déplacer la protéase ou de bloquer le clivage de C4, comme observé pour C1q (Ferreira et

al., 2004b) et la ficoline L. Ce résultat reste néanmoins troublant compte-tenu de l'homologie structurale et fonctionnelle entre la MBL et la ficoline L.

La TcCRT joue donc un rôle majeur dans la capacité de *T. cruzi* à échapper au système immunitaire et à réaliser son cycle d'amplification au sein de la cellule hôte. D'autres parasites expriment également des calréticulines qui participent à leur infectiosité, suggérant des mécanismes d'évasion similaires. Les calréticulines de *Necator americanus* (Kasper et al., 2001) *Trypanosoma carassii* (Oladiran and Belosevic, 2010), *Haemonchus contortus* (Suchitra and Joshi, 2005) interagissent avec C1q et inhibent l'activation de la voie classique du complément, tandis que la calréticuline de *Entamoeba histolytica* participe à la phagocytose des cellules de l'hôte par l'intermédiaire de C1q (Vaithilingam et al., 2012).

IV. CR1(CD35), récepteur pour C3b et C4b

CR1, récepteur pour C3b et C4b aussi connu sous la terminologie CD35, est un récepteur membranaire, membre des régulateurs du complément (avec DAF, MCP, le facteur H et la C4bp), trouvé à la surface de différents types cellulaires. Grâce à sa capacité à lier les opsonines C3b et C4b, il participe activement à la protection des cellules de l'hôte en inactivant le complément, mais concourt également à l'élimination de débris et particules avec d'autres récepteurs des opsonines. Plus récemment, il a été montré que CR1 était également capable de lier certains collagènes de défense, C1q et la MBL, renforçant son implication dans de nombreux processus et notamment dans l'élimination des cellules apoptotiques ou la phagocytose des pathogènes (comme suggéré pour la calréticuline). Cette capacité de CR1 de fixer une grande variété d'opsonines (CR1 est une véritable plateforme de liaison) en fait un récepteur incontournable du système immunitaire, expliquant en partie son implication dans de nombreuses pathologies. Nous donnerons ici un aperçu de l'état des connaissances sur ce récepteur en mettant en exergue son rôle dans la fixation des collagènes de défense.

IV.1. Généralités

IV.1.1. Localisation

CR1 a premièrement été identifié comme le récepteur des opsonines C3b en tant que gp205 à la surface des érythrocytes, des neutrophiles, des lymphocytes B et des monocytes (Fearon, 1980). Par la suite, il a également été identifié à la surface des éosinophiles (Fischer et al.,

1986), sur les podocytes glomérulaires (Pascual et al., 1994b), sur des macrophages et des cellules dendritiques (Nauta et al., 2004). CR1 serait également exprimé sur des sous-populations de lymphocytes T (Cohen et al., 1989), mais les résultats divergent concernant les populations concernées (CD4 -/+ et/ou CD8-/+) et seraient très dépendants du donneur considéré (Erdei et al., 2009b). Les quantités de molécules de CR1 déterminées expérimentalement sur chaque type cellulaire sont récapitulées dans le *tableau 1.6*. Bien que CR1 soit faiblement exprimé à la surface des érythrocytes par rapport aux autres types cellulaires, ces cellules constituent néanmoins le réservoir en CR1 le plus important du fait de leur prédominance dans la circulation (les érythrocytes contiennent 90% du CR1). Dans les neutrophiles, CR1 est également contenu dans des vésicules sécrétoires qui peuvent être mobilisées selon certains stimuli pro-inflammatoires (Sengelov, 1995).

Les niveaux de CR1 exprimés à la surface des cellules sont extrêmement dépendants de facteurs génétiques et environnementaux. La répartition de CR1 à la surface de différents types cellulaires est également associée avec un certain nombre de fonctions qui seront détaillées plus loin dans cette partie (*Chapitre 1, section IV.4*). Une forme soluble de CR1 (sans les domaines transmembranaire et cytoplasmique) est également retrouvée dans le plasma mais en très faible quantité (30 ng/mL), suggérant qu'elle n'aurait pas de rôle physiologique global mais pourrait avoir un effet local (sur le site d'inflammation par exemple) suite à sa libération par des leucocytes par « shedding » (Danielsson et al., 1994).

Type cellulaire	Quantité (en nombre de molécule)	Références
Erythrocytes	169-1333	(Jouvin et al., 1986)
Monocytes/ Macrophages	5000-48000	(Fearon, 1980; Katyal et al., 2001; Khera and Das, 2009)
Lymphocytes B	20000-40000	(Krych-Goldberg and Atkinson, 2001)
Lymphocytes T (sous population)	2700-18000	(Yaskanin and Waxman, 1995)
Neutrophiles	5000-50000*	(Krych-Goldberg and Atkinson, 2001)
Oesoniphiles	20000	(Fischer et al., 1986)
Podocytes glomérulaires	200000	(Pascual et al., 1994b)

Tableau 1.6 : Expression de CR1 à la surface de différents types cellulaires

* sous condition de régulation par mobilisation de vésicules sécrétoires

Cette forme proviendrait d'un clivage protéolytique au niveau de la partie transmembranaire qui se produirait soit dans les vésicules sécrétoires soit à la membrane (Hamer et al., 1998). Une autre forme de CR1 est également retrouvée dans les urines (uCR1) et proviendrait de vésicules lipidiques issues des podocytes glomérulaires. Le suivi de sa concentration (2-3 ng/mL chez un patient sain) permettrait de suivre l'évolution de certaines pathologies rénales (Pascual et al., 1994b).

IV.1.2. Régulation de l'expression

Sous l'effet de certains effecteurs, l'expression à la surface de CR1 peut être modulée et celle-ci dépend fortement du type cellulaire considéré. Il a été observé une augmentation de l'expression de CR1 dans les monocytes en présence de $\text{TNF}\alpha$, $\text{TNF}\beta$, IL2 et IL4 (Khera et Das, 2009; Limb et al., 1992). Il est intéressant de noter que certains de ces effecteurs agissent sur la mobilisation des vésicules sécrétoires contenant CR1 comme le GM-CSF (« granulocyte-macrophage colony stimulating factor ») à la surface des neutrophiles (Buckle and Hogg, 1989), mais également sur le contrôle transcriptionnel de l'expression du gène de CR1 (Martin, 2007). Une augmentation d'ARNm codant pour CR1 est notamment détectée dans différentes lignées cellulaires en présence d'acide rétinoïque ou de Ara-C (cytosine arabinoside), un analogue de la cytosine (Funkhouser and Vik, 1999). L' $\text{INF-}\gamma$ aurait un effet semblable sur l'augmentation du nombre de transcrits de CR1 dans les neutrophiles (Arora et al., 2007), pour lesquels un effet de C5a sur l'expression de CR1 avait également été suggéré (Doi et al., 1997). En association avec d'autres stimuli, les complexes immuns influenceraient également les niveaux de CR1. Au niveau des érythrocytes, il a également été suggéré que l'érythropoïétine pourrait augmenter l'expression de CR1 en surface (Hebert et al., 1994). En plus de ces effecteurs moléculaires, il a été montré que le niveau d'expression de CR1 à la surface des érythrocytes diminuait avec l'âge de la cellule (Cohen et al., 1992. Sim et al., 1983) mais également avec l'âge du donneur (Shapiro et al., 1994). Dans certaines pathologies (voir *Chapitre 1, section IV.5.3 et 5.4*), une diminution acquise de l'expression de CR1 à la surface des érythrocytes et des leucocytes est également observée chez les patients atteints de SLE (Arora et al., 2011; Kiss et al., 1999) et du VIH (Munson et al., 1995; Cohen et al., 1988).

IV.1.3. Génétique et polymorphisme

IV.1.3.1. Organisation génétique

Comme les autres régulateurs du complément (MCP, DAF, facteur H et C4bp), la séquence codante de CR1/CD35 est contenue dans le cluster de gène RCA (figure 1.10), situé sur le chromosome 1 au niveau de la bande q32 (1q32) (Krych-Goldberg and Atkinson, 2001). Les protéines codées par ce cluster sont composées en majeure partie de l'assemblage de plusieurs unités d'un même domaine structural, le module CCP ou SCR ou encore domaine Sushi (« Complement Control Protein repeat » ou « Short Consensus Repeat »), dont la structure sera détaillée plus loin (*Chapitre 1, section IV.2.1*). La partie extracellulaire de CR1 est uniquement composée de ces domaines CCP qui peuvent être regroupés en de plus larges unités sur la base d'homologies internes, les LHRs pour « Long Homologous Repeat », contenant chacun 7 domaines CCP. Chez l'homme, il existe 4 variants alléliques de CR1 : CR1*1, CR1*2, CR1*3 et CR1*4 (*tableau 1.7*). Ils sont obtenus à partir du précurseur CR1*3 (contenant les LHR-A, C et D) par des « crossing-over » inégaux (*figure 1.10*) entre des LHRs homologues (Wong et al., 1989). Chaque variant possède une seule copie entière du LHR-D mais se distingue par un nombre variable de copies (1 à 3) d'un même site qui est similaire au LHR-C, site auquel est associée la capacité de fixation de C3b (Krych-Goldberg and Atkinson, 2001). Le variant CR1*1 est le plus fréquent suivi par le variant CR1*2, les deux autres variants étant beaucoup moins représentés. Ces fréquences sont observées dans l'ensemble des ethnies étudiées, les homozygoties CR1*1/CR1*1 et les hétérozygoties CR1*1/CR1*2 étant retrouvées le plus souvent (Khera and Das, 2009). Dans ce chapitre, nous ne nous intéresserons qu'au variant le plus représentatif, à savoir CR1*1 (en bleu dans le *tableau 1.7*). Dans CR1*1, l'homologie entre les différents modules CCP a permis de les classer en 4 groupes a, b, c et d. De façon intéressante, les 2 premiers modules CCP du LHR-A (CCP 1 à 2) sont différents des deux premiers modules CCP du LHR-B (CCP 8 à 9) et du LHR-C (CCP 15 à 16) qui sont très homologues entre eux (99%). A l'inverse, les 4 premiers CCP du LHR-D (CCP 22 à 25) ne présentent qu'une faible homologie avec les autres modules CCP de CR1, suggérant une fonction différente de celle des LHR-A, -B et -C (Klickstein et al., 1988). Cette particularité explique notamment la variété de ligands pris en charge par CR1.

Ceux-ci, dont certains modifient la charge portée par l'acide aminé, influenceraient la stabilité de CR1 et conduiraient à un taux plus faible de protéines exportées à la membrane, expliquant le phénotype observé (Stoute, 2011). Il est intéressant de noter que ces différents polymorphismes n'exercent pas le même effet en fonction de l'ethnie considérée. Des études ont également été réalisées sur des SNPs situés dans la région promotrice de CR1 et 3' UTR (« 3' untranslated region ») mais aucune corrélation n'a pu être établie. A la surface des leucocytes, les variations du niveau d'expression ont été associées à une composante tissulaire, conduisant à des différences dans les mécanismes de régulation de l'expression de CR1 (Wilson et al., 1986a).

Les polymorphismes **R483C** et **Q981H** (Birmingham et al., 2007) modifient certaines fonctions de CR1 (liées à la fixation de C3b et C4b) et leur distribution varie en fonction des populations concernées. D'autres, comme les SNPs **D1850H** (CCP28) et **T1876I** (CCP29), n'ont pas encore été corrélés à un quelconque phénotype et nécessitent d'autres investigations (Stoute, 2011). Certains de ces SNPs sont associés aux antigènes du système du Knops qui fait partie des 25 systèmes (dont ABO, Rhésus) permettant de définir les groupes sanguins. Ils ont été spécifiquement identifiés dans le LHR-D de CR1 au niveau des modules CCP 22-23 (exon 26) et CCP 24-25 (exon 29). Les différents « Knops groups » identifiés jusqu'à ce jour ainsi que les mutations associées sont indiqués dans le *tableau 1.8*. De façon intéressante, de nombreux SNPs sont localisés à l'intérieur du LHR-D, renforçant l'attrait de cette zone de CR1 pour des études fonctionnelles. On notera que des liens ont été établis ou suggérés entre certains de ces SNPs et des pathologies comme la malaria ou la maladie d'Alzheimer. Leur implication sera détaillée dans la partie consacrée (*Chapitre 1, section IV.5*).

Allèles *	SNP associé	Localisation
SI1/SI2 (KN 4 / 7)	R1601/G1601	CCP 25
Kn ^a /Kn ^b (KN 1 / 2)	V1561/M1561	CCP 24
McC ^a / McC ^b (KN 3 / 6)	K1590/E1590	CCP 25 (à la jonction CCP 24-25)
Yk ^a / Yk ^{a-} (KN 5)	T1408/M1408	CCP 22-23
SL3 (KN 8)	R1601 et S1610	CCP 25
KCAM (KN 9)	I1615V	CCP 25

Tableau 1.8 : Système du Knops – Polymorphismes associés à CR1/CD35

D'après (Stoute, 2011). * L'ancienne nomenclature (SI1, McC^a...) a été remplacée par la nomenclature ISBT (International Society of Blood Transfusion) avec les nombres KN 1 à 9 (en rouge dans le tableau).

IV.2. Structure

IV.2.1. Généralités

CR1/CD35 est une glycoprotéine membranaire possédant une partie extracellulaire, un segment transmembranaire et une extension cytoplasmique. La partie extracellulaire est composée, comme d'autres protéines codées par le cluster RCA, d'une succession de modules CCP (*figure 1.11*). CR1 est celle qui contient le plus grand nombre de modules CCP, avec au total 30 répétitions qui s'organisent en LHR (A, B, C et D) sur la base d'homologies internes allant de 45 à 100 % (Nickells et al., 1998). Chaque module CCP identifié à ce jour est composé d'environ 60 acides aminés et est caractérisé par la conservation stricte de 4 cystéines et d'un résidu de tryptophane. Dans plus de 40 % des modules CCP, 13 autres résidus majoritairement hydrophobes sont également conservés (Krych-Goldberg and Atkinson, 2001), suggérant un repliement identique pour l'ensemble des modules CCPs. En effet, ces résidus conservés forment un cœur hydrophobe enveloppé dans un réseau de 7 à 8 brins β (dont le nombre dépend des auteurs) maintenu par 2 ponts disulfures, respectivement entre les 1^{ère} et 3^{ème} cystéines et les 2^{ème} et 4^{ème} cystéines. Sur la base de l'alignement entre 243 séquences de modules CCP (provenant de diverses protéines) et de structures déjà résolues (24 en tout), un modèle consensus du module CCP a pu être établi (*figure 1.11*) et a été utilisé pour construire un modèle de chaque module CCP de CR1 (Soares et al, 2005). Chaque module CCP, dont la taille moyenne calculée est de 3,6 nm, est relié au CCP suivant par une courte séquence ou « linker », généralement de 3 à 4 acides aminés, située après la quatrième cystéine (module N) et avant la première cystéine (module N+1). Ces « linkers » adoptent une conformation variable en fonction de leur longueur, des acides aminés les constituant et des modules CCP qu'ils relient (Kirkkitadze et al, 1999).

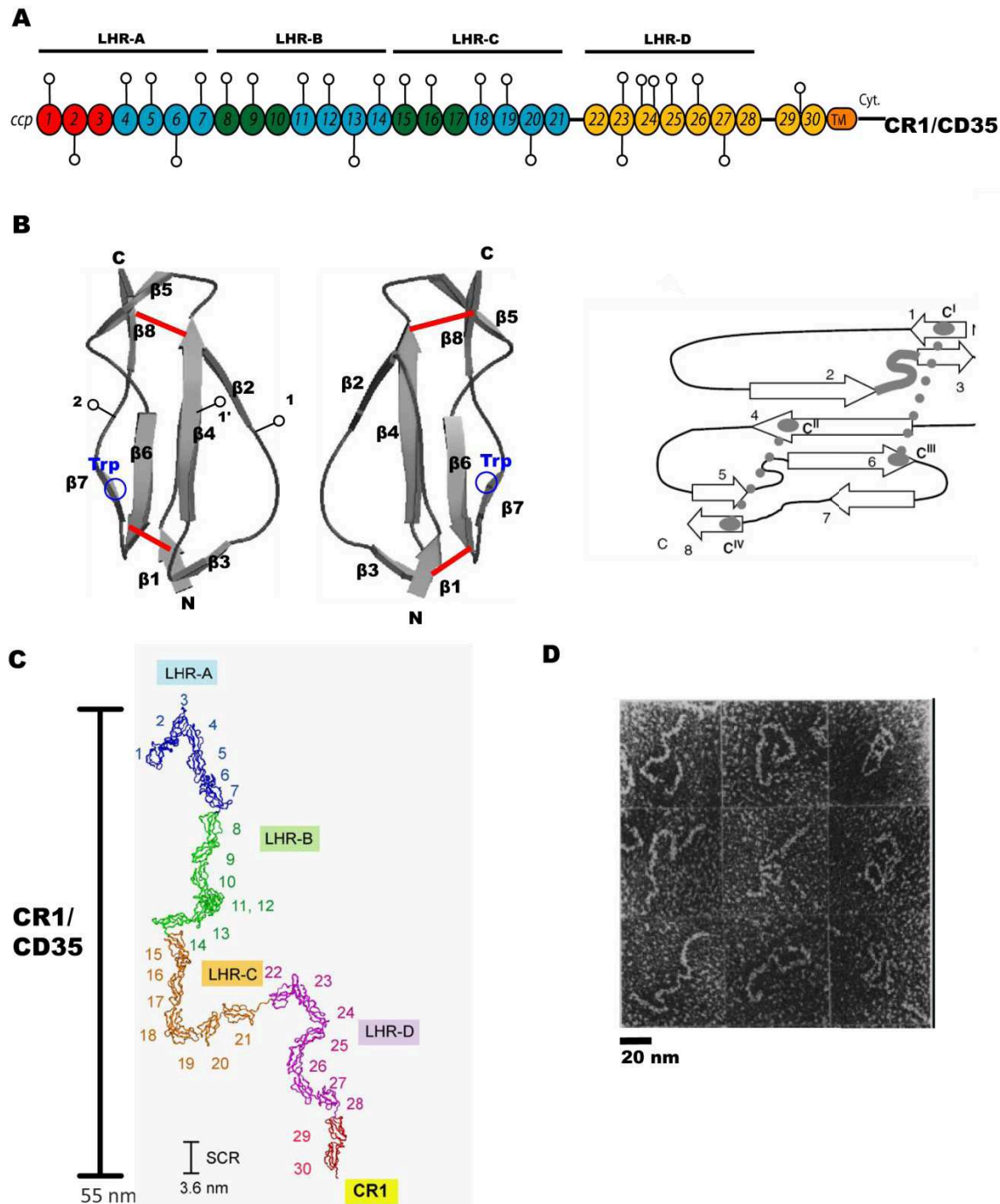


Figure 1.11 : Organisation et structure de CR1/CD35

(A) Représentation schématique linéaire de la succession des modules CCP de CR1. La partie transmembranaire (TM), l'extension cytoplasmique (Cyt.) ainsi que les linkers plus longs entre les modules CCP 21-22 et 28-29 sont indiqués. Les sites potentiels de N-glycosylations sont indiqués par des cercles vides \circ ; l'orientation sur le schéma dépend de leur position sur le module CCP : en haut position 1 ($\beta 2$) et 1' ($\beta 4$), en bas position 2 ($\beta 7$ -8). (B) Structure consensus (à gauche) et représentation schématique (à droite) du module CCP d'après (Barlow et Soares, 2005). Les positions des feuillets β , du tryptophane invariant (cercle bleu) et des deux ponts disulfures (trait rouge) sont indiquées. Les sites potentiels occupés par des N-glycosylations dans CR1 sont représentés par des cercles vides \circ en position 1, 1' et 2. (C) Modèle structural de la partie extracellulaire de CR1 (modules CCP 1 à 30) obtenue par SAXS. D'après (Furtado et al., 2008). (D) Images de microscopie électronique en coloration négative de CR1. D'après (Weisman et al., 1990b).

Il a notamment été montré que ces résidus contribuaient fortement au repliement du module CPP, suggérant leur importance dans le repliement de la molécule entière (Kirkitadze et al., 1999). L'activité de CR1 serait également fortement influencée puisque des mutations dans le « linker » entre les modules CCP 1 et 2 diminuent la capacité de fixation de C4b (Krych-Goldberg et al., 2005). La structure des « linkers » de CR1 est similaire à ce qui est retrouvé dans le facteur H, ce qui n'est pas étonnant puisque ces deux protéines reconnaissent des ligands identiques et sont impliquées dans la dissociation des convertases. Des « linkers » plus longs, de 5 à 8 résidus, sont retrouvés dans le facteur H, CR1 et CR2 (Barlow et Soares, 2005). Dans CR1, la présence d'un « linker » plus long entre les modules CCP 21-22 et 28-29, respectivement de 8 et 7 résidus, conférerait à CR1 une plus grande flexibilité lui permettant de fixer au niveau du LHR-D des ligands assez larges comme les collagènes de défense tout en continuant de fixer d'autres ligands (C3b, C4b) sur le LHR-A, -B et -C (Furtado et al., 2008). Le « linker » entre les modules CCP 21-22 pourrait également conduire à un repliement en « V », comme observé pour CR2, qui laisserait envisager une interaction entre le CCP 25 de CR1 et PfEMP1, une protéine de *Plasmodium falciparum* associée à la virulence de ce parasite (Rowe et al., 2000). Enfin, comme CR1/CD35 est un récepteur membranaire, il est ancré à la membrane par un segment transmembranaire composé d'une unique hélice α longue de 25 acides aminés en majorité hydrophobes (hélice transmembranaire de type I). Celle-ci est suivie par une extension cytoplasmique de 43 acides aminés qui serait impliquée dans la signalisation cellulaire et l'attachement au cytosquelette.

IV.2.2. Structures résolues de CR1

Une première idée du repliement de CR1 (*figure 1.11*) a été fournie par Weisman et collaborateurs avec l'obtention d'images de la partie extracellulaire de CR1 par la technique de microscopie électronique en coloration négative (Weisman et al., 1990a). CR1 apparaît comme une molécule adoptant une structure linéaire avec différents repliements possibles et avec une taille s'échelonnant de 48 à 108 nm (moyenne à 82 ± 25 nm). Plus tard, les structures des modules CCP 15-16 et 16-17, correspondant au site de fixation de C3b, ont été résolues par RMN (Smith et al., 2002). Cependant, la flexibilité entre les modules CCP et la taille de CR1 a limité son étude par cristallographie aux rayons X et RMN à quelques modules uniquement. Plus récemment, la technique de diffraction aux petits angles (SAXS : Small Angle X-ray Scattering) a permis de s'affranchir de ces limitations techniques et d'affiner la structure de CR1 en obtenant un premier modèle de la partie extra-cellulaire

(Furtado et al., 2008). Cette analyse confirme la nature étendue et flexible de la molécule, avec des régions formant des coudes notamment au niveau du LHR-C et du LHR-D. La taille approximative de CR1 dans ce modèle est de 55 ± 5 nm, ce qui est compatible avec les précédentes données de microscopie électronique.

IV.2.3. CR1, une molécule glycosylée

CR1 contient 25 sites potentiels de N-glycosylations (*figure 1.11*) répartis sur l'ensemble du domaine extracellulaire. Des études préliminaires ont établi que CR1 possédait majoritairement des N-glycosylations tri- et tétra-ramifiées, pour un total de 33 000 Da, mais pas de O-glycosylations (Lublin et al., 1986). Sur la base de l'analyse en carbohydrates de CR1, 14 sites seraient potentiellement glycosylés, donnant une masse moyenne pour CR1 de 245 kDa (Furtado et al., 2008). Ceux-ci seraient majoritairement composés de structures bi-antennaires (90%) et minoritairement des structure tri- (8,5%) et tétra-antennaires (1,5%) (Thomas et al., 2004). Furtado et collaborateurs ont déterminé par ultracentrifugation analytique la masse moyenne de la partie extracellulaire de CR1 et ont obtenu une valeur de 235 ± 13 kDa, compatible avec la masse attendue de 245 kDa déterminée à partir de l'analyse en carbohydrates. Peu d'informations sont cependant disponibles sur la localisation des sites glycosylés, la majeure partie des fragments de CR1 étant produits sous des formes déglycosylées pour les études RMN. Tous les sites de N-glycosylation potentiels de CR1 sauf un, entre les CCP 28 et 29, sont exposés en surface au centre des modules CCP mais sur différentes faces. Trois positions sont ainsi identifiées (notation personnelle) : La position 1 à la fin du brin $\beta 2$; la position 1' au niveau du brin $\beta 4$, la position 2 au niveau des brins $\beta 7-8$ (*figure 1.11*). Comme les sucres N-liés ont tendance à s'orienter en s'éloignant de la surface des protéines, il est donc peu probable qu'elles puissent influencer l'orientation des modules CCP entre eux (Furtado et al., 2008). Ces glycosylations sont également importantes pour la stabilité de CR1/CD35, puisqu'elles influencent directement le turnover de la protéine et par voie de conséquence, son export à la membrane. Elles pourraient également avoir un impact sur la fixation de certains ligands comme c'est le cas pour l'interaction avec iC3b. Le type de glycosylation, complexe *versus* high mannose, ne semble cependant pas influencer les fonctions de CR1 (Lublin et al., 1986).

IV.3. Ligands connus de CR1

CR1 est une molécule capable de lier un certain nombre de ligands lui permettant d'assurer ses fonctions à la surface des cellules humaines, fonctions qui seront détaillées dans la section suivante (*Chapitre 1, section IV.4*). Le schéma de la *figure 1.12* représente les domaines de CR1 mis en jeu dans ces interactions.

IV.3.1. C3b/C4b/iC3b

CR1/CD35 a initialement été identifié à la surface des érythrocytes comme le récepteur gp205 fixant l'opsonine C3b issue de l'activation du complément (Fearon, 1980) puis comme le récepteur de l'opsonine C4b (Dobson et al., 1981). L'avènement de la biologie moléculaire a permis de cloner et d'exprimer différentes formes de CR1 afin de localiser avec plus de précision les différents sites d'interaction pour ces deux opsonines. Ainsi, Klickstein et collaborateurs ont exprimé différents variants de CR1 à la surface de cellules COS et ont évalué leur capacité à se lier à des érythrocytes porteurs de C3b ou C4b. Ils ont pu montrer que C4b se liait spécifiquement au LHR-A, tandis que C3b se fixait principalement sur le LHR-B et -C, le LHR-D ne fixant ni C3b ni C4b (Klickstein et al., 1988). Ces auteurs suggèrent que les trois premiers modules CCP de chaque LHR seraient impliqués dans l'interaction avec les opsonines C4b ou C3b. Reilly et collaborateurs ont par la suite prouvé que C4b était également capable de se lier avec une affinité plus faible que C3b sur les LHR-B et -C, mais comparable à celle observée sur le LHR-A (Reilly et al., 1994). Des expériences de mutagenèse dirigée et l'obtention de la structure des modules CCP 15-17, ont permis de définir avec plus de précision les modalités de l'interaction avec C3b et C4b (Krych et al., 1994; Krych-Goldberg and Atkinson, 2001; Krych-Goldberg et al., 1999; Smith et al., 2002). On considère maintenant que les modules CCP 1-3 ou « site 1 » sont impliqués majoritairement dans l'interaction avec C4b et très faiblement avec C3b, tandis que les modules CCP 8-11 et 15-17 ou « site 2 » fixent C3b et faiblement C4b (*figure 1.12*). Un certain nombre de résidus dans le site 1 (Gly⁷⁶, Arg¹⁰⁵, Asn¹⁰⁶, Tyr¹³⁵) sont critiques pour la fixation de C4b et des fonctions associées. Dans le site 2 (LHR-C), c'est majoritairement la modification de la charge de certains acides aminés (Lys⁹⁵³, Lys⁹⁵⁵, Arg⁹⁷⁴, Lys¹⁰⁰⁵, Thr¹⁰³⁹, Asn¹⁰⁵⁰, Lys¹⁰⁵⁷ et Arg¹⁰⁸²) qui conduit à la perte de l'interaction avec C3b. Cette dernière est majoritairement le fait d'interactions ioniques entre des charges positives sur le site 2 (formation d'un « patch » positif) et des charges négatives portées par l'extrémité N-terminale de la chaîne α de C3b (résidus 727 à 768). Des observations similaires ont été faites avec le

site 2 du LHR-B où des résidus spécifiques de l'interaction soit avec C3b soit avec C4b ont pu être identifiés (Smith et al., 2002). Notons que certaines mutations dans le site 1, comme D109N et E116K, augmentent la capacité de liaison des ligands et les activités associées (Krych-Goldberg et al., 1999). CR1 peut également se lier à iC3b (ligand de CR2, CR3 et CR4), la version inactivée de C3b résultant de l'activité du facteur I, mais avec une affinité 100 fois inférieure. Ceci explique son transfert de CR1 vers d'autres récepteurs ayant une meilleure affinité pour iC3b (Grattone et al., 1999). iC3b peut ensuite être clivé par le facteur I en C3c et C3d, mais uniquement en présence de CR1 (non observé avec DAF ou MCP)(Lambris et al., 1996). Plus récemment, il a été suggéré que CR1 et CR2 ne reconnaissent pas la même forme de iC3b (Nilsson et al., 2011). Cette capacité des sites 1 et 2 de lier C3b, iC3b et C4b est associée avec la capacité de CR1 à dissocier les C3 et C5 convertases (DAA pour « Decay Accelerating Activity ») et à permettre l'activité du facteur I (CA pour « Cofactor Activity »). Notons que la liaison de dimères de C4b et de C3b a également été observée (Reilly et al., 1994).

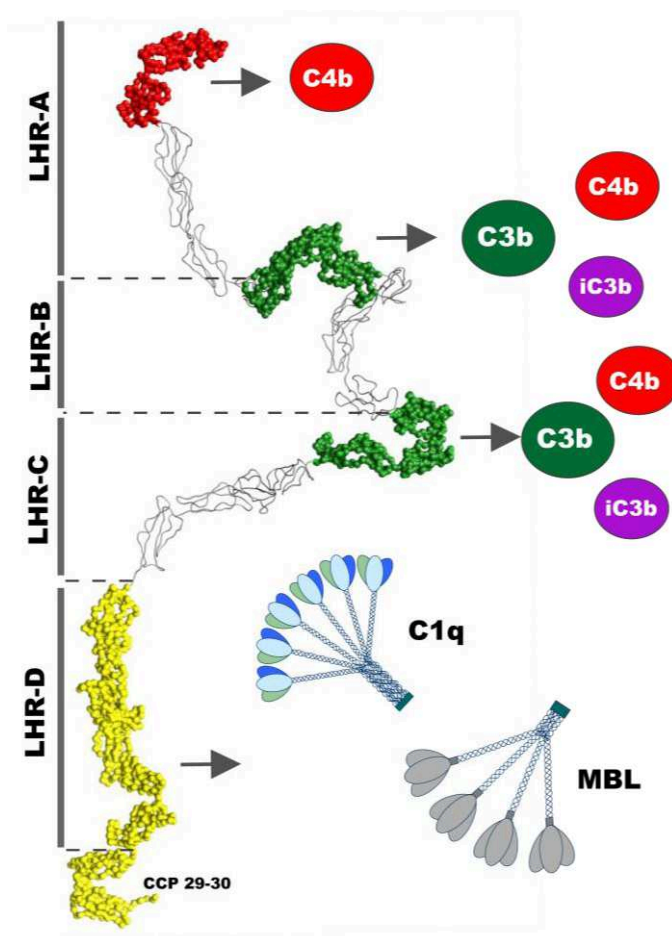


Figure 1.12 : Représentation schématique des sites de fixation de C3b, C4b, C1q et MBL sur CR1/CD35

Le modèle structural de Furtado et collaborateurs (Furtado et al., 2008) a été choisi pour représenter les sites de fixation des ligands de CR1 : site de fixation de C4b ou site 1 (modules CCP 1-3, en rouge), site de fixation de C3b ou site 2 (modules CCP 8-11 et 15-17, en vert), site potentiel de fixation de C1q et MBL (modules CCP 22-30, en jaune).

IV.3.2. C1q et MBL

Dans les années 90, des protéines membranaires capables d'interagir avec C1q ont été isolées (par affinité) à partir d'extraits de membranes issus de différents types cellulaires. Des protéines comme la calréticuline (Peerschke et al., 1993) ou P33 (Peerschke et al., 1994) ont ainsi été identifiées comme récepteurs pour les parties collagéniques ou globulaires de C1q. Une corrélation entre l'expression de CR1, le récepteur des opsonines C3b et C4b, et l'augmentation de la fixation de C1q sur des PMNs a également été observée, suggérant que CR1 pourrait être un récepteur de C1q (Jack et al., 1994). Klickstein et collaborateurs ont ensuite fourni la première évidence concrète d'une telle interaction en évaluant par SPR et par ELISA la fixation de C1q sur la partie extracellulaire de CR1 immobilisée ou sur du CR1 exprimé à la surface de cellules (Klickstein et al., 1997). Les affinités calculées sont de l'ordre du nanomolaire pour l'interaction entre C1q et CR1 (0,5 nM par ELISA et 3,4 nM par SPR), qui mettraient en jeu les fragments collagéniques de C1q. Le site de fixation de C1q sur CR1 est quant à lui supposé prendre place au niveau des modules CCP 22-30 et cette fixation est très sensible aux variations de la concentration en sels, suggérant l'implication d'interactions ioniques. Dans cette même étude, les auteurs indiquent qu'il est difficile de visualiser l'interaction lorsque C1q est immobilisé, laissant supposer que celui-ci aurait une valence plus importante pour CR1 qu'inversement, et/ou que l'interaction nécessiterait l'intervention de plusieurs molécules de CR1. Cet élément pointe également l'importance de placer CR1 dans un contexte proche de celui de la membrane où il a été montré qu'il était présent sous forme de clusters dans les érythrocytes (Chevalier and Kazatchkine, 1989).

Plusieurs molécules de CR1 pourraient alors interagir avec au maximum 6 sites présents sur une molécule de C1q (1 par tige). Des expériences complémentaires ont apporté la preuve que CR1 pouvait fixer à la fois C3b/C4b et C1q, suggérant que C1q se fixerait sur un site différent de ceux de C3b/C4b (LHR-A,-B et-C), et soutiennent l'hypothèse d'un site d'interaction présent dans les modules CCP 22 à 30 (Tas et al., 1999). De façon intéressante, cette fixation n'a pas pu être bloquée par des anticorps reconnaissant des épitopes situés au niveau des modules CCP 22 à 25 ou 29-30 (Nickells et al., 1998), indiquant que certains de ces modules ou parties de modules ne seraient probablement pas impliqués dans l'interaction. Le fait que le complexe C1 se fixe plus faiblement que C1q à des érythrocytes exprimant CR1 et, que l'ajout d'EDTA ou de C1-INH (qui déplace le tétramère C1s₂C1r₂) permette de retrouver cette interaction, indiquent probablement que CR1 se fixerait à proximité ou au niveau du site

d'interaction de C1s₂C1r₂. Très récemment, l'interaction de fragments de CR1 sur du C1q immobilisé a été évaluée par une autre équipe (Tetteh-Quarcoo et al., 2012). Les auteurs montrent que les modules CCP 15-17 contribueraient majoritairement à la liaison de C1q au fragment CR1 CCP 15-25. Ces résultats sont en opposition avec les hypothèses de Tas et collaborateurs qui localisent le site d'interaction de C1q dans les modules CCP 22-30 de CR1 et soutiennent la non-implication du site 2 dans le LHR-C (Tas et al., 1999). Tetteh-Quarcoo et collaborateurs montrent également que C1q se fixe plus fortement sur CR1 que sur CR1 CCP 15-25 immobilisé (par ELISA), suggérant la présence d'un second site en dehors de ces modules CCP ou la contribution de la structure entière dans la stabilisation de l'interaction. Néanmoins, ces informations nécessitent d'être vérifiées d'autant que les fragments sont produits dans un système différent du CR1 entier et que les quantités immobilisées ne sont pas clairement spécifiées.

L'homologie entre C1q et la MBL a conduit Klickstein et collaborateurs à évaluer la fixation de la MBL à CR1 (Ghiran et al., 2000). Ils ont ainsi montré que la MBL interagissait avec CR1 immobilisé via son domaine collagénique avec une affinité semblable à celle déterminée pour C1q ($K_D = 5,2$ nM). La plus faible affinité de CR1 pour la MBL immobilisée ($K_D = 45$ nM) suggère, comme pour C1q, la présence de plusieurs sites d'interaction au niveau de ce collagène de défense (dépendant du degré d'oligomérisation de la MBL) et la présence de phénomènes d'avidité. Les auteurs soulignent que CR1 forme un complexe plus stable avec la MBL qu'avec C1q et que ces deux collagènes de défense partageraient un même site de fixation sur CR1 (ou du moins des sites proches), indiquant la possible implication des modules CCP 22-30 dans l'interaction avec la MBL. Aucune étude n'a cependant encore identifié avec précision le site d'interaction des collagènes de défense dans CR1, et précisément dans les modules CCP 22-30. Les collagènes de défense apparus plus récemment (ficolines, CL-K1) doivent également être évalués quant à leur capacité de fixer CR1, ceci afin de généraliser et conforter son implication comme récepteur de ce type de molécules.

IV.3.3. Autres ligands identifiés

Les composés polysulfatés tels que le sulfate de dextran, l'héparine et le sulfate de chondroïtine ont été identifiés comme ligands potentiels de CR1 par leur capacité à inhiber l'interaction entre des complexes immuns recouverts de C3b et des érythrocytes exprimant CR1 (Jepsen et al., 1987). Cette inhibition est dépendante de la quantité de sulfates présents

(chargés négativement) et impliquerait une fixation à proximité du site d'interaction de C3b (site 2). Ceci est en accord avec nos connaissances sur cette interaction qui met en jeu des charges négatives sur C3b et des charges positives sur le site 2 (CR1). Les composés polysulfatés étant largement porteurs de charges négatives, on peut alors imaginer sans difficulté qu'ils puissent interagir avec CR1 d'autant plus que le facteur H, une protéine régulatrice du complément très similaire à CR1, possède également de nombreux sites de fixation pour l'héparine dans ses modules CCP (Ormsby et al., 2006). La capacité de fixation à l'héparine a été utilisée à ce titre par différents groupes pour purifier CR1 (Ishii et al., 2003; Seya et al., 1985). Très récemment, Lepse et collaborateurs ont rapporté que CpG-DNA, un analogue synthétique de l'ADN bactérien, était capable de se fixer à CR1 de façon spécifique (Lepse et al., 2011). Il est intéressant de noter que CpG-DNA est un ligand du récepteur Toll-like 9 (TLR9) qui est impliqué dans la stimulation de nombreuses cellules du système immunitaire grâce à l'activation de voies de signalisation cellulaire. Cette activation conduit notamment à la synthèse de différentes cytokines pro-inflammatoires. Ce nouveau ligand potentiel de CR1, dont la mise en évidence n'a pas encore été publiée, laisse entrevoir de nouveaux rôles pour CR1, dont celui de co-récepteur du TLR9 qui a été suggéré pour la fixation de certains CpG-DNA (Verthelyi and Zeuner, 2003). Les nombreuses charges négatives présentes sur cette molécule pourraient expliquer sa capacité de liaison à CR1, à l'image de ce qui a été mis en évidence pour C3b et l'héparine.

IV.4. Activités biologiques

Par sa capacité à fixer une grande variété de ligands, CR1 est considéré comme étant la protéine du cluster RCA la plus versatile, ce qui lui confère notamment un rôle primordial dans de nombreux processus biologiques (*figure 1.13*)

IV.4.1. Protection des cellules du soi

Comme nous l'avons vu, CR1/CD35 est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires dont un certain nombre (monocytes, macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T) est impliqué dans l'établissement de la réponse immunitaire. Ces cellules sont par conséquent localisées ou recrutées à proximité du lieu d'activation du complément. Pour éviter que ces cellules et les cellules du soi environnantes ne deviennent elles aussi la cible de cette activation, CR1 joue un rôle de régulateur par sa capacité à fixer les opsonines C3b et C4b.

Les études sur la fixation de ces deux molécules ont permis de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents et de comprendre dans quelle mesure CR1 était impliqué.

IV.4.1.1. Activité de cofacteur pour le facteur I (CA)

Le facteur I est une protéase à sérine plasmatique responsable du clivage de C3b/C4b dans un premier temps en iC3b et iC4b. Cependant, cette activité nécessite la présence d'un cofacteur qui peut être soit soluble comme le facteur H et la C4bp (uniquement pour C4b), soit membranaire comme CR1 et MCP. iC3b et iC4b peuvent ensuite être clivés par le facteur I en d'autres sous-produits, respectivement C3c et C3d ou C4c et C4d. Comparativement au facteur H et à MCP, CR1 est le seul à être cofacteur du facteur I pour le clivage de iC3b en C3c et C3d. Ces différences peuvent s'expliquer par la manière de se fixer à C3b qui semble différente dans le cas de MCP (Lambris et al., 1996). Pour CR1, cette activité de cofacteur est principalement portée par le site 2 de CR1 qui, rappelons le, fixe avec une forte affinité C3b et plus faiblement C4b. Des mutations dans les résidus du site 2 impliqués dans l'interaction avec C3b ou C4b influencent directement l'activité de cofacteur de CR1. Cependant, certaines mutations (K566E, I573A, P574A) n'influencent que peu la fixation des ligands mais ont un impact important sur l'activité de cofacteur de CR1, suggérant que cette activité pourrait impliquer une interaction entre le facteur I et CR1 (Krych-Goldberg and Atkinson, 2001). Au delà du fait de limiter l'activation et le dépôt du complément à la surface des cellules du soi, cette activité permet de contribuer à l'élimination des surfaces recouvertes par C3b (généralement associées à un danger) en procédant à une modification des récepteurs impliqués, chaque récepteur ayant une affinité propre pour chacun des produits de protéolyse considérés (C3b, iC3b, C3d). Ainsi, iC3b pourra être pris en charge par les récepteurs CR3 et CR4 exprimés à la surface de cellules de types phagocytaires, tandis que C3d, qui nécessite la présence exclusive de CR1, sera pris en charge par CR2 qui n'est présent que sur certaines cellules comme les lymphocytes B (Liu and Niu, 2009). Ce « shift » entre récepteurs est d'une importance capitale dans l'élimination des pathogènes (voir IV.4.4) et des complexes immuns (voir IV.4.2), mais également dans l'activation des lymphocytes B (voir IV.4.3). Il permet également d'expliquer comment des pathogènes parviennent à échapper au système immunitaire en envahissant certains types cellulaires.

IV.4.1.2. Dissociation des C3 et C5 convertases (DAA)

Les C3 (C4b2b et C3bBb) et C5 (C4b2b3b ou C3bBb3b) convertases, nécessaires à l'activation du complément, peuvent être déstabilisées et dissociées en leurs différents éléments (C4b, C2b, C3b, Bb) par l'interaction entre CR1 et C3b/C4b. Le site 1 (CCP 1 à 3) est responsable de cette activité pour les C3 convertases, à la fois pour la C3 convertase de la voie classique via une interaction avec C4b, mais également pour la C3 convertase de la voie alterne en interagissant avec C3b. Ceci est très surprenant compte-tenu des faibles capacités de fixation du site 1 pour C3b mais a déjà été observé pour DAF (Krych-Goldberg and Atkinson, 2001). Il est cependant possible que CR1 ait une meilleure affinité pour la C3-convertase que pour C3b ou C4b, suggérant la présence d'autres sites d'interaction ou d'une modification de C3b dans la convertase. Ceci est mis en exergue par la présence de résidus clés (Trp⁷, Phe⁸², Ser⁹⁹ et Thr¹⁰³) dont la mutation ne modifie pas l'interaction avec les ligands mais diminue fortement l'activité DAA pour la C3 convertase (Krych-Goldberg et al., 1999). Du fait de la présence d'une faible activité de DAA pour le site 2 présent sur le LHR-B et -C, certains éléments indiquent que le site 2 participerait dans une moindre mesure à la dissociation de la C3 convertase classique mais pas de la C3 convertase alterne. Pour la dissociation de la C5 convertase, le site 1 est requis mais également le site 2 grâce à sa capacité de fixation de C3b (Krych-Goldberg and Atkinson, 2001). A ce titre, la présence des modules CCP 4 à 7 sont nécessaires pour obtenir une activité optimale (Krych-Goldberg et al., 1999). Ces modules, qui ne participent pas à la liaison des ligands, permettraient d'optimiser la fixation de C3b en fournissant l'espacement nécessaire pour fixer les dimères C3bC3b ou C4bC3b contenus dans ces convertases. Cet élément est en accord avec la meilleure affinité observée pour le dimère de C3b comparativement au monomère (Makrides et al., 1992; Reilly et al., 1994). Enfin, un minimum de deux modules CCP entre les sites 1 et 2 est suffisant pour assurer 100 % de l'activité DAA sur la C5 convertase (Krych-Goldberg et al., 2005).

IV.4.1.3. Un rôle pour la fixation de C1q ?

Comme nous l'avons vu précédemment, le site de fixation de CR1 dans C1q se situerait au niveau ou à proximité du site d'interaction de C1s₂C1r₂, expliquant la faible fixation du complexe C1 à CR1 (Tas et al., 1999). Il serait intéressant d'envisager la possibilité que l'interaction entre CR1 et C1q puisse inhiber l'activation du complément en empêchant l'interaction avec le tétramère. Ceci ne pourrait cependant se produire que sur le lieu d'une

inflammation avec du C1q nouvellement synthétisé, le C1q circulant étant majoritairement présent sous forme de complexe C1. Une hypothèse identique pourrait également être formulée pour la MBL bien que celle-ci s'explique moins facilement du fait de la synthèse exclusivement hépatique de la MBL.

IV.4.2. Elimination des complexes immuns

Les complexes immuns (CI) sont composés d'antigènes solubles recouverts par des immunoglobulines G (IgG) ou M (IgM) que l'on retrouve dans la circulation après une stimulation immunitaire. C1q reconnaît ces complexes immuns et active la voie classique du complément conduisant au dépôt des opsonines C3b et C4b. Ces complexes sont ensuite éliminés de la circulation grâce à leur prise en charge par les érythrocytes qui les transportent vers le foie et la rate. Au niveau de ces organes des macrophages résidents, comme les cellules de Kupffer, vont décrocher de façon concertée ces CI des érythrocytes sans lyser les cellules puis les internaliser pour les détruire (Henderson et al., 2002). En effet, le C3b présent en surface des CI est clivé en iC3b par le facteur I en présence de CR1. iC3b est alors transféré à CR3 et CR4 présents en grande densité sur les cellules de Kupffer (Katyal et al., 2001), ce mécanisme étant essentiel pour la clairance des CI de la circulation. CR1 est majoritairement présent à la surface des érythrocytes et est à ce titre principalement impliqué dans l'élimination de ces complexes immuns grâce à sa capacité à fixer le C3b et le C4b (Jepsen et al., 1987; Khera and Das, 2009). Bien que les érythrocytes fassent partie des cellules exprimant le moins de molécules de CR1 à leur surface, ils possèdent cependant la plus grande capacité de fixation des complexes immuns. Cela serait lié à l'organisation de CR1 sous forme de « clusters » qui favoriserait une interaction multivalente avec les opsonines C3b recouvrant les CI (Paccaud et al., 1990b). La formation de « clusters » de CR1 a été identifiée premièrement à la surface des érythrocytes (Chevalier and Kazatchkine, 1989) mais ceux-ci sont également présents en plus faible proportion à la surface des neutrophiles (15% contre 50 % dans les érythrocytes). Cette différence expliquerait pourquoi les complexes immuns sont pris en charge en priorité par les érythrocytes et peu par d'autres types cellulaires. Dans les deux cas, un minimum de 3 molécules de CR1 semble impliqué dans chaque cluster (Paccaud et al., 1990a). La méthodologie employée à l'époque donnait cependant des résultats très variables, allant de 3 à 82 clusters avec en moyenne de 4 à 67 molécules de CR1 par cluster. Une technique plus récente estime que le nombre de clusters serait de 61 à 124 avec un espacement d'environ 79 nm. Cependant, cette étude ne nous

informe pas sur le nombre de molécules de CR1 contenu dans chaque cluster (Lapin et al., 2012). De plus, de récents résultats semblent indiquer que CR1 adopte une configuration dispersée à la surface des érythrocytes, la formation des « clusters » étant initiée suite à la liaison des complexes immuns (Ghiran et al., 2008). L'induction de ce regroupement serait associée à des interactions avec le cytosquelette. En effet, CR1 possède 2 sites PDZ dans sa partie cytoplasmique (SSV et SRV) lui permettant d'interagir avec FAP-1, une protéine faisant le lien avec le cytosquelette d'actine et de β -spectrine. Ces mêmes auteurs ont également prouvé que l'interaction avec CR1 entraînait une cascade de signalisation dépendante du calcium conduisant à une augmentation de la déformabilité membranaire, caractéristique essentielle des érythrocytes pour circuler rapidement dans les capillaires et ainsi atteindre notamment les cellules de Kupffer (Glodek et al., 2010).

Le fait que CR1 puisse également interagir avec C1q et MBL (Ghiran et al., 2000; Tas et al., 1999), des molécules reconnaissant des motifs présents à la surface des complexes immuns, suggère que ce type d'interactions pourrait également contribuer à l'élimination des CI et être associé au même effet que la fixation de C3b.

IV.4.3. Activation des lymphocytes

IV.4.3.1. Activation des lymphocytes B

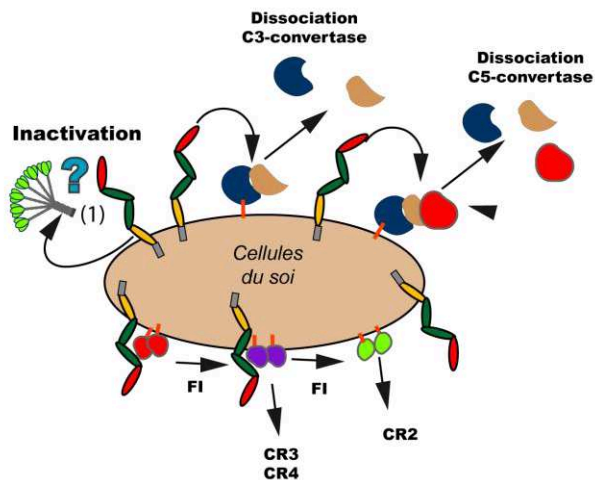
Les lymphocytes B expriment en grande quantité CR1, mais également CR2, le récepteur de C3d. L'interaction de C3d et de iC3b sur CR2 à la surface des lymphocytes B est connue depuis longtemps pour son rôle dans le contrôle de l'activation de ces cellules. Il a notamment été montré que la fixation de C3d sur CR2 baissait le seuil d'activation des lymphocytes B en co-stimulant le récepteur des antigènes ou BCR (B-Cell Receptor). Le BCR correspond à une immunoglobuline membranaire associée à deux autres protéines, Ig α et Ig β (CD79), responsables de la signalisation. Son activation conduit à une augmentation du calcium libre intracellulaire et à la phosphorylation de nombreuses protéines cytoplasmiques, signal nécessaire à la transformation des lymphocytes B en plasmocytes, les cellules à l'origine de la production des anticorps (Erdei et al., 2009b). Pour assurer sa fonction, CR2 est associée en complexe avec CD19 et TAPA-1 (CD81) puis, lors de la liaison de C3d, se lie avec le BCR pour transmettre un signal positif d'activation (Fearon and Carter, 1995). Le rôle de CR1 dans la transduction du signal au niveau des lymphocytes B (LB) a été davantage controversé avec initialement des éléments suggérant que CR1 soit régulait positivement ou négativement

l'activation des LB, soit n'avait aucun rôle, ces différences d'interprétation s'expliquant souvent par la façon utilisée pour activer les lymphocytes B. Jozsi et collaborateurs proposent quant à eux un rôle inhibiteur pour CR1 en utilisant du C3 agrégé (et purifié) se fixant spécifiquement sur ce récepteur (Jozsi et al., 2002). CR1 inhibe alors l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire et la phosphorylation des protéines cytoplasmiques impliquées dans l'activation des LB, suggérant l'implication directe ou indirecte de CR1 dans une voie de signalisation cellulaire. En fixant C3b, CR1 empêcherait ainsi l'activation non spécifique des lymphocytes B tant que le C3b présent dans les complexes immuns n'est pas dégradé en C3d par le facteur I et pris en charge par CR2. De façon intéressante, CR1 est également retrouvé en complexe avec CR2 à la surface des LB via leurs ectodomaines respectifs (Fearon and Carter, 1995). Cette coopération entre CR1 et CR2 serait impliquée dans l'internalisation des antigènes recouverts de C3b/iC3b/C3d (Grattone et al., 1999). Un lien entre la formation de ce complexe CR1/CR2 et le mécanisme d'activation des LB reste cependant envisageable, notamment en perturbant l'activité de CR2. L'implication de l'interaction entre CR1 et MBL ou C1q dans ce mécanisme n'a, à ce jour, jamais été évaluée mais ne serait pas inconcevable, notamment puisque C1q (Nayak et al., 2010) et la MBL (Wang et al., 2008) semblent impliqués dans la régulation de certains processus de l'immunité adaptative.

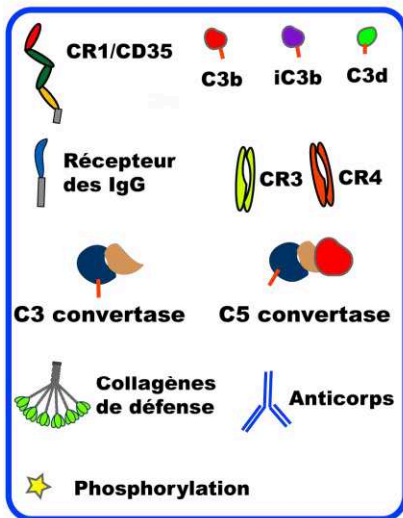
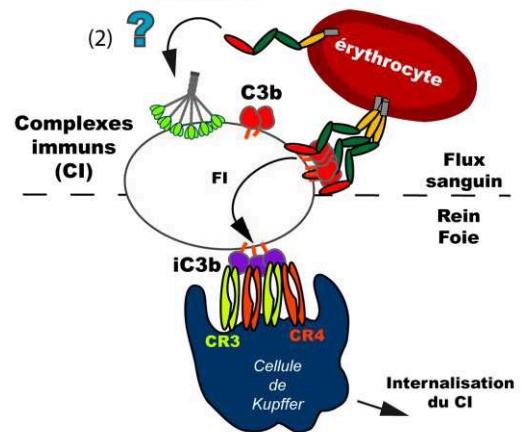
IV.4.3.2. Activation des lymphocytes T

La présence de CR1 à la surface des lymphocytes T (LT) est source de nombreux débats tant les résultats varient d'une étude à l'autre. Les auteurs s'accordent cependant sur le fait que CR1 serait exprimé par certains LT et que cette expression serait transitoire et dépendante de chaque donneur. A l'inverse des lymphocytes B, peu d'informations sont disponibles concernant le rôle fonctionnel de CR1 à la surface des lymphocytes T. Wagner et collaborateurs proposent que CR1 aurait un rôle inhibiteur à l'image de ce qui est observé sur les lymphocytes B (Wagner et al., 2006). Certains auteurs attribuent à CR1 un rôle dans l'activation des LT comme co-ligand du récepteur des LT (TCR ou T-Cell Receptor). L'expression de CR1 semble également stimulée lors de l'activation polyclonale des lymphocytes T (Rodgaard et al., 1995).

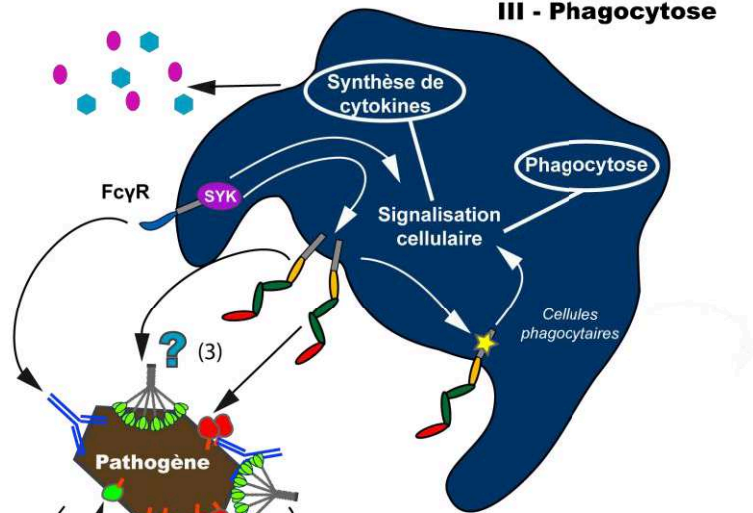
I- Protection du soi



II- Elimination des complexes immuns



III - Phagocytose



IV- Régulation lymphocytes B

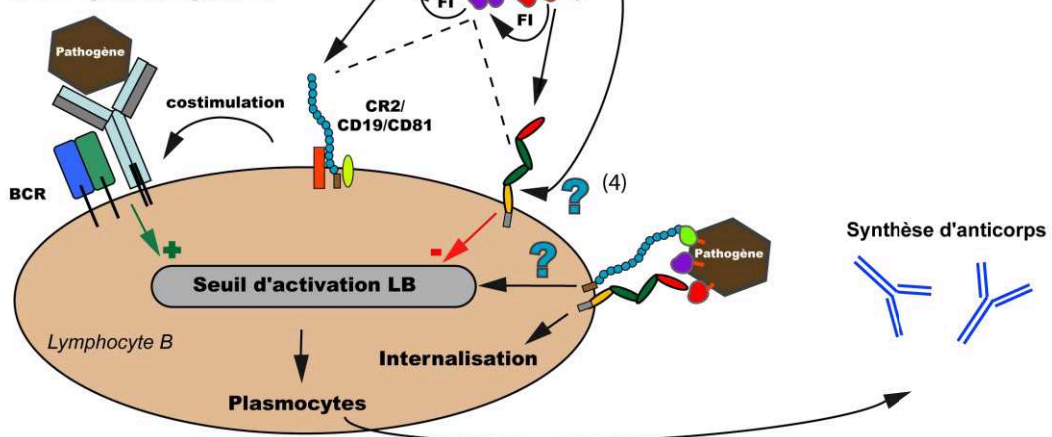


Figure 1.13 : Rôle de CR1/CD35 dans différents processus cellulaires

Le détail des interactions mises en jeu est précisé dans la partie consacrée (voir IV.4). La légende de la figure est donnée dans l'encadré bleu. Les points d'interrogation correspondent aux mécanismes suggérés mais dont la preuve expérimentale n'a pas encore été apportée : l'interaction CR1 – collagènes de défense participe-t-elle à (1) l'inactivation des voies classique et lectine ?, (2) à l'élimination des complexes immuns ?, (3) au processus de phagocytose et au processus de signalisation cellulaire ?, (4) à la régulation de l'activation des lymphocytes B ?

IV.4.4. Phagocytose

Les pathogènes, les cellules apoptotiques, les cellules nécrotiques et les complexes immuns sont recouverts par différentes opsonines suite à l'activation du complément. Par sa capacité à interagir avec C4b, C3b, C1q et la MBL, CR1 est un récepteur profondément impliqué dans les mécanismes de phagocytose en association avec CR3, CR4, les récepteurs des immunoglobulines et les récepteurs de PAMPs. Le rôle de CR1 a été associé à la phagocytose de *Mycobacterium leprae* (Schlesinger and Horwitz, 1991), de *Mycobacterium avium* (Roecklein et al., 1992), de *Mycobacterium tuberculosis* (Schlesinger et al., 1990; Schlesinger and Horwitz, 1990), de *Cryptococcus neoformans* (Levitz et al., 1997), de *Streptococcus pneumoniae* (Gordon et al., 1986), de *Legionella pneumophila* (Payne and Horwitz, 1987) et de *Leprosy bacilli* (Schlesinger and Horwitz, 1990). La phagocytose par les éosinophiles de *Staphylococcus aureus* sous forme inactive semble également fortement associée à CR1 (Hatano et al., 2009). Il y a également de nombreuses évidences montrant une synergie entre les récepteurs Fcγ et CR1 dans l'ingestion de particules (Khera and Das, 2009) mais également avec CR3 (Fallman et al., 1993; Sutterwala et al., 1996).

Ces études mettent en évidence l'importance de l'interaction entre C3b/C4b et CR1 mais peu de données suggèrent un rôle de l'interaction entre CR1 et C1q/MBL dans la phagocytose, notamment à cause d'expériences n'utilisant que des anticorps bloquants ciblant spécifiquement les sites d'interaction de C3b et C4b. L'implication de l'interaction de CR1/MBL dans la phagocytose de *S. montevideo* a été démontrée sur des PMNs (Ghiran et al., 2000). Cependant, celle-ci n'est significative que sur des PMNs « activés » par de la fibronectine ou en synergie avec des IgG. Cela rejoint l'idée que l'interaction entre les collagènes de défense et CR1 peut contribuer au phénomène de phagocytose mais que la présence d'autres signaux et d'autres interactions (synergie) sont nécessaires pour conduire à l'internalisation des particules. Bien que le rôle de C1q, de la MBL et des ficolines dans la phagocytose soit avéré, à l'heure actuelle, seul le lien entre la MBL et CR1 a été établi. L'élimination des cellules apoptotiques a également été étudiée. Des corrélations ont été faites entre l'augmentation de la phagocytose et l'interaction avec la MBL/C1q via des récepteurs tels que CD91 et la calréticuline. CR1 est également soupçonné d'intervenir dans ces mécanismes car des cellules dendritiques, qui n'expriment que ce récepteur, phagocytent davantage les cellules apoptotiques. Cet effet reste cependant très limité et est probablement dominé par le dépôt de C3b (Nauta et al., 2004).

IV.4.5. Signalisation cellulaire

Peu d'informations sont disponibles quant à la façon dont CR1 peut transmettre un signal, notamment dans le cas de l'inhibition de l'activation des lymphocytes B et T. La transmission des signaux cellulaires est généralement associée à l'interaction avec d'autres partenaires au niveau de la partie cytoplasmique de récepteurs membranaires, résultant de l'interaction des parties extracellulaires avec des ligands. Nous l'avons vu précédemment, CR1 peut interagir avec certains éléments du cytosquelette via FAP-1. CR1 peut également être phosphorylé spécifiquement (d'autres récepteurs ne l'étant pas suite aux mêmes stimuli). Cette caractéristique serait notamment limitée à des cellules impliquées dans les mécanismes de phagocytose (monocytes, neutrophiles, éosinophiles) puisque CR1 n'est pas phosphorylé dans les LB contrairement à CR2 (Changelian and Fearon, 1986). Cette phosphorylation interviendrait suite à l'activation des cellules phagocytaires et pourrait être réalisée par la protéine kinase C (PKC) (Bussolino et al., 1989; Lapin et al., 2012). La phosphorylation des serines et thréonines de CR1, liée à la fixation de complexes immuns sur les monocytes, a ensuite été confirmée et associée à l'activation d'une autre protéine, la tyrosine kinase Syk, impliquée dans la voie de signalisation des récepteurs Fcγ des leucocytes (Jarvis and Wang, 1999). Ce résultat suggère que la phosphorylation de CR1 ne ferait pas suite à la fixation de ses ligands mais nécessiterait l'engagement d'autres récepteurs conduisant à l'activation de kinases susceptibles d'interagir avec CR1. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'augmentation intracellulaire de calcium dans les cellules phagocytaires ne peut avoir lieu que lorsque CR1 et les récepteurs Fcγ sont stimulés simultanément (Ernst et al., 1995). L'augmentation intracellulaire de calcium est également observée dans des neutrophiles stimulés avec des anticorps anti-CR1 qui induiraient également l'activation de la phospholipase D (Fallman et al., 1993). Cette phospholipase D est capable d'interagir avec des kinases comme Syk (Lee et al., 2006) ou PKC (Kook and Exton, 2005), les protéines qui ont été précédemment identifiées comme responsables de la phosphorylation de CR1 (partie cytoplasmique). Notons qu'un site de phosphorylation pour la caséine kinase II (CKII) est présent dans la partie cytoplasmique de CR1 (QTNEE), mais à ce jour aucune phosphorylation de ce site n'a pu être détectée, en particulier dans des érythrocytes (Glodek et al., 2010). Il est intéressant de noter que la fixation de C1q et de la MBL influence l'expression de cytokines par les monocytes (Fraser et al., 2006), suggérant que CR1 pourrait être l'un des récepteurs impliqués dans la signalisation cellulaire conduisant à ce phénomène.

IV.4.6. Et CR1 soluble ?

Nous l'avons vu, CR1 est présent à une très faible concentration dans le plasma (30 ng/mL), suite à son clivage par des protéases soit à la membrane (« shedding »), soit dans les vésicules sécrétoires. Bien que les concentrations plasmatiques ne soient pas suffisantes pour justifier un rôle pour ce CR1 soluble, il est possible que l'augmentation locale de sa concentration au niveau du site de clivage puisse avoir un rôle physiologique en inhibant le complément (Khera and Das, 2009). Remarquons que ce CR1 soluble pourrait également interagir avec d'autres partenaires permettant son recrutement au niveau d'autres sites.

IV.5. Pathologies et thérapies associées à CR1

CR1 est essentiel à la fois comme régulateur du complément mais également pour phagocytter les particules opsonisées ou éliminer les cellules apoptotiques. Son rôle important dans l'immunité innée explique pourquoi des modifications de l'activité de ce récepteur sont associées à de nombreuses pathologies.

IV.5.1. Paludisme

Le paludisme est une maladie causée par l'infection par un parasite de type *Plasmodium* dont il existe 5 espèces : *falciparum*, *vivax*, *malariae*, *ovale* et *knowlesi*. *Plasmodium falciparum* est la forme la plus virulente du parasite qui entraîne le plus fort taux de mortalité chez l'homme. Elle est transmise, comme les autres espèces, sous forme de sporozoïtes par la pique de moustiques femelles du genre *Anopheles*. Ces sporozoïtes se dirigent vers le foie où ils commencent par infecter les hépatocytes avant de se multiplier sous forme de mérozoïtes. Ils sont ensuite libérés dans la circulation sanguine où ils peuvent alors infecter les érythrocytes. L'infection par *P. Falciparum* peut conduire à des manifestations asymptomatiques, à des accès simples (fièvre, maux de tête) et à des accès graves comme des anémies sévères (anémie malariale), du neuropaludisme (malaria cérébrale) et à des détresses respiratoires notamment chez les jeunes enfants. Chez les adultes, l'ensemble des organes peut être touché avec notamment des insuffisances rénales aiguës ou chroniques (consécutives à une glomérulonéphrite chronique). Chez des enfants africains, le neuropaludisme a été associé en partie à la séquestration des globules rouges infectées dans les micro-capillaires cérébraux (Stoute, 2011 ; Vigan-Womas et al, 2012). Notons que cette observation n'a pas été corrélée avec des enfants de Papouasie-Nouvelle-Guinée (Al Yaman et al, 1995). C'est l'adhésion d'érythrocytes infectés entre eux et à des érythrocytes sains, nommé « Rosetting »,

qui expliquerait l'obstruction observée (Stoute, 2011). Le Rosetting serait notamment corrélé avec une augmentation de la parasitémie (Rowe et al, 2002), suggérant que la formation de la rosette faciliterait l'infection des érythrocytes sains par *P. falciparum*. Cependant, le Rosetting n'est pas le seul élément conduisant au neuropaludisme. Les érythrocytes infectés par des souches incapables de former des rosettes peuvent interagir avec des motifs présents à la surface des cellules endothéliales comme CD36 ou ICAM-1, causant des ralentissements circulatoires importants comme observé avec les souches formant des rosettes (Claessens et al, 2012). Notons aussi que des dérèglements des mécanismes de coagulation (liés à différents mécanismes) sont observés suite à l'infection par *P. falciparum*. Ces dérèglements conduisent à la formation de micro-thrombus qui contribuent de façon importante au neuropaludisme (Moxon et al, 2009).

L'importance des érythrocytes dans la pathogénèse du paludisme a rapidement conduit les chercheurs à s'intéresser aux mécanismes permettant l'invasion du parasite et la formation des rosettes. Le récepteur CR1/CD35 a notamment retenu l'attention des équipes de recherche. Celui-ci est impliqué dans la voie d'invasion indépendante des acides sialiques utilisée par certains isolats de parasite et serait une alternative à la voie d'entrée par les glycophorines (Tham et al., 2010). L'invasion est d'ailleurs corrélée avec le niveau d'expression de CR1 et une interaction directe avec les mérozoïtes a été détectée (Spadafora et al., 2010). La protéine de *P. falciparum*, PfRh4, a par la suite été identifiée comme responsable de l'interaction avec CR1 (figure 1.14) et son site de liaison déterminé (Tham et al., 2011). Celui-ci se situerait dans les modules CCP 1-3 de CR1, le site impliqué dans la liaison de C4b/C3b et dans l'activité de dissociation des convertases. Il est intéressant de noter que le regroupement en cluster de CR1 associé avec une augmentation de la déformabilité de la membrane pourrait favoriser la pénétration du parasite. Une fois à l'intérieur des érythrocytes, les mérozoïtes de certains isolats peuvent exporter à la membrane des érythrocytes qu'ils viennent d'infecter une adhésine, PfEMP-1, dont certains variants sont capables d'interagir avec de nombreux récepteurs ou molécules présents à la surface soit des cellules endothéliales soit des érythrocytes (ligand reconnu dépendant de la lignée de *P. falciparum* considérée) : trisaccharides du groupe sanguin A et B, CR1/CD35, IgM et IgG, glycosaminoglycanes, CD36, ICAM-1, CR1/CD35 (Janes et al., 2011; Mercereau-Puijalon et al., 2008). Certains variants de cette adhésine sont notamment impliqués dans le phénomène de Rosetting dans lequel un érythrocyte infecté se lie à un minimum de 3 érythrocytes non infectés (figure 1.14). Rowe et collaborateurs ont montré que PfEMP1 interagissait avec CR1 et que cette interaction était

nécessaire au phénomène de Rosetting (Rowe et al., 2000). Celle-ci prend place au niveau des modules CCP 10 et 17 de CR1 et au niveau du domaine DBL1 α 1 de PfEMP1 (Mercereau-Puijalon et al., 2008). De nombreuses études statistiques et génétiques ont été menées sur l'association entre certains polymorphismes de CR1 et la résistance à la malaria, mais les données obtenues sont conflictuelles et dépendent fortement de la population concernée et de son degré d'exposition au parasite (Stoute, 2011; Sinha et al., 2009; Thomas et al., 2005). Certains éléments restent cependant intéressants à noter. Les mutations associées au système du Knops, McC^b (KN 6, E1590) et SI2 (KN 7, G1601), ont une fréquence plus importante dans les populations africaines que caucasiennes et notamment dans celles exposées à la malaria (région endémique) (Moulds, 2010). Des travaux ont montré que le phénotype SI2 (KN 7) était associé avec une diminution de la formation de rosettes (Rowe et al., 2000) et que McC^b (KN 6) et SI2 (KN 7) pourraient être des phénotypes protecteurs vis-à-vis de la malaria cérébrale, en limitant notamment le phénomène de Rosetting. Il est intéressant de noter que les mutations associées à McC^b (KN 6) et SI2 (KN 7), K1590E et R1601G, sont situées sur une même face du CCP 25 et conduisent à une modification locale de la surface électrostatique (Soares et al., 2005), suggérant leur implication possible dans des liaisons ioniques avec d'autres ligands. Cependant, il reste difficile d'expliquer comment des mutations présentes dans le CCP 25 pourraient influencer la fixation de PfEMP1 au niveau des CCP 10 et 17. Pour répondre à cette question, plusieurs hypothèses ont été émises (Smith et al., 2002) : (1) Le linker plus long entre les modules CCP 21 et 22 permettrait le repliement à 180° de CR1 amenant le CCP 25 à proximité du CCP 17 (mais serait insuffisant pour permettre l'interaction avec le CCP 10) ; (2) Ces mutations pourraient influencer la fixation de C1q/MBL qui participeraient alors au phénomène de « Rosetting » en interagissant avec PfEMP1; (3) le CCP25 serait impliqué dans la formation des clusters de CR1 qui seraient essentiels pour l'interaction avec PfEMP1. Concernant les hypothèses (1) et (2), il a été récemment montré qu'il était peu probable, au sein d'une même molécule, que CR1 puisse adopter une conformation amenant le CCP 25 à proximité du CCP 17 (Tetteh-Quarcoo et al., 2012). Il n'est cependant pas exclu, au sein d'un cluster de CR1, que le module CCP 25 d'une molécule puisse interagir avec les modules CCP 10 et 17 d'autres molécules. Ces mêmes auteurs ont également montré que les mutations K1590E et R1601G ne semblent avoir aucun impact sur les fonctions de CR1, et notamment sur sa capacité à fixer C1q (Tetteh-Quarcoo et al., 2012). Ceux-ci s'orientent donc vers un rôle éventuel de ces mutations dans la formation des clusters de CR1 mais n'excluent pas la possibilité qu'elles puissent influencer la fixation de la MBL (non évaluée).

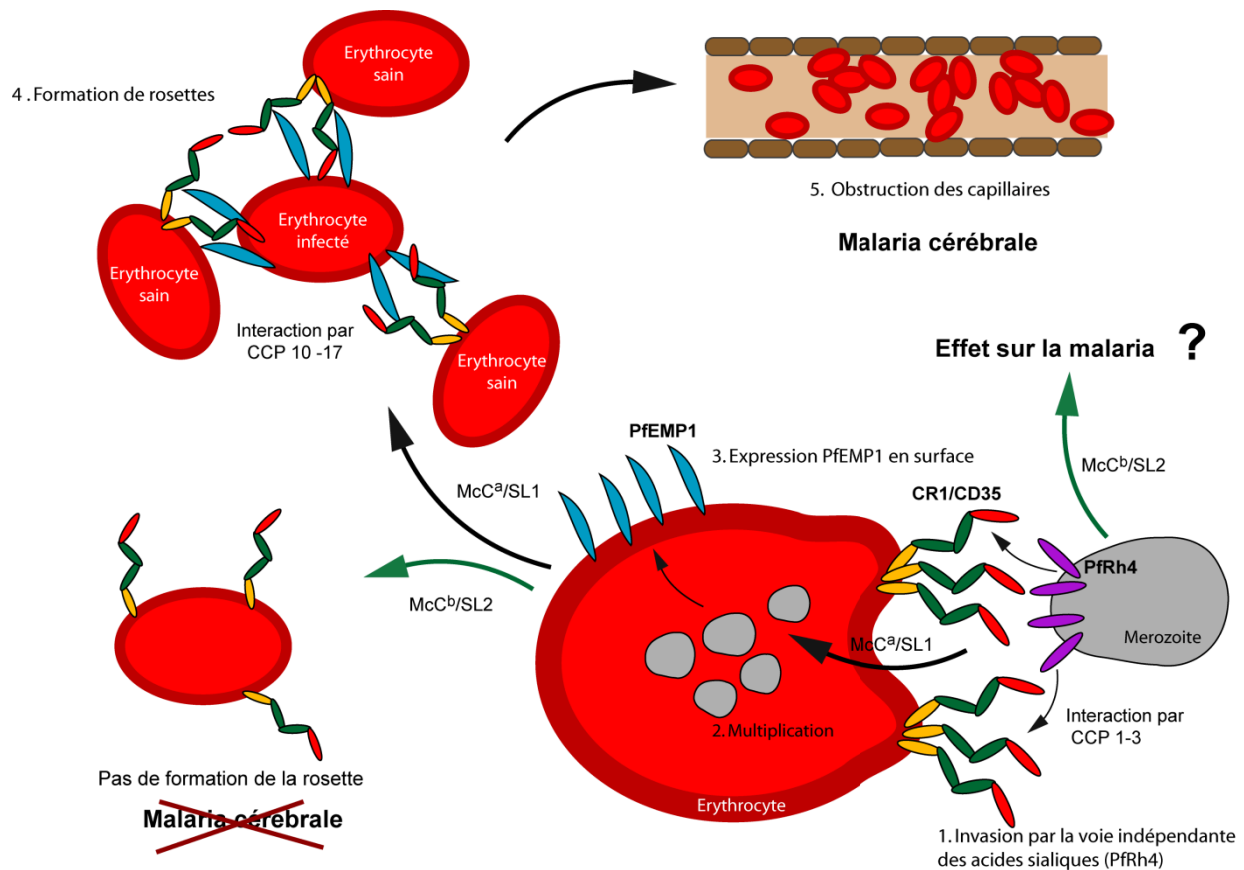


Figure 1.14 : Possible implication de CR1 dans la malaria cérébrale (hypothèse dans le cas d'une souche de *P. falciparum* formant des rosettes)

La voie d'entrée du mérozoïte indépendante des acides sialiques (interaction CR1-PfRh4) et la formation de rosettes via l'interaction entre CR1 et PfEMP1 sont représentées dans ce schéma pour un individu présentant le phénotype normal $McC^a/SL1$ (KN3/4) et le phénotype résistant $McC^b/SL2$ (KN6/7). La possible implication du phénotype $McC^b/SL2$ (KN6/7) dans l'invasion des érythrocytes est également indiquée.

Si, dans ce contexte, la formation de clusters est perturbée par le phénotype $McC^b/SL2$ (KN6/7), il est également possible que ces SNPs influencent l'invasion des érythrocytes via PfRh4 pour les mêmes raisons. Notons que l'implication du CCP 25, et plus généralement du LHR-D, dans la formation de clusters est soutenue par la plus faible immunogénicité de cette zone par rapport au reste de la molécule (Nickells et al., 1998).

Des polymorphismes influençant le niveau d'expression de CR1 ont également été incriminés dans la protection contre la CM en limitant la formation de rosettes. Cependant, cette diminution s'accompagne également d'une plus faible élimination des complexes immuns et est associée avec d'autres formes sévères de malaria comme la SMA (Khera and Das, 2009). Le polymorphisme Q981H, qui augmente la capacité de liaison à C3b/C4b au niveau du site 2 dans le LHR-C, a été identifié dans certaines populations asiatiques et compenserait le faible niveau d'expression de CR1 associé au polymorphisme *HindIII*. L'élimination des complexes

immuns serait ainsi favorisée par le SNP Q981H qui aurait un rôle protecteur contre les formes sévères de malaria, même lorsque les niveaux de CR1 sont réduits (Thomas et al., 2005). Dans la SMA, la diminution du nombre de molécules de CR1 à la surface semble être associée à la destruction des érythrocytes qui seraient alors plus sensibles à la déposition de l'opsonine C3b, du fait d'un défaut dans la régulation assurée habituellement par CR1. Le dépôt de C3b conduit à leur phagocytose par des macrophages présents dans le foie et les reins. Cette diminution ne serait cependant pas reliée à des polymorphismes connus de CR1 du fait de l'absence de corrélations observées dans les différentes études statistiques et d'une normalisation des niveaux de CR1 chez les patients après traitement (Stoute, 2011). Le mécanisme par lequel les érythrocytes perdent leurs molécules de CR1 en surface n'est cependant pas encore élucidé, mais pourrait être relié à la formation et à l'élimination des complexes immuns durant l'infection.

IV.5.2. Maladies neurodégénératives – Cas d'Alzheimer

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par l'accumulation de peptides β -amyloïdes (plaques séniles) conduisant à une dégénération des neurones et à une altération des capacités cognitives, motrices et intellectuelles. L'implication du complément dans la pathogénèse de ces maladies, et notamment dans celle d'Alzheimer (AD), est largement avérée depuis que C1q, C3 et C4 ont été détectés dans les plaques séniles. Ceci est appuyé par le fait que cette pathologie touche essentiellement les personnes âgées, population souffrant d'une diminution progressive de l'activité du complément. De nombreuses études ont été conduites pour déterminer l'implication de chaque élément du complément (Veerhuis et al., 2011). Il a notamment été montré que C1q et la MBL pouvaient reconnaître les peptides $\alpha\beta$ -42/40 conduisant au dépôt de C3b. Alors qu'une composante inflammatoire a été associée à l'activation du complément dans AD, la présence d'auto-anticorps semble également indiquer l'importance des réactions auto-immunes dans la maladie, résultant probablement d'une défaillance dans l'élimination des complexes immuns et des neurones morts (Sardi et al., 2011). L'implication de CR1 dans AD a également été démontrée par sa co-localisation à la surface d'érythrocytes avec les peptides $\alpha\beta$ -42 et C3b, suggérant un mécanisme d'élimination proche de celui des complexes immuns (Rogers et al., 2006). Les auteurs suggèrent à ce propos que la plus grande susceptibilité des femmes à Alzheimer serait reliée à un plus faible nombre d'érythrocytes, conduisant à une diminution dans les capacités d'élimination des peptides $\alpha\beta$ -42 circulant. Ceci est à rapprocher de l'observation d'une diminution de la

quantité de CR1 à la surface des érythrocytes chez les personnes âgées, une population fortement affectée par les maladies neurodégénératives comme AD (Shapiro et al., 1994). L'avènement des études génomiques à grande échelle (GWAS) a permis d'identifier un certain nombre de facteurs de risques associés avec une plus grande susceptibilité à la maladie d'Alzheimer comme l'apolipoprotéine E. Plus récemment, deux études indépendantes ont conduit à la découverte de nouveaux facteurs de risques dans les populations caucasiennes pour les formes tardives d'Alzheimer (LOAD), facteurs associés notamment à des loci situés dans le gène de CR1 (van Es and van den Berg, 2009). Bien que les SNPs associés (rs6656401 et rs3818361) ne soient pas situés dans la partie codante de la molécule, ces variants pourraient potentiellement influencer les niveaux d'expression de CR1 et ainsi avoir un impact sur la capacité d'élimination des peptides $\alpha\beta$ -42. Ces observations ont par la suite été corroborées par d'autres études ciblant des populations variées (Chen et al., 2012; Jun et al., 2010; Zhang et al., 2010). Une autre étude a mis en évidence que l'allèle S de CR1 (possédant un site supplémentaire de fixation pour C3b) augmenterait de 30 % le risque de développer AD (Brouwers et al., 2012). Cette observation va à l'opposé du rôle supposé de CR1 dans l'élimination des feuillets $\alpha\beta$ -42, puisqu'un site supplémentaire de fixation de C3b devrait au contraire renforcer cette activité et donc conduire à un phénotype protecteur. Les auteurs expliquent cette observation par le fait que ce site supplémentaire interviendrait dans l'activité de cofacteur par le facteur I, inactivant ainsi le C3b (iC3b et C3d) et réduisant la capacité d'élimination des peptides $\alpha\beta$ -42 par le CR1 présent à la surface des érythrocytes (CR1 a une plus faible affinité pour iC3b que C3b). Très récemment, un polymorphisme associé au système du Knops et situé dans le LHR-D au niveau du module CCP 25, le variant S1610T (rs4844609), a été associé avec un déclin de la mémoire épisodique (Keenan et al., 2012). Comme C1q et MBL se fixent dans le LHR-D et sont capables d'interagir avec les peptides $\alpha\beta$ -42, les auteurs ont émis l'hypothèse que cette mutation influencerait l'élimination des peptides $\alpha\beta$ -42 en affectant la fixation de ces collagènes de défense. Ce SNP pourrait notamment altérer la structure du LHR-D, comme suggéré par la plus forte immunogénicité du CR1 portant la mutation comparativement au CR1 non muté (Moulds et al., 2002). Il pourrait également influencer l'expression de CR1 à la surface des cellules.

IV.5.3. Maladies auto-immunes – Cas du SLE

Nous avons vu précédemment que des déficits en C1q ou en MBL pouvait conduire à l'établissement d'une réaction auto-immune (*Chapitre 1, section II.4*). Les auteurs s'accordent

sur le fait que deux hypothèses peuvent expliquer le développement de ce type de réaction : (1) une mauvaise élimination des complexes immuns (hypothèse suggérée pour les déficits en C1q et MBL) conduisant à une activation du complément sur des tissus sains et à la libération d'antigènes du soi; (2) une perturbation des seuils d'activation des lymphocytes B et T conduisant à la synthèse d'auto-anticorps (Manderson et al., 2004). Comme nous l'avons vu précédemment, CR1 est impliqué dans ces deux aspects en participant à l'élimination des complexes immuns et en agissant négativement sur le seuil d'activation des LB. Il est alors évident que des anomalies dans l'expression de CR1 puissent conduire à l'établissement d'une réaction auto-immune. L'implication de CR1 dans de telles pathologies a été notamment bien étudiée dans le cas du lupus érythémateux systémique (SLE). Les patients atteints par cette pathologie montrent une diminution significative du niveau d'expression de CR1 à la surface de leurs érythrocytes, expliquant également la mauvaise élimination des complexes immuns observée (Manderson et al., 2004). Arora et collaborateurs rapportent également que les niveaux d'expression de CR1, tant au niveau des transcrits que de la protéine, seraient fortement diminués dans des leucocytes de patients atteints de SLE (Arora et al., 2011; Arora et al., 2007). Fait intéressant, une diminution du niveau d'expression de CR1 est également détectée dans des lymphocytes B (Erdei et al., 2009a; Wilson et al., 1986b), contribuant très probablement à la diminution du seuil d'activation de ces cellules observée dans le SLE. Une diminution de l'expression de CR1, ainsi que de uCR1, a aussi été observée à la surface de podocytes glomérulaires (Sivasankar et al., 2004). Notons également que des anticorps dirigés contre CR1 ont été détectés chez des patients atteints de SLE (Sadallah et al., 2003). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cette diminution de CR1 à la surface des cellules (Khera and Das, 2009). Comme dans le cas d'autres pathologies ou infections, les polymorphismes réduisant le niveau d'expression de CR1 ont été incriminés mais cela ne représenterait qu'une faible partie des patients. Deux autres hypothèses ont alors été suggérées : un clivage protéolytique du CR1 de surface ou une réduction de la synthèse de CR1, comme observé dans le cas des leucocytes avec une diminution de la quantité de transcrits (Arora et al., 2011). Une combinaison des deux précédentes hypothèses est également envisageable. D'autres maladies auto-immunes ont également été associées avec une diminution du niveau d'expression de CR1 comme l'arthrite rhumatoïde (Piccoli et al., 2011), la glomérulonéphrite proliférative diffuse (DPGN), la glomérulosclérose segmentaire et focale (FSGS) et certains syndromes néphritiques (Katyal et al., 2001). Curieusement dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (AMD), une autre maladie avec une composante auto-immune (Gurne et al., 1991), la maladie a été associée avec une augmentation de

l'expression de CR1 à l'inverse des précédentes pathologies citées (Haas et al., 2011). Ces résultats nécessitent cependant d'être confirmés par d'autres études pour justifier de leur pertinence.

IV.5.4. Invasion des pathogènes – Cas du VIH et de *M. tuberculosis*

CR1 constitue une voie d'entrée possible pour certains pathogènes qui utilisent sa capacité à interagir avec les opsonines C3b/C4b et son implication dans le processus de phagocytose pour pouvoir pénétrer dans les cellules hôtes. Par exemple, le VIH opsonisé par C3b est capable d'envahir des monocytes (Thieblemont et al., 1993) mais également des lymphocytes T (Delibrias et al., 1993) et des thymocytes (Delibrias et al., 1994) grâce à son interaction avec CR1. Le VIH (recouvert de C3b) a également été retrouvé associé à CR1 à la surface des érythrocytes qui constituent alors une source importante de particules virales (Beck et al., 2011; Horakova et al., 2004). Cette liaison ne serait cependant que transitoire car les particules virales seraient alors transférées, suite au clivage de C3b en iC3b et C3d, aux lymphocytes B et T et aux monocytes (Beck et al., 2011; Khera and Das, 2009). Chez les patients infectés, une diminution du nombre de molécules de CR1 a été observée à la surface des érythrocytes et résulterait d'une augmentation du clivage de CR1 (Banki et al., 2005). En interagissant avec le VIH opsonisé, CR1 conduirait également à une augmentation de la réplication virale dans les cellules infectées grâce à la translocation de NF- κ B (Thieblemont et al., 1995). Des anticorps dirigés contre CR1 ont également été identifiés chez des patients infectés, renforçant l'implication de CR1 dans les mécanismes d'infection du VIH (Sadallah et al., 2003). D'autres pathogènes tels que *Mycobacterium tuberculosis* (Zimmerli et al., 1996) ou *Leishmania major* sous sa forme promastigote (Dominguez and Torano, 1999) activent également le complément et sont alors recouverts par C3b. Ils peuvent ensuite être pris en charge par CR1 présent à la surface de macrophages puis internalisés pour poursuivre leur cycle de réplication. De façon intéressante, il a été montré que les allèles McC^b (KN6) et SI2 (KN7) du système Knops étaient associés avec une plus grande résistance à l'infection par *M. tuberculosis* dans la population africaine (Noumsi et al., 2011), comme observé pour l'infection par *P. falciparum*. Comme pour la phagocytose, ces études mettent en évidence l'importance de l'interaction entre C3b et CR1. Il est cependant possible que les collagènes de défense, et notamment la MBL qui reconnaît de nombreux motifs à la surface des pathogènes, soient impliqués dans ces processus. Cette possibilité est étayée par le fait que des polymorphismes modulant les variations de niveau d'expression de la MBL ont été associés

avec les infections précédemment citées. Ainsi des faibles niveaux d'expression de MBL ont un effet protecteur pour certaines leishmanioses (Asgharzadeh et al., 2007) et pour la tuberculose (Gupta et al., 2008), suggérant un rôle de la MBL dans l'infectiosité des pathogènes associés. A l'inverse, ils sont considérés comme un facteur de risque pour l'infection par le VIH (Garred et al., 1997), la MBL contribuant probablement à l'élimination du pathogène. Ces éléments renforcent le rôle de la liaison entre la MBL et ses récepteurs (dont CR1) dans les interactions hôtes-pathogènes, mêmes si celle-ci ne représente probablement qu'une faible part de l'ensemble des interactions mises en jeu (C3b, IgG, PAMPs).

IV.5.5. CR1 comme molécule thérapeutique

La polyvalence de CR1 et sa capacité à fortement inhiber le complément ont conduit à évaluer cette molécule comme traitement thérapeutique potentiel pour des pathologies impliquant une activation excessive ou indésirable du complément (SLE, RA) (Krych-Goldberg and Atkinson, 2001). Une forme soluble (contenant les modules CCP 1 à 30) a été développée et initialement testée sur différents modèles de maladies. Ainsi, des effets intéressants de CR1 ont été notés dans des modèles d'animaux d'ischémie et de reperfusion myocardique (Weisman et al., 1990a), d'œdème pulmonaire (Rabinovici et al., 1992), de glomerulonéphrite (Couser et al., 1995), d'anémie hémolytique auto-immune (Yazdanbakhsh, 2005) ou encore de blessure médullaire (Li et al., 2010). La forme de CR1 développée par la société Celldex Therapeutics (TP10) est actuellement en essai préclinique pour une utilisation dans certaines maladies inflammatoires et notamment dans les pathologies rénales. Cette forme soluble de CR1 a également donné de bons résultats *in vitro* pour le traitement de l'infertilité liée à une composante auto-immune (Dcruz et al., 1996). Par son implication dans le phénomène de Rosetting avec *P. falciparum*, cette forme soluble est également pressentie comme agent thérapeutique dans le traitement des cas de malaria sévère (SM) associés à la formation de rosettes (Cockburn et al., 2004).

D'autres formes recombinantes de CR1 ont également été développées pour potentialiser et cibler son action. Une molécule de CR1 portant des glycosylations modifiées (sLe^x) a été produite pour inhiber les interactions impliquant les sélectines et permettre de concentrer l'activité de CR1 au niveau des surfaces où sont surexprimées les sélectines (par exemple l'endothélium vasculaire) (Picard et al., 2000). Malheureusement, cette forme a montré des

effets indésirables lors des premières phases d'essais cliniques, nécessitant une nouvelle phase de développement (Khera and Das, 2009). Afin d'augmenter son temps de demi-vie (et donc son activité), CR1 a été fusionné avec le site de liaison pour l'albumine provenant de la protéine G de Streptocoques (Makrides et al., 1996). Pour rétablir les niveaux de CR1 relativement bas observés à la surface des érythrocytes dans plusieurs pathologies (dont le SLE), CR1 et un anticorps dirigé contre le facteur Rh(D) (spécifique des érythrocytes) ont été tous les deux fusionnés avec le domaine C-terminal de la C4bp α . Ce domaine est capable de s'oligomériser conduisant à la formation d'une forme « MultiCR1 » contenant également un certain nombre de copies de l'anticorps anti-Rh(D). Ce système permet alors d'adresser spécifiquement CR1 au niveau de la membrane érythrocytaire (Oudin et al., 2000). CR1 a également été immobilisé en plusieurs couches à la surface d'îlots de Langerhans grâce à une ancre membranaire et à de l'héparine pour limiter le rejet des greffes de ces îlots (Nguyen Minh et al., 2011). Des constructions plus courtes de CR1 contenant les modules CCP 8-30, CCP 1-3 et CCP 8-11 ont également été évaluées pour leur capacité à inhiber l'activation du complément (Asghar and Pasch, 2000; Souza et al., 2005). La construction contenant les modules CCP 8-11 a notamment été fusionnée à une ancre GPI et à des fragments d'anticorps F(ab')₂ afin de cibler son action.

Comme nous venons de le voir, de nombreuses molécules dérivées de CR1 ont été ou sont en cours d'évaluation pour le traitement de diverses pathologies. Les différentes études menées sur les maladies auto-immunes et inflammatoires semblent également indiquer que CR1 pourrait être envisagé comme un marqueur pour diagnostiquer et suivre l'évolution de certaines de ces maladies. Ainsi la variation du niveau d'expression de CR1 (protéine et ARN_m) a été relié aux glomérulonéphrites (dont la glomérulonéphrite lupique) et à l'infection par le VIH (Khera and Das, 2009).

V. Le projet de thèse

Nous l'avons vu, les récepteurs des collagènes de défense jouent un rôle primordial dans les mécanismes de l'immunité innée et leur contrôle. Alors que la fixation de C1q, MBL et des ficolines sur ces récepteurs est connue, nous manquons d'informations sur les modalités de ces interactions. Notre laboratoire s'intéresse depuis plusieurs années à l'étude des collagènes de défense activant le complément et a ainsi pu développer un véritable savoir-faire sur les aspects structuraux et fonctionnels de ces molécules (Arlaud et al., 1979a; Bally et al., 2009; Chouquet et al., 2011; Garlatti et al., 2007; Lacroix et al., 2009; Paidassi et al., 2011; Rossi et al., 1998; Teillet et al., 2008; Thielens et al., 2001). Plus récemment, l'intérêt s'est également porté sur l'étude des récepteurs interagissant avec les collagènes de défense, que ce soit par des projets internes (calréticuline) ou des collaborations extérieures (CD91, calréticuline). L'étude de la calréticuline humaine (HuCRT), l'un des récepteur de C1q, de la MBL et des ficolines, a notamment permis d'obtenir un fragment recombinant soluble de son domaine globulaire. Ce fragment a contribué à préciser les modalités d'interaction de la calréticuline humaine avec les collagènes de défense (Paidassi et al., 2011) et à obtenir une structure à haute résolution (Chouquet et al., 2011). Cette avancée majeure est essentielle pour la compréhension des relations structure-fonction de l'interaction entre les collagènes de défense et la calréticuline. Le rapprochement récent avec l'équipe d'Arturo Ferreira a conduit le laboratoire à s'intéresser à un homologue de la calréticuline humaine, la calréticuline de *T. cruzi* (TcCRT). La forme entière de cette protéine a été produite par Ferreira et collaborateurs qui ont pu montrer son interaction avec C1q et son implication dans l'inactivation de la voie classique du complément, la présentant alors comme un mécanisme d'évasion du parasite (Ferreira et al., 2004b). Fort de l'expérience du laboratoire obtenue avec la HuCRT, l'un des premiers objectifs de cette thèse sera de s'inspirer du projet sur la HuCRT pour produire un fragment soluble de la TcCRT en vue d'études fonctionnelles mais surtout structurales. La comparaison avec la structure de la calréticuline humaine permettra de mettre en évidence les différences en relation avec la pathogénicité de la TcCRT. Toujours dans le but de renforcer nos connaissances sur les interactions des collagènes de défense avec leurs récepteurs, nous avons fait le pari de nous intéresser au cas de CR1/CD35. La littérature actuelle concernant ce sujet est très limitée (4 références sur les 15 dernières années) et seules quelques données étayaient l'hypothèse que le fragment LHR-D+ de CR1 (modules CCP 22 à 30) est impliqué dans l'interaction avec C1q et la MBL (Ghiran et al., 2000; Klickstein et al., 1997; Tas et al., 1999), la plus récente suggérant même que celui-ci ne serait que partiellement impliqué

(Tetteh-Quarcoo et al., 2012). Notre premier objectif sera donc de produire une forme recombinante soluble de cette partie du récepteur CR1 et de vérifier ses capacités de liaison à C1q et à la MBL par différentes méthodologies. Dans un second temps, nous réaliserons des fragments de délétions du LHR-D⁺ en supprimant un ou plusieurs modules CCP au niveau des extrémités N- et C-terminales, l'objectif étant de déterminer avec plus de précision le site d'interaction avec C1q et la MBL. Afin d'élargir la liste des ligands de CR1, nous évaluerons également la possible fixation des ficolines L, M et H sur le LHR-D⁺ et CR1 et, si l'évolution du projet nous le permet, nous envisagerons de nous orienter vers l'étude structurale du site de liaison de CR1.

Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES

I. Biologie moléculaire

L'ensemble des étapes de biologie moléculaire décrites dans ce chapitre ont été réalisées selon les protocoles établis par Sambrook et collaborateurs (Sambrook and Russell, 2001). Les enzymes de restriction proviennent de différents fournisseurs (New England Biolabs, Roche et Promega). Les étapes de ligation d'ADN ont été réalisées avec le kit Rapid DNA Ligation (Roche) selon les recommandations du fournisseur.

I.1. Souches et milieux de culture

I.1.1. Souches bactériennes utilisées

Plusieurs types de souches bactériennes ont été utilisés en fonction des étapes du projet de thèse :

- Les souches bactériennes **DH5α** (Invitrogen) utilisées en routine pour le clonage, l'amplification et la conservation des plasmides.
- Les souches bactériennes **DH10B** (Invitrogen) utilisées pour les clonages avec un faible taux de réussite grâce à une efficacité de transformation accrue.
- Les souches bactériennes **XL10 Gold** (Agilent Technologies) sont les souches utilisées pour la mutagenèse dirigée (*Chapitre 2, section I.3.3*). Elles possèdent une très grande efficacité de transformation et une capacité accrue pour la transformation de vecteurs de grande taille.
- Les souches bactériennes **DH10Bac** (Invitrogen) sont utilisées pour la préparation des bacmides recombinants (*Chapitre 2, section I.4*).

Les souches bactériennes utilisées sont chimio-compétentes et ont été transformées par choc thermique selon les recommandations (température, temps, milieu) propres de chaque fournisseur. Les souches bactériennes utilisées pour la production des protéines recombinantes sont décrites dans la section appropriée.

La congélation des souches bactériennes, contenant ou non nos constructions plasmidiques, est effectuée par mélange avec 50% (v/v) d'une solution de conservation [Glycérol 65% (p/v), MgSO₄ 100 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8,0)] suivi d'un stockage à -80 °C.

I.1.2. Milieux de culture

Les milieux solides LB Agar Miller et LB Lennox Agar (BD Biosciences) ont été utilisés pour la préparation des boîtes de Pétri. Le milieu liquide LB Lennox Broth Base (Invitrogen) a été utilisé pour la culture des bactéries et les milieux SOC (Invitrogen) et NZY pour les transformations bactériennes. L'ensemble de ces milieux sont stérilisés 30 minutes à 120 °C sous 15 psi.

I.2. Purification et quantification de l'ADN

I.2.1. Gel d'agarose

Les gels d'agarose sont utilisés pour analyser les résultats de PCR et de digestions enzymatiques ainsi que pour purifier les fragments d'ADN et les plasmides.

Préparation des échantillons

Les échantillons sont dilués avec du bleu de charge 5X [EDTA 0.1 M, bleu de bromophénol 0,25% (p/v), xylène cyanol 0,25% (p/v), glycérol 30% (v/v)] puis déposés sur le gel d'agarose. Pour évaluer la taille des fragments d'ADN et/ou les quantifier, on utilisera des standards d'ADN (100 pb et 1 kb DNA Ladder, NEB) s'échelonnant de 100 pb à 10 kpb.

Préparation du gel

Celui-ci est obtenu par dissolution d'agarose en poudre (electrophoresis grade, Invitrogen) dans du tampon TAE [Tris-Acetate 40 mM EDTA 1mM (pH 8,0)] à une concentration de **0,5 à 2% (p/v)**, pourcentage qui sera fonction de la taille des échantillons d'ADN à analyser. Le mélange est alors chauffé 10 min au bain marie à 100 °C pour dissoudre l'agarose, puis refroidi avant d'ajouter un volume de 1/10000 d'agent intercalant (SYBR® Safe, Invitrogen) qui permettra la révélation de l'ADN. Le gel est coulé dans un support adapté puis, une fois la polymérisation achevée, placé dans une cuve d'électrophorèse horizontale (Mupid-Exu, Mupid) remplie de tampon TAE. Les échantillons sont alors déposés et migrent sous une tension de 100 Volts.

Révélation

L'ADN ayant migré sur le gel d'agarose est révélé à l'aide d'un transilluminateur UV. Un système constitué d'une enceinte hermétique, d'une caméra CCD et d'un système

d'acquisition (Bio-Print Mega , Vilber-Lourmat) permet de visualiser l'ADN et de sauvegarder/imprimer une image du gel.

I.2.2. Purification de l'ADN

L'ADN plasmidique est purifié à l'aide du QIAprep Spin Miniprep Kit et HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen) selon les protocoles fournis par le fournisseur. Les fragments d'ADN et de PCR purifiés sur gel d'agarose sont extraits en utilisant le QIAquick Extraction Kit (Qiagen) selon les protocoles fournis par le fournisseur. L'ADN purifié peut également être précipité pour concentrer et augmenter la pureté de l'échantillon. Pour cela, on mélange à 1 volume d'ADN : 2,5 volumes d'éthanol absolu froid (-20 °C) et 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 4,8). L'échantillon est placé 30 minutes à -20 °C puis est centrifugé (13200 rpm, 10 min, 4 °C). On enlève le surnageant et on lave avec 1 mL d'éthanol 70 % froid (-20 °C). Après une nouvelle étape de centrifugation, on enlève le surnageant et on laisse sécher le culot à l'air libre. On reprendra ensuite l'échantillon dans un volume de 30-50 µL d'eau stérile.

I.2.3. Quantification de l'ADN

La quantification des échantillons ADN est réalisée de deux manières :

- Soit de façon approximative par analyse sur gel d'agarose et comparaison avec les standards d'ADN du marqueur pour les fragments de PCR et les fragments d'ADN issus de digestion enzymatique.
- Soit par mesure l'absorbance à 260 nm pour les plasmides purifiés en appliquant la relation suivante :

1 unité d'absorbance = 50µg/mL (pour de l'ADN double brin)

La mesure de l'absorbance est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (BioPhotometer, Eppendorf) permettant l'automatisation du calcul précédent.

I.3. Construction des vecteurs d'expression

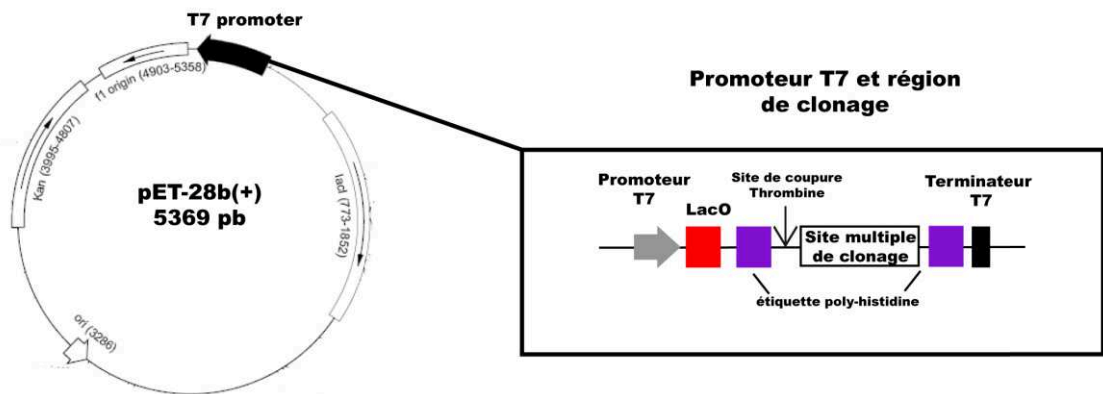
Les amorces d'oligonucléotides utilisées pour la construction des vecteurs d'expression ont été synthétisées chimiquement chez Eurogentec S.A. La liste des amorces utilisées est disponible dans les *tableaux 2.2, 2.3 et 2.4*. La température de fusion (T_m), la présence de dimères et de structures secondaires sont évaluées à l'aide du programme Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). La synthèse de fragments d'ADN a été réalisée par la société GeneCust.

I.3.1. Plasmides utilisés

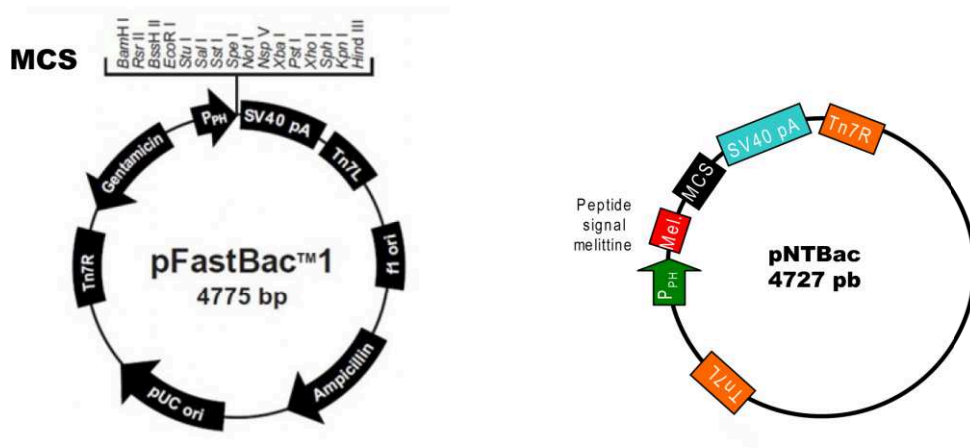
Les cartes vectorielles schématiques des plasmides utilisés pour les différents projets menés durant cette thèse sont repris dans la *figure 2.1*. Le détail de chaque plasmide est donné ci-après :

- Le plasmide **pET-28b +** (Novagen) est utilisé pour l'expression de la calréticuline de *T. cruzi* et de ses variants en système bactérien (*E. coli*). Il s'agit d'un vecteur de type « High copy » (origine de répllication pBR322) permettant le clonage en phase de la protéine d'intérêt avec une étiquette poly-histidine (Histag) en position N-terminale ou C-terminale. L'expression de la protéine est placée sous la dépendance d'un promoteur T7 inducible à l'IPTG. Ce vecteur apporte une résistance à la kanamycine et nécessite l'utilisation de souches bactériennes de type DE3, c'est-à-dire portant une copie du gène de la T7 polymérase (sous dépendance de l'IPTG) et du gène du répresseur LacI (également présent sur pET-28b +) dans l'ADN chromosomique.
- Le plasmide **pFastBac1** provient de chez Invitrogen. Celui-ci est utilisé comme vecteur pour la construction du bacmide recombinant dans le système Bac-To-Bac (*Chapitre 2, section I.4*). Il comporte une cassette d'expression constituée d'un site multiple de clonage permettant l'introduction de notre gène d'intérêt sous la dépendance du promoteur fort de la polyhédrine, d'un signal de polyadénylation du virus Simien 40 (SV40) et d'un gène de résistance à la gentamycine. La cassette est encadrée par les sites Tn7r/Tn7l formant ainsi le fragment mini Tn7 qui est inséré dans le bacmide durant un phénomène de recombinaison. Un gène de résistance à l'ampicilline ainsi qu'une origine de répllication pUC permettent la l'amplification chez *E. coli*. La polyhédrine est une protéine virale surexprimée dans la phase très tardive de l'infection par le baculovirus (entre 24 et 96 H post-infection) qui permet d'encapsuler les particules virales, leur permettant ainsi de résister à l'environnement avant d'être ingérées par un insecte hôte. Le système Bac-To-Bac permet de remplacer le gène de la polyhédrine par notre gène d'intérêt et ainsi de surproduire notre protéine. Le plasmide **pNT-Bac** est une modification du plasmide pFastBac1 (Rossi et al., 1998) dans lequel le peptide signal de la melittine a été inséré, permettant l'expression en phase de fragments de protéines dépourvus de peptide signal endogène.

Expression en système bactérien



Expression en cellules d'insectes



Expression en cellules de mammifères

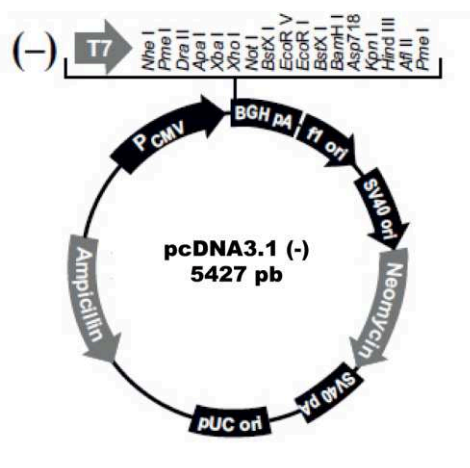


Figure 2.1 : Cartes vectorielles des plasmides d'expression utilisés

Les cartes vectorielles de pET-28b(+), pFastBac1 et pcDNA3.1 (-) proviennent des manuels des fournisseurs respectifs. Kan : kanamycine ; Ori : origine de réplication ; MCS : site multiple de clonage ; P_{PH} : promoteur polyhédrine ; SV40 pA : signal de polyadénylation du virus Simien 40 ; BGH pA : signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine ; P_{CMV} : promoteur du cytomegalovirus.

- Le plasmide **pcDNA3.1(-)** (Invitrogen) est utilisé pour l'expression transitoire des protéines recombinantes en cellules de mammifères CHO et HEK 293-F. Il est constitué d'un promoteur fort CMV (issu du cytomegalovirus), d'un signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine (BGH), de gènes de résistance à l'ampicilline et à la néomycine et d'origines de réplication pour *E. coli* (pUC) et le phage M13 (F1)

I.3.2. Amplification par PCR

Afin d'assurer la meilleure fidélité possible, l'amplification de fragments d'ADN par PCR (hors mutagenèse dirigée) a été réalisée à l'aide de la *Vent* Polymérase (NEB) selon les recommandations du fournisseur en présence d'une matrice d'ADN, d'amorces spécifiques, d'un mélange de dNTP, de MgSO₄ et de tampon ThermoPol.

I.3.3. Mutagenèse dirigée

Les expériences de mutagenèse dirigée décrites ci-après a été réalisé à l'aide du QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) selon les recommandations du fournisseur ou selon les protocoles optimisés. Ce kit a été spécifiquement développé pour les mutagenèses difficiles ou impliquant l'utilisation de vecteurs de grande taille. Les conditions utilisées sont résumées dans le *tableau 2.1*. La conception des amorces de mutagenèse est réalisée conformément aux préconisations du fournisseur. Quand cela est possible, un site de restriction est ajouté ou supprimé (en introduisant une mutation silencieuse) afin de pouvoir facilement sélectionner les colonies positives.

I.3.3.1. Principe

La mutagenèse dirigée permet de réaliser des mutations ponctuelles (insertion d'un site de restriction, remplacement d'un acide aminé) ou d'insérer/supprimer un ou plusieurs acides aminés dans une séquence d'ADN plasmidique. Le protocole se déroule en 3 étapes (*figure 2.2*) :

- Une étape de PCR, dans laquelle le plasmide à modifier (matrice) est mis en présence de deux amorces d'ADN complémentaires (sens et antisens) contenant la mutation, permettant d'insérer la modification dans le plasmide matrice et d'amplifier le plasmide modifié.

- Une étape de digestion par l'enzyme *DpnI* (capable de digérer l'ADN parental méthylé) permettant d'éliminer l'ADN matriciel. Cette étape est nécessaire afin d'éviter par la suite de nombreux faux positifs.
- Une étape de transformation dans la souche ultra-compétente XL10 Gold (*Chapitre 2, section I.1.1*) permettant de sélectionner les plasmides modifiés et de les amplifier.

L'identification des colonies positives (c.à.d. contenant le plasmide correctement modifié) est réalisée soit directement par criblage PCR des colonies (*Chapitre 2, section I.3.4*), soit par extraction/purification du plasmide associé (*Chapitre 2, section I.2.2*) puis digestion enzymatique. Dans ce cas de figure, les enzymes de restriction seront choisies de manière à pouvoir différencier le plasmide matrice et le plasmide modifié. Le choix de la méthode de criblage sera fonction de la modification effectuée.

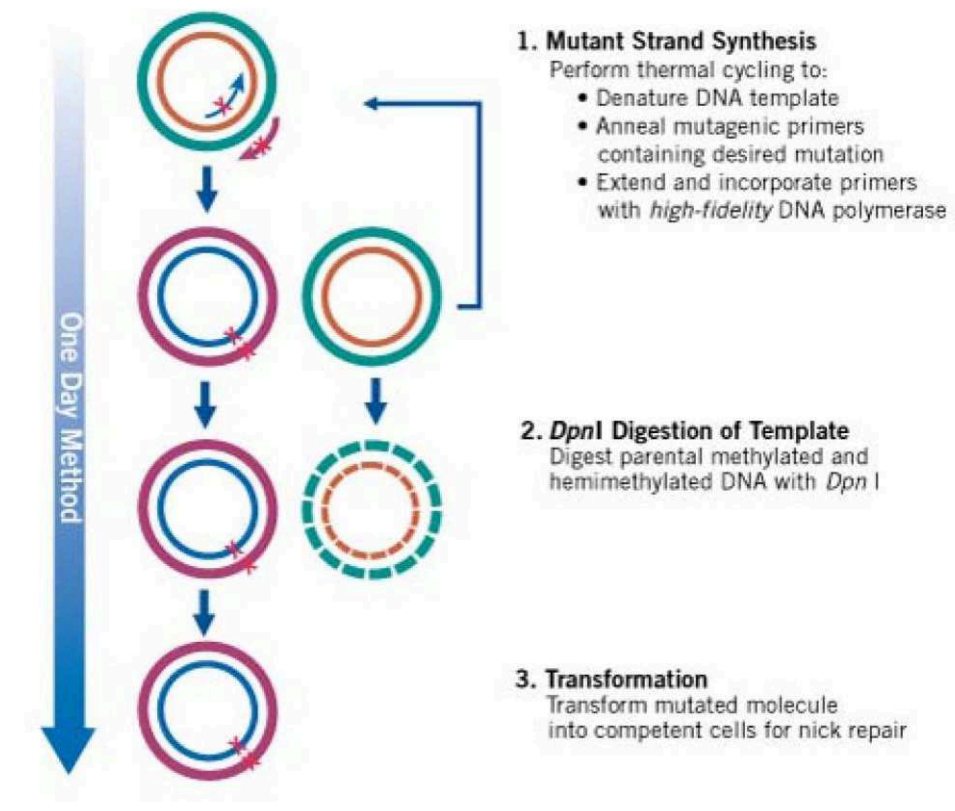


Figure 2.2 : Représentation schématique de la méthode de mutagenèse dirigée du kit QuikChange II XL

Source : Manuel d'instruction QuikChange II XL de Agilent Technologies.

Quelques modifications ont cependant été apportées au protocole initial :

- Utilisation de 50-200 ng de matrice d'ADN
- Pré-traitement thermique de 10 min à 95 °C avant l'ajout des dNTP et de la *Pfu* DNA polymérase
- Utilisation de 1,5 µL de dNTP Mix
- Augmentation du temps d'amplification : 1,5 minutes/ kb de plasmide
- Réalisation de 2 traitements avec *DpnI*

Le protocole classique du kit permet d'atteindre des efficacités de l'ordre **de 80 %** pour des événements de mutagenèse simple (modification de quelques bases, insertion/délétion courte). Cependant, pour des modifications ou des délétions plus longues (avec des amorces de taille plus importante), des optimisations du protocole sont nécessaires. Celles-ci sont décrites ci-après.

1.3.3.2. Optimisation 1 : insertion/délétion longues

La modification concerne la phase d'amplification par PCR qui est divisée en deux étapes distinctes (Wang and Malcolm, 1999), ceci afin d'optimiser l'efficacité de la réaction en limitant la formation de dimère entre les deux amorces de mutagenèse. Il y a ainsi plus d'amorces libres capables de s'hybrider avec l'ADN matriciel. Les étapes de cette optimisation sont les suivantes :

- Réalisation de deux réactions de PCR en parallèle sur 5 cycles avec une température d'hybridation plus basse (55 °C), l'une avec l'amorce sens, l'autre avec l'amorce antisens.
- Mélange des deux tubes réactionnels et ajout de 0,25 µL de *Pfu* DNA polymérase suivi d'un cycle PCR classique de mutagenèse dirigée.

Ce protocole rend possible des événements de mutagenèse dirigée (délétion et insertion) jusque là impossibles à obtenir avec le protocole classique.

I.3.3.3. Optimisation 2 : Insertion de longs fragments d'ADN

Un protocole décrit par Geiser et collaborateurs (Geiser et al., 2001) permet l'insertion de grands fragments d'ADN (méga-primer de 100 à 2000 pb) dans une construction plasmidique sans passer par une étape de clonage. Ces mega-primers peuvent être obtenus soit par une réaction de PCR classique soit par synthèse. Le fragment d'ADN, qui remplace alors l'amorce dans le protocole de mutagenèse dirigée, est directement mélangé avec la matrice avant de subir une amplification par PCR qui est constituée de deux étapes successives : l'une sur 5 cycles avec une température d'hybridation faible (52° C) et l'autre sur 13 cycles avec une température d'hybridation un peu plus élevée (55° C). Des insertions jusqu'à plus de 1 kb ont ainsi pu être réalisées à l'aide de ce protocole (Makarova et al., 2000).

	Protocole classique	Optimisation 1		Optimisation 2
Mélange réactionnel		Tube 1	Tube 2	
ADN matrice	50-200 ng	25 ng	25 ng	50 ng
Megaprimer				100-200 ng
Amorce sens	125 ng	125 ng		
Amorce anti-sens	125 ng		125 ng	
QuikSolution	3 µl	1,5 µl	1,5 µl	3 µl
QuikChange Buffer	5 µl	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
10 minutes à 95 °C				
dNTP Mix	1,5 µL	1 µl	1 µl	1,5 µl
<i>Pfu</i> Polymérase	1 µl	0,5 µl	0,5 µl	1 µl
Cycles de PCR				
PCR 1	1 min 95 °C 50 s 95 °C 50 s 60 °C 1,5 min/kb 68 °C] 18 cycles 7 min 68 °C	30 s 95 °C 30 s 95 °C 60 s 55 °C 1,5 min/kb 68 °C] 5 cycles 8 min 68 °C		30 s 95 °C 30 s 95 °C 1 min 52 °C 1,5 min/kb 68 °C] 5 cycles
		Mélange tube 1 + 2 et ajout 0,25 µL <i>Pfu</i>		PCR2 suit immédiatement PCR1
PCR 2		1 min 95 °C 50 s 95 °C 50 s 60 °C 1,5 min/kb 68 °C] 18 cycles 7 min 68 °C		30s 95 °C 30 s 95 °C 1 min 55 °C 1,5 min/kb 68 °C] 13 cycles 7 min 68 °C

Tableau 2.1 : Résumé des conditions de mutagenèse dirigée utilisées

I.3.4. Vérification des plasmides modifiés

I.3.4.1. Criblage par restriction

L'utilisation d'enzymes de restriction permet de sélectionner les plasmides correctement modifiés sous réserve que la modification entraîne l'ajout/la perte d'un site de restriction ou qu'une différence de migration puisse être observée sur gel d'agarose. Pour chaque enzyme utilisée, nous nous plaçons dans les conditions expérimentales préconisées par les fournisseurs (quantité d'enzyme, température, tampon) permettant la digestion totale de notre ADN et limitant la « star-activity » (digestion non spécifique). Les enzymes sont systématiquement utilisées avec leur tampon associé sauf dans le cas d'une double digestion où le choix du tampon doit alors permettre une activité optimale des deux enzymes (utilisation des tables fournies par les fournisseurs). Les échantillons digérés sont analysés sur gel d'agarose pour déterminer les profils de restriction. Un témoin positif est systématiquement réalisé pour s'assurer du bon fonctionnement des enzymes utilisées. Les profils de restriction attendus (avec la taille des fragments associés) sont générés à l'aide du programme en ligne « NEBcutter » (New England Biolab, <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

I.3.4.2. Criblage des colonies par PCR

Cette technique permet d'obtenir rapidement des informations quant à la réussite d'un clonage ou de l'insertion/délétion d'un fragment d'ADN. Elle s'effectue directement sur des colonies ayant poussés sur une boîte de Pétri. Chaque colonie à cribler est prélevée et mise en suspension dans 7,5 µL d'eau stérile. Un traitement thermique (10 minutes, 95 °C) permet de rompre la paroi ainsi que la membrane plasmique bactérienne et de libérer l'ADN plasmidique contenu dans le cytoplasme. Ce lysat est ensuite mis en présence de 17,5 µL d'un mélange pour PCR (PCRMix, Promega) dans lequel les amorces oligonucléotidiques nécessaires à l'amplification ont été diluées. Dans le cas du criblage d'un clonage, on choisira une amorce sur le vecteur accepteur et une sur le fragment d'ADN inséré. Pour le criblage d'une insertion/délétion d'ADN, on choisira des amorces de part et d'autre de la modification permettant une amplification de taille suffisante (> 150 pb). Le cycle PCR est ensuite réalisé selon les recommandations du fournisseur puis la totalité de l'échantillon est analysée sur gel d'agarose. Le vecteur non modifié est utilisé comme témoin négatif de la modification criblée. Notons que cette technique n'est applicable que pour des différences facilement observables sur gel (à partir de 100 pb). Le kit utilisé est quant à lui optimisé pour amplifier des fragments d'ADN de 200 à 2000 pb.

I.3.4.3. Séquençage

Afin de vérifier qu'aucune mutation non désirée n'est été introduite au cours des différentes étapes de biologie moléculaire, la séquence codante de notre gène d'intérêt est systématiquement déterminée par séquençage. Celui-ci nécessitant un appareillage spécifique et coûteux afin d'obtenir des résultats fiables et sur un grand nombre de paire de base (entre 700 et 1000 pb par réaction de séquençage), nous avons sous-traité cette tâche. La société Cogenics (2009-2010) puis la société GATC Biotech (2010-2012) ont été choisies pour réaliser le séquençage de nos échantillons. Dans les deux cas, les plasmides, les fragments de PCR et les amorces sont envoyés sous forme soluble selon les recommandations propres à chaque fournisseur. L'alignement des séquences d'ADN obtenues est ensuite réalisé à l'aide du logiciel SeqMan (Lasergene 8, DNASTAR) pour comparer les résultats de séquençage à la séquence attendue.

I.3.5. Construction des plasmides pET28b(+) TcCRT Clean, pET 28b(+) TcCRT ΔN et pET 28b(+) TcCRT ΔN/ΔC34

Le gène *TcCRT* d'un des variants de la calréticuline de *Trypanosoma cruzi* (clone Miranda 76, Entrez : AF162779) cloné dans le vecteur pET-28b(+) nous a été généreusement fourni par notre collaborateur Chilien, Arturo Ferreira (Ferreira et al., 2004b). Dans cette construction (pET-28b+ TcCRT AF), le gène de la TcCRT (correspondant aux résidus Thr²¹ à Asp³⁹⁸ sans le peptide signal et le peptide de rétention KEDL) a été cloné directement dans le site *EcoRI*, conduisant à une protéine comportant en position N-terminale une étiquette poly-histidine (étiquette His₆), un site de coupure à la thrombine et des résidus supplémentaires correspondant à la séquence comprise entre les sites de restriction *NdeI* et *EcoRI*. La TcCRT obtenue, nommée TcCRT AF, présente également en position C-terminale une extension de 42 acides aminés résultant de l'absence d'un codon stop à la fin de la séquence clonée.

Une construction optimisée a été obtenue par mutagenèse dirigée (protocole optimisé N° 1) en supprimant la séquence n'appartenant pas à la TcCRT en position N-Terminale et en remplaçant le site de coupure par la thrombine par un site de coupure par la protéase du virus de la gravure du tabac (protéase TEV ; site TEV : **Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln // Gly**). La séquence correspondant à l'étiquette poly-histidine en position N-terminale est quant à elle conservée. Un codon « stop » a ensuite été introduit par mutagenèse dirigée à la fin de la séquence endogène codant pour la TcCRT afin de supprimer l'extension C-terminale et

obtenir le plasmide pET-28b+ TcCRT Clean. La forme globulaire de la TcCRT a été obtenue à partir du plasmide pET-28b+ TcCRT Clean par mutagenèse dirigée (protocole optimisé N° 1) en supprimant le domaine P (résidus Pro²⁰¹ à Glu²⁹⁸) et en le remplaçant par le triplet Gly-Ser-Gly, comme initialement décrit pour la calréticuline humaine par Paidassi et collaborateurs (Paidassi et al., 2011). Cette construction est contenue dans le plasmide pET-28b+ TcCRT ΔP.

Les constructions tronquées en position C-terminale de la forme globulaire de la TcCRT (TcCRT ΔP) ont été obtenues à partir du plasmide pET-28b+ TcCRT ΔP par mutagenèse dirigée (protocole classique) en insérant un codon stop dans la séquence codante après les résidus Lys³⁶⁴ (ΔC34), Lys³⁶⁶ (ΔC32), Lys³⁶⁹ (ΔC29) et Lys³⁷⁷ (ΔC21).

Les différentes amorces oligonucléotidiques utilisées pour les étapes de mutagenèse dirigée et les modifications associées sont répertoriées dans le *tableau 2.2*.

Nom	Séquence (5' => 3')	Modifications
TcCRT ΔNter	GCC ATC ATC ATC ATC ATC ACG AAA ACC TGT ATT TCC AGG GCA CGG TGT ACT TCC ACG AGG	Suppression Extension N-terminale, Ajout site TEV , Perte <i>NheI</i> et <i>EcoRI</i>
TcCRT ΔCter	GGA AAA AAA GGG TGA CCG TGA TTA AAT GCT AGC TCC GTC GAC AAG CTT GCG G	Ajout codon stop . Ajout <i>NheI</i> et perte <i>EcoRI</i>
TcCRT ΔP	GAC TGG AGC CTG CTG CCG GGT AGC GGT GAC TCT GAG CTC CAC AAG G	Remplacement Domaine P par linker GSG . Perte du site <i>SacII</i>
TcCRT ΔP ΔC21	GAG GAA GAG AGG GAA AAG TAA AAG GCC T AG GCG GAG GAA GAA AAG G	Insertion codon stop Ajout <i>StuI</i>
TcCRT ΔP ΔC29	GGA GAA GGA GAA GAG GAA GAA GTA AGA ATT C GA AGA GAG GGA AAA GGA AAA GG	Insertion codon stop Ajout <i>EcoRI</i>
TcCRT ΔP ΔC32	GGA GGA TAT GGA GAA GGA GAA GTA AAG GCC T GA GGA AGA GGA AGA GAG GG	Insertion codon stop Ajout <i>StuI</i>
TcCRT ΔP ΔC34	GTC ATG GAG GAT ATG GAG AAG TAA AAG AGG CCT AAG GAG GAA GAG GAA GAG AGG	Insertion codon stop Ajout <i>StuI</i>

Tableau 2.2 : Amorces de mutagenèse dirigée utilisées pour la construction des vecteurs pET28b+ TcCRT Clean, pET28b+ TcCRT ΔP, pET28b+ TcCRT ΔP ΔC21, ΔC29, ΔC32 et ΔC34

Seules les séquences sens sont données ici. Les séquences antisens peuvent être facilement obtenues en utilisant des logiciels appropriés. Quand des nucléotides sont remplacés dans la séquence originelle, ceux-ci sont indiqués en surbrillance grise.

I.3.6. Construction des plasmides pNT-Bac-CR1 CCP 22-30 et pFastBac1-CR1

L'ADN codant pour la forme soluble de la molécule de CR1, comprenant le peptide signal endogène (Met¹ à Gly⁴¹) et les CCP 1 à 30 (Gln⁴² à Asp¹⁹⁷¹), a été fourni gracieusement par le professeur Jacques Cohen (CHU de Reims). Dans la construction reçue, nommé pKC3 CR1/C4BPα (*figure 2.3*), CR1 est cloné en fusion avec l'extrémité C-terminale de la chaîne α de la C4-Binding Protein ou C4bp (Oudin et al., 2000). La délimitation des domaines CCP dans CR1 est basée sur les informations disponibles dans les banques de données (Uniprot : P17927). Nous avons initialement essayé d'extraire par PCR les séquences codantes de CR1 et de ses modules CCP 22-30 pour les cloner respectivement dans les vecteurs pFastBac1 et pNT-Bac. Cependant, du fait de la forte homologie de séquence entre les différents modules CCP de CR1, cette stratégie n'a pas pu aboutir à cause des difficultés rencontrées dans l'amplification des fragments (hybridation des amorces sur plusieurs sites). Pour solutionner ce problème, une stratégie par mutagenèse dirigée a alors été mise en place (*figure 2.3*). Les amorces utilisées figurent dans le *tableau 2.3*. Concrètement, un site de restriction pour *Bgl*II a été ajouté soit en 5' de la séquence codante de CR1 (en amont du peptide signal endogène, *figure 2.3 : mutagenèse 1*), soit en 5' de la séquence codante du module CCP 22 au niveau du résidu Gly¹³⁹⁴ (*figure 2.3 : mutagenèse 1'*). L'insertion du site *Bgl*II au début du CCP 22 entraîne le remplacement du résidu Gly¹³⁹⁴ par un résidu Leu¹³⁹⁴. Une séquence codant pour un codon « stop » ainsi que pour un site de restriction *Kpn*I a ensuite été insérée par mutagenèse dirigée (**optimisation 1**) après la séquence codante pour le résidu Ala¹⁹⁶⁹ (*figure 2.3 : mutagenèse 2*). Cette insertion est réalisée sur les 2 plasmides obtenus précédemment (*figure 2.3 : mutagenèse 1 et 1'*). Les séquences codantes de CR1 et de CR1 CCP 22-30 sont ensuite obtenues par double digestion *Bgl*II/*Kpn*I puis sont clonées respectivement dans les vecteurs pFastBac1 et pNT-Bac, ouverts entre les sites de restriction *Bam*HI (compatible avec *Bgl*II) et *Kpn*I. Ce clonage entraîne la perte des sites *Bam*HI et *Bgl*II utilisés. Le clonage de la séquence codant pour CR1 CCP 22-30 dans pNT-Bac permet de placer ce fragment en phase avec le peptide signal de la mellitine (protéine présente en grande quantité dans le venin d'abeille) mais ajoute également un résidu d'aspartate à l'extrémité N-terminale du module CCP 22 (Leu¹³⁹⁴).

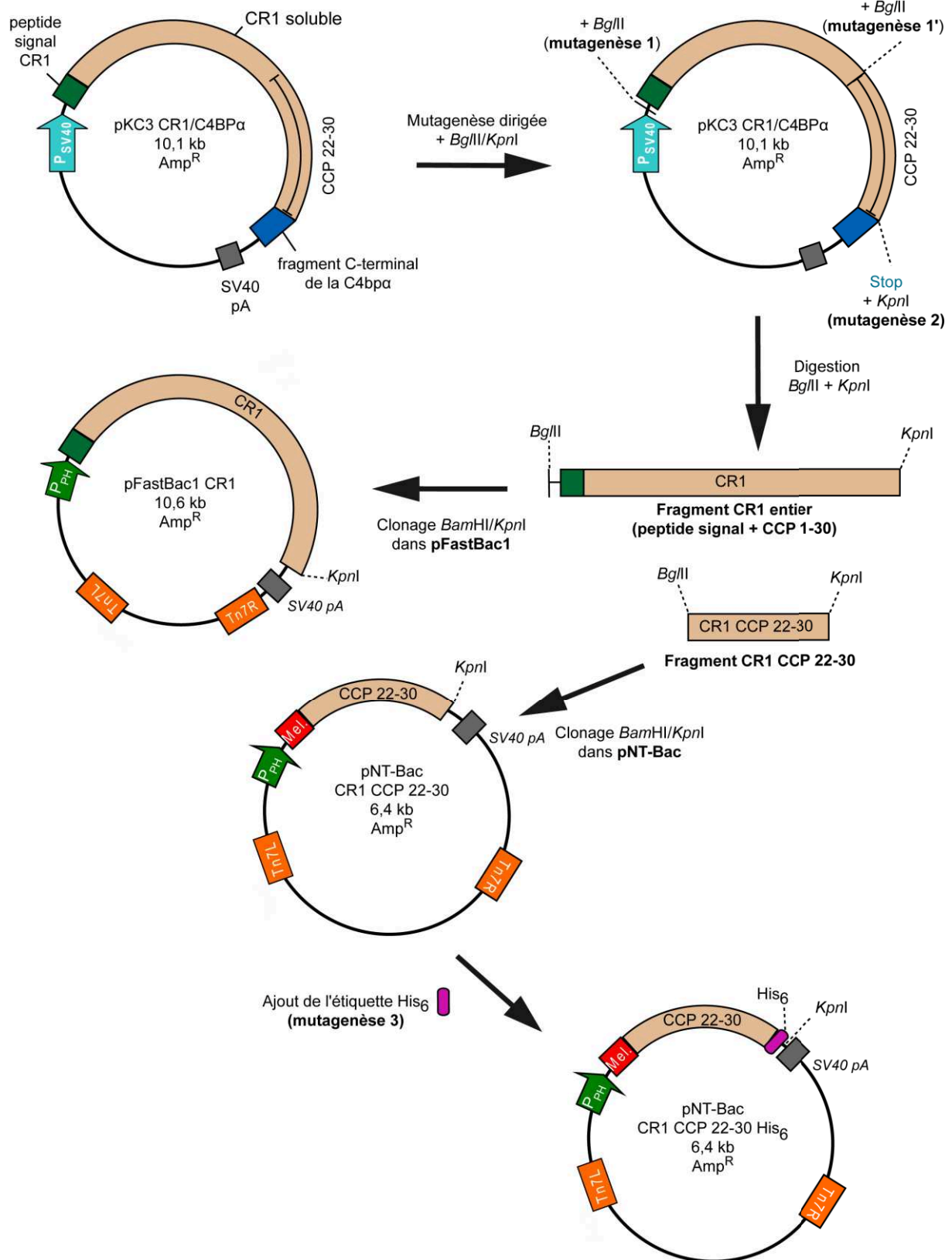


Figure 2.3 : Schéma de la construction des vecteurs pFastBac1 CR1 et pNT-Bac CR1 CCP 22-30 His₆

Amp^R : résistance à l'ampiciline ; P_{SV40} : promoteur du virus Simien 40 ; pA : site de polyadénylation ; P_{PH} : promoteur polyhedrine ; SV40 pA : signal de polyadénylation du virus Simien 40 ; Mel : peptide signal de la melittine ; His₆ : étiquette poly-histidine.

Une courte séquence d'ADN codant pour 6 histidines (étiquette poly-histidine ou His₆) et terminée par un codon stop a été insérée (**mutagenèse 3**) par mutagenèse dirigée (**optimisation 1**) dans le plasmide pNT-BAC CR1 CCP 22-30 à la suite de la séquence codante de CR1 CCP 22-30. Le plasmide ainsi obtenu, pNT-BAC CR1 CCP 22-30 His₆, permet d'exprimer notre protéine d'intérêt en fusion avec l'extension His₆. Cette extension permet d'optimiser l'étape de purification en assurant la rétention de la protéine sur une colonne chargée en ions bivalents (chromatographie IMAC).

Nom	Séquence (5' => 3')	Modification
CR1_2230_BglII_Mut	TCG CTG TGA ACT TTC TGT TCG AGA TCT TCA CTG TAA AAC CCC AGA GCA G	Ajout BglII en 5' CCP 22 (mutagenèse 1')
CR1_Nter_BglII_Mut	CCG TGG TTT GT A GAT CTG CTT GGG GAG AAT GG	Ajout BglII en 5' CR1 (mutagenèse 1)
CR1_KpnI_Beta	CCA AAT GTA CCT CTC GTG CAT AAG GTA CCT CCG GAG GCG GTG GCT CG	Ajout KpnI + codon Stop (mutagenèse 2)
CR1_2230_His6	GCC AAA TGT ACC TCT CGT GCA CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA GGT ACC AAG CTT GTC GAG ATG	Ajout extension His₆ + codon Stop (mutagenèse 3)

Tableau 2.3 : Amorces de mutagenèse dirigée utilisées pour la construction des vecteurs pFastBac1 – CR1, pNT-Bac CR1 CCP 22-30 et pNT-Bac CR1 CCP 22-30 His₆.

Seules les séquences sens sont données ici. Les séquences antisens peuvent être facilement obtenues en utilisant des logiciels appropriés. Quand des nucléotides sont remplacés dans la séquence originelle, ceux-ci sont indiqués en surbrillance grise.

I.3.7. Construction des plasmides pNT-Bac CR1 CCP 22-30 Δ22-23, Δ 22-25, Δ 27-30, Δ 29-30, Δ 26-30, Δ 25-26 et pNT-Bac CR1 CCP CCP 25-26

Les plasmides pNT-Bac CR1 CCP 22-30 His₆ Δ22-23, Δ22-25, Δ29-30, Δ27-30 et Δ25-26 sont obtenus par mutagenèse dirigée (**optimisation 1**) à partir du plasmide pNT-Bac CR1 CCP 22-30 His₆ en supprimant les modules choisis. Pour la construction Δ25-26, un « linker » de 5 résidus a été choisi pour relier les CCP 24 et 27, en accord avec la taille des « linkers » trouvés entre les CCP 24-25 (5 résidus) et les CCP 26-27 (4 résidus). Les plasmides pNT-Bac CR1 CCP 22-30 His₆ Δ26-30 et pNT-Bac CR1 CCP 25-26 His₆ sont générés de la même manière à partir du plasmide pNT-Bac CR1 CCP 22-30 His₆ Δ27-30, en supprimant respectivement les modules CCP 26 et CCP 22 à 24. La délimitation des domaines CCP dans CR1 est basée sur les informations disponibles dans les banques de données (Uniprot : P17927). Les amorces oligonucléotidiques utilisées pour la construction de ces plasmides sont disponibles ci-après dans le *tableau 2.4*.

Nom	Séquence (5' => 3')	Modification
Δ22-23	TCT TAC ATC TAT GCG GAT CTT ATA TCT TGT GAG CCA CCT CCA ACC	Délétion des CCP 22 et 23. Hybridation sur peptide signal et sur CCP 24.
Δ22-25	CAT TTC TTA CAT CTA TGC GGA TCT TAG GGT GTG TCA GCC GCC TCC AG	Délétion des CCP 22 à 25. Hybridation sur peptide signal et sur CCP 26.
Δ29-30	CCT CGC TGT GAA CTT TCT GTT CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA GGT ACC	Délétion des CCP 29 et 30. Hybridation sur CCP 28 et sur tag His ₆ .
Δ27-30	GAA GCC CCT AGA TGT ACA GTG CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA GG	Délétion des CCP 27 à 30. Hybridation sur CCP 26 et sur tag His ₆ .
Δ25-26	CCC CCT CGG TGT ATT TCT ACT AAA TCC TGT GAT GAC TTC CT	Délétion des CCP 25 et 26. Hybridation sur CCP 24 et CCP 27.
Δ26-30	GCT GCC ACA CTG CTC CAG GCA TCA CCA TCA CCA TCA CTA AGG	Délétion du CCP 26. Hybridation sur CCP 25 et sur tag His ₆ .
CCP 25-26	CTT ACA TCT ATG CGG ATC TTA ATA AAT GCA CAG CTC CAG AAG TTG	Délétion des CCP 22 à 24. Hybridation sur peptide signal et sur CCP 25.

Tableau 2.4 : Amorces de mutagenèse dirigée utilisées pour la construction des vecteurs pNT-Bac CR1 CCP 22-30 His₆ Δ22-23, Δ22-25, Δ29-30, Δ27-30 , Δ25-26, Δ26-30 et pNT-Bac CR1 CCP 25-26 His₆

I.3.8. Construction des plasmides pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 et pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 TM

Afin d'évaluer l'importance des glycosylations dans l'interaction de CR1 CCP 22-30 avec les collagènes de défense et dans l'objectif de développer un modèle cellulaire de celle-ci, nous avons réalisé deux constructions dans le vecteur pcDNA 3.1 (-) :

- **pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30** pour l'expression en cellules de mammifères
- **pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 TM/Cyto** pour l'expression à la membrane de cellules de mammifères de CR1 CCP 22-30

I.3.8.1. Construction de pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30

Une première stratégie consistant à cloner les séquences codantes de CR1 et de son fragment CR1 CCP 22-30 (issues de la modification du plasmide fourni par J. Cohen, *Chapitre 2 section I.3.6*) dans pcDNA3.1 (-), entre les sites de restriction *Bam*HI et *Kpn*I, a été réalisée. Celle-ci ayant malheureusement échoué à de nombreuses reprises, une stratégie combinant clonage et mutagenèse dirigée a été mise en place (*figure 2.4*). Tout d'abord, la séquence codante pour CR1 a été extraite du plasmide pKC3 CR1/C4BPα modifié précédemment (**mutagenèse 1+2**, *Chapitre 2 section I.3.6*) par digestion entre les sites de restriction *Eco*RV (situé en amont du site *Bgl*II introduit) et *Kpn*I. Ce fragment a ensuite été cloné entre les sites *Eco*RV et *Kpn*I de pcDNA 3.1 (-) pour obtenir le plasmide pcDNA 3.1 (-) CR1.

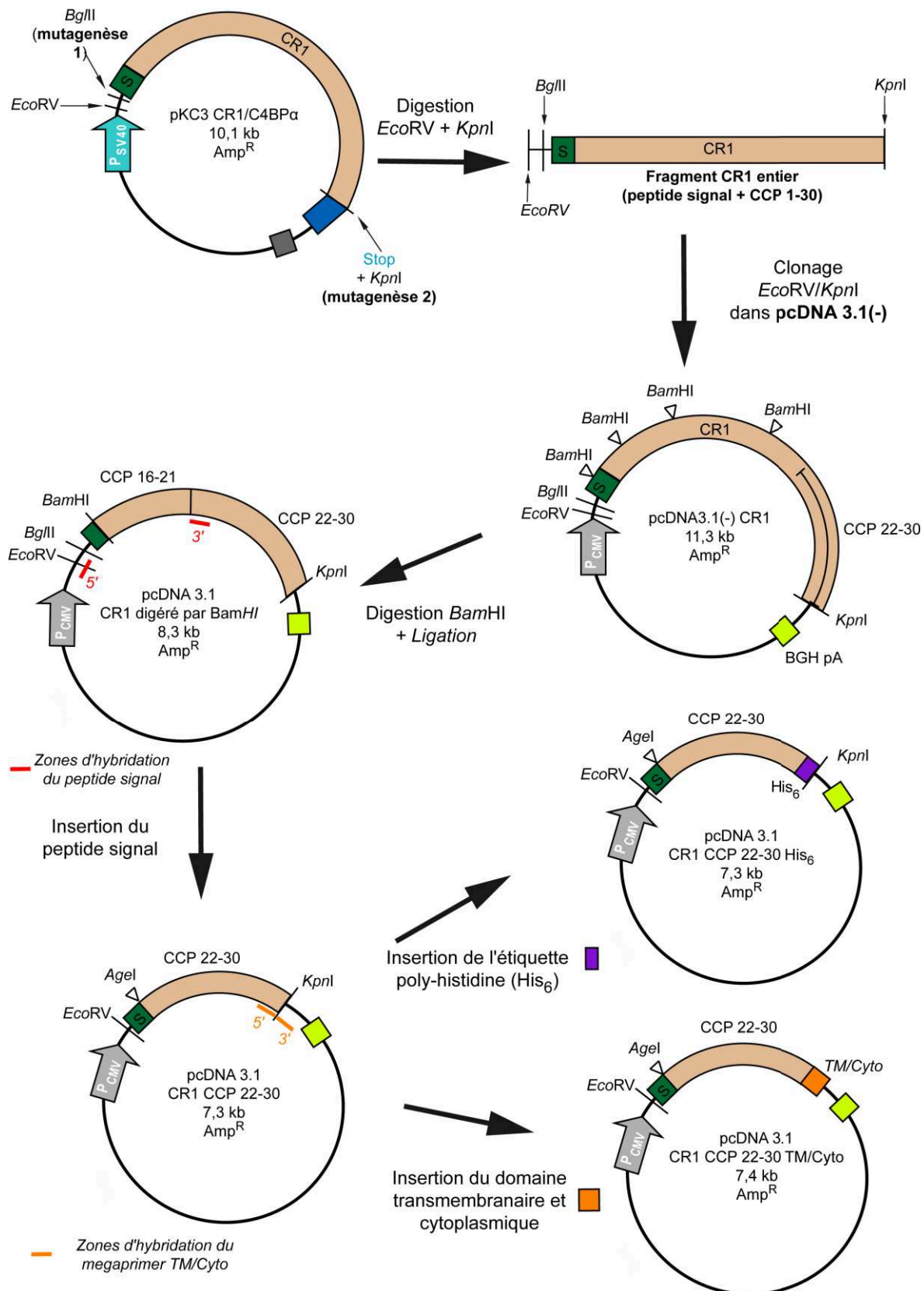


Figure 2.4 : Schéma de la construction des vecteurs pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 et pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 TM/Cyto.

Amp^R : résistance à l'ampicilline; S : peptide signal de CR1 ; P_{SV40} : promoteur SV40 ; BGH pA : signal de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine ; P_{CMV} : promoteur du cytomégalo virus; TM/Cyto : partie transmembranaire et cytoplasmique de CR1 ; His₆ : étiquette poly-histidine.

Malgré la présence d'une partie de séquence ne codant pas pour CR1 (entre *EcoRV* et *BglII*), la séquence de CR1 reste dans la bonne phase de lecture et permet l'expression de la molécule soluble (le premier codon initiateur trouvé est celui du peptide signal endogène de CR1). Afin d'obtenir la construction codant pour CR1 CCP 22-30, pcDNA 3.1 (-) CR1 a été digéré par *BamHI*, permettant ainsi de supprimer une partie de la séquence codante de CR1 (globalement les modules CCP 1 à 15). Après purification et ligation, on obtient un plasmide pcDNA 3.1 contenant le reste de la séquence codante de CR1 (les modules CCP 16 à 30) ainsi qu'une partie du peptide signal de CR1 (un site *BamHI* est présent dans la séquence du peptide signal). Afin de recouvrir la partie du peptide signal manquante et d'enlever la séquence codant pour les modules CCP 16 à 21, une étape d'insertion/délétion a été nécessaire.

Le peptide signal complet de CR1 a été amplifié par PCR à partir du plasmide pKC3-CR1. Les amorces utilisées sont données dans le *tableau 2.5*. Celles-ci sont composées d'une partie s'hybridant spécifiquement au début et à la fin du peptide signal de CR1 (surlignée en bleu ciel) et d'extrémités s'hybridant respectivement avec pcDNA 3.1, soit en amont du site de restriction *EcoRV* (surlignée en jaune) soit au début (à partir de Gly¹³⁹⁴) de la séquence du CCP 22 de CR1 (surlignée en vert). Un site *AgeI* a été introduit, entre la fin de la séquence du peptide signal et le début de la séquence du CCP 22, afin de pouvoir sélectionner les clones positifs et permettre, par la suite, d'autres clonages en phase sous la dépendance du peptide signal de CR1. Cet ajout entraîne la modification de la glycine terminale du peptide signal (Gly⁴¹) en une Thréonine (Thr⁴¹), ce qui ne modifie pas le site de coupure théorique (évaluation avec le programme SignalP). Le fragment d'ADN (megaprimer) ainsi obtenu est utilisé comme amorce dans une réaction de mutagenèse dirigée réalisée dans les conditions décrites précédemment (**optimisation 2**). Cette insertion conduit à la perte du site *BglII* et des séquences codant pour le CCP 16 à 21. Elle permet également de recouvrir le peptide signal dans sa globalité.

Cette construction a été utilisée pour l'expression recombinante de CR1 CCP 22-30 en cellules de mammifères HEK 293-FTM. Le plasmide pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 His₆ a été obtenu par mutagenèse dirigée (optimisation 1) à partir du plasmide pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 avec les amorces données dans le *tableau 2.5*. Cette modification permet l'optimisation des étapes de purification de la protéine recombinante.

Nom	Séquence (5' => 3')	Modification
For_Signal_CR1_MegaP	CCG CCA CTG TGC TGG ATA TCT GCA GAA TTA TGG GGG CCT CTT CTC CAA GAA GCC C	Amplification du peptide signal de CR1 (côté 5') et insertion dans le plasmide pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 au niveau de la région promotrice
Rev_Signal_CR1_MegaP	GGA AAC TGC TCT GGG GTT TTA CAG TGA CCG GTC CAG GCC ACC GGC AGC GCA AGC	Amplification du peptide signal de CR1 (côté 3') et insertion dans le plasmide pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 au niveau du CCP 22. Ajout du site <u>AgeI</u> .
pcDNA3.1 CR1 CCP 22-30 His	CCT CCT CTG GCC AAA TGT ACC TCC CGG GCA CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA GGT ACC AAG CTT AAG TTT AAA CCG CTG ATC AGC	Ajout d'une étiquette poly-histidine et d'un site <u>SmaI</u>

Tableau 2.5 : Amorces de PCR pour l'amplification et l'insertion du peptide signal de CR1 et amorces de mutagenèse dirigée utilisée pour l'ajout de l'étiquette poly-Histidine (His6) sur la construction pcDNA 3.1(-) CR1 CCP 22-30.

Seule l'amorce sens pour l'insertion de l'étiquette poly-histidine est donnée ici. La séquence antisens peut être facilement obtenue en utilisant des logiciels appropriés. Quand des nucléotides sont remplacés dans la séquence originelle, ceux-ci sont indiqués en surbrillance grise.

1.3.8.2. Construction de pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 TM/Cyto

La seconde phase a consisté à insérer le fragment correspondant aux parties transmembranaire et cytoplasmique de CR1. Cette séquence d'ADN n'étant pas disponible sur le plasmide fourni par J. Cohen (partie soluble de CR1 uniquement), un fragment d'ADN correspondant a du être synthétisé (*figure 2.5*). Ce fragment contient la séquence codante pour les parties transmembranaire et cytoplasmique de CR1 (provenant de la séquence de l'ARN_m de CR1 Y00816) ainsi que des zones d'hybridations nécessaires à son insertion par mutagenèse dirigée. L'ADN synthétisé étant fourni dans un plasmide, des sites de restriction ont du être ajoutés à chaque extrémité pour pouvoir sortir le fragment. Ces sites sont choisis de façon à permettre une coupure « bout franc » et à ne pas introduire de modification lors de l'insertion. Celui-ci a ensuite été inséré par mutagenèse dirigée, de la même manière que le peptide signal de CR1 (**optimisation 2**), dans le plasmide pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 pour obtenir la construction pCDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 TM/Cyto qui a été utilisée pour les expériences d'expression à la membrane du fragment CR1 CCP 22-30. L'insertion entraîne la perte du site de restriction *KpnI*. Cette stratégie permettrait également de modifier le plasmide pcDNA 3.1 CR1 et d'ajouter ainsi les fragments transmembranaire et cytoplasmique à la molécule entière de CR1. Cependant, compte-tenu des délais impartis, la construction d'un tel plasmide n'a pas pu être réalisée.

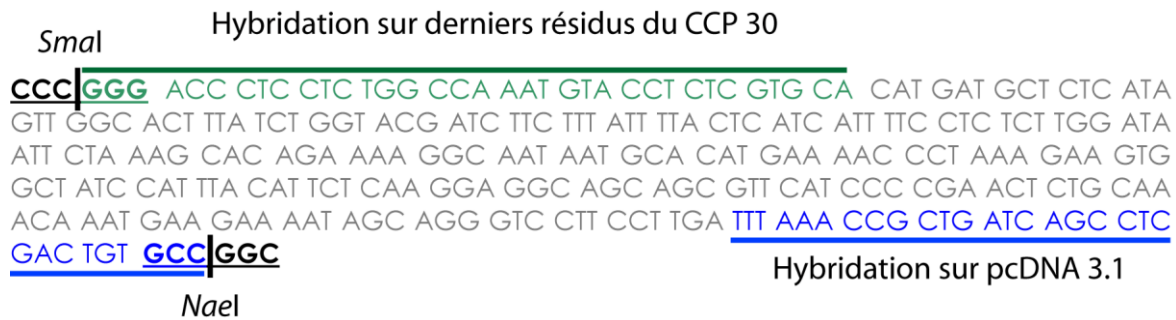


Figure 2.5 : Fragment d'ADN synthétique conçu pour l'insertion des parties transmembranaire et cytoplasmique de CR1.

En gris : séquence d'ADN de la partie transmembranaire et cytoplasmique de CR1 ; En vert et en bleu : zone d'hybridation du megaprimer, respectivement sur les derniers résidus du module CCP 30 et sur pcDNA3.1.

I.4. Transposition

L'obtention du bacmide recombinant, étape préalable à la transfection de cellules d'insectes pour l'obtention de virus, est réalisée selon le protocole du système Bac-to-Bac (Invitrogen) dont les grandes étapes sont rappelées dans la *figure 2.6*.

Un vecteur donneur de type pFastBac1 ou pNT-Bac est tout d'abord transformé dans la souche *E. coli* DH10Bac. Cette souche contient les éléments nécessaires à l'étape de transposition qui permet l'insertion dans un bacmide accepteur de la cassette génétique d'intérêt (contenant le gène d'intérêt sous la dépendance du promoteur de la polyhédrine ainsi qu'un site de polyadénylation SV40 et un gène de résistance à la gentamycine) contenu dans le vecteur donneur. Cette cassette est encadrée par les sites *Tn7r* et *Tn7l* qui permettent sa transposition (grâce à une transposase codée par un plasmide *helper*) au niveau du site **mini-attTn7** présent dans le bacmide. Un tel événement conduit à la perte de l' α -complémentation de la β -galactosidase. Les colonies bactériennes sont d'abord sélectionnées en fonction du succès de l'évènement de transposition (sélection bleu/blanc) puis en fonction de leur susceptibilité à l'ampicilline (résistance à l'ampicilline portée par le vecteur donneur). Les colonies blanches sensibles à l'ampicilline (bactéries contenant potentiellement le bacmide recombinant et ayant perdu le vecteur donneur) sont finalement criblées par PCR et les bacmides positifs résultants préparés à l'aide d'une Midiprep en vue de l'étape de transfection (*Chapitre 2, III.3.2*).

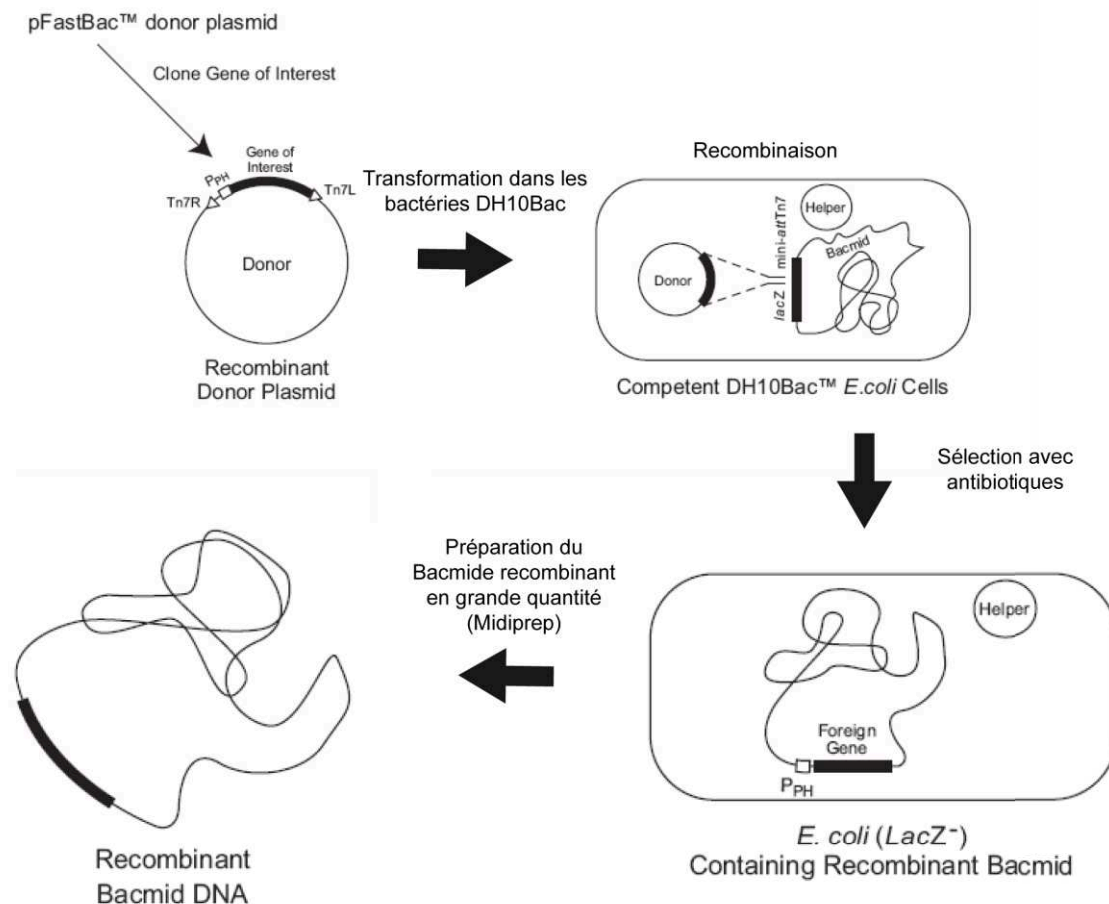


Figure 2.6 : Représentation schématique des étapes de la transposition (Adapté du manuel d'utilisateur du système Bac-To-Bac)

II. Methodes d'analyse des protéines – Biochimie

II.1. Détermination des paramètres biophysiques intrinsèques des protéines

Les différents paramètres théoriques et expérimentaux des protéines recombinantes produites et utilisées durant ce projet sont donnés dans le *tableau 2.6*.

II.1.1. Détermination *in silico*

La masse moyenne (Da) théorique, le point isoélectrique et le coefficient d'absorption molaire (Abs 1 %/cm : absorbance d'une solution à 10 g/L) de chaque protéine étudiée sont déterminés de manière informatique à l'aide du programme ProtParam, disponible sur le serveur ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

II.1.2.Détermination de la masse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

Les analyses de masses ont été effectuées sur la plateforme de spectrométrie de masse de l'IBS par Lucas Signor et Isabelle Bérard sur un appareil MALDI-TOF MS Autoflex (Bruker Daltonics). Les échantillons solubles sont co-cristallisés avec une matrice d'acide sinapinique (SA) puis déposés sur la cible. Ils sont ensuite désorbés et ionisés par un faisceau laser pulsé puis séparés dans un analyseur temps de vol dans un mode linéaire positif afin de déterminer les rapports m/z . Un traitement informatique des données permet d'obtenir un spectre à partir duquel sera déduite la masse molaire expérimentale moyenne de notre protéine. L'erreur expérimentale observée pour chaque mesure est de l'ordre de 0.1%.

II.1.3.Détermination de la séquence N-terminale des protéines

La détermination de la séquence N-terminale des protéines a été réalisée par Jean-Pierre Andrieu au niveau de la plateforme de séquençage protéique de l'IBS. La séquence a été déterminée à chaque fois sur les 5 à 8 premiers résidus, longueur suffisante pour identifier précisément nos protéines et les possibles contaminants. La détermination de la séquence en acides aminés est basée sur le principe de la réaction de dégradation d'Edman (Edman, 1949). Les dérivés d'acides aminés générés à chaque cycle réactionnel sont identifiés et quantifiés par séparation par HPLC et comparaison avec des standards.

II.1.4.Analyse par spectrométrie de dichroïsme circulaire

L'analyse par dichroïsme circulaire des échantillons protéiques a été réalisée à l'EMBL sous la supervision de Marc Jamin sur un spectropolarimètre 810 (JASCO) thermostaté. Le dichroïsme circulaire est une technique non destructive permettant l'analyse de la conformation secondaire et tertiaire d'échantillons protéiques solubles. Son principe repose sur la capacité des molécules chirales d'absorber différemment la lumière polarisée à gauche et celle polarisée à droite. L'appareil de dichroïsme circulaire permettra la mesure de la différence entre ces deux types d'absorbance ($\Delta A = A_G - A_D$) qui sera exprimée ici en millidegrés (mDeg).

Dans les protéines, 3 chromophores principaux contribuent au signal observé :

- Les liaisons peptidiques pour des longueurs d'ondes inférieures à 240 nm
- Les acides aminés aromatiques (tryptophane, phénylalanine, tyrosine) entre 260 et 350 nm.
- Les ponts disulfures qui absorbent majoritairement vers 260 nm.

Deux zones spectrales sont alors généralement observées :

- L'UV lointain entre 180 et 260 nm qui nous renseigne sur les structures secondaires des protéines (hélices α , feuilletts β). Il est possible de déduire des spectres la proportion relative de chaque structure secondaire.
- L'UV proche entre 260 et 350 nm qui nous renseigne sur la structure tertiaire des protéines.

Les spectres de dichroïsme circulaire ont été enregistrés dans une cuve UV ($l = 0,1$ cm) à une température de 20 °C dans la région des UV lointains entre 200-210 et 260 nm. Pour chaque mesure, 5 spectres ont été accumulés à une vitesse de 50 nm/min pour une résolution de 0,5 nm. La solution protéique était concentrée entre 10 et 20 μ M dans du tampon Phosphate de sodium 20 mM NaF 130 mM (pH 7,3). Ce tampon est particulièrement adapté pour le dichroïsme circulaire du fait de l'absence d'ions chlorure qui ne perturbent pas le signal. Le logiciel Spectra manager (JASCO Corporation) a été utilisé pour acquérir les données. Notons que les spectres de dichroïsme circulaire du fragment CR1 CCP 22-30 sans étiquette poly-histidine ont été enregistrés à l'IBS sur un spectropolarimètre Jobin Yvon CD6 sous la supervision de Dominique Madern à une température de 20 °C. L'échantillon était dilué en tampon phosphate 25 mM NaCl 150 mM (pH 7,5) à une concentration de 0,48 mg/mL. 6 spectres ont été accumulés à une vitesse de 0,5 nm / s dans une cuve de 0,1 cm de trajet optique.

II.1.5.Détermination de la masse apparente par chromatographie d'exclusion

La chromatographie d'exclusion permet de séparer les constituants d'un mélange complexe en fonction de leur masse apparente et de leur forme. La capacité séparative (ou résolution) de cette technique dépend de la granulométrie, de la porosité et de la hauteur de la phase utilisée. Pour nos analyses, nous avons utilisé une colonne Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, volume de phase = $V_t = 24$ mL) permettant de séparer des protéines globulaires de 1 à 300

kDa. Cette colonne a préalablement été calibrée en tampon Tris-HCl 20 mM NaCl 150 mM CaCl₂ 5 mM (pH 7,4) avec les standards de protéines globulaires suivants : ovalbumine (43 kDa); BSA monomérique (66 kDa); BSA dimérique (132 kDa); BSA trimérique (198 kDa). Le volume mort (V_m) est déterminé par injection de bleu dextran (2 MDa). Les volumes d'élutions (V_e) obtenus sont donnés dans la *figure 2.7*.

Ces volumes d'élution nous permettent de calculer pour chaque molécule le coefficient de partage (K_{AV}) selon la relation :

$$K_{AV} = (V_e - V_m) / (V_t - V_m)$$

La relation entre la masse moléculaire (MW) et le K_{AV} (Log MW = a.K_{AV} + b) doit être linéaire. La courbe obtenue (*figure 2.7*) nous permet de déduire la masse moléculaire apparente d'une protéine injectée sur la colonne en fonction de son volume d'élution. Cette méthode donnera une bonne estimation de la masse moléculaire apparente, sous réserve que la protéine analysée soit globulaire et n'interagisse pas avec la phase.

Molécule injectée	Volume d'élution (mL)
bleu dextran	8,1
BSA (trimère)	10,7
BSA (dimère)	11,5
BSA (monomère)	12,9
ovalbumine	13,7

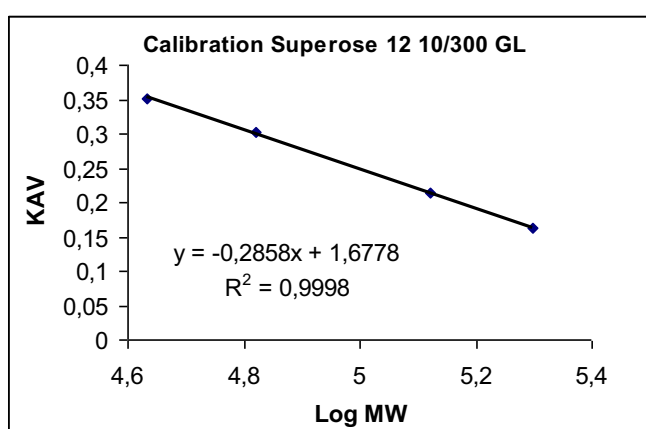


Figure 2.7 : Calibration de la colonne Superose 12 10/300 GL

Les volumes d'élution des molécules servant à la calibration sont indiqués dans le tableau de droite. Le graphique de gauche correspond à la courbe de calibration utilisée pour déterminer les masses moléculaires expérimentales. K_{AV} : coefficient de partage; MW : masse moléculaire

Dans le cas de CR1 CCP 22-30 et de ses fragments, l'analyse des échantillons a été effectuée en tampon PBS (pH 7,4). Pour la TcCRT et ses fragments, cette même analyse a été réalisée en tampon Tris HCl 20 mM NaCl 150 mM CaCl₂ 5 mM (pH 7,4). Les quantités (de 50 à 500 µg) et volumes chargés sur la colonne sont en accord avec les recommandations du fournisseur.

II.2. Analyse des échantillons protéiques

II.2.1. Quantification des échantillons protéiques

La présence dans les protéines de résidus aromatiques (Phe, Trp, Tyr) leur procure la capacité d'absorber fortement à une longueur d'onde de 280 nm. Classiquement, cette absorbance permet de déterminer la concentration molaire (mol.L^{-1}) des échantillons protéiques en appliquant la loi de Beer-Lambert (*Beer, 1852*) :

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C \text{ ou } C = A / (\epsilon \cdot l)$$

où A correspond à l'absorbance à 280 nm de l'échantillon, l à la longueur du trajet optique en cm, C à la concentration de l'échantillon en mol.L^{-1} et ϵ au coefficient d'extinction molaire à 280 nm en $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

La concentration massique (g.L^{-1}) peut être obtenue en multipliant la concentration molaire (mol.L^{-1}) par la masse moléculaire de la protéine exprimée en Da ou en g.mol^{-1} . Pour simplifier les calculs, nous avons déterminé pour chaque protéine une valeur correspondant à l'absorbance d'une solution à 10 g.L^{-1} (Abs 1 %/cm). Une simple règle de trois permet alors de passer de l'absorbance à la concentration en g.L^{-1} .

Le coefficient d'extinction molaire à 280 nm est calculé d'après la méthode de Edelhoch (*Edelhoch, 1967*) mais en utilisant les coefficients d'extinction molaire de la tyrosine et du tryptophane déterminés par Pace et collaborateurs (*Pace et al., 1995*). Ce calcul repose sur la composition en acides aminés de la protéine et sur la présence de résidus de cystéines impliqués dans la formation de ponts disulfures (cystines). La formule de calcul du coefficient d'extinction molaire est la suivante :

$$\epsilon (\text{protéine}) = \text{Nbre (Tyr)} \cdot \epsilon (\text{Tyr}) + \text{Nbre (Trp)} \cdot \epsilon (\text{Trp}) + \text{Nbre (cystine)} \cdot \epsilon (\text{cystine})$$

Avec $\epsilon (\text{Tyr}) = 1490 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon (\text{Trp}) = 5500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et $\epsilon (\text{cystine}) = 125 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (ϵ à 280nm)

Ce calcul considère l'hypothèse qu'aucun autre groupement n'absorbe à 280 nm (comme notamment les groupements prosthétiques de certaines protéines). L'utilisation du programme ProtParam, disponible sur le serveur ExPASy, permet d'automatiser le calcul du coefficient d'extinction molaire (<http://web.expasy.org/protparam/>).

II.2.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

La méthode d'analyse par SDS-PAGE (SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) permet de séparer les différents constituants d'un mélange protéique complexe en fonction de leur masse moléculaire et sans considération de charge (Laemmli, 1970).

II.2.2.1. Préparation des échantillons

Les échantillons protéiques qui vont être analysés sur gel SDS-PAGE sont dénaturés par un traitement thermique et chimique. Pour ce faire, on mélange notre échantillon avec une solution dénaturante concentrée 4X [Tris-HCl 0,125M, SDS 6 %, glycérol 20 %, bleu de bromophénol (pH 6,8)] en présence ou non de DTT 100 mM dans le cas où l'on souhaite des échantillons réduits ou non réduits. Dans les deux cas, les échantillons sont ensuite chauffés 5 minutes à 95 °C à l'aide d'un bain sec. Ceux-ci peuvent être déposés immédiatement sur le gel ou conservés à 4 °C ou -20 °C. Lorsque le volume de l'échantillon est trop important pour être déposé sur gel, celui-ci est précipité par un volume équivalent d'acide trichloroacétique 50 % (TCA) pendant une nuit à 4 °C. On centrifuge ensuite l'échantillon (4 °C, 30 min, 13200 rpm) avant de retirer le surnageant et de laver 2 fois le culot avec une solution d'acétone pure. Le culot sera ensuite remis en suspension dans un volume adapté de tampon de dénaturation.

II.2.2.2. Préparation du gel

Le gel de polyacrylamide est composé de deux gels distincts aux propriétés séparatives différentes (diamètre des mailles du gel différent) :

- Un gel dit de concentration [Tris-HCl 125 mM pH 6,8, **acrylamide 3 %** (p/v) - bisacrylamide 0,08 % (p/v), SDS 0,1 % (p/v), persulfate 0,04 % (p/v), *N,N,N',N'*-tétra-méthyl-éthylènediamine (TEMED) 0,4 % (v/v)] permettant de concentrer le mélange de protéines avant la séparation.
- Un gel dit de séparation [Tris-HCl 375 mM pH 8,8, **acrylamide 7.5 – 12.5 %** (p/v) - bisacrylamide 0,2 – 0,33 % (p/v), SDS 0,1 % (p/v), persulfate 0,025 % (p/v), *N,N,N',N'*-tétra-méthyl-éthylènediamine (TEMED) 0,2 % (v/v)] permettant de séparer les constituants du mélange protéique en fonction de leur masse moléculaire. C'est en jouant sur le pourcentage d'acrylamide présent dans ce gel que l'on pourra optimiser la séparation des échantillons protéiques.

Le gel est placé dans un système d'électrophorèse vertical (Dual Vertical Mini-Gel Electrophoresis System, CBS Scientific Co). Le tampon de migration [Tris-HCl 25 mM Glycine 192 mM SDS 0,1 %, pH non ajusté] est ensuite ajouté et les échantillons sont chargés dans les puits. La migration des échantillons s'effectue grâce à la génération d'un champ électrique (générateur PowerPac 300, Biorad) à une tension de 200 Volt. Les échantillons alors chargés négativement (présence du SDS), migreront de l'anode (-) vers la cathode (+).

L'utilisation d'un mélange protéique prêt à l'emploi (Prestained Protein Ladder Plus, Euromedex) contenant des protéines de masse moléculaire connue [250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa et 10 kDa] comme standard de migration, permettra ensuite de localiser facilement nos protéines d'intérêt et d'obtenir une approximation de leurs masses moléculaires. Une fois la migration achevée, on procèdera soit à la révélation des protéines du gel à l'aide d'une solution de bleu de Coomassie instantanée (Instant Blue, Expedion) soit au transfert sur membrane de nitrocellulose (immunorévélation) ou de PVDF (en vue du séquençage).

II.2.3. Transfert sur membrane de nitrocellulose (Western Blot)

Le transfert sur membrane ou Western Blot est une technique permettant de révéler à l'aide d'anticorps hautement spécifiques certaines protéines séparées par SDS-PAGE. Le transfert sur une membrane de nitrocellulose rend alors accessible aux anticorps les protéines qui étaient contenues à l'intérieur du gel SDS-PAGE.

II.2.3.1. Préparation de la membrane

Après la séparation électrophorétique, on équilibre le gel ainsi qu'une membrane de nitrocellulose (Whatman) dans du tampon de transfert [Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, éthanol 20 % (v/v), pH non ajusté] pendant quelques minutes. On procède ensuite au montage ci-après (*figure 2.8*). Ce montage est ensuite placé un appareil de transfert (Mini Blot Cell, Biorad) en présence de tampon. Le transfert s'effectue soit à 4 °C à 100 Volt pendant une heure soit à 12 Volt pendant la nuit. Les échantillons protéiques présents dans le gel étant chargés négativement (SDS), ils migreront depuis la borne – vers la borne + de l'appareillage.

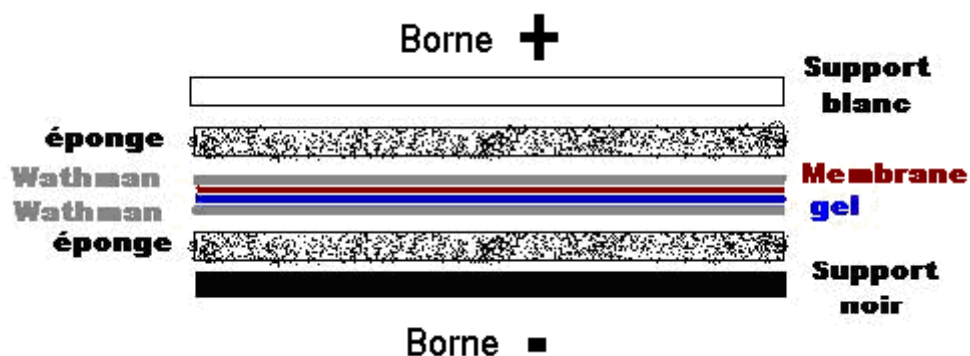


Figure 2.8 : Schéma de montage en vue de la réalisation d'un transfert sur membrane de nitrocellulose

II.2.3.2. Immunorévélation

Une fois le transfert effectué, on rince 2 fois la membrane avec du tampon PBS (10 minutes/lavage). On pourra éventuellement la colorer avec une solution de rouge ponceau (Ponceau S solution, Sigma Aldrich) afin de vérifier l'efficacité du transfert. La membrane est ensuite mise en présence d'une solution de blocage [tampon PBS + 5 % (p/v) de lait lyophilisé] pendant 1 h à 37 °C sous agitation pour saturer les sites non spécifiques.

Un anticorps primaire spécifique d'un épitope de la protéine d'intérêt à révéler est ensuite ajouté. Celui-ci est dilué dans la solution de blocage et est mis en présence de la membrane pendant 1 h à 37 °C ou une nuit à 4 °C sous agitation. Après 3 lavages de 10 min avec du tampon PBS additionné de 0,05 % de Tween 20 (PBS-T), la membrane est incubée dans les mêmes conditions que précédemment avec un second anticorps, spécifique de l'isotype de l'anticorps primaire et couplé à peroxydase de Raifort (HRP) ou à la phosphatase alcaline. Après de nouveau 3 lavages de 10 min en PBS-T, la membrane est séchée avant de procéder à sa révélation. Les dilutions et les anticorps utilisés sont donnés dans le tableau 2.6.

Nom commercial	Espèce	Type	Epitope	Dilution	Couplage
Anti CR1 H-300 (Santacruz)	Lapin	Polyclonal (I)	CCP 27-30 CR1	1/400	non
Anti-histidine (Sigma)	Souris	Monoclonal (I)	étiquette poly-histidine	1/2000	HRP
Anti-lapin	Chèvre	Polyclonal (II)	IgG de lapin	1/12500	HRP
Anti-lapin	Chèvre	Polyclonal (II)	IgG de lapin	1/5000	Phosphatase alcaline

Tableau 2.6 : Anticorps et dilutions utilisés pour l'immunorévélation par Western Blot

I : anticorps primaire; II : anticorps secondaire; HRP : « horse radish peroxydase » ou peroxydase de Raifort

Pour la HRP, la révélation de la membrane est réalisée par chimioluminescence à l'aide d'un kit commercial (ECL Advance Western Blotting detection kit, GE Healthcare) contenant le substrat de la peroxydase. La détection de la réaction est quant à elle réalisée à l'aide d'une caméra CCD (Image Station, Kodak) associée à un logiciel de traitement d'image (Image Analyser Software, Kodak). Le temps d'exposition de la caméra sera choisi en fonction de l'intensité du signal désirée.

Pour la phosphatase alcaline, la membrane est mise en contact avec 1 mL de substrat NBT/BCIP Uptima (Interchim) pendant quelques minutes jusqu'à obtenir l'intensité de signal désirée. Pour stopper la réaction, la membrane est simplement lavée plusieurs fois avec de l'eau distillée.

II.2.4. Transfert sur membrane de PVDF

Le transfert sur membrane peut être également utilisé pour le séquençage N-terminale des protéines contenues dans un mélange complexe et séparé sur gel SDS-PAGE. De la même manière que pour le Western Blot, les protéines du gel SDS-PAGE sont transférées sur une membrane mais ici de PVDF. Cette membrane sera ensuite colorée avec du bleu de Coomassie [bleu de Coomassie G250 0,1% (p/v), éthanol 40 % (v/v), acide acétique 1 % (v/v)] puis décolorée avec une solution d'éthanol 50 % (v/v) jusqu'à l'apparition de la bande correspondant à la protéine. Celle-ci est ensuite séchée, découpée puis donnée en séquençage. L'utilisation de membrane de nitrocellulose n'est pas possible car l'un des solvants utilisé pour le séquençage la dissout.

III. Production des protéines recombinantes

Les principales caractéristiques des protéines utilisées durant ce projet sont répertoriées dans les *tableaux 2.7, 2.8 et 2.9*.

III.1. Protéases et collagènes de défense

Les protéases (MASP-3, C1r₂C1s₂) et les collagènes de défense sont régulièrement produits au laboratoire. Ils sont issus soit de source recombinante soit extraits de plasma humain. Bien qu'utilisant régulièrement ces protéines, je n'ai pas participé activement à leur purification.

III.1.1. C1q

La protéine C1q a été purifiée à partir de sérum humain comme décrit par Arlaud et collaborateurs (Arlaud et al., 1979b). Les régions globulaires (GR) et les fragments collagènes (CLF) ont été obtenus à partir de C1q purifié, respectivement par traitement à la collagénase et à la pepsine, puis purifiés comme décrit par Thielens et collaborateurs (Thielens et al., 1993).

III.1.2. C1r₂C1s₂

Le tétramère C1r₂-C1s₂ a été purifié à partir du complexe C1 isolé du sérum humain et selon le protocole décrit par Arlaud et collaborateurs (Arlaud et al., 1979b).

III.1.3. MBL

La MBL a été produite en cellules HEK 293-FTM et purifiée par chromatographie d'affinité sur Glucosamine-Sepharose, comme décrit par Jensen et collaborateurs (Vorup-Jensen et al., 2001). Ses variants K55A et K55E ont été exprimés en cellules HEK 293-FTM et purifiés comme décrit par Teillet et collaborateurs (Teillet et al., 2007).

III.1.4. Ficolines L, H et M

La ficoline L a été purifiée du plasma selon le protocole décrit par Teillet et collaborateurs (Teillet et al., 2008). Son domaine fibrinogène a été exprimé en cellules d'insectes et purifié par chromatographie échangeuse d'ions à partir de surnageant de culture (Garlatti et al., 2007). La ficoline H a été purifiée à partir de surnageant de culture de lignée stable CHO-K1 et purifiée par chromatographie échangeuse d'ions et chromatographie d'exclusion (Lacroix et al., 2009). La ficoline M a été produite en cellules S2 de drosophiles et purifiée à partir du surnageant de culture selon la méthode décrite par Liu et collaborateurs (Liu et al., 2005).

III.1.5. MASP-3

MASP-3 a également été produite par transfection transitoire de cellules de mammifères HEK 293-FTM avec le plasmide pcDNA3.1 contenant le gène codant pour MASP-3. La protéine est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne Sepharose-C1q (Ancelet et Thielens, résultats non publiés).

III.1.6.

CR1

Le domaine extracellulaire de CR1, contenant les CCP 1 à 30 (Gln⁴² à Asp¹⁹⁷¹) ainsi qu'une extension poly-histidine (His₁₀) en position C-terminale, a été acheté chez R&D SYSTEM. Cette protéine, produite dans une lignée cellulaire de myélome de souris dérivée des cellules NS0, est reçue sous forme lyophilisée et est reprise à 400µg/mL dans un tampon PBS.

Protéine	MW Th. (Da)	MW Exp. (Da)	pI Th.	Abs 1%/cm (280 nm)
C1q	421436	459300 (1)	8,84 *	6,8
GR C1q	45272	48000 (1)	8,36*	7,0
CLF C1q	149804	189900 (1)	7,51*	2,1 (275 nm)
MBL**	23908	25449 (2)	5,4	7,8
Domaine C-Lectine (MBL)**	12285	16399 (7)	4,56	11,1
Ficoline L**	31413	33860 (4)	6,34	17,6
Domaine FBG Ficoline L**	24710	26058 (6)	6,07	22,2
Ficoline H**	30354	33000 (4)	6,22	19,4
Ficoline M**	32018	32342 (5)	6,11	17,6
C1r2-C1s2	306200	330000 (1)	5,31	13,5
MASP-3	79616	87500 (2)	4,94	12,9
sCR1	213534	245000 (3)	6,54	10,7

Tableau 2.7 : Protéines recombinantes utilisées dans ce projet

Les masses moléculaires (MW Th.) et les points isoélectriques (pI Th.) théoriques sont calculés à l'aide du programme ProtParam hébergé sur le serveur ExPASy. Les masses moléculaires théoriques ne tiennent pas compte de la formation des ponts disulfures et s'entendent sans peptide signal. La masse moléculaire expérimentale (MW Exp.) et les coefficients d'absorption (Abs 1 %/cm) proviennent des références suivantes : ⁽¹⁾ (Tacnet et al., 2001); ⁽²⁾ (Teillet et al., 2005); ⁽³⁾ (Furtado et al., 2008); ⁽⁴⁾ (Lacroix et al., 2009); ⁽⁵⁾ (Gout et al., 2010); ⁽⁶⁾ (Garlatti et al., 2007); ⁽⁷⁾ (Gjelstrup et al., 2012). * Le point isoélectrique théorique de C1q a été déterminé pour la molécule entière, une tige collagénique (CLF) ou un tête globulaire (GR) et correspond à une moyenne entre les chaînes A, B et C. ** La masse moléculaire théorique et expérimentale est donnée pour une chaîne.

III.2. Production en système bactérien de la TcCRT et de ses variants

III.2.1. Souches d'expression et milieu de culture

La production des protéines recombinantes a été effectuée en milieu LB Lennox Broth Base (Invitrogen) en présence des antibiotiques appropriés. Les souches utilisées ainsi que leur description sont données ci-dessous. Celles-ci portent toutes la désignation DE3 car elles possèdent une copie du gène de l'ARN polymérase du phage T7 inducible par l'IPTG.

- **BL21 (DE3) pLysS** : Cette souche est régulièrement utilisée pour la production de protéines recombinantes car elle est déficiente en deux protéases majoritaires de *E. coli* (*lon* et *ompT*). Elle contient également un vecteur codant pour le lysozyme T7 (pLysS), un inhibiteur naturel de l'ARN polymérase du phage T7 permettant de limiter l'expression basale des protéines sous dépendance d'un promoteur T7.
- **Rosetta 2TM (DE3)** : Cette souche est dérivée des BL21 et contient le plasmide pRARE2 codant pour les ARN_t associés aux codons rares suivants : AUA (Ile), AGG, AGA, CGG (Arg), CUA (Leu), CCC (Pro) et GGA (Gly).
- **Origami 2TM (DE3)** : Cette souche est dérivée de la souche K-12 de *E. coli*. Elle possède des mutations dans les gènes de la thiorédoxine réductase et de la glutathion réductase permettant de favoriser la formation de ponts disulfures dans le compartiment cytoplasmique, celui-ci devenant moins réducteur et plus oxydant.
- **SHuffleTM T7 Express (DE3)** : Cette souche est déficiente en thiorédoxine réductase et permet la surexpression dans le cytoplasme de la protéine chaperonne DsbC. Cette protéine permet de favoriser la formation des ponts disulfures dans le compartiment cytoplasmique et le repliement des protéines (fonction de chaperonne).

Les bactéries BL21 (DE3), Rosetta 2TM (DE3) et Origami 2TM (DE3) proviennent de chez Novagen. La souche SHuffleTM provient de chez New England BioLabs. Ces souches sont toutes chimio-compétentes et ont été transformées selon les protocoles propres à chaque fournisseur.

III.2.2. Production des différentes formes recombinantes de la TcCRT

Le protocole décrit ci-après est largement inspiré des expériences réalisées par Molina et collaborateurs (Molina et al., 2005) et par Chouquet et collaborateurs (Chouquet et al., 2011)

III.2.2.1. Expression

Le vecteur pET-28b(+) TcCRT AF est transformé dans la souche BL21 (DE3) pLysS. La culture est réalisée à 37 °C et l'expression de la TcCRT AF est induite à une DO₆₀₀ égale à 0,6 par ajout de 1 mM final d'IPTG. La culture se poursuit ensuite pendant 3 H à 37 °C.

Les vecteurs pET-28b(+) TcCRT Clean, TcCRT ΔP, TcCRT ΔP ΔC21, TcCRT ΔP Δ2C9, TcCRT ΔP ΔC32 et TcCRT ΔP ΔC34 sont transformés dans la souche Rosetta 2TM (DE3). Les cultures sont réalisées à 37 °C jusqu'à une DO₆₀₀ égale à 0,6. L'expression des protéines est induite par ajout de 0,1 mM d'IPTG et les cultures sont placées à 20 °C pendant 20 H.

Les vecteurs pET-28b(+) TcCRT Clean et TcCRT ΔP sont également transformés en souches SHuffleTM et Origami2TM. La culture est réalisée à 37 °C jusqu'à une DO₂₆₀ égale à 0,6, puis l'expression des protéines est induite par ajout de 0,1 mM ou 1 mM d'IPTG. Les cultures se poursuivent pendant 20 H à 20 °C.

Avant et à la fin de l'induction, la DO₆₀₀ est mesurée et un aliquote est prélevé. On définit alors la notion de UDO qui permet de calculer facilement le volume de bactéries à analyser en fonction de la DO₆₀₀. On analysera sur gel une quantité de 100 UDO pour chaque condition (+/- IPTG), correspondant à un volume de bactéries égale au rapport 100/ DO₆₀₀ (exemple : pour une DO₆₀₀ = 0,6, on analysera 100/0,6 soit 167 μL ; pour une DO₆₀₀ = 1,8, on analysera 100/1,8 soit 56 μL).

Dans chaque cas de figure, les bactéries sont récupérées par centrifugation puis remises en suspension dans du tampon Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, imidazole 10 mM (pH 7,4). Le contenu cytoplasmique est ensuite récupéré par casse des bactéries :

- Soit par double passage dans un Microfluidizer (Microfluidics Corp) à une pression de 10000 psi (690 Bar) lorsque le volume de culture est important.
- Soit par traitement aux ultrasons à l'aide d'un sonicateur (petite sonde) pour les faibles volumes. Les bactéries sont alors placées dans un bac à glace et soumises à 5 cycles comprenant 20 secondes d'impulsion à 70 % d'intensité et 2 minutes de repos.

Le lysat obtenu est ensuite centrifugé 30 min à 15000 rpm. Le surnageant de cassage est filtré à travers un filtre 0,2 micron. Le culot (fraction insoluble) est remis en suspension dans une solution de SDS 2 % afin de pouvoir être analysé.

III.2.2.2. Purification

L'échantillon est chargé sur une colonne d'affinité HisTrap (GE Healthcare, volume de phase = 5 mL) préalablement équilibrée dans le tampon de casse. Après lavage par 6 volumes de colonne en présence d'imidazole 10 mM (lavage 1) et par 10 volumes de colonne en présence d'imidazole 15 mM (lavage 2), les protéines sont éluées à l'aide d'un gradient linéaire de 15 à 500 mM d'imidazole (10 volumes). Les fractions sont analysées par SDS-PAGE et celles contenant la protéine d'intérêt sont rassemblées puis concentrées sur une membrane Amicon Ultra 4 (cut-off 10 kDa). L'échantillon est ensuite analysé par chromatographie d'exclusion comme décrit dans le *Chapitre 2, section II.1.5*. Les masses théoriques des fragments produits sont données dans le *tableau 2.8*.

Protéine	MW Th. (Da)	MW exp. (Da)	pI	Abs 1%/cm (280 nm)
TcCRT AF	52406	ND	5,25	15,5
TcCRT Clean	45877	ND	4,95	16,8
TcCRT ΔP	34700	34717	5,44	12,3
TcCRT ΔP ΔC21	32154	ND	5,80	13,2
TcCRT ΔP ΔC29	31095	ND	6,10	13,7
TcCRT ΔP ΔC32	30682	ND	5,86	13,9
TcCRT ΔP ΔC34	30425	ND	5,85	14,0

Tableau 2.8 : Différentes formes recombinantes de la TcCRT produites en système bactérien

Les masses moléculaires théoriques s'entendent sans la méthionine initiatrice. MW Exp. : masse moléculaire expérimentale déterminée par spectrométrie de masse MALDI TOF; MW Th. : masse moléculaire théorique.

III.3. Production en cellules d'insectes

III.3.1. Cellules et milieux de culture

Les cellules d'insectes Sf21 ont été utilisées pour l'obtention des virus recombinants et les cellules High FiveTM (nom officiel : BTI-TN-5B1-4) pour l'expression des protéines recombinantes du fait de leur meilleure capacité de production (Wickham et al., 1992). Celles-ci sont cultivées et maintenues à 27 °C en milieu TC100 (Gibco), respectivement en présence de 5 % et 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (Dominique Dutcher), et

d'un mélange de pénicilline (50 U/mL finale) et de streptomycine (50 µg/mL finale) (Pen Strep, Gibco). L'amplification virale et l'expression des protéines sont effectuées en milieu sans sérum SF900-II SFM (Invitrogen) en présence de pénicilline/streptomycine, sauf mention contraire. Les techniques de culture de cellules d'insectes employées sont décrites de façon exhaustive dans le manuel « Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVS) and Insect Cell Culture Techniques » de Life Sciences Technologies. Le dénombrement des cellules est effectué par coloration au bleu Trypan (Life Sciences Technologies) et comptage sur cellule de Malassez. Le nombre de cellules observées sur 10 carrés de la cellule équivaut à un volume de 0,1µL. Ce résultat nous permet de remonter à la quantité de cellules contenue dans 1 mL.

III.3.2. Transfection et amplification virale

Les bacmides obtenus précédemment (*Chapitre 2, section I.4*) sont utilisés pour obtenir les particules virales nécessaires à l'infection des cellules d'insectes (*figure 2.9*). Ces bacmides servent à transfecter des cellules d'insectes Sf21 en présence de Cellfectin (Life Technologies) selon un protocole adapté de celui du fournisseur (voir ci-après).

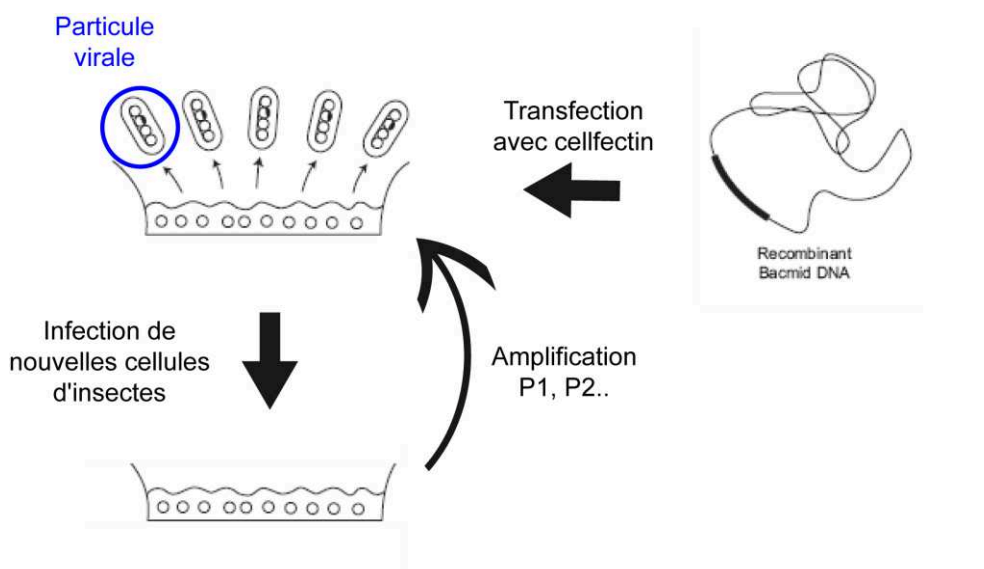


Figure 2.9 : Représentation schématique des étapes de la transfection du bacmide et de l'amplification virale (Adapté du manuel d'utilisateur du système Bac-To-Bac)

$3,2 \times 10^6$ cellules Sf21 sontensemencées dans une boîte de 25 cm² la veille de la transfection. A J₀, on mélange séparément dans deux tubes de polypropylène distincts :

- ⇒ 15 µL de solution de bacmide recombinant avec 500 µL de milieu SF900-II SFM sans antibiotique
- ⇒ 15 µL de Cellfectin avec 500 µL de milieu SF900-II SFM sans antibiotique

Les deux tubes sont mélangés et incubés 30 minutes à température ambiante. On dépose ensuite le mélange de transfection, dilué avec 1 mL de SF900-II SFM sans antibiotique, sur les cellules préalablement lavées. Après 6 H à 27 °C, le milieu de transfection est retiré et remplacé par 8 mL de milieu SF900-II SFM. Au bout de 4 jours à 27 °C, on retire le milieu qui est alors centrifugé 10 minutes à 2000 rpm. Le surnageant récolté constitue le premier stock de virus, nommé P0, qui contient les particules capables d'infecter les cellules d'insectes et ainsi de surproduire notre protéine d'intérêt. Du fait de sa sensibilité, celui-ci est conservé à 4 °C à l'abri de la lumière.

Ce stock initial P0 est ensuite amplifié 1 ou 2 fois pour optimiser la charge virale (meilleur rendement de production) et obtenir un volume suffisant pour assurer les besoins en production. Pour chaque amplification virale, $1,75 \times 10^7$ cellules Sf21 sontensemencées la veille dans une boîte de 175 cm². A J₀, les cellules sont lavées avec du milieu SF900-II SFM puis mises en présence de 5 mL d'un mélange composé **de 4,5 mL de SF900-II SFM et de 0,5 mL de stock viral P0**. Au bout de 2 H à température ambiante, on ajoute 30 mL de milieu SF900-II SFM et on laisse les cellules 6 jours à 27 °C. Au bout de ce délai, le stock viral P1 est récupéré par centrifugation et le surnageant stocké dans les mêmes conditions que celles décrites pour la préparation du stock P0. Le stock viral P2 est préparé de façon identique à partir du stock P1. Celui-ci sera utilisé pour les productions de protéines recombinantes.

III.3.3. Expression des protéines recombinantes en cellules High Five

III.3.3.1. Evaluation du niveau d'expression

Afin de vérifier la capacité d'expression de notre stock viral et d'évaluer le temps optimal de d'incubation post-infection, un test d'expression est préalablement réalisé. 2×10^6 cellules d'insectes High FiveTM sontensemencées la veille dans chaque puits (1 puits par condition

d'incubation et 2 puits témoins). A J_0 , les cellules sont lavées avec du milieu SF900-II SFM et incubées pendant 2 H à température ambiante avec un inoculum composé de **0,2 mL de stock viral P1 ou P2** et de **0,3 mL de milieu SF900-II SFM** pour les puits inoculés, ou de **0,5 mL de milieu SF900-II SFM** pour les puits témoins. Ce mélange est ensuite remplacé par 2 mL de milieu SF900-II SFM et les cellules sont placées à 27 °C durant un temps d'incubation donné.

Aux temps d'incubation $T = 0$ H, 24 H, 48 H, 72 H et 96 H, on prélève 800 μ L de surnageant de culture dans le puits correspondant. Le surnageant de culture des puits témoins est quant à lui prélevé uniquement aux temps d'incubation $T = 0$ H et $T = 96$ H. Ces échantillons sont ensuite précipités au TCA 50% avant d'être analysés en condition réductrice par SDS-PAGE et Western Blot. Le temps optimal d'incubation est déterminé en fonction de la quantité de protéine produite et de son état de dégradation. Celui-ci a été estimé à 72 H en moyenne pour chacune de nos constructions.

III.3.3.2. Expression à plus grande échelle

Afin de produire nos protéines recombinantes en grande quantité, nous devons augmenter les volumes de cultures. Les conditions d'expression restent identiques à celles décrites ci-dessus, seules les quantités utilisées variant :

- 18 boîtes de 175 cm² sontensemencées avec $3,6 \times 10^6$ cellules d'insectes High FiveTM 4 jours avant l'infection
- A J_0 , chaque boîte est inoculée avec un mélange composé de **2 mL de stock viral P2 et de 3 mL de milieu SF900-II SFM**.
- L'inoculum est remplacé par 30 mL de milieu SF900-II SFM, correspondant à un volume total de surnageant de culture d'environ 500 mL.

Au bout des 72 H d'incubation, le milieu de culture est prélevé et centrifugé pendant 15 min à 8000 rpm (4 °C). 1 mM final de diisopropyl fluorophosphate (DFP), un inhibiteur irréversible des protéases à sérine, est ajouté au surnageant récolté pour prévenir une possible dégradation de notre protéine d'intérêt. Le surnageant de culture peut être soit purifié immédiatement, soit conservé à -20 °C.

III.3.4. Purification de CR1 CCP 22-30 produit en cellules High FiveTM

Le surnageant de culture (500 mL) est dialysé à 4 °C (membrane de dialyse avec un cut-off de 12-14 kDa) contre du **tampon A** [phosphate 25 mM, NaCl 40 mM (pH 7,5)] en 2 bains de 5 L (4 H et sur la nuit). L'échantillon est centrifugé 15 min à 6000 rpm (4 °C) puis chargé à un débit de 100 mL/H sur une colonne échangeuse d'anions Q-Sepharose Fast-Flow (GE Healthcare, volume de phase = 55 mL) préalablement équilibrée par 10 volumes de colonne avec du tampon A. La phase est ensuite lavée par 12 volumes de colonne de tampon A puis les protéines sont éluées grâce à un gradient linéaire (18 volumes de colonne) entre le tampon A et le **tampon B** [phosphate 25 mM, NaCl 500 mM (pH 7,5)]. Des fractions de 5 mL sont collectées. Les fractions sont analysées par SDS-PAGE et celles contenant le fragment CR1 CCP 22-30 sont concentrées en cellule Amicon (cut-off 10 kDa) et sur concentrateur Amicon Ultra 15 (cut-off 30 kDa). L'échantillon obtenu est injecté en plusieurs fois sur une colonne Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, volume de phase = 24 mL) à un débit de 0,5 mL/min en **tampon C** [phosphate 25 mM, NaCl 150 mM (pH 7,5)]. La protéine purifiée est concentrée à 0.5 mg/mL sur Amicon Ultra 4 (cut-off 30 kDa) puis aliquotée et conservée à -20 °C ou dans la glace.

III.3.4.1. Purification de CR1 CCP 22-30 His et de ses fragments produits en cellules High FiveTM

Ce protocole de purification a été utilisé pour CR1 CCP 22-30 His (ou HF) ainsi que ses fragments plus courts. Les principales caractéristiques de ces protéines sont rappelées dans le *tableau 2.9*.

Le surnageant de culture (250 mL ou 500 mL) est dialysé à 4 °C (cut-off 12-14 kDa) contre du **tampon A1** [phosphate de sodium 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 10 mM (pH 7,4)] en 3 bains de 4 L (temps de dialyse : 2 H, sur la nuit puis 2H). L'échantillon est centrifugé 15 min à 11000 rpm (4 °C) puis chargé à un débit de 2,5 mL/min sur une colonne d'affinité His-Select (Sigma-Aldrich, volume de la phase = 18 mL). La phase est lavée avec 10 volumes de colonne avant d'éluer la protéine avec 75 mL de **tampon E1** [Phosphate de sodium 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 150 mM (pH 7,4)]. Une seconde élution avec 75 mL de **tampon E2** [phosphate de sodium 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 300 mM (pH 7,4)] est également réalisée pour éluer le reste des protéines potentiellement retenues. Les fractions contenant le

fragment CR1 CCP 22-30 His ou ses variants sont analysées par SDS PAGE. Les fractions les plus pures sont rassemblées et dialysées contre un **tampon A2** [PBS Euromedex : KH_2PO_4 1,06 mM, Na_2HPO_4 3 mM, NaCl 154 mM (pH 7,4)] en 2 bains de 1 L (3 H et sur la nuit). Les échantillons obtenus sont concentrés sur Amicon Ultra 4 (cut-off 10 kDa) jusqu'à des valeurs comprises entre 0,5 et 2,6 mg/mL puis aliquotés et conservés à -20 °C.

III.4. Production en cellules de mammifères

III.4.1. Cellules et milieux de culture

Les cellules HEK 293-FTM (Life Sciences Technologies) sont maintenues en suspension dans un milieu sans sérum FreeStyle 293 (Life Sciences Technologies) sous une agitation constante de 140 rpm et sans antibiotique. Elles sont cultivées à 37 °C sous une atmosphère chargée de 5 % de CO_2 selon les protocoles standards en vigueur (Phelan, 2007).

III.4.2. Transfection transitoire

Les cellules HEK 293-FTM sont transfectées avec l'ADN plasmidique en présence de 293FectinTM (Invitrogen). La transfection (quantité de cellules, d'ADN, de réactif) est réalisée selon les recommandations du fournisseur. Classiquement, 30 mL de cellules HEK 293-FTM à 10^6 cellules/mL sont transfectés par 30 µg de plasmide en présence de 60 µL d'agent de transfection. Après 72 H, le milieu de culture est centrifugé 5 minutes à 3000 rpm et le surnageant est purifié comme décrit ci-après.

III.4.3. Purification de CR1 CCP 22-30 produit en HEK 293-FTM

Le surnageant de culture est dialysé à 4 °C (cut-off de 12-14 kDa) contre du tampon [Triéthanolamine-HCl (TEA) 50 mM, NaCl 50 mM (pH 8,0)] en 3 bains de 1,5 L (2 H, 1 H et 1 H). Le dialysat est centrifugé 10 minutes à 4500 rpm (4 °C), puis chargé à 2 mL/min sur une colonne échangeuse d'anions MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare, volume de colonne = 1 mL) préalablement équilibrée dans le même tampon. La colonne est lavée par 15 volumes de tampon puis les protéines retenues sont éluées par deux gradients linéaires successifs, respectivement de 50 à 525 mM de NaCl (20 volumes) et de 525 mM à 1 M NaCl (10 volumes). Des fractions de 1 mL sont collectées et analysées par SDS-PAGE. Les fractions contenant CR1 CCP 22-30 sont rassemblées et concentrées sur Amicon Ultra 15 (cut-off 30 kDa)

Protéine recombinante	MW Th. (Da)	MW exp. (Da)	pI	Abs 1%/cm (280 nm)	Système d'expression
CR1 CCP 22-30 HEK	63609	69118	5,95	13,5	Mammifère (HEK 293-FTM)
CR1 CCP 22-30 HF	63679	70498	5,88	13,4	Cellules d'insectes (HF)
*CR1 CCP 22-30 HF	64502	71156	6,08	13,3	Cellules d'insectes (HF)
*CR1 CCP 22-30 Δ 22-23	50978	56132	6,21	12,4	Cellules d'insectes (HF)
*CR1 CCP 22-30 Δ 22-25	36493	38894	6,07	13,9	Cellules d'insectes (HF)
*CR1 CCP 22-30 Δ 27-30	35835	40107	5,95	10,1	Cellules d'insectes (HF)
*CR1 CCP 22-30 Δ 25-26	51163	57083	5,93	12,5	Cellules d'insectes (HF)
*CR1 CCP 22-30 Δ 26-30	29234	32708	6,47	9,8	Cellules d'insectes (HF)
*CR1 CCP 22-30 Δ 29-30	50470	56567	6,12	9,7	Cellules d'insectes (HF)
*CR1 CCP 25-26	14408	15434	6,65	9,4	Cellules d'insectes (HF)

Tableau 2.9 : Protéines recombinantes exprimées en cellules d'insectes et de mammifères

Les masses moléculaires (MW Th.) et les points isoélectriques (pI Th.) théoriques sont calculés à l'aide du programme ProtParam hébergé sur le serveur ExPASy. Les masses moléculaires théoriques s'entendent sans peptide signal et tiennent compte de la formation des ponts disulfures. La masse expérimentale (MW Exp.) a été déterminée par spectrométrie de masse MALDI TOF. * Avec étiquette poly-histidine.

IV. Caractérisation des interactions

IV.1. Résonance Plasmonique de Surface (SPR)

L'étude des interactions entre les différentes constructions de CR1 et les collagènes de défense a été réalisée avec un instrument Biacore 3000 (GE Healthcare) sur la plateforme de SPR de l'IBS sous la supervision de Nicole Thielens. Cet appareil fonctionne sur le principe d'un biocapteur basé sur l'utilisation de la résonance plasmonique de surface (SPR) qui détecte des variations de masse à la surface d'une "sensor chip" sur laquelle un des deux interactants (le ligand) est immobilisé de façon covalente ou non. L'autre interactant (l'analyte) est injecté par un système microfluidique dans un flux continu de tampon à la surface de la "sensor chip". Le suivi en temps réel des interactions permet de calculer la valeur des constantes cinétiques d'association et de dissociation et de la constante d'équilibre de dissociation (K_D) reflétant l'affinité de l'interaction. Cette technologie permet la caractérisation des interactions moléculaires impliquant les petites molécules (limite de détection : 150 Da pour le Biacore 3000) et toutes les classes de macromolécules biologiques (protéines, polysaccharides, lipides et acides nucléiques).

IV.1.1. Principe de la détection

Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre deux milieux d'indice de réfraction différents, une partie de la lumière incidente est réfléchiée sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface. A une certaine valeur de l'angle d'incidence du faisceau, toute la lumière peut être réfléchiée. Le phénomène de résonance plasmonique de surface (SPR) se produit dans des conditions de réflexion totale. En absence de réfraction, une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde. Si une couche fine de métal riche en électrons libres, tel que l'or, est déposée à l'interface, ceux-ci entrent en résonance avec les photons du faisceau incident. Ce phénomène est appelé résonance plasmonique de surface. Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi qui présente une chute d'intensité à un angle défini. Cet angle d'intensité minimum est l'angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. Les changements de masse induits par l'association de deux partenaires ou la dissociation d'un complexe modifient la réfringence du milieu et décalent la position de l'angle de résonance détectée par une barrette de diodes. L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées à la surface de la sensor chip. Le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU). La variation de l'angle θ de $0,1^\circ$ donne un signal de 1000 RU. L'enregistrement de ce signal en fonction du temps s'appelle un sensorgramme

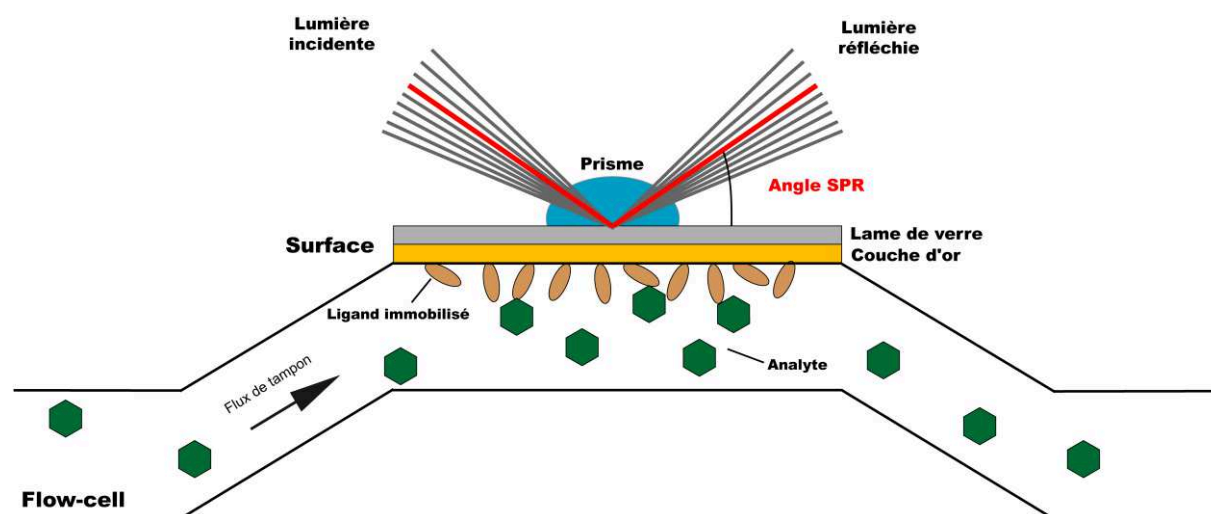


Figure 2.10 : Principe de la résonance plasmonique (des plasmons) de surface (Inspiré du « Biacore sensor surface handbook », édition du 05/2008 version AB)

Le système Biacore utilisé durant cette thèse repose sur le phénomène physique de SPR (*figure 2.10*). Notons que la sensibilité des appareils dépendra de leur capacité à mesurer le plus petit angle possible. Le Biacore 3000 permet notamment la mesure de la fixation d'analytes allant de 150 à 10^6 Da (BIACORE 3000 Instrument Handbook, BIACORE, édition de mars 1999).

Le signal de SPR observé classiquement est illustré dans la *figure 2.11*. L'analyte est injecté à T_0 dans un flux continu de tampon sur la surface contenant le ligand immobilisé ou sensor chip. Celui-ci s'associe progressivement (phase d'association T_0 - T_1) jusqu'à pouvoir atteindre une phase d'équilibre (correspondant au Req). Plus on ajoutera d'analyte, plus le Req augmentera, tendant vers le Rmax qui correspond à la capacité maximale de fixation de la surface. La phase de dissociation (T_1 - T_2) correspond au moment où l'on stoppe l'injection de l'analyte qui peut alors se dissocier spontanément, dans un flux de tampon, du ligand immobilisé. En fonction de la force (affinité) de l'interaction, l'analyte se dissociera plus ou moins vite. Il reste le plus souvent des molécules d'analytes fixées sur les ligands à la surface ce qui nécessite alors une étape de régénération pour revenir à la ligne de base. Cette étape est nécessaire avant de pouvoir débuter un nouveau cycle.

De la phase d'association et de dissociation, on déduira par le calcul les constantes de vitesse d'association (k_a) et de dissociation (k_d) qui permettront de déterminer la constante apparente de dissociation (K_D) propre à chaque couple ligand - analyte.

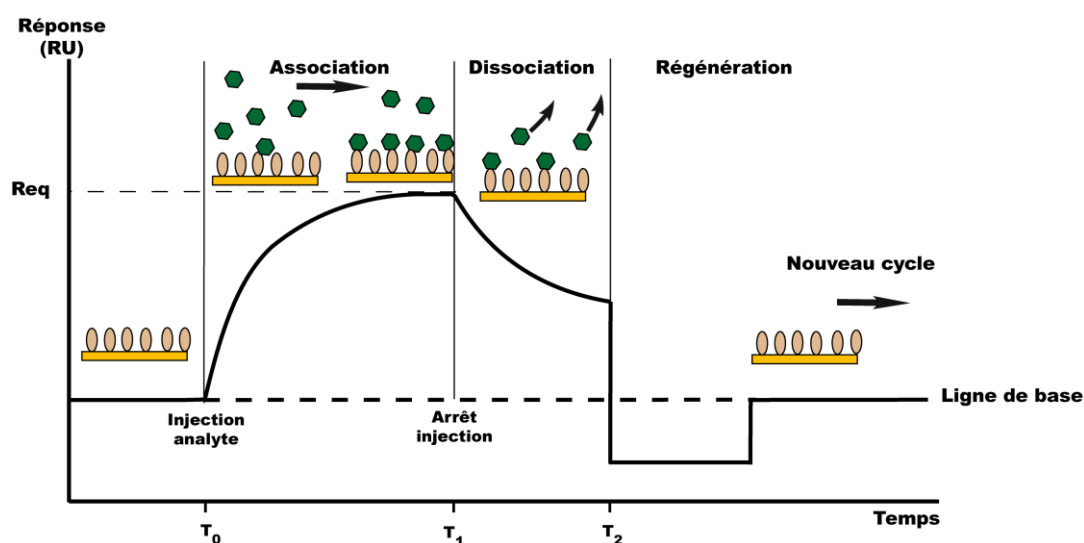


Figure 2.11 : Différentes phases du signal de résonance plasmonique de surface (adapté du « Biacore sensor surface handbook », édition du 05/2008 version AB)

La sensor chip utilisée est divisée en plusieurs pistes (4 au total), appelées communément « flow-cell (Fc) ». Un système microfluidique composé de canaux et de valves permet de délivrer le tampon et les échantillons à la surface de la sensor chip. Il permet également de sélectionner les pistes sur lesquelles nous souhaitons travailler. L'ensemble des expériences est réalisé à une température de 25 °C.

IV.1.2. Préparation de la surface

Les protéines sont immobilisées de façon covalente sur une surface d'or recouverte de dextran carboxyméthylé (sensor chip CM5 – Research Grade, GE Healthcare) par couplage entre leurs amines primaires et les groupements acide carboxyliques du dextran préalablement activés (amine coupling kit, GE Healthcare). L'immobilisation s'effectue à un débit de 10 µl/min en tampon HBS-P [Hepes 10mM, NaCl 145 mM, surfactant P20 0,005 % pH 7,4]. La surface de dextran est tout d'abord activée par l'injection de 80 µL d'un mélange 1 : 1 de 1-ethyl-3-(3-dimethylpropyl)-carboiimide 0,4 M (EDC) et de N-Hydroxysuccinimide 0,1 M (NHS) résultant en la formation d'esters de succinimide fortement réactifs capables de former des liaisons covalentes avec les amines primaires des protéines (majoritairement celles de la chaîne latérale des résidus de lysine). Cette activation résulte généralement en une réponse de 200-300 RU. La protéine à immobiliser ou « **ligand** » est ensuite injectée sur la surface en une ou plusieurs fois à une concentration donnée pour atteindre le nombre de RU souhaités (*tableau 2.10*). Celle-ci est diluée dans un tampon acétate de sodium 10 mM **pH 4,0 - 4,5** (sauf pour les collagènes de défense, voir *tableau 2.10*). A un pH compris entre 3,5 et le point isoélectrique (pI) de la protéine, la surface de la sensor chip est chargée négativement tandis que les protéines à immobiliser présentent de nombreuses charges positives. Les interactions électrostatiques rapprochent et concentrent la protéine à proximité de la surface, favorisant ainsi la formation de liaisons covalentes entre les esters de succinimide et les résidus de lysine. Deux injections de 80 µL d'éthanolamine 1 M pH 8,5 sont ensuite effectuées pour saturer les esters non liés. Le nombre de RU total immobilisé correspond à la différence entre la ligne de base avant et après couplage. Une surface de référence, généralement la piste Fc1, est également préparée de la même manière sauf que l'injection du ligand est remplacée par une injection de tampon de couplage. Le signal obtenu sur cette piste lors de l'injection de l'analyte sera soustrait du signal obtenu sur les autres pistes afin d'obtenir le signal spécifique de fixation de l'analyte. Dans le cas de la configuration inverse, c'est-à-dire avec les collagènes de défense immobilisés, la BSA sera choisie comme référence (voir *tableau 2.10*).

La surface est conditionnée dans le tampon HBS-P pendant une nuit à faible débit (position « Standby ») avant de procéder aux premières injections.

Protéines immobilisées	pH du tampon de dilution	Concentrations injectées	Quantité moyenne immobilisée (RU)
CR1*	4,5	25 µg/mL	15000
CR1 CCP 22-30	4,0	20 µg/mL	5700
CR1 CCP 22-30*	4,0	5 et 20 µg/mL	1500 et 6200
CR1 CCP 22-30*	4,2	10 µg/mL	3400-4700
CR1 CCP 22-30 Δ22-23*	4,2	5 µg/mL	2800 (Ref : 4700)
CR1 CCP 22-30 Δ22-25*	4,2	5 µg/mL	1700 (Ref : 4700)
CR1 CCP 22-30 Δ29-30*	4,2	10 µg/mL	3300 (Ref : 4200)
CR1 CCP 22-30 Δ27-30*	4,2	5 µg/mL	2000 (Ref : 3400)
CR1 CCP 22-30 Δ26-30	4,2	5 µg/mL	2100 (Ref : 4300)
CR1 CCP 22-30 Δ25-26*	4,2	10 µg/mL	3800 (Ref : 4300)
CR1 CCP 25-26*	4,2	2,5 µg/mL	1000 (Ref : 4200)
CR1 CCP 22-30 HEK	4,2	10 µg/mL	4000
C1q	5,0	50 µg/mL	20600
MBL	4,0	25 µg/mL	13000
ficoline L	5,0	25 µg/mL	17000
BSA	4,0	25 µg/mL	10200

Tableau 2.10 : Conditions d'immobilisation des protéines testées

Pour l'immobilisation des fragments, la quantité (en RU) de CR1 CCP 22-30 utilisé comme référence est donnée entre parenthèses. * Présence d'une étiquette poly-histidine.

IV.1.3. Injections des protéines

Les molécules ou « analytes », dont on souhaite étudier l'interaction avec les ligands immobilisés, sont diluées dans le tampon de course à la concentration désirée. Elles sont ensuite injectées (60 µl) dans un flux continu de tampon à un débit de 20 µl/min. L'injection est réalisée en mode « Kinject » avec une période de dissociation de 180 secondes, équivalente en terme de temps à l'étape d'association. Après dissociation, une certaine quantité d'analyte est encore associée aux protéines immobilisées. La surface est régénérée, par une ou plusieurs injections de 10 µL de tampon Tris 20 mM, NaCl 1 M, EDTA 10 mM pH 7,4, permettant ainsi la dissociation des complexes toujours formés à la surface de la sensor chip. Lorsque la régénération est plus difficile, des solutions telles que le Tris 20 mM, NaCl 2 à 4M, l'EDTA 20 mM, le MgCl₂ 1 à 3 M, le SDS 0,01-0,025 % et NaOH 2,5 à 10 mM ont été utilisées. La composition des différents tampons nécessaires à l'étude est donnée dans le *tableau 2.11*.

Tampon	Composition
HBS-P	Hepes 10 mM, NaCl 145 mM, P20 0,005 % (pH 7,4)
HBS-EP	Hepes 10 mM, NaCl 145 mM, EDTA 3 mM, P20 0,005 % (pH 7,4)
HBS-CA-P	Hepes 10 mM, NaCl 145 mM, CaCl ₂ 1mM, P20 0,005 % (pH 7,4)
HBS-CA/Man-P	Hepes 10 mM, NaCl 145 mM, CaCl ₂ 1mM, L-mannose 10 mM, P20 0,005 % (pH 7,4)
TEA-P	Triéthanolamine 50 mM, NaCl 145 mM, P20 0.005% (pH 7,4)
TEA-CA-P	Triéthanolamine 50 mM, NaCl 145 mM, CaCl ₂ 1mM, P20 0,005% (pH 7,4)
TEA-CA/Man-P	Triéthanolamine 50 mM, NaCl 145 mM, CaCl ₂ 1mM, L-mannose 10 mM, P20 0,005% (pH 7,4)

Tableau 2.11 : Composition des tampons utilisés pour les expériences de SPR.

IV.1.4. Détermination des paramètres cinétiques

Des concentrations croissantes de l'analyte sont injectées sur un même ligand immobilisé. Les différentes solutions sont obtenues par dilution à partir de la solution de plus forte concentration. Après chaque injection, la piste est régénérée avant de débiter un nouveau cycle. Après soustraction du signal non spécifique obtenu sur la piste de référence, l'ensemble des sensorgrammes est corrigé par la soustraction du signal correspondant à l'injection du tampon seul sur le ligand (« double referencing »). Les paramètres cinétiques (k_a , k_d) et l'affinité (K_D) sont déterminés à partir d'au moins 5 valeurs de concentration. Le jeu de sensorgrammes expérimentaux est analysé à l'aide du logiciel BIAevaluation 3.2. Le début et la fin de l'injection sont indiqués ainsi que les concentrations d'analyte injectées. Un modèle d'interaction est ensuite défini parmi l'ensemble des ceux proposés par le logiciel qui calculera alors les sensorgrammes théoriques en fonction des paramètres choisis (concentration, modèle, début/fin de l'injection). L'adéquation entre les sensorgrammes expérimentaux et théoriques peut être évaluée visuellement et par la détermination de la valeur statistique de χ^2 . On considère généralement que pour des valeurs de χ^2 inférieures à 10 le modèle choisi est acceptable et est en accord avec les données expérimentales (BIAevaluation version 3.0 Software Handbook, BIACORE, édition juillet 1997). L'ajustement est en général global, c'est-à-dire qu'il se fait sur tous les sensorgrammes simultanément et sur les phases d'association et de dissociation ce qui conduit à l'obtention d'une seule valeur de k_a , k_d et K_D pour l'ensemble des sensorgrammes. Nous avons déterminé les paramètres cinétiques en utilisant le modèle Langmuir 1:1t en autorisant la variation du paramètre R_{max} pour chacun des sensorgrammes. L'ajustement « local » de ce paramètre améliore la qualité de l'ajustement des sensorgrammes des collagènes de défense.

IV.1.5. Comparaison de la fixation de C1q, MBL et ficoline L sur les différents variants de CR1 CCP 22-30

Pour pouvoir comparer la fixation des collagènes de défense sur nos différents fragments, une quantité équimolaire de chaque protéine a été immobilisée et CR1 CCP 22-30 a été choisi comme référence. Compte tenu des limitations techniques, nous ne pouvons immobiliser que deux autres fragments par surface. La quantité (en RU) à immobiliser est déterminée par rapport à la quantité de CR1 CCP 22-30 immobilisée sur la même « sensorchip » (3400-4700 RU suivant les immobilisations comme indiqué dans le *tableau 2.10*), en se basant sur la masse moléculaire de chaque protéine. Le signal en fin de phase d'association, obtenu après injection des différents collagènes de défense, est utilisé pour calculer la capacité de fixation de chaque fragment en comparaison à la valeur de référence obtenue pour la fixation sur CR1 CCP 22-30. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la fixation sur CR1 CCP 22-30. Une moyenne est calculée en tenant compte de plusieurs injections d'une même molécule.

IV.2. ELISA

IV.2.1. Principe

Le test ELISA pour « Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay » est très couramment utilisé en immunologie pour évaluer la présence dans un sérum d'antigène ou d'anticorps spécifique. Son résultat peut être à la fois quantitatif (dosage) ou qualitatif (présence ou absence). Une représentation schématique du test ELISA est donnée dans la *figure 2.12 A*. Concrètement, une protéine 1 est immobilisée sur une surface puis les sites non spécifiques ont été bloqués par un ligand neutre (BSA, lait lyophilisé, gelatine, solution commerciale). Une solution contenant l'autre partenaire (protéine 2) est alors mise en contact. Après plusieurs lavages, la présence de la protéine 2 est révélée par un anticorps spécifique de façon directe ou indirecte. La révélation peut être de différentes natures : colorimétrie, fluorescence, radioactivité.

Cette méthode est également utilisable pour mesurer des interactions entre deux partenaires protéiques et prend communément le nom de dosage en phase solide. En réalisant une gamme, il est alors possible de déterminer la constante d'affinité entre deux partenaires. De nombreux paramètres sont cependant à optimiser (type de surface, tampon, température, témoin, quantité de protéines immobilisées, agent bloquant, concentration des anticorps, système de révélation, nombre de lavages...), faisant de l'ELISA une technique souvent laborieuse à mettre au point. De plus, celle-ci est fortement consommatrice en échantillon et nécessite d'avoir à disposition des anticorps spécifiques.

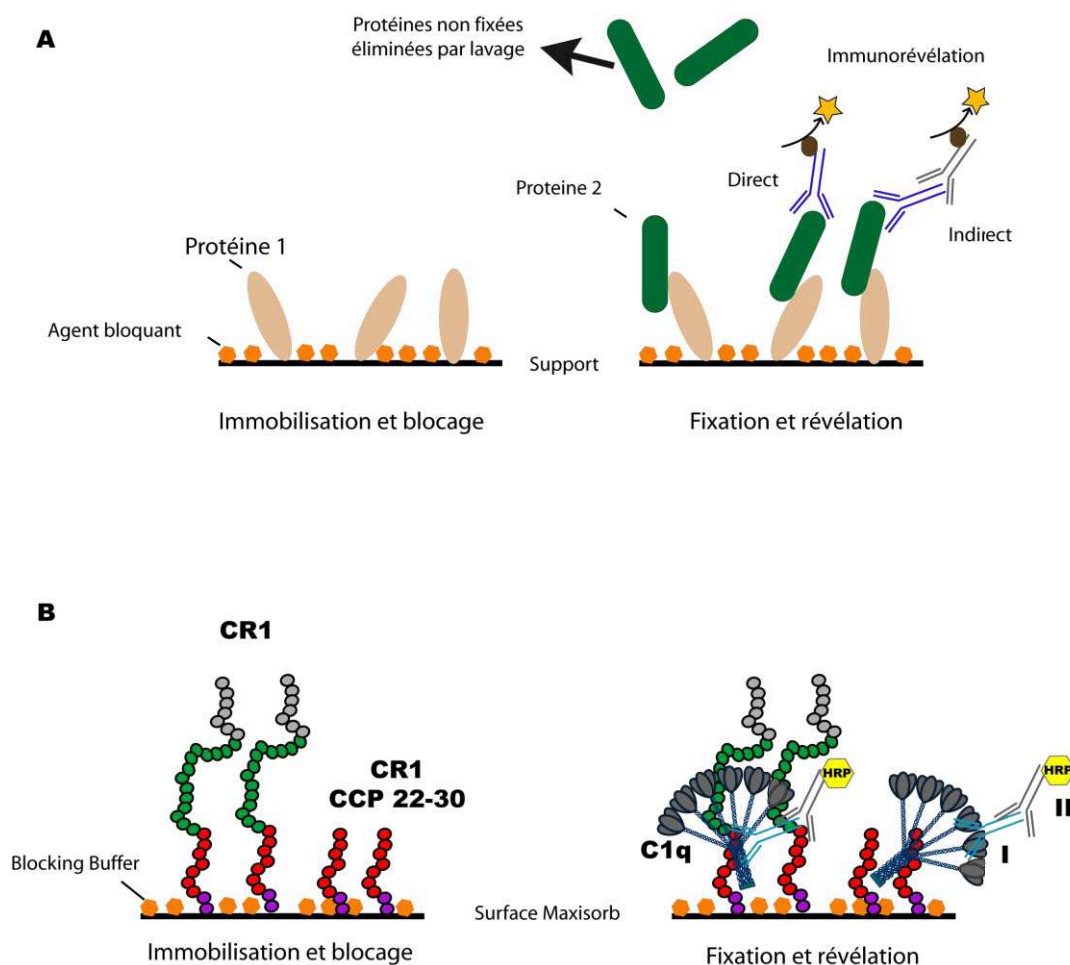


Figure 2.12 : Mise au point d'un test ELISA pour la fixation de C1q à CR1 et CR1 CCP 22-30

(A) Schéma général du test ELISA. (B) Configuration du test ELISA mis au point pour visualiser et quantifier l'interaction de C1q avec CR1 et CR1 CCP 22-30. I : anticorps primaire anti-C1q ; II : anticorps secondaire couplé à la HRP anti-IgG de lapin.

IV.2.2. Détermination de la constante d'affinité de C1q pour CR1 et CR1 CCP 22-30

En nous basant sur la littérature, nous avons mis au point un test ELISA nous permettant de quantifier l'interaction entre CR1 et C1q (*figure 2.12 B*). Entre chaque étape, les puits sont lavés 4 fois avec 250 μ L de tampon de lavage PBS-KE [Na_2HPO_4 50 mM, KH_2O_4 50 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05 % (p/v) (pH 7,4)]. Hormis pour l'immobilisation, l'ensemble des incubations est réalisé à 37 °C en chambre humide dans un volume total de 100 μ L. Différentes quantités de CR1 (0,1 et 0,3 μ g) et de CR1 CCP 22-30 (0,06, 0,12 et 0,24 μ g) ont été immobilisées dans du tampon carbonate [Na_2CO_3 0,01M, NaHCO_3 0,04 M (pH 9,6)] sur une plaque 96 puits Maxisorb Nunc-Immuno F96 (Nunc) pendant une nuit à 4° C. Ces

plaques ont été choisies pour leur capacité de fixation renforcée (des plaques non traitées ne retiennent pas nos protéines). Les puits sont saturés pendant 2 H avec 250 µL de tampon PBS Blocking Buffer (Pierce). Différentes concentrations de C1q diluées dans le tampon de lavage sont ensuite ajoutées sur CR1 (gamme 0,1, 0,3, 1, 3 et 10 µg/mL) ou sur CR1 CCP 22-30 (gamme 0,1, 0,3, 1, 3, 5, 10 et 30 µg/mL) puis incubées 2 H 30. La fixation de C1q est détectée par immunorévélation indirecte avec un anticorps polyclonal anti-C1q (produit chez le lapin, dilution 1/1000) suivi d'un anticorps secondaire dirigé contre les IgG de lapin et couplé à la HRP (produit chez la chèvre, dilution 1/20000). Ces anticorps sont dilués dans le tampon de lavage et sont incubés pendant 1 H. L'incubation du substrat spécifique de la HRP (TMB one component, Tebu-Bio) pendant 25 minutes conduit à une coloration bleue. La réaction est stoppée par ajout de 50 µL de H₂SO₄ 1M et l'absorbance des échantillons, proportionnelle à la quantité de C1q fixée, est lue à 450 nm à l'aide d'un lecteur de plaques. Pour chaque concentration de C1q, les valeurs sont corrigées par la fixation non spécifique de C1q dans des puits sans aucune protéine immobilisée. Chaque point mesuré correspond à une moyenne sur 2 mesures. Pour chaque concentration de CR1 ou de CR1 CCP 22-30 immobilisée, l'absorbance à 450 nm en fonction de la concentration de C1q est tracée. Un modèle classique de liaison est utilisé pour décrire la fixation de C1q et déterminer la constante d'affinité K_D :

$$A_{450} = (A_{450\max} \times [C1q]) \div ([C1q] + K_D)$$

Ce modèle considère une interaction de type 1 : 1 entre les deux molécules. Les K_D sont calculés à partir de 3 essais indépendants.

IV.2.3. Evaluation de la fixation de C1q sur CR1 CCP 22-30 et ses fragments

Un autre test a également été développé pour visualiser les différences de fixation de C1q sur CR1 CCP 22-30 et ses fragments de délétion. Afin de pouvoir comparer les constructions entre elles, une quantité équimolaire est immobilisée et la fixation de C1q est mesurée pour une seule concentration. Hormis pour les modifications citées ci-après, le test est réalisé dans les mêmes conditions que précédemment. **3,4 picomoles** de chacune des constructions sont immobilisées dans du **tampon PBS** (Euromedex) pendant une nuit à 4 °C et les incubations sont réalisées à **température ambiante**. Les puits sont saturés pendant 1 H 30 avec 250 µL d'un tampon de blocage PBS-KE BSA 1 % [Na₂HPO₄ 50 mM, KH₂O₄ 50 mM, NaCl 150

mM, **BSA 1 %** (p/v), Tween 20 0,05 % (p/v) (pH 7,4)] puis 10 µg/mL de C1q est ensuite ajouté et incubé pendant 1 h 30. Les anticorps sont utilisés dans les mêmes conditions à la différence qu'ils sont dilués dans le tampon de blocage pour réduire les interactions non spécifiques et incubés pendant 1 h 30. La fixation de C1q sur CR1 CCP 22-30 sert de référence et est normalisée à 100 %. L'absorbance corrigée minimale observée est de 0,1.

IV.3. Microscopie électronique à transmission (MET)

La réalisation des expériences a été confiée à la plateforme de microscopie électronique de l'IBS/UVHCI sous la supervision de Guy SCHOEHN. Les différents clichés ont été réalisés par Christine MORISCOT, Daphna FENEL et Wai LI LING.

Le fonctionnement d'un microscope électronique à transmission peut être assimilé à celui d'un microscope optique à la différence que les photons sont ici remplacés par des électrons qui sont focalisés sur l'échantillon. La plus faible longueur d'onde associée à ce type de technique permet d'atteindre des résolutions bien supérieures à celles obtenues en microscopie classique mais impose cependant certaines contraintes : la génération d'un faisceau d'électrons, une enceinte sous un vide poussé et un échantillon ultra mince (nécessaire pour être le plus transparent possible aux électrons). La préparation de l'échantillon est l'étape qui va le plus influencer la qualité des résultats. Elle permet de rendre l'échantillon conducteur, davantage résistant au faisceau d'électrons et observable par transmission. Nos échantillons ont été observés par coloration négative sur un microscope Phillips CM12. Ils ont tout d'abord été dilués en tampon [Tris 50 mM, NaCl 150 mM (pH 7,4)] à des concentrations de 20 à 140 nM puis adsorbés sur une interface mica-carbone (technique de flottaison de carbone). Afin d'augmenter le contraste et de permettre leur observation, les échantillons adsorbés ont été mis en présence d'un agent contrastant, le silicotungstate de sodium 2 % (p/v) ou le molybdate d'ammonium 2 % dans le cas particulier de la MBL. Une grille est ensuite placée sur le dessus du film carbone puis l'ensemble est séché avant d'être observé au microscope. Pour l'étude des complexes CR1 CCP 22-30 / collagènes de défense, le fragment protéique a été mis en excès par rapport à C1q (6-9 fois), à la MBL (4-6 fois) et à la ficoline L (6-8 fois). Afin de faciliter la visualisation des échantillons, un traitement de l'image avec le logiciel Adobe Photoshop (augmentation artificielle du contraste, balance blanc/noir) a été effectué dans certains cas.

IV.4. Biologie cellulaire

IV.4.1. Cellules, milieux et anticorps

Les cellules CHO-K1 sont maintenues en milieu DMEM F-12 GlutaMAX (Life Sciences Technologies) en présence de sérum de veau foetal décomplémenté (10 %) et d'un mélange pénicilline et streptomycine (Pen Strep, Gibco). Elles sont cultivées en monocouche à 37 °C sous une atmosphère chargée de 5 % de CO₂ selon les protocoles standards en vigueur (Phelan, 2007). Celles-ci sont décrochées de leur support par action d'une solution de Versene (Life Sciences Technologies) puis lavage en tampon PBS. Nous n'avons pas utilisé une solution de trypsine/EDTA puisque le récepteur CR1/CD35 montre une forte susceptibilité à cette protéase (Pascual et al., 1994a). Les cellules HEK 293-FTM sont maintenues comme décrit précédemment (*Chapitre 2, III.4.1*).

Les cellules HEK 293-FTM et CHO-K1 sont transfectées par l'ADN plasmidique, respectivement en présence de 293FectinTM (Invitrogen) et de Lipofectamine 2000TM (Invitrogen). La transfection (quantité de cellules, d'ADN, de réactif) est réalisée selon les recommandations du fournisseur. Les cellules CHO-K1 sontensemencées la veille de la transfection dans une boîte 6 puits à 0,5 x 10⁶ cellules/puits pour atteindre 1 x 10⁶ cellules le jour suivant. Chaque puits est transfecté par un mélange de 4 µg d'ADN plasmidique et de 10 µL d'agent de transfection. Les cellules HEK 293-FTM sont transfectées dans un erlen contenant 1 x 10⁶ cellules/mL (volume minimal de 20 mL) dans des proportions identiques à celles décrites pour la production (*Chapitre 2, III.4.2*). Le nombre de cellules à transfecter est déterminé en fonction du nombre d'essais à réaliser. Le temps de transfection a été fixé arbitrairement à 40 H sur la base d'essais d'expression de la forme soluble de CR1 CCP 22-30 en cellules CHO-K1 et HEK 293-FTM. Les anticorps et les dilutions utilisés pour le marquage des cellules sont indiqués dans le *tableau 2.12*.

Nom	Espèce	Epitope reconnu	Type	Dilution	Couplage
Anti-C1q total	Lapin	C1q (Molécule entière)	Polyclonal	1/2000	Non
Anti-MBL total	Lapin	MBL (Molécule entière)	Polyclonal	1/2000	Non
Anti-CR1 E11	Souris	CR1	Monoclonal	1/100	Non
Anti-IgG de lapin	Chèvre	IgG Lapin	Polyclonal	1/1000	FITC
Anti-IgG de souris	Chèvre	IgG Souris	Polyclonal	1/250	FITC

Tableau 2.12 : Anticorps et dilution utilisés pour l'immunofluorescence et la cytométrie en flux

IV.4.2. Analyse de l'expression de CR1 CCP 22-30 TM/Cyto par Western BLOT

L'expression du récepteur est évaluée par analyse en Western BLOT du lysat total de cellules CHO-K1 ou HEK 293-FTM transfectées ou non par la construction CR1 CCP 22-30 TM/Cyto. Après lavage en PBS, 1×10^6 cellules sont reprises dans 100 μ L d'un tampon de lyse [Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 (pH 8,0)] additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases ajouté extemporanément (Complete EDTA-Free, Roche). Les cellules sont lysées pendant 30 minutes sur la glace puis centrifugées 30 minutes à 13200 rpm (4 °C). 1,25, 2,5 et 5 μ L du surnageant sont analysés par Western BLOT (gel SDS-PAGE 10%) avec un anticorps anti-CR1/CD35 (H-300, Santa Cruz Biotechnology) comme décrit dans le *Chapitre 2, section II.2.3*.

IV.4.3. Analyse en cytométrie en flux de l'expression de CR1 CCP 22-30 et de la fixation des collagènes de défense

Les cellules transfectées par pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 TM/Cyto ou pcDNA 3.1 – sans insert sont récupérées, centrifugées puis lavées en tampon PBS (grade biologie cellulaire, Life Technologies) en présence de BSA 1 % (p/v). Elles sont remises en suspension (PBS-BSA 1%) à une concentration de 1×10^6 cellules/mL. Pour chaque essai, $0,5 \times 10^6$ cellules sont incubées avec 100 μ L des différentes protéines ou anticorps pendant 45 minutes sur la glace. Pour les besoins de l'expérience, C1q et l'ovalbumine (témoin) ont été marqués avec le fluorochrome Alexa 488 à l'aide du Kit commercial « Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit » (Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur. Ce marquage permet une révélation directe de la fixation sans passer par l'incubation avec des anticorps. Les différents marquages effectués lors de cette étude ainsi que les témoins réalisés dans chaque cas sont répertoriés dans le tableau ci-après (*tableau 2.13*). Entre chaque incubation, les cellules sont lavées par 1 mL de PBS BSA 1 % (2 lavages). Les cellules sont finalement fixées par 100 μ L de PFA 4 % puis conservées dans 300 μ L de tampon PBS à 4 °C jusqu'à l'analyse. Durant toutes ces étapes, les cellules sont centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes sauf après fixation où la vitesse de centrifugation est augmentée à 1900 rpm. Les échantillons sont analysés avec l'assistance d'Evelyne Gout sur un FACScan (Beckton Dickinson). Les échantillons sont injectés à une vitesse comprise entre 200 et 700 événements par seconde lorsque cela est possible. Les essais donnant respectivement le signal minimal et maximal sont utilisés pour calibrer l'appareil. Pour chaque mesure, un nombre total de 20000

événements est enregistré. Les données brutes sont analysées à l'aide du logiciel Cellquest Pro (Beckton Dickinson).

Incubation	Marquage expression CR1	Marquage C1q-Alexa 488	Marquage C1q	Marquage MBL
1) Protéines	Tampon PBS BSA 1 %	1 ou 4 µg C1q A488	1 ou 5 µg C1q	2,5 ou 5 µg de MBL
2) Anticorps I	Anti-CR1 E11		Anti-C1q total	Anti-MBL total
3) Anticorps II	Anti-IgG souris FITC		Anti-IgG lapin FITC	Anti-IgG lapin FITC
Témoins	Anticorps II seul	Ovalbumine marquée avec Alexa 488	Anticorps seuls	Anticorps seuls

Tableau 2.13 : Marquages et témoins réalisés pour l'étude de la fixation de C1q et de la MBL à des cellules exprimant CR1 CCP 22-30 en surface

IV.4.3.1. Analyse en immunofluorescence de l'expression de CR1 CCP 22-30

Les cellules préparées pour l'analyse en cytométrie en flux et présentant un signal intéressant sont également analysées en immunofluorescence. 5×10^4 cellules dans un volume de 50 µL sont déposées sur une lamelle de 12 mm traitée à la poly-lysine puis sont centrifugées 5 minutes à 1600 rpm. Cette étape permet de fixer les cellules sur la lamelle. Celles-ci sont ensuite montées sur une lame avec un liquide de montage contenant un colorant du noyau, le DAPI (VectaShield, Vector Laboratories). Le bord des lamelles est recouvert d'un vernis transparent puis les lames sont conservées à 4 °C à l'abri de la lumière jusqu'à leur observation. Les cellules sont observées sur un microscope optique d'épifluorescence IX81 (Olympus) à l'aide d'objectifs plans apochromatiques de grossissement 40 et 60 fois. Des roues dotées de filtres d'excitation (Ex.) et d'émission (Em.) couplées à une caméra haute sensibilité permettent l'analyse de la fluorescence associée au DAPI (Ex./Em. : 387 nm/440 nm), au FITC (Ex./Em. : 490 nm /525 nm) et à l'Alexa 488 (Ex./Em. : 495 nm /519 nm). Un système de contraste interférentiel Nomarski permet également l'observation des cellules en lumière blanche avec un fort contraste. Le pilotage du microscope et l'analyse des données sont assurés par le logiciel Volocity (Perkin Elmer).

Chapitre 3 : Production d'une forme soluble et cristallisable de la calréticuline de *Trypanosoma cruzi*

Préambule

L'interaction de la calréticuline humaine (HuCRT), et notamment de son domaine S (comprenant une grande partie du domaine P et quelques résidus du domaine N), avec les domaines collagéniques de C1q et de la MBL est étudiée depuis de nombreuses années et a conduit à de nombreuses publications sur le sujet (Kuraya et al., 2005; Pagh et al., 2008; Paidassi et al., 2011; Sim et al., 1998; Stuart et al., 1997). Plus récemment, la forte homologie entre la HuCRT et la calréticuline de *T. cruzi* (TcCRT), notamment au niveau du domaine S (identité de 80%), a conduit l'équipe d'Arturo Ferreira à s'inspirer des précédents travaux pour montrer l'interaction de la TcCRT et de son domaine S avec C1q et la MBL (Ferreira et al., 2004b).

Au niveau de notre laboratoire, une stratégie de dissection structurale de la HuCRT a été menée. Grâce à de nouvelles délimitations structurales, il a ainsi été montré (Paidassi et al., 2011) que la HuCRT interagissait par sa partie globulaire (composée des domaines N et C) à la fois avec les têtes globulaires et les fragments collagènes de C1q. A l'inverse des résultats précédents, aucune interaction avec le domaine P n'a pu être observée. La structure du domaine globulaire de la HuCRT a par la suite été résolue au sein de notre équipe (Chouquet et al., 2011) permettant de valider les hypothèses de dissection structurale.

Dans la continuité des travaux réalisés sur la HuCRT au sein du laboratoire, et dans le cadre d'une récente collaboration avec l'équipe d'Arturo Ferreira, nous avons entrepris d'utiliser notre expertise pour produire la TcCRT entière, ainsi qu'un fragment soluble et cristallisable. La TcCRT entière et ses fragments pourront alors être analysés par SPR pour déterminer les constantes d'interaction avec les collagènes de défense. L'obtention d'un fragment cristallisable permettra, quant à lui, la résolution de la structure du domaine globulaire de la TcCRT. Prises ensemble, ces informations permettront de mieux appréhender les mécanismes d'évasion du système immunitaire mis en place par *Trypanosoma cruzi*.

I. Purification de la TcCRT de A. Ferreira (TcCRT AF)

Dans un premier temps, nous avons produit la TcCRT à partir du plasmide fourni par A. Ferreira (pET28b+ TcCRT AF) dans les conditions expérimentales décrites précédemment (Ferreira et al., 2004b). Ce plasmide code pour une protéine (*figure 3.1*) associée en position N-terminale à une étiquette poly-histidine (Histag) et disposant de résidus supplémentaires en amont et en aval de la séquence endogène de la TcCRT, comme décrit dans le chapitre *matériel et méthodes* (Chapitre 2, section I.3.5).

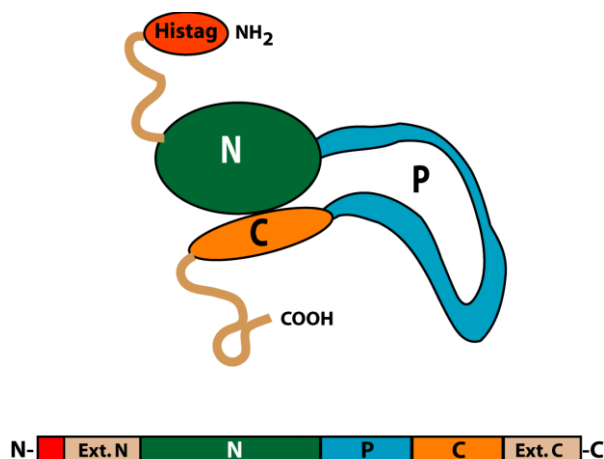


Figure 3.1 : Représentation schématique de la TcCRT issue de la construction d'A. Ferreira

En rouge : extension poly-histidine ; En beige : extensions N- et C- terminales liées au clonage dans pET28b+ ; En vert : Domaine N ; En bleu : Domaine P ; En orange : Domaine C)

La TcCRT est produite selon le protocole décrit dans le chapitre *matériel et méthodes* (Chapitre 2, section III.2.2). L'analyse par SDS-PAGE de l'induction (*figure 3.2 A*) montre clairement qu'une protéine pouvant correspondre à la TcCRT est largement surexprimée dans les bactéries induites et migre vers 60 kDa (en accord avec les données de la littérature disponibles pour la TcCRT). Seule une faible proportion est présente sous forme soluble (20%), le reste étant probablement contenu sous la forme de corps d'inclusion (*figure 3.2 C*). La confirmation que cette bande correspond à la TcCRT est apportée par séquençage N-Terminal, confirmant également l'absence de la méthionine initiatrice (Séquence : G-S-S-H-H-H). La purification sur la colonne d'affinité permet de séparer deux pics principaux, élués respectivement entre 50 et 250 mM puis entre 250 et 500 mM d'imidazole (*figure 3.2 B*). L'analyse par SDS-PAGE des fractions d'élution nous indique que la TcCRT est majoritairement retrouvée dans le second pic correspondant aux fractions 53 à 65 (*figure 3.2 C*).

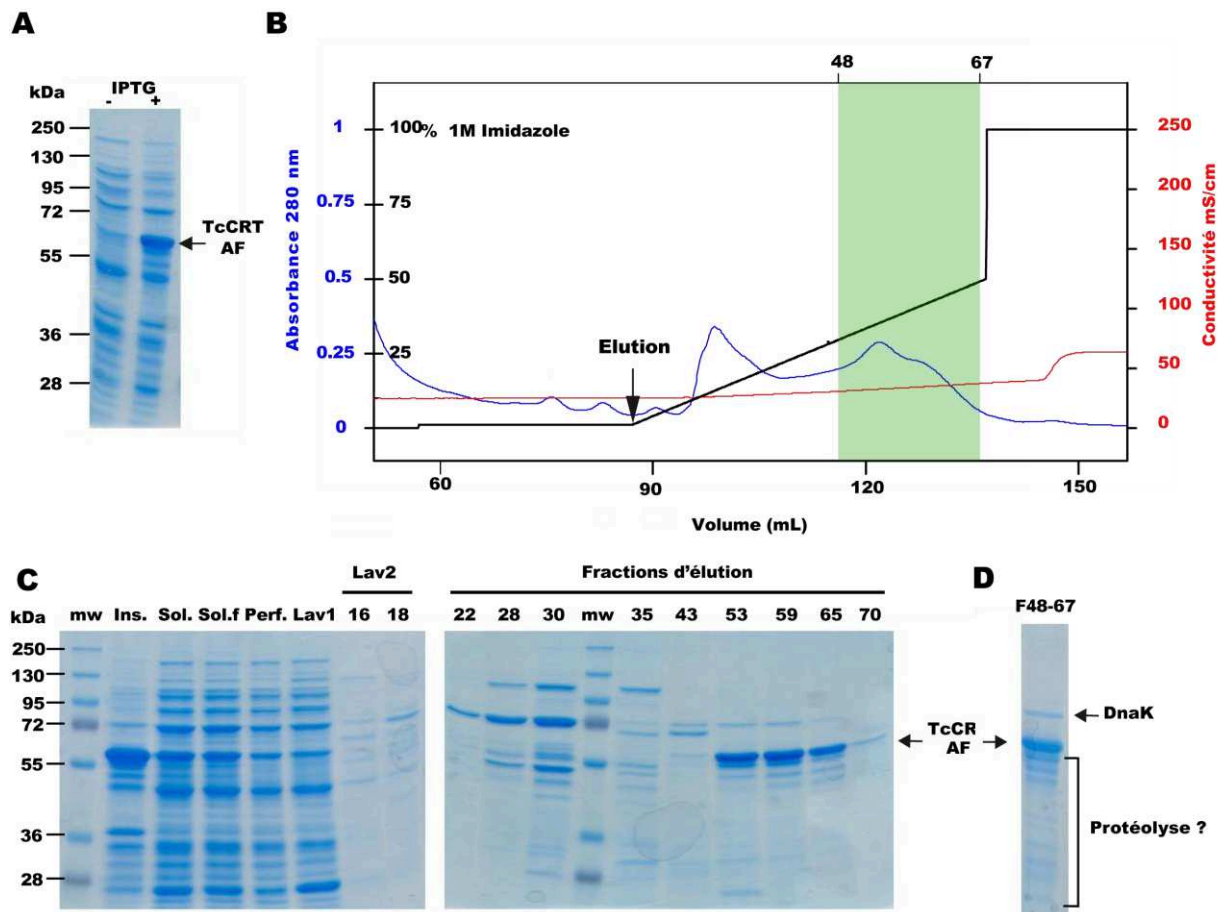


Figure 3.2 : Purification de la TcCRT AF

(A) Analyse par SDS-PAGE 10% en condition réductrice de l'induction à l'IPTG de l'expression de la TcCRT AF. Un volume correspondant à une même quantité de bactéries (10 uDO) a été analysé avant et après induction par IPTG. (B) Elution des protéines en présence d'un gradient linéaire d'imidazole sur la colonne d'affinité. (C) Analyse par SDS-PAGE 10 % en condition réductrice des différentes étapes de purification : mw : marqueur de poids moléculaire ; Ins. : Fraction insoluble après cassage (15µl) ; Sol. : Fraction soluble après cassage (15µl) ; Sol. : Fraction soluble filtrée (15µl) ; Perf. : Perfusé (30 µl) ; Lav1. : Lavage avec 10 mM Imidazole (10µl) ; Lav2 : Lavage avec 15 mM Imidazole (30µl) ; 16 à 70 : Fractions d'élution (20-30µl). (D) Analyse par SDS-PAGE 10% en condition réductrice de 10 µg des fractions 48 à 67. La présence de la protéine chaperonne DnaK et des fragments de protéolyse est indiquée.

Une quantité non négligeable ne semble néanmoins pas retenue et se retrouve dans les différents lavages, suggérant une possible saturation de la capacité de notre colonne ou une mauvaise accessibilité de l'étiquette poly-histidine. Les fractions 48 à 67 sont rassemblées puis concentrées jusqu'à une concentration de 3 mg/mL, soit 4,1 mg de protéines totales. Bien que cette étape nous permette d'éliminer un grand nombre de contaminants protéiques, l'échantillon final reste largement contaminé (*figure 3.2 D*). Des fragments de plus bas poids moléculaire sont notamment observés et pourraient correspondre à de la protéolyse conduisant à des formes tronquées de la TcCRT. Ces résultats sont en accord avec les étapes de purification décrite par Molina et collaborateurs (Molina et al., 2005) dans lesquelles ces fragments avaient notamment été identifiés par Western Blot. Une protéine de masse

apparente égale à 72kDa est également présente et est identifiée par séquençage N-terminal comme étant la chaperonne HSP70 (DnaK) de *E. coli*. Pour améliorer sa pureté, l'échantillon est alors chargé sur une colonne de chromatographie d'exclusion disposant d'une capacité séparative de 1 à 300 kDa (*figure 3.3 A*). L'analyse par SDS-PAGE (*figure 3.3 C*) et le profil d'élution nous indiquent que la TcCRT est présente majoritairement (estimation de 80%) dans le premier pic élué, le pic 1 (8.1 mL), qui correspond au volume mort de la colonne. Il semblerait donc que la majorité de notre échantillon soit composé de TcCRT sous forme d'oligomères de taille supérieure à 300 kDa, l'analyse sur SDS-PAGE de ce pic n'indiquant pas la présence de protéine à cette taille. Cette observation n'est pas étonnante depuis qu'il a été montré que la calréticuline humaine avait une tendance à former des oligomères de poids moléculaire élevé (Rizvi et al., 2004). Le pic 2 ($V_e = 11.7$ mL), contenant également de la TcCRT, correspond d'après la calibration de la colonne à une protéine globulaire de masse apparente égale à 118 kDa. La calréticuline humaine monomérique, native ou recombinante, migre à des masses apparentes équivalentes en chromatographie d'exclusion (Young et al., 2006) suggérant que le pic 2 pourrait donc correspondre à de la TcCRT sous forme soluble et monomérique. Les autres pics observés à des volumes d'élution supérieurs ne correspondent pas à de la TcCRT entière. A l'issue de cette étape, nous obtenons environ 30 µg de TcCRT soluble et potentiellement monomérique. L'analyse par microscopie électronique des deux pics purifiés nous confirme l'état de forte oligomérisation du pic 1 comparativement au pic 2 (*figure 3.3 B*). L'échantillon obtenu à ce stade ne nous permet pas d'envisager de poursuivre plus loin l'étude de la TcCRT (quantité trop faible et pureté insuffisante). Une optimisation de la construction ainsi que des conditions expérimentales est requise afin d'obtenir un échantillon de meilleure qualité. De plus, la présence d'extrémités N- et C- terminales désordonnées ainsi que d'un domaine P très flexible, sont des limitations à l'obtention de cristaux. Sur la base de l'expérience acquise avec la calréticuline humaine et des données structurales à notre disposition, de nouvelles constructions et de nouvelles conditions expérimentales sont alors évaluées.

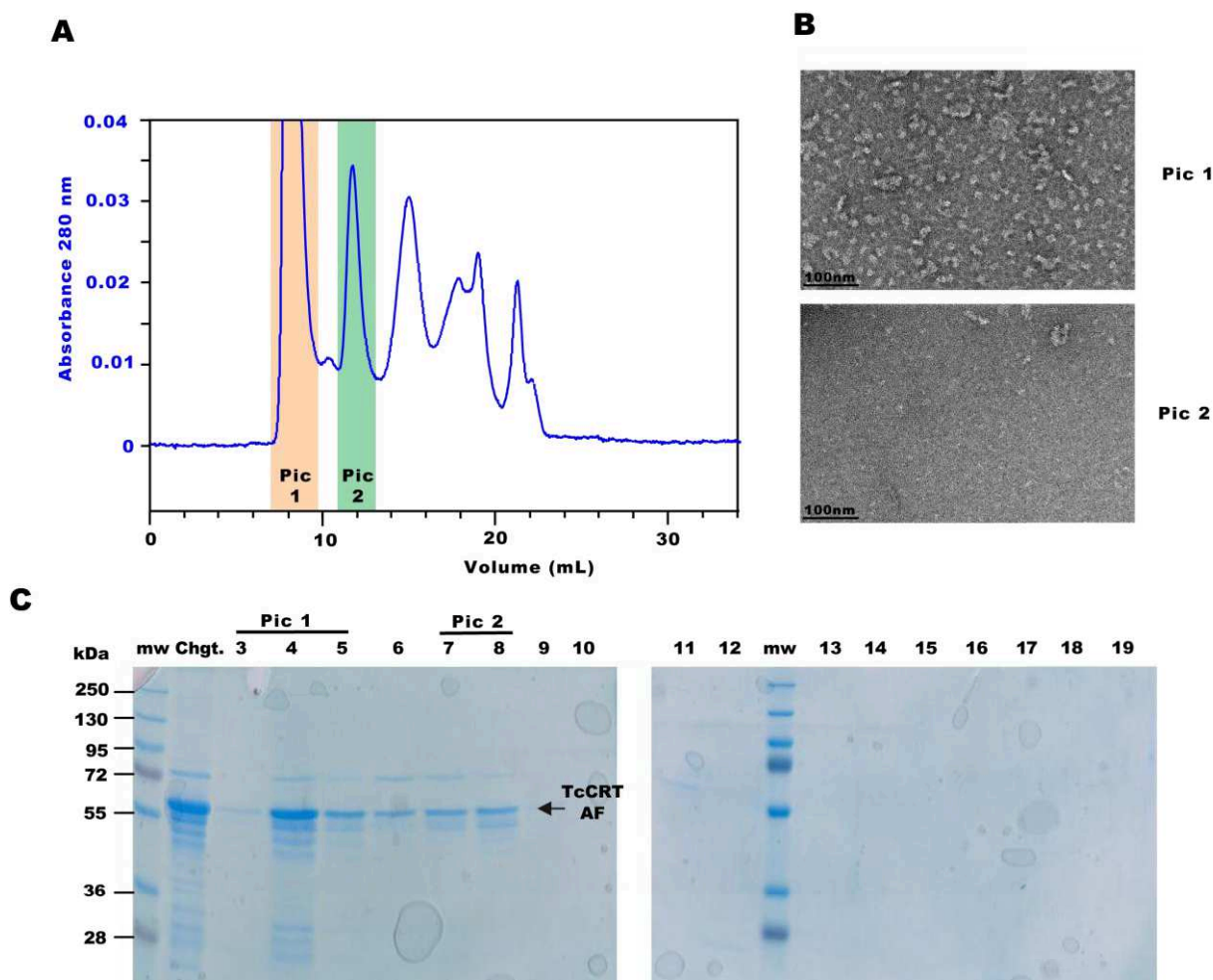


Figure 3.3 : Purification sur colonne Superose 12 10/300 GL de la TcCRT AF

(A) Profil d'élution de l'échantillon (100µg) chargé sur colonne de chromatographie d'exclusion Superose 12 10/300 GL. (B) Analyse en microscopie électronique en coloration négative (grossissement X 45000) des échantillons issus des pics 1 et 2 de chromatographie d'exclusion. (C) Analyse par SDS-PAGE 10% en condition réductrice des différents pics élués ; mw : marqueur de poids moléculaire ; Chgt. : échantillon chargé (4µL) ; 3 à 19 : fractions d'élution (30µl).

II. Vers une TcCRT soluble et monomérique ?

II.1. Réflexions sur les optimisations à apporter

Différentes pistes de réflexion ont été étudiées au cours de ce projet et ont conduit à adapter notre stratégie au fur et à mesure des essais réalisés. Ceux-ci sont listés ci-après par ordre d'importance.

II.1.1. Le calcium, élément stabilisateur

La calréticuline humaine est connue depuis longtemps pour sa capacité à fixer le calcium (Ca^{2+}) par son domaine C (région très acide) avec une faible affinité ($K_D \sim 1\text{-}2 \text{ mM}$) mais une capacité importante (25-50 mol de Ca^{2+} /mol de HuCRT) (Johnson et al., 2001).

Li et collaborateurs (Li et al., 2001) ont alors démontré que la fixation d'ions Ca^{2+} avait un fort effet stabilisateur en augmentant la stabilité thermique et la rigidité de la structure (moins de zones flexibles). Ces résultats ont été récemment confirmés par une autre équipe (Villamil Giraldo et al., 2010) et sont confortés par l'importance des ions Ca^{2+} pour le repliement du domaine globulaire (Chouquet et al., 2011). D'autres études ont également soulevé le fait que l'absence de calcium favoriserait l'oligomérisation de la HuCRT (Rizvi et al., 2004). La fixation d'ions Zn^{2+} , au niveau d'un site présent dans le domaine N ($K_D \sim 310 \mu\text{M}$, $14 \text{ mol Zn}^{2+}/\text{mol HuCRT}$), conduirait quant à elle à une déstabilisation de la calréticuline par l'exposition de zones hydrophobes. Ce phénomène conduit alors à une auto-association de la protéine et pourrait éventuellement mener à son oligomérisation (Li et al., 2001). Il semble donc que la présence d'ions bivalents module fortement le comportement de la calréticuline humaine. Ces sites de fixation de l'ion Ca^{2+} sont fortement conservés dans les différentes calréticulines, même si dans la TcCRT cette conservation est moins stricte. Il reste cependant fort probable que la présence de calcium dans les tampons de purification et de conservation puisse augmenter sensiblement la solubilité et la stabilité de la TcCRT.

II.1.2. L'extrémité C-terminale, aimant à chaperonne

La présence dans notre échantillon purifié de la chaperonne HSP70 de *E. Coli* (DnaK) peut être expliquée par la présence d'une longue extrémité (42 résidus) en position C-terminale de la TcCRT, extrémité n'appartenant pas à la séquence endogène de la protéine. Celle-ci, en plus d'être désordonnée, contient une grande proportion d'acides aminés hydrophobes (40%) susceptibles d'être reconnus par les protéines chaperonnes de *E. coli*. Ceci est confirmé par l'utilisation d'un algorithme de prédiction de sites de liaison de la DnaK (Van Durme et al., 2009) sur la séquence de la TcCRT de A. Ferreira. Nous observons alors la présence de 6 sites potentiels dans les 42 résidus de l'extrémité C-terminale supplémentaire. Cette observation nous conduit donc à réaliser une nouvelle construction de la TcCRT (TcCRT clean) dans laquelle cette extrémité, ainsi que la séquence N-terminale supplémentaire (*figure 3.1*), sont supprimées afin de limiter la présence de zones désordonnées et hydrophobes susceptibles de conduire à un mauvais repliement et à une interaction indésirable avec les chaperonnes de *E. coli*.

II.1.3. Du protozoaire à la bactérie, quand l'ARN s'en mêle

Trypanosoma cruzi est un parasite unicellulaire du groupe des protistes. A ce titre, il possède de nombreuses caractéristiques des cellules eucaryotes et notamment l'utilisation de certains couples ARN de transfert/codons dont la fréquence est moins élevée dans d'autres organismes et notamment chez *E. coli*, notre système d'expression. La présence de tels codons, dans la séquence d'un gène exprimé chez *E. coli*, peut conduire à un ralentissement de la synthèse protéique (baisse de rendement) voire, dans des cas extrêmes, à un désengagement de la machinerie d'expression, conduisant alors à des formes tronquées de la protéine (Sørensen et al., 2003). Depuis que la TcCRT AF purifiée précédemment présente des fragments pouvant correspondre à des formes tronquées, nous avons émis l'hypothèse que ce phénomène pourrait être associé en partie à des clusters de codons « rares ». L'analyse de la séquence du gène de la TcCRT AF (figure 3.4) est réalisée à l'aide du programme libre « Rare codon Calculator » (Clarke and Clark, 2008). Ce programme nous permet de différencier des zones où se trouvent des codons fortement (%Max) ou faiblement (%Min) utilisés par *E. coli*.

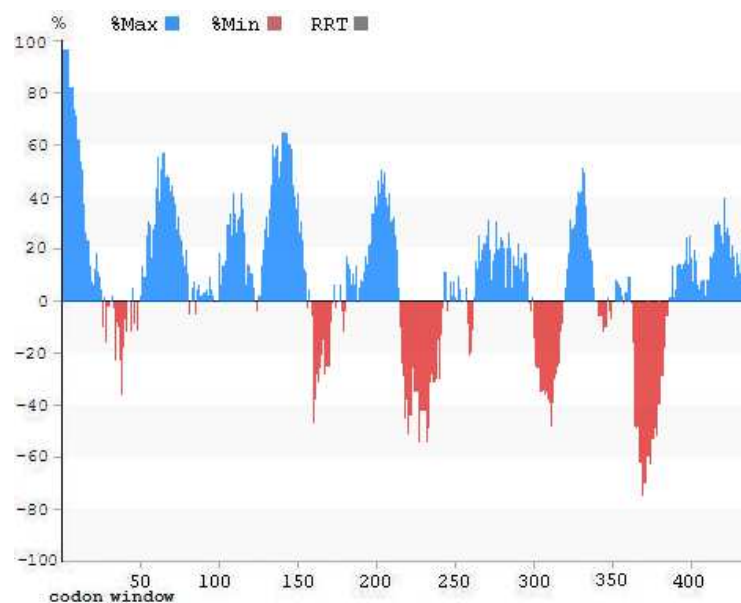


Figure 3.4 : Analyse de la présence de codons rares dans la séquence codante de la TcCRT d'A. Ferreira à l'aide du logiciel « Rare codon Calculator ».

Certaines de ces zones correspondent à des clusters assez larges et pourraient correspondre à des formes tronquées de la TcCRT présentant des masses moléculaires théoriques de 19, 27, 36 et 42 kDa. Ces masses seraient alors compatibles avec les bandes observées sur gel SDS-PAGE et identifiées comme résultant de la protéolyse de notre fragment (figure 3.2 D).

L'utilisation de la souche bactérienne Rosetta 2TM, dérivée de la souche BL21, nous permettra de limiter l'effet des codons. En effet, cette souche contient un plasmide codant pour des Arn_t spécifiques des codons rares et notamment de ceux de l'arginine.

II.2. Purification de la TcCRT « Clean »

La nouvelle construction de la TcCRT, la TcCRT Clean, a donc été produite en tenant compte des optimisations décrites précédemment. Notons également que les conditions d'induction ont été adoucies (temps et température). Les conditions expérimentales utilisées sont décrites en détail dans la partie *matériel et méthodes* (Chapitre 2, section I.3.5).

La TcCRT « clean » migre vers une masse apparente de 53 kDa, ce qui est en accord avec la différence de masse attendue par rapport à la TcCRT AF ($\Delta = 6.5$ kDa). La comparaison entre la fraction totale après cassage et la fraction soluble semble indiquer que la TcCRT clean est majoritairement produite sous forme soluble. L'élution avec le gradient d'imidazole (10 à 500 mM) permet de séparer deux pics principaux (*figure 3.5 A*). Seules les fractions les moins contaminées, correspondant au second pic (*figure 3.5 B*), sont rassemblées puis concentrées pour un total de 5.2 mg. La présence de la TcCRT dans ce pic est confirmée par séquençage N-terminal (séquence : H-H-H-H-H-H-E-N). L'échantillon obtenu présente une pureté largement supérieure à celle observée lors de la purification la TcCRT AF et ceci malgré une quantité analysée plus importante (*figure 3.5 C*). Bien que largement minoritaires, nous observons néanmoins encore quelques fragments de dégradation correspondant à la TcCRT, comme révélé par l'analyse des fractions B3-B9 en Western Blot (*figure 3.5 C*). L'analyse par perméation sur gel (*figure 3.5 D*) nous informe cependant que notre échantillon est toujours majoritairement présent sous la forme d'oligomères solubles. Seule une infime partie (< 5%) de notre échantillon s'élue à un volume d'élution pouvant correspondre à de la calréticuline monomérique.

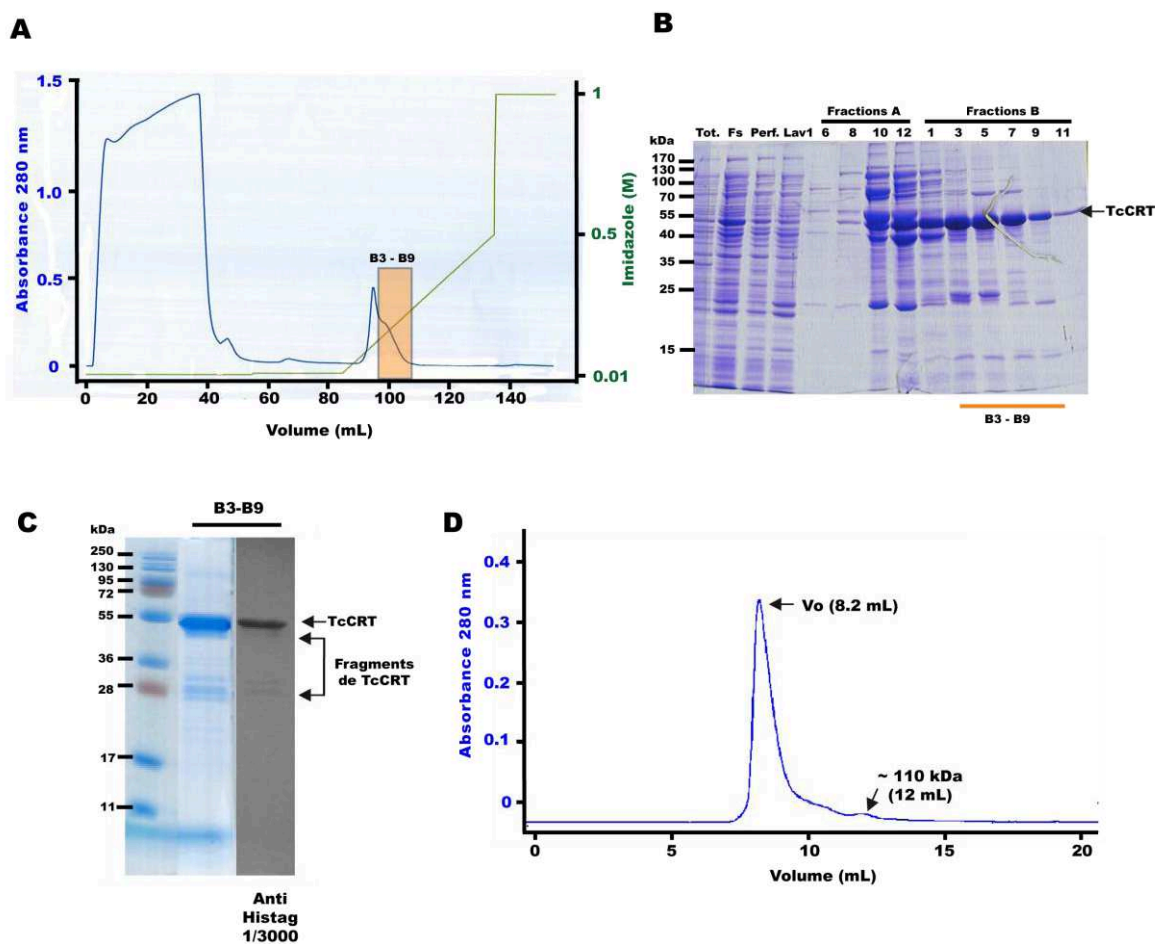


Figure 3.5 : Purification de la TcCRT « clean »

(A) Elution des protéines en présence d'un gradient linéaire d'imidazole sur la colonne d'affinité. (B) Analyse par SDS-PAGE (12%) en condition réductrice des étapes de purification sur colonne d'affinité ; mw : marqueur de poids moléculaire ; Tot. : fraction totale après cassage (1 µl) ; Fs : Fraction soluble (5 µl) ; Perf. : Perfusate (5 µl) ; Lav1 : Lavage avec 10 mM Imidazole (20 µl) ; A6 à A12 et B1 à B11 : Fractions d'élution (20 µl). (C) Analyse par SDS-PAGE (10%) et Western Blot (Anti Histag au 1/3000) en condition réductrice des fractions B3 à B9. (D) Profil d'élution de l'échantillon purifié (300 µg) chargé sur colonne Superose 12 10/300 GL.

Les modifications de nos conditions expérimentales (optimisation de la séquence de la TcCRT, induction plus douce, présence de Ca^{2+} et souche RosettaTM) nous ont permis d'augmenter la solubilité et la quantité de TcCRT produite. Cependant, nous ne parvenons toujours pas à obtenir un échantillon majoritairement monomérique, ce qui laisse supposer que cette tendance à l'oligomérisation serait associée à d'autres facteurs.

II.3. Formation du pont disulfure intramoléculaire

Aucune de nos hypothèses de travail n'a jusqu'à présent conduit à une amélioration de la qualité de notre échantillon. Une de nos autres hypothèses de travail nous a amené à nous intéresser à la formation du pont disulfure intramoléculaire de la TcCRT (entre les Cys¹⁰³ et Cys¹³⁴). Dans les calréticulines de différentes espèces, ces cystéines sont fortement conservées

et notamment dans la HuCRT. A ce titre, la mutation des Cys⁸⁸ et Cys¹²⁰ impliquées dans la formation du pont disulfure provoque une diminution de l'activité chaperonne de la HuCRT (Martin et al., 2006). La présence de cette liaison covalente aurait alors un rôle dans le maintien de la rigidité de la structure et contribuerait à son bon repliement, condition nécessaire à son activité. Notons que ce pont est suggéré être en équilibre avec une troisième cystéine qui serait également impliquée dans la formation de dimère de calréticuline (Hojrup et al., 2001; Jorgensen et al., 2003). Seules deux cystéines sont présentes dans la séquence de la TcCRT, et celles-ci sont engagées dans la formation d'un pont disulfure qui pourrait exercer un rôle identique que celui suggéré pour la HuCRT. La formation de ce type de liaisons covalentes dans *E. coli* est possible mais n'est pas favorisée du fait d'un cytoplasme réducteur. L'utilisation de souches génétiquement modifiées comme les souches Origami 2TM (cytoplasme oxydant) ou ShuffleTM (expression d'une isomérase des ponts disulfures) permet d'améliorer sensiblement la formation de ces ponts disulfures, ce qui pourrait conduire à une amélioration du repliement de la TcCRT et de sa solubilité.

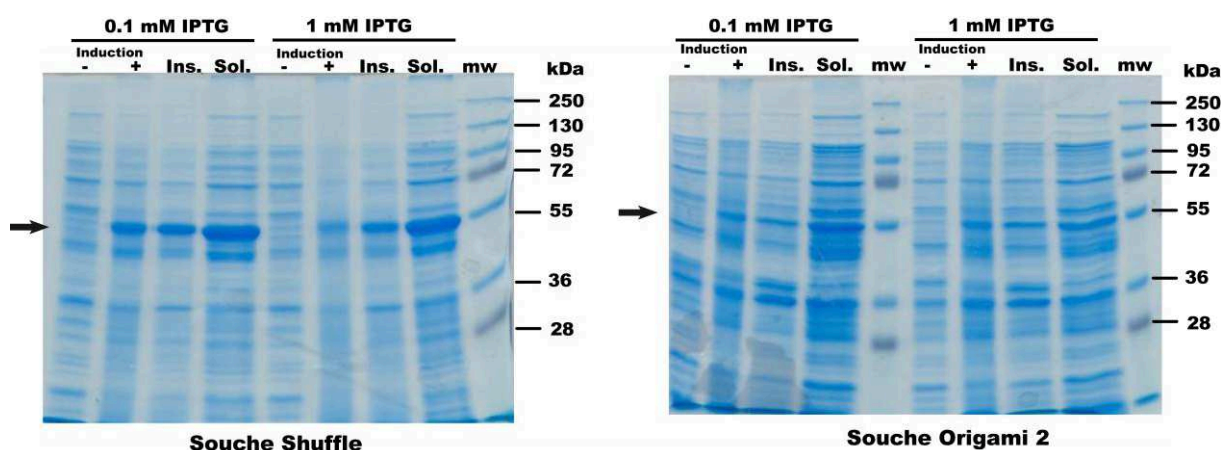


Figure 3.6 : Evaluation de l'expression et de la solubilité de la TcCRT Clean exprimé en ShuffleTM et en Origami 2TM

Analyse sur gel SDS-PAGE 10 % en condition réductrice de l'induction de l'expression de la TcCRT Clean. L'équivalent de 10 UDO est analysé avant (-) et après induction (+). 15 µl ou 30 µl de fraction insoluble (ins.) ou soluble (sol.) sont déposés sur gel, respectivement pour l'expression en Shuffle et en Origami 2 ; mw : marqueur de poids moléculaire. La position de la TcCRT Clean est indiquée par une flèche.

Nous avons dans un premier temps testé l'expression de la TcCRT clean dans ces deux souches et sous deux conditions d'induction (figure 3.6). Dans les deux cas, la part de TcCRT présente sous forme soluble est assez importante (70-80%) et 0,1 mM d'IPTG permet une induction optimale de l'expression. La souche Shuffle est celle qui donne le meilleur rendement en termes de quantité produite, nous conduisant à la choisir pour produire la

TcCRT clean dans un plus grand volume (1L). Le profil d'élution sur chromatographie d'affinité (*figure 3.7 A*) est cohérent avec celui observé précédemment (*figure 3.5 A*) et la protéine est majoritairement retrouvée dans le second pic au niveau des fractions 37-50 (*figure 3.7 C*). Une quantité non négligeable est cependant retrouvée dans le perfusat en accord avec les observations précédentes. Après concentration, nous obtenons environ 20 mg de TcCRT clean par litre de surnageant de culture. L'analyse par chromatographie d'exclusion (*figure 3.7 B*) de cet échantillon nous révèle cependant que la TcCRT clean est toujours majoritairement retrouvée sous forme d'agrégats solubles. Bien que notre protéine soit fortement soluble et que nous ayons fortement amélioré les rendements avec l'utilisation de la souche ShuffleTM, il nous est toujours impossible de purifier un échantillon sous forme monomérique.

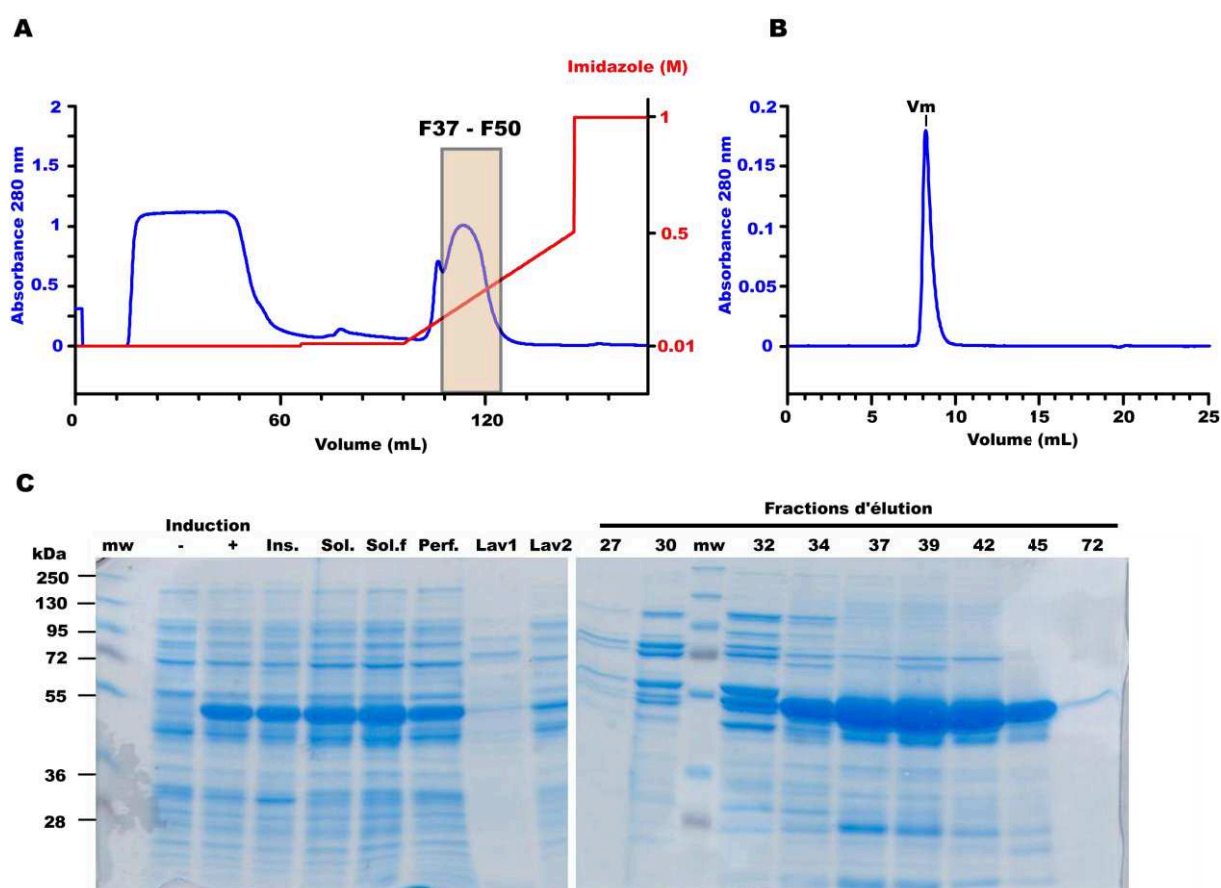


Figure 3.7 : Purification de la TcCRT « clean » produite en souche Shuffle

(A) Elution des protéines en présence d'un gradient linéaire d'imidazole sur la colonne d'affinité. (B) Profil d'élution de l'échantillon purifié (150 µg) chargé sur Superose 12 10/300 GL. (C) Analyse par SDS-PAGE (10%) en condition réductrice des étapes de purification sur colonne d'affinité; mw : marqueur de poids moléculaire; (-) avant et (+) après induction (10 UDO); Ins. : Fraction insoluble (10 µL); Fs : Fraction soluble (10 µL); Sol.f : Fraction soluble filtrée (10 µL); Perf. : Perfusat (15 µL); Lav1 : Lavage avec 10 mM Imidazole (30 µL); Lav2 : Lavage avec 15 mM Imidazole (30 µL); 27 à 72: Fractions d'élution (20-30 µL).

III. Vers un fragment de TcCRT soluble, monomérique et cristallisable ?

L'autre aspect de ce projet consistait à obtenir une forme de la TcCRT permettant d'envisager sa cristallisation. Les contraintes étaient alors d'obtenir un échantillon soluble, homogène (pur et monomérique), sans zone de flexibilité, et bien évidemment en quantité suffisante pour permettre le criblage de plusieurs conditions de cristallisation. Les précédentes optimisations réalisées sur la TcCRT entière ont permis d'obtenir un échantillon avec une meilleure pureté et en plus grande quantité (environ 20 mg/L de culture), mais cependant composé majoritairement d'agrégats solubles. De plus, dans la construction actuelle (TcCRT clean), le domaine P et l'extrémité C-terminale sont prédits comme étant les zones plus flexibles de la protéine. Afin d'atteindre notre objectif, nous avons donc réalisé de nouvelles constructions dans lesquelles ces zones flexibles ont été supprimées afin d'obtenir une forme globulaire répondant aux critères énoncés de cristallisation.

Dans notre tâche, nous avons pu bénéficier de l'expertise développée au laboratoire pour l'étude de la calréticuline humaine. Nous nous sommes alors largement inspirés des constructions réalisées dans le cadre de la détermination de la structure cristallographique de la partie globulaire de la HuCRT (Chouquet et al., 2011). Nous avons tout d'abord supprimé le domaine P (ΔP) dont la délimitation a été choisie entre les résidus Pro²⁰¹ à Glu²⁹⁸. Ce choix a été effectué sur la base sur de l'alignement entre les séquences (sans peptide signal et séquence de rétention) de la TcCRT et son homologue humaine (*figure 3.8 B*), en respectant les limites déterminées pour la HuCRT (Pro²⁰⁴ à Pro³⁰¹). Ce domaine a été remplacé dans la TcCRT par un linker composé de 3 acides aminés, Gly-Ser-Gly, permettant de faire le lien entre les domaines N et C. (*figure 3.8 A*)

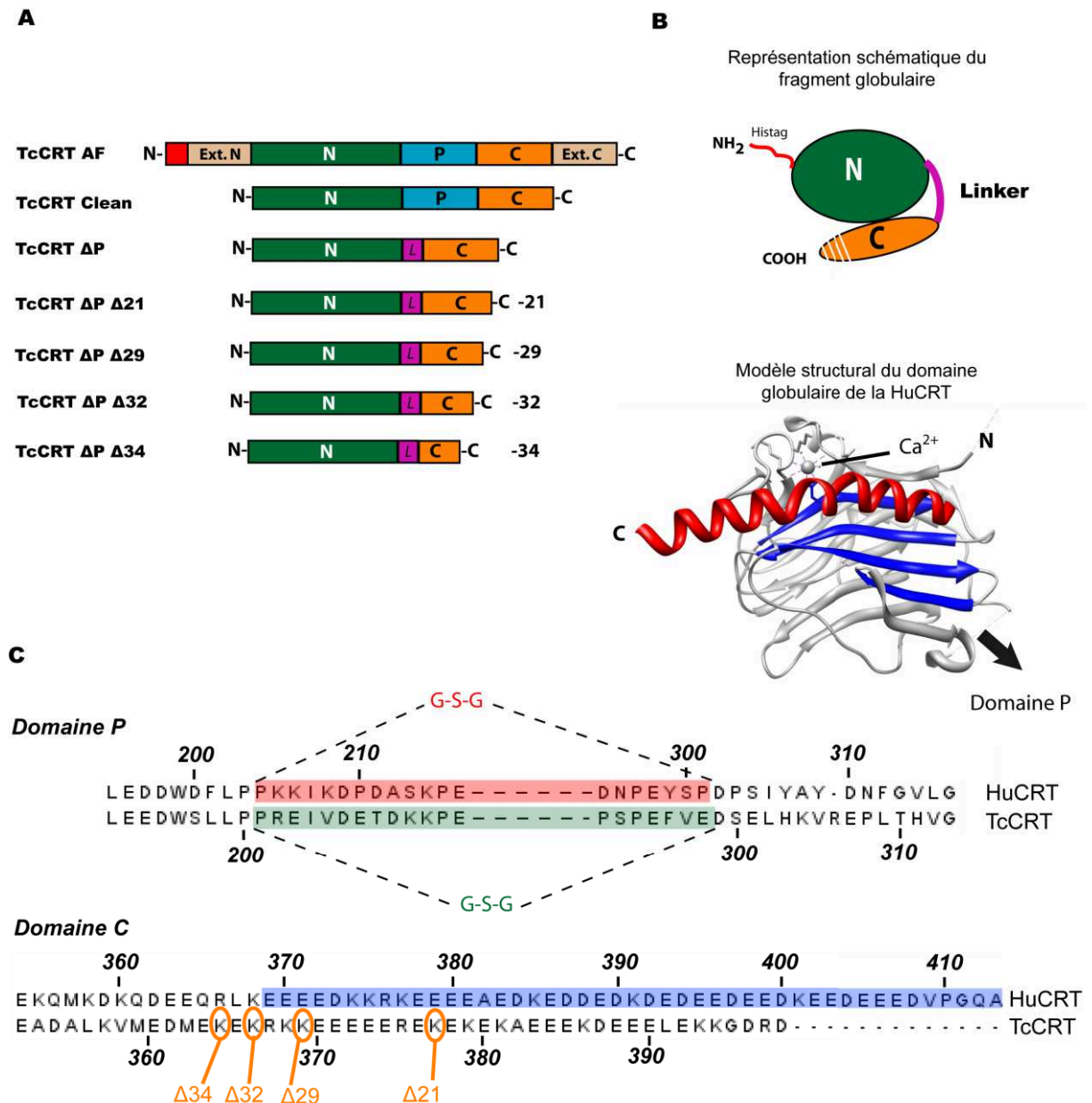


Figure 3.8 : Construction du domaine globulaire de la TcCRT

(A) Représentation schématique des fragments de TcCRT conçus pour la production du domaine globulaire de la TcCRT. (B) Représentation schématique de la TcCRT globulaire et modèle structural du domaine globulaire de la HuCRT (code PDB :3POS_A). En bleu : Feuillet β ; En rouge : Hélice α C-terminale. (C) Alignement partiel des séquences protéiques des domaines P et C de la TcCRT et de la HuCRT. La délimitation du domaine P supprimé dans la HuCRT est indiquée dans le rectangle rouge et celui de la TcCRT dans le rectangle vert. La partie du domaine C de la HuCRT enlevé dans la construction globulaire est indiqué par le rectangle bleu. Les résidus C-terminaux choisis dans les constructions de la TcCRT globulaire sont indiqués en orange. La numérotation des résidus est donnée pour chaque protéine.

Concernant les limites du domaine C-terminal, le choix du résidu terminant la séquence est plus délicat à prédire, d'autant plus que cette zone présente une forte variabilité entre les espèces. Dans le cas de la HuCRT, plusieurs constructions ont été nécessaires avant d'obtenir un fragment donnant des résultats satisfaisants, tant en terme de purification que de cristallisation (pour la HuCRT, il s'agissait de la Lys³⁶⁸). Le choix de ce résidu semble être déterminant dans le succès de la stratégie puisque des constructions similaires à celles de la HuCRT ont permis de résoudre la structure globulaire de la calréticuline de souris (Kozlov et al., 2010). Compte tenu de la plus faible longueur du domaine C de la TcCRT et de la faible identité avec la HuCRT, nous avons opté pour une stratégie globale. Nous avons ainsi réalisé une série de constructions dont l'extrémité C-terminale se situe de part et d'autre de la Lys³⁶⁸ de la HuCRT, respectivement aux Lys³⁶⁴ ($\Delta P/\Delta 34$), Lys³⁶⁶ ($\Delta P/\Delta 32$), Lys³⁶⁹ ($\Delta P/\Delta 29$) et Lys³⁷⁷ ($\Delta P/\Delta 21$) de la TcCRT (*figure 3.8 B*).

III.1. Evaluation de l'expression et de la solubilité des constructions

Les niveaux d'expression et la solubilité de ces constructions, ainsi que de la construction ΔP , ont tout d'abord été évalués en petits volumes selon le protocole précédemment utilisé pour la TcCRT Clean (*figure 3.9*). Seule la méthode de casse des bactéries (par ultrason) diffère du protocole initial. L'ensemble des constructions migrent à des masses apparentes en accord avec leur masse théorique (*voir chapitre matériel et méthodes, tableau 2.1*). Hormis pour la TcCRT $\Delta P/\Delta 32$ qui n'est pas ou très faiblement exprimée, toutes les protéines sont produites dans des quantités acceptables. Cependant, celles-ci sont toutes majoritairement retrouvées dans la fraction insoluble. Seule la TcCRT ΔP est exprimée à hauteur de 15% dans la fraction soluble. Par comparaison avec la production de la TcCRT Clean, il semble que l'absence du domaine P ait un impact important sur la proportion de protéines retrouvées dans la fraction soluble. La réduction de l'extrémité C-terminale a quant à elle un effet drastique sur la solubilité puisque les protéines $\Delta P/\Delta 21$, $\Delta P/\Delta 29$, $\Delta P/\Delta 32$ et $\Delta P/\Delta 34$ sont retrouvées à plus de 95% dans la fraction insoluble. L'augmentation de l'insolubilité dans la construction TcCRT ΔP nous laisse supposer que le domaine P joue un rôle prépondérant dans la stabilité de la protéine. Il est également possible que les limites choisies pour ce domaine ainsi que la longueur du linker imposent une contrainte forte qui déstabiliserait le reste de la protéine.

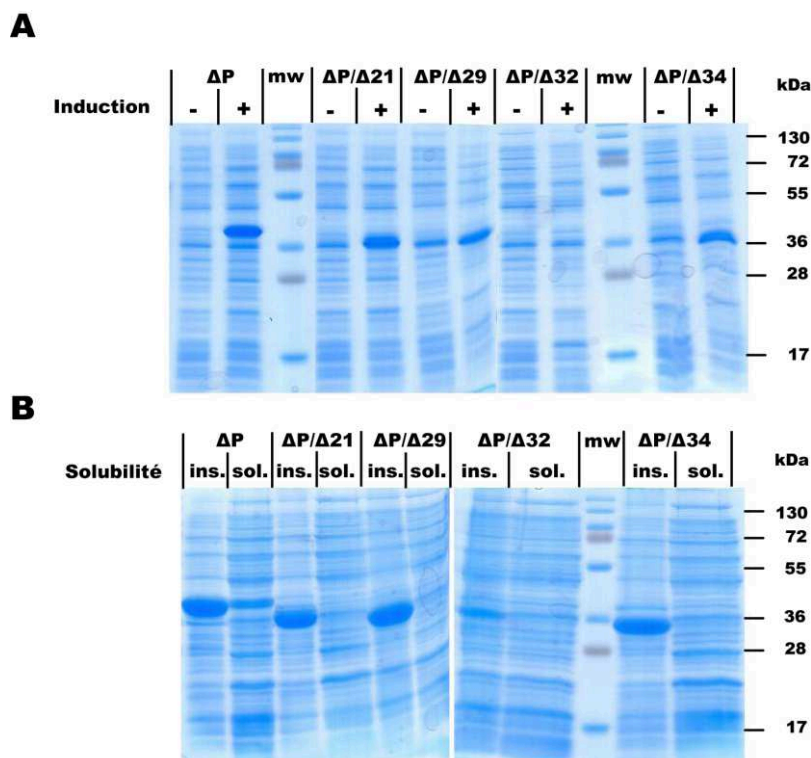


Figure 3.9 : Evaluation de l'expression et de la solubilité des constructions de la TcCRT

(A) Analyse par gel SDS-PAGE 12,5 % en condition réductrice de l'induction de l'expression des différentes constructions. L'équivalent de 10 UDO est analysé avant (-) et après induction (+). (B) Analyse par gel SDS-PAGE 12,5 % en condition réductrice de la solubilité des constructions exprimées. 30 μ L de fraction insoluble (ins.) ou soluble (sol.) sont déposés sur gel ; mw : marqueur de poids moléculaire.

Dans la structure du domaine globulaire de calréticuline humaine (code PBD : 3POS, *figure 3.8 A*), la partie C-terminale adopte un repliement en hélice α (Asp³³⁵ à Glu³⁶⁵) venant se coller contre le domaine N (notamment contre des brins β contenant des acides aminés hydrophobes). Une prédiction des structures secondaires se basant sur la séquence de la HuCRT avait également prédit la présence de cette hélice (NPS@: Network Protein Sequence Analysis). Par le même type d'analyse, une hélice α est également prédite dans le domaine C-terminal de la TcCRT. Le domaine C de la TcCRT étant plus court que celui de la HuCRT, il est possible que nous ayons supprimé trop de résidus en position C-terminale, conduisant peut-être à révéler au solvant une zone hydrophobe normalement masquée par cette hélice. La forte insolubilité observée sur les constructions $\Delta P/\Delta C$ pourrait alors s'expliquer par un caractère hydrophobe plus marqué que dans les autres constructions.

III.2. Production de la TcCRT ΔP

Malgré des rendements plus faibles attendus pour la TcCRT ΔP , cette construction présente la meilleure solubilité et a donc été produite selon le protocole utilisé pour la TcCRT clean. Celle-ci migre vers une masse apparente de 38 kDa, comme précédemment observé lors du test d'expression et de solubilité (*figure 3.9*). L'élution avec le gradient d'imidazole (10 à 500 mM) permet de séparer trois pics principaux (*figure 3.10 A*). Les deux premiers pics (pic1 : fractions 26-31 ; pic2 : fractions 22-36) sont composés en grande partie de contaminants. Le pic 3 (Fractions 37-48), quant à lui, s'élue plus tardivement et contient majoritairement la TcCRT ΔP (quantité estimée à 6,2 mg) avec une pureté satisfaisante de l'ordre de 90% (*figure 3.10 C*). Les fractions 37 à 48 (pic3) sont rassemblées et injectées sur colonne de chromatographie d'exclusion afin d'améliorer la pureté de l'échantillon et de déterminer son état d'oligomérisation (*figure 3.10 B*). Comme précédemment, nous retrouvons majoritairement la TcCRT ΔP dans le volume mort (V_m) de la colonne, suggérant que celle-ci est toujours présente sous forme d'oligomères de grande taille (>300 kDa). Deux autres pics de plus faible intensité sont également observés vers 12,5 mL (Pic A) et 13,7 mL (pic B). Ces 2 pics contiennent également de la TcCRT ΔP (*figure 3.10 D*) et correspondent à des masses expérimentales de 79 kDa pour le pic A et de 44 kDa pour le pic B. Ces masses sont en accord avec la présence potentielle d'une forme globulaire de la TcCRT monomérique et dimérique, respectivement pour le pic B et le pic A. Nous obtenons au final 2,3 mg de TcCRT ΔP oligomérisée, 80 μ g du pic A et 130 μ g du pic B. L'analyse des échantillons par microscopie électronique confirme le fort état d'agrégation du pic élué dans le volume mort par rapport au pic B qui présente quelques anneaux de protéines (*figure 3.10 E*).

Bien que nous parvenions à identifier une forme potentiellement monomérique et présentant un bon niveau de pureté, les quantités obtenues (75 μ g par litre de culture) ne permettent pas la réalisation d'une étude cristallographique.

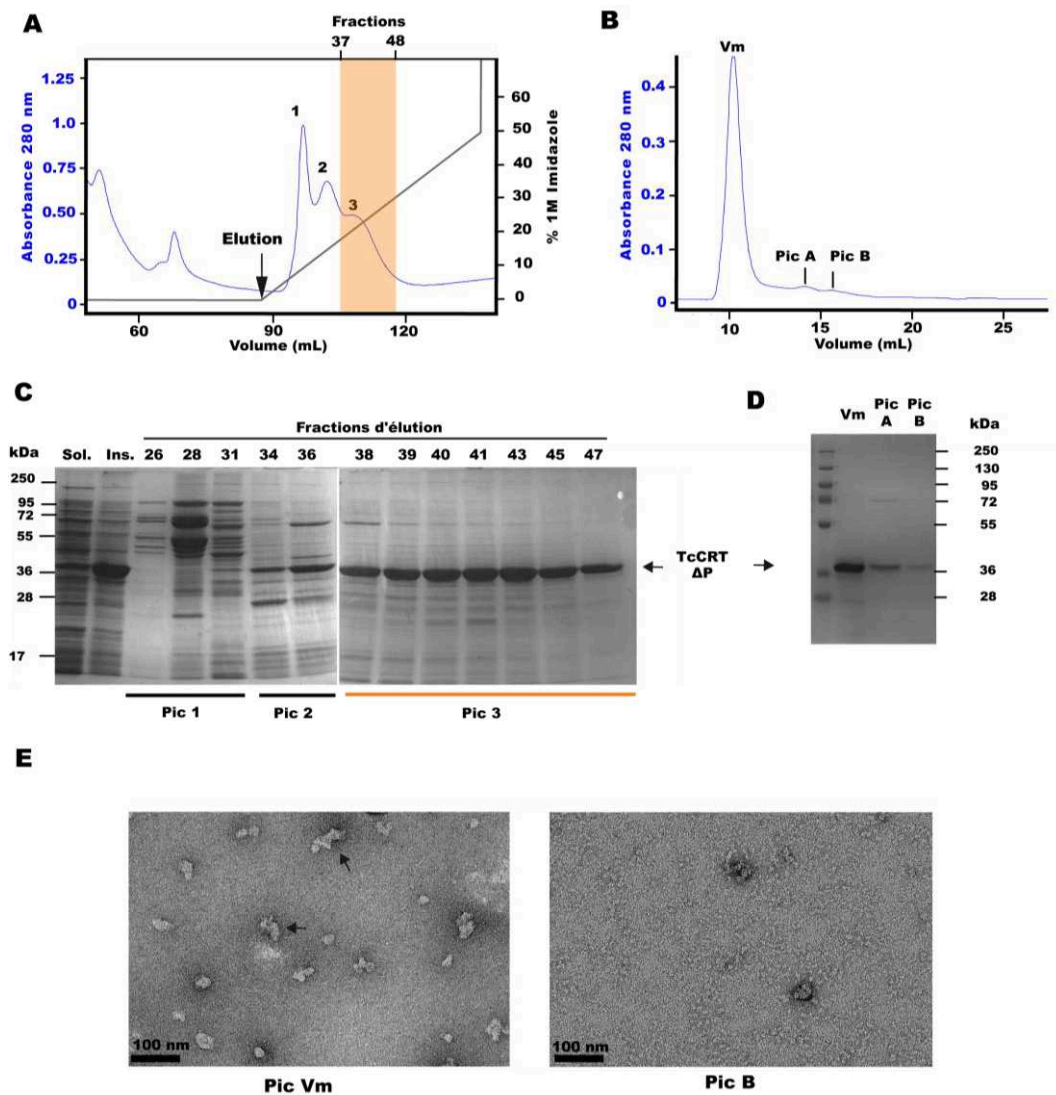


Figure 3.10 : Production de la TcCRT Δ P

(A) Elution des protéines en présence d'un gradient linéaire d'imidazole sur la colonne d'affinité. Les fractions contenant la TcCRT Δ P sont indiquées sur le profil. (B) Profil d'élution de l'échantillon (300 μ g) chargé sur Superose 10/300 GL. Le volume mort (Vm) ainsi que les différents pics élués sont indiqués par des flèches. (C) Analyse par gel SDS-PAGE (10%) en condition réduite de la purification de la TcCRT Δ P ; Sol. : Fraction soluble (15 μ l) ; Ins. : Fraction insoluble (15 μ l) ; 26 à 47 : Fractions d'élutions (20 μ l) (D) Analyse sur gel SDS-PAGE (10%) en condition réduite des pics élués (25 μ l) sur colonne Superose 10/300 GL ; Vm : Volume mort. (E) Contrôle qualité du pic Vm et du pic B séparés sur colonne Superose 10/300 GL par microscopie électronique en coloration négative (grossissement X 45000).

IV. Abandon du projet et perspectives

Dans nos essais, les constructions de TcCRT purifiées ont présenté une forte tendance à former des oligomères solubles lors de leur purification. De plus, la suppression d'une partie du domaine C-terminal conduit à une forte insolubilité. Nous espérions qu'en utilisant une stratégie calquée sur celle utilisée pour la calréticuline humaine, nous parviendrions à obtenir rapidement un échantillon d'une qualité suffisante pour des expériences de cristallographie. L'expérience nous montre que le choix des délimitations des domaines de la TcCRT semble plus complexe qu'il n'y paraît et qu'une nouvelle approche semble nécessaire pour aborder ce problème. Je n'ai malheureusement pas poursuivi sur ce projet car nous avons décidé d'un commun accord de recentrer le projet de thèse sur l'étude de CR1/CD35, dont l'avancée était prometteuse à contrario des difficultés rencontrées avec la TcCRT. L'arrivée d'Emmanuelle LAFFLY en contrat post-doctoral a pu donner de nouvelles perspectives au projet TcCRT, toujours dans l'optique d'améliorer les rendements et la qualité de l'échantillon. Dans un premier temps, des modifications des conditions de cultures (changement de température d'induction, cinétiques d'induction, choc thermique pour favoriser le repliement des protéines surexprimées) et de conditions de casse (tampon de lyse) ont été testées avec la construction TcCRT ΔP sans cependant aboutir à des résultats concluants et reproductibles. Une construction optimisée du gène de la TcCRT ΔP a alors été conçue en modifiant l'extrémité N-terminale (ajouts de quelques résidus, nouveau site de coupure) et en optimisant les codons pour la production chez *E. coli*. La construction obtenue gagne alors en solubilité mais les rendements restent faibles. De plus, la protéine est toujours présente sous forme d'agrégats solubles. Sur la base de nouvelles informations structurales et de résultats de digestion enzymatique, la construction de la TcCRT a donc été revisitée. La séquence de la TcCRT a tout d'abord été harmonisée avec la séquence présente dans les banques de données (séquence Q4CPZ0). En effet, notre séquence initiale était un variant non répertorié de la séquence Q4CPZ0. La position de l'étiquette poly-histidine a ensuite été modifiée pour être placée à l'extrémité C-terminale de la TcCRT et ainsi résoudre un problème d'accessibilité observé avec la précédente construction. A partir de ce gène optimisé (TcCRT entière), une nouvelle construction de la TcCRT ΔP , nommée TcCRT mutP, a été réalisée en choisissant une nouvelle délimitation pour le domaine P dans laquelle le premier et le dernier feuillet β du domaine P ont été conservés et reliés par un linker Gly-Ser-Gly. Pour les constructions, les rendements obtenus sont largement supérieurs à ceux précédemment observés (> 10 mg par litre de culture) et l'échantillon n'est plus retrouvé sous forme d'agrégats soluble.

Malencontreusement, aucune de ces protéines n'a donné à ce jour de cristaux. Une stratégie de délétion progressive du domaine C, basée sur des données de protéolyse ménagée, est actuellement à l'étude pour résoudre cette difficulté. Les premiers résultats sont très encourageants tant en termes de rendement que de qualité.

Chapitre 4 : CR1, Récepteur des collagènes de défense

Préambule

Le récepteur CR1/CD35, déjà bien connu comme récepteur des opsonines C3b et C4b (Smith et al., 2002), a émergé au début des années 2000 comme récepteur potentiel des collagènes de défense par sa capacité à interagir avec C1q et la MBL (Ghiran et al., 2006). Exprimé à la surface d'érythrocytes, de monocytes et de macrophages, ces nouveaux ligands ont renforcé l'implication de CR1 dans la phagocytose des pathogènes et l'élimination des cellules apoptotiques, à l'image du rôle de l'interaction de C1q/MBL avec la calréticuline et CD91. Peu d'informations sont cependant disponibles concernant les modalités de cette interaction. Le fragment contenant les modules CCP 22 à 30 semble se présenter comme un site potentiel, les autres parties de CR1/CD35 étant impliquées dans l'interaction avec C3b et C4b (Klickstein et al., 1997). Cependant, à notre connaissance ce fragment n'a jamais été produit sous forme recombinante et aucune étude biochimique complète n'a été réalisée. L'agrandissement récent de la famille des collagènes de défense activant le complément avec la découverte des ficolines (Endo et al., 2011) ouvre la voie à la découverte de nouveaux ligands de CR1/CD35. L'intérêt grandissant pour CR1/CD35 s'explique également par son implication potentielle dans de nombreuses pathologies. CR1 a notamment été suggéré comme facteur de risque dans le développement de lupus systémique érythémateux et de maladies neurodégénératives comme Alzheimer. Il participerait également à l'infectiosité de *P. falciparum*, l'agent responsable de la malaria, et serait une voie d'entrée pour de nombreux virus ou pathogènes (VIH-1, *M. tuberculosis*). Afin de mieux comprendre le rôle joué par l'interaction entre CR1 et les collagènes de défense, nous nous sommes intéressés à son fragment CR1 CCP 22-30. Notre objectif est de définir avec précision le ou les sites d'interaction et de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes mettant en jeu ces interactions. Dans ce but, ce fragment a été produit puis son interaction avec plusieurs collagènes de défense caractérisée.

I. Obtention du fragment CR1 CCP 22-30

Depuis sa découverte à la surface de plusieurs types cellulaires (Fearon, 1980), CR1 a été largement étudié et sa production recombinante a été réalisée en cellules CHO (Weisman et al., 1990b). Des fragments de CR1 ont également été produits en système de levure (*P. Pastoris*) pour des études structurales (Smith et al., 2002) et d'interaction (Tetteh-Quarcoo et al., 2012). Les fragments CR1 CCP 1-3 et CCP 1-4 ont également été produits en système bactérien (Mossakowska et al., 1999) mais, à ce jour, aucune équipe n'a décrit la production du fragment recombinant CR1 CCP 22-30. La molécule de CR1 est une molécule fortement glycosylée comportant 25 sites potentiels de N-glycosylation dont 8 sont prédits au niveau des modules CCP 22-30. De plus, l'importance des glycosylations pour la fonction et la stabilité a été clairement démontrée pour l'interaction avec iC3b, bien que le type de N-glycosylation (high mannose versus complexe) ne semble pas revêtir la moindre importance dans ce cas de figure (Lublin et al., 1986). Les glycosylations étant souvent un pré-requis pour assurer la stabilité et la fonction des protéines (Sola and Griebenow, 2009), nous avons donc choisi de produire le fragment CR1 CCP 22-30 dans deux systèmes d'expression différents, permettant à la fois la synthèse de sucres N-liés de type high mannose (cellules d'insectes High FiveTM) et de type complexes (cellules HEK 293-F).

I.1. Production et caractérisation de la forme recombinante de CR1 CCP 22-30 produite en cellules d'insectes High FiveTM

Le fragment CR1 CCP 22-30 a tout d'abord été produit en cellules d'insectes High FiveTM. Les étapes de biologie moléculaire nécessaires à l'obtention des plasmides d'expression et des bacmides recombinants ainsi que la production du fragment ont été réalisées comme décrit dans le chapitre *matériel et méthodes*.

I.1.1. Purification de CR1 CCP 22-30

Le test d'expression, réalisé au préalable, nous indique que le fragment CR1 CCP 22-30 semble correctement exprimé dans le système baculovirus – cellules d'insectes High FiveTM. Celui-ci migre sur gel SDS-PAGE à une masse moléculaire apparente de 85 kDa (*figure 4.1*), largement supérieure à la masse moléculaire attendue mais probablement due à la présence de modifications post-traductionnelles. Cette bande ainsi qu'une seconde bande migrant à une

masse apparente de 69 kDa sont révélées spécifiquement par un anticorps dirigé contre les CCP 27 à 30 (*figure 4.1*). Bien que la bande à 69 kDa réagisse de façon similaire avec l'anticorps, elle est difficilement observable par SDS-PAGE, à l'inverse de la bande à 85 kDa. Elle pourrait alors correspondre à une forme aglycosylée de la protéine (63679 Da) présentant une réactivité accrue pour l'anticorps. Des fragments de tailles inférieures pouvant résulter d'une protéolyse sont également observés entre 72 et 28 kDa.

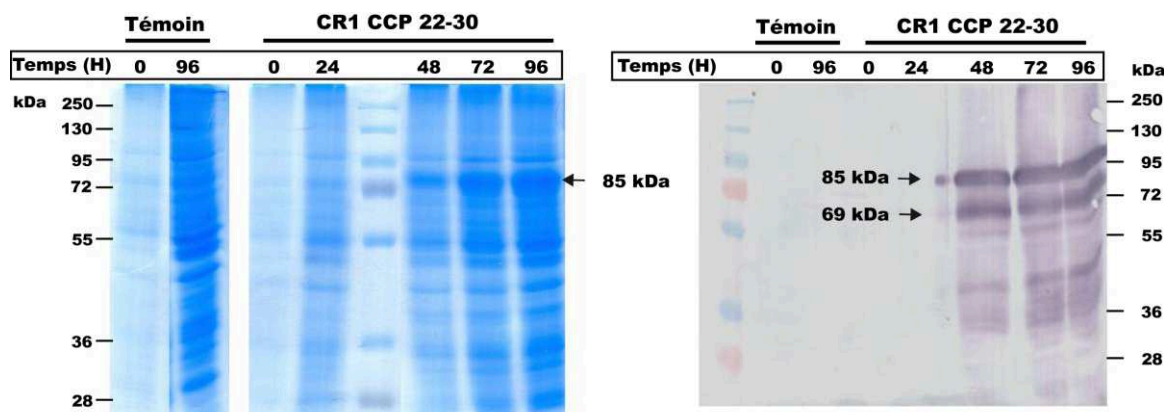


Figure 4.1 : Test d'expression de CR1 CCP 22-30 en cellules High Five™

Analyse en condition réduite sur gel SDS-PAGE 12,5 % (gauche) et en Western Blot (gel SDS PAGE 10%) avec l'anticorps anti-CR1 H-300 (panneau de droite) de 30 µl de surnageant de culture aux temps 0, 24, 48, 72 et 96 H après infection. 30 µl de surnageant de culture témoin (non incubé avec le stock viral) sont également analysés dans les mêmes conditions aux temps 0 et 96 H.

Le fragment CR1 CCP 22-30 a ensuite été produit en plus grande quantité en vue de sa purification. Malgré le respect des conditions opératoires (pH > pI), CR1 CCP 22-30 est faiblement retenu sur la colonne échangeuse d'anions (Q-Sepharose) et est retrouvé en grande majorité dans le perfusat (*figure 4.2 A*). Il est possible que la présence de glycosylations sur la protéine exerce un effet masquant sur les charges exposées, expliquant ainsi sa faible interaction avec la matrice de la colonne. L'analyse en Western Blot révèle également la présence de la seconde forme (bande à 69 kDa, non observée par SDS-PAGE) dans le perfusat. Compte-tenu de la faible proportion de cette bande, comparativement à la bande correspondant au CR1 CCP 22-30 (85 kDa), celle-ci sera considérée comme négligeable dans notre échantillon. Les fractions (5mL) contenant le fragment retenu sur la colonne semblent moins contaminées par la bande à 69 kDa, mais elles ne représentent qu'une faible proportion du fragment purifiable comparativement à la quantité contenue dans le perfusat (500 mL). De plus, elles sont largement contaminées par d'autres protéines ce qui compliquerait les étapes de purification ultérieures.

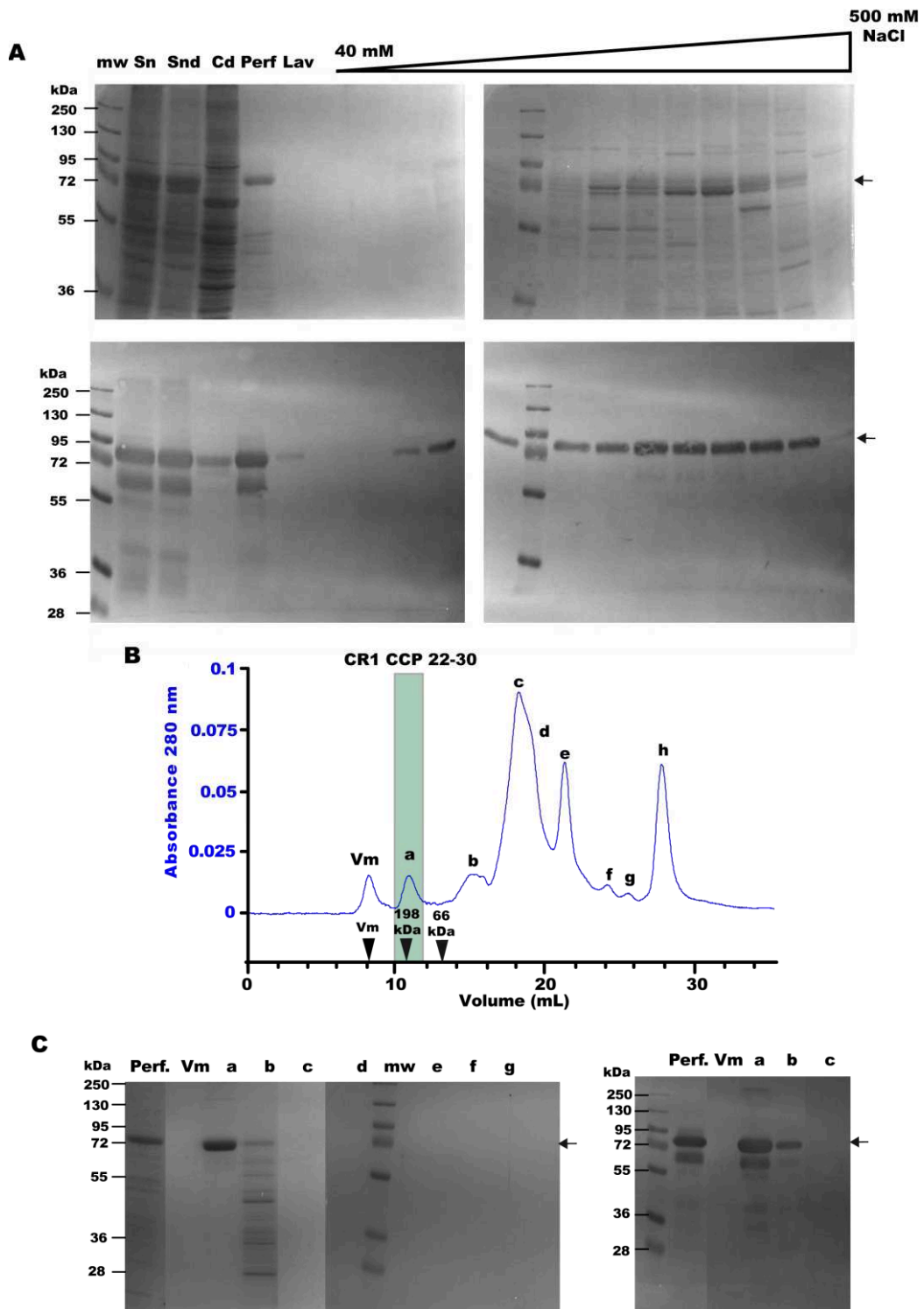


Figure 4.2 : Purification du fragment CR1 CCP 22-30 produit en cellules d'insectes High Five

(A) Analyse en condition réduite par SDS-PAGE (haut) et par Western Blot avec un anticorps dirigé contre CR1 (bas) de l'étape de purification sur Q-Sepharose. Différentes fractions d'élution ont été analysées sur l'ensemble du gradient (40 à 500 mM NaCl). Chaque échantillon analysé correspond à un volume de 300 μ L à l'exception du lavage (450 μ L). (B) Profil d'élution du perfusat issu de Q-Sepharose chargé sur la colonne de chromatographie d'exclusion. Les différents pics obtenus sont annotés de a à h et Vm correspond au volume mort de la colonne. La position des marqueurs utilisés pour la calibration est indiquée. (C) Analyse en condition réduite par SDS-PAGE (gauche) et par Western Blot avec un anticorps dirigé contre CR1 (droite) des fractions obtenues au cours de la purification du perfusat par chromatographie d'exclusion. Sn : Surnageant de culture ; Snd : Surnageant de culture après dialyse ; Cd : Culot après dialyse ; Perf : Perfusat ; Lav : Lavage. La position du fragment CR1 CCP 22-30 est indiquée par la flèche.

La purification par chromatographie d'exclusion du perfusat permet d'éliminer une partie importante des fragments de protéolyse précédemment observés (*figure 4.2 B et C*). Par cette méthode, nous arrivons à purifier avec une pureté supérieure à 95 %, 0,76 mg de CR1 CCP 22-30 par litre de surnageant de culture. Cet échantillon, dont le séquençage N-terminal est en accord avec la séquence attendue pour le fragment sans le peptide signal de la Melittine (Séquence : D-L-H-(C)-K-T-P-E), est par la suite caractérisé par diverses méthodes analytiques afin de s'assurer de son bon repliement.

I.1.2. CR1 CCP 22-30 est une molécule N-glycosylée

La masse moléculaire déterminée par spectrométrie de masse MALDI-TOF est de **70498 ± 70 Da** (*figure 4.3 D*), soit une variation moyenne de + **6679 Da** par rapport à la masse moléculaire théorique (63679 Da) qui est probablement liée à la présence de modifications post-traductionnelles, comme suggéré précédemment. Puisqu'aucune O-glycosylation n'a été identifiée expérimentalement sur CR1 (Lublin et al., 1986) et que l'analyse prédictive semble défavorable à d'autres types de modifications (C-mannosylation, myrostylation, prénylation), cette augmentation de masse est donc probablement liée à la présence d'asparagines (Asn) associées à des oligosaccharides N-liés. Les protéines recombinantes produites en cellules d'insectes High Five présentent des motifs de N-glycosylation assez variés allant de structures High mannose à des structures de type pauci-mannose (GlcNAc₂Man₁₋₃ pouvant porter des fucoses en position α1-3 ou α1-6 du premier GlcNAc) (Rendic et al., 2008). Il devient alors assez difficile de déterminer précisément le nombre de sites N-liés sur la seule base de la différence de masse entre la forme aglycosylée et glycosylée. De plus, ces glycosylations semblent assez hétérogènes puisque l'analyse sur gel SDS-PAGE révèle des bandes assez diffuses et que les pics obtenus en spectrométrie de masse sont un peu élargis (*figure 4.3 D*). Nous pouvons néanmoins essayer d'évaluer le nombre de sites effectivement N-glycosylés en émettant les hypothèses suivantes :

- L'augmentation de masse est uniquement liée à des modifications de type N-glycosylation.
- La structure classique des glycosylations retrouvées dans les protéines produites en cellules d'insectes est de la forme **GlcNAc₂Man₄₋₈**, correspondant à des masses moyennes de 1055-1704 Da (basé sur l'expérience acquise avec les protéines produites dans ce système au sein du laboratoire).

Dans ce cas de figure, le fragment CR1 CCP 22-30 pourrait alors contenir de **4 à 6 sites N-glycosylés** sur les 8 sites prédits (50-75%). Cette donnée est en accord avec ce qui est observé pour la molécule entière, puisque l'analyse de la composition en carbohydrates de CR1 suggère que seulement 14 sites sur les 25 prédits (56%) portent des sucres N-liés (Furtado et al., 2008). Le traitement à la N-glycosydase F (enzyme coupant la structure oligosaccharidique au niveau de l'asparagine) de l'échantillon permet d'enlever seulement 1 à 2 sites glycosylés, comme indiqué par l'analyse par SDS-PAGE et par spectrométrie de masse (*figure 4.3 E*). L'impossibilité d'enlever la totalité des sucres N-liés est en accord avec les observations faites par Lublin et collaborateurs (Lublin et al., 1986) et pourrait suggérer la présence de fucoses associés en position α (1-3) au premier résidu de N-Acetyl-D-glucosamine de l'oligosaccharide N-lié (Maley et al., 1989). La présence de ce fucose inhiberait alors l'action de la N-glycosydase F et est compatible avec la possible présence de structure de type pauci-mannose. Une accessibilité réduite de l'enzyme à certains sites de N-glycosylation pourrait également expliquer cette observation.

I.1.3. Confirmation du bon repliement de la molécule

L'analyse sur gel SDS-PAGE (*figure 4.3 A*) de l'échantillon purifié donne un profil de migration différent en condition réduite (85 kDa) et non réduite (57 kDa). La forte amplitude de migration entre les deux conditions est en accord avec la formation des 18 ponts disulfures contenus dans CR1 CCP 22-30. En chromatographie d'exclusion (*figure 4.2 C*), le fragment est élué à un volume d'élution correspondant à une masse moléculaire expérimentale de 189 kDa, soit 3 fois supérieure à sa masse théorique (63679 Da). Ce comportement était prévisible puisqu'une forme allongée (non globulaire) est attendue pour ce fragment comme observé avec la molécule entière de CR1 (Weisman et al., 1990b). Des observations similaires ont d'ailleurs été rapportées avec des molécules comportant des modules CCP telles que CR2 (Moore et al., 1989) et la C4BP α (Kask et al., 2002). Cet aspect allongé de la molécule CR1 CCP 22-30 est confirmé par l'analyse en microscopie électronique de l'échantillon (*figure 4.3 B*) dans lequel des petits filaments d'environ 25 à 30 nm sont observés. Sachant que la taille moyenne d'un module CCP est de 3,6 nm (Furtado et al., 2008), ces résultats sont en accord avec la taille attendue pour une molécule en contenant 9.

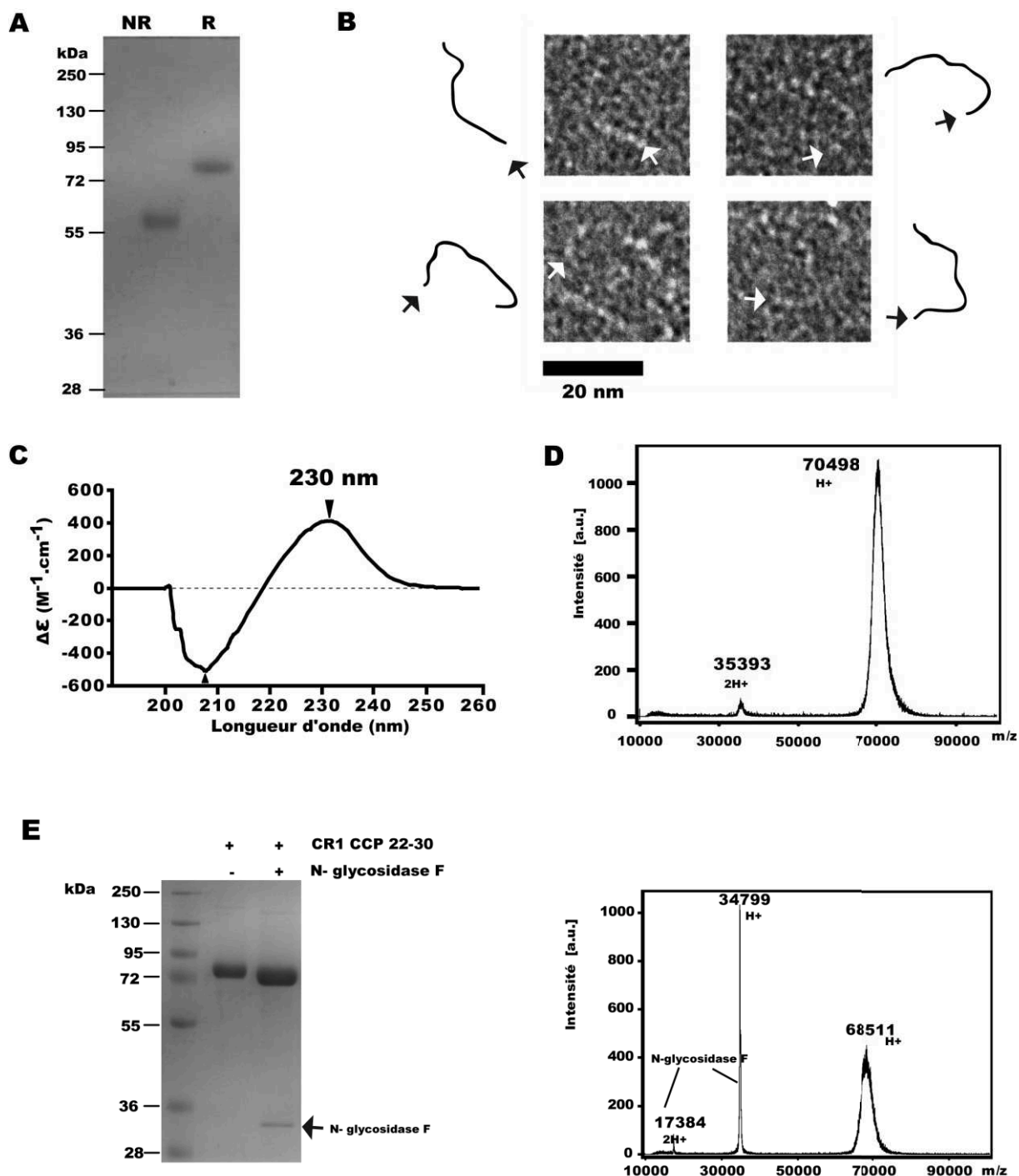


Figure 4.3 : Caractérisation du fragment CR1 CCP 22-30 produit en cellules d'insectes High FiveTM

(A) Analyse en condition réduite (R) et non réduite (NR) par SDS-PAGE 10 % de 4 μg du fragment CR1 CCP 22-30 purifié. (B) Analyse en microscopie électronique par coloration négative (Grossissement X 45000). Les molécules observées sont indiquées par une flèche blanche. Une représentation schématique de la molécule est fournie afin de faciliter la visualisation. (C) Spectre de dichroïsme circulaire dans la région des UV lointains (190 à 260 nm). Les minima et les maxima sont indiqués par des flèches. (D) Spectre de spectrométrie de masse MALDI TOF de la protéine purifiée. (E) Déglycosylation du fragment CR1 CCP 22-30 par la N-glycosidase F. Analyse par SDS PAGE 10% (gauche) et par spectrométrie de masse MALDI TOF (droite) de 5 μg du fragment CR1 CCP 22-30 traité ou non par 0,5 μg de N-glycosidase F.

La confirmation du bon repliement de notre fragment, déjà supposé au vu des précédents résultats, est apportée par le spectre de dichroïsme circulaire (*figure 4.3 C*). Celui-ci présente un pic négatif et un pic positif, respectivement centrés sur **207 et 230 nm**. Ce spectre est en accord avec celui d'une protéine contenant des modules CCP, comme observé avec la C4BP α (Kask et al., 2004), CR2 (Moore et al., 1989) et les modules CCP 15-17 de CR1 (Kirkitaдзе et al., 1999). La présence de la bande positive dans la région 220-240 nm pourrait être expliquée par la contribution de résidus aromatiques et des ponts disulfures comme observé chez la fibronectine qui présente le même type de spectre (Khan et al., 1989). Elle serait associée plus particulièrement aux tryptophanes présents dans les feuillets β (Freskgard et al., 1994).

I.1.4. Optimisation de la purification (CR1 CCP 22-30 His)

L'ajout de l'étiquette poly-histidine permet de purifier rapidement une protéine d'intérêt à partir d'un extrait brut tel qu'un surnageant de culture. Dans notre cas de figure (ajout de l'étiquette poly-histidine en position C-terminale), cette étape de chromatographie nous a permis d'optimiser la production du fragment CR1 CCP 22-30. Dans nos conditions expérimentales, la protéine est correctement retenue par la colonne d'affinité et est complètement éluée en présence d'imidazole 150 mM (*figure 4.4 A*). L'analyse par SDS-PAGE et Western Blot des fractions correspondant au pic élué nous confirme la présence d'une bande vers 85 kDa correspondant au fragment CR1 CCP 22-30 attendu (*figure 4.4 B*), comme déterminé par séquençage N-terminal (séquence : D-L-H-(C)-K). La masse moléculaire expérimentale obtenue par MALDI-TOF est de **71156 \pm 71 Da**. Celle-ci est en accord avec la masse moléculaire de CR1 CCP 22-30 déterminée précédemment (70498 \pm 70) et assumant la présence de l'étiquette poly-histidine (+ 822 Da). La pureté atteinte à ce stade est supérieure à celle de l'échantillon précédemment purifié puisqu'aucun fragment de protéolyse n'est observé. Une étape de chromatographie d'exclusion n'a donc pas été nécessaire. Sur l'ensemble des lots purifiés par cette méthode, nous obtenons des rendements de l'ordre de **2,6 à 4 mg** de fragment CR1 CCP 22-30 par litre de surnageant de culture. Ces rendements sont 4–5 fois supérieurs à ceux observés avec la précédente technique de purification.

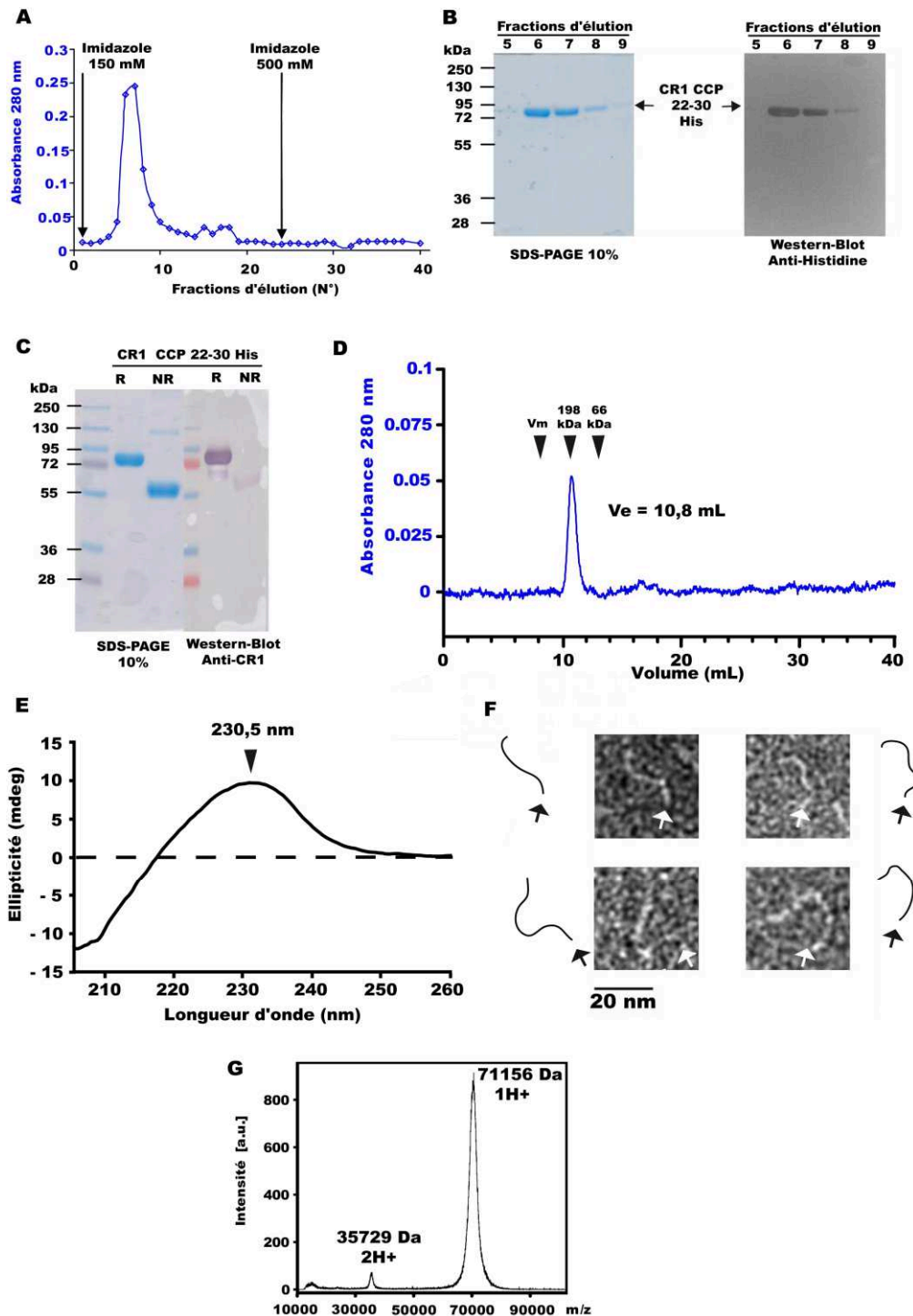


Figure 4.4 : Caractérisation du fragment CR1 CCP 22-30 (avec étiquette poly-histidine) produit en cellules d'insectes High Five™

(A) Profil d'élution de CR1 CCP 22-30 sur la colonne d'affinité Hisselect. Les deux étapes d'élution par l'imidazole sont indiquées par des flèches. (B) Analyse en condition réduite par SDS-PAGE 10 % et Western Blot (anti-histidine) des fractions d'élutions. (C) Analyse en condition réduite (R) et non réduite (NR) par SDS-PAGE 10 % et Western Blot (anti-CR1 H-300) de 4 µg du fragment CR1 CCP 22-30 purifié. (D) Analyse par chromatographie d'exclusion sur colonne Superose 12 10/300 GL de 30 µg de CR1 CCP 22-30 purifié. (E) Spectre de dichroïsme circulaire dans la région des UV lointains (205 à 260 nm). Les minima et les maxima sont indiqués par des flèches. (F) Analyse en microscopie électronique par coloration négative (grossissement X 45000). Les molécules observées sont indiquées par une flèche blanche. Une représentation schématique de la molécule est fournie afin de faciliter la visualisation. (G) Spectre de spectrométrie de masse MALDI TOF de la protéine purifiée.

Afin d'évaluer l'impact de l'étiquette poly-histidine sur la conformation du fragment CR1 CCP 22-30, l'échantillon est soumis à la même caractérisation que précédemment. Les résultats obtenus (*figure 4.4 C, D, E, F et G*) sont en accord avec les données récoltées pour le fragment CR1 CCP 22-30 sans étiquette. La présence de ces 6 histidines supplémentaires en position C-terminale ne semble donc pas perturber la structure ou le comportement du fragment produit. Celui-ci a donc été exclusivement produit de cette façon pour l'ensemble du projet. Notons enfin que la forme à 69 kDa précédemment observée semble ici très minoritaire (*figure 4.4 C*).

I.2. Production et caractérisation de la forme recombinante de CR1 CCP 22-30 produite en cellules de mammifères HEK 293-F (CR1 CCP 22-30 HEK)

L'utilisation de cellules d'insectes High Five conduit à la synthèse de protéines portant des motifs oligosaccharidiques riches en résidus de type mannose et ne présentant pas d'acides sialiques terminaux, à l'inverse des glycosylations retrouvées sur les protéines humaines. Afin de confirmer les observations réalisées avec le fragment produit en cellules High FiveTM, nous avons souhaité « humaniser » les glycosylations de la protéine recombinante en exprimant notre construction en cellules HEK 293-F. Cette étape a nécessité de cloner la séquence codante de notre fragment dans un plasmide adapté, permettant également de la placer en phase avec le peptide signal endogène de CR1. Les étapes de biologie moléculaire conduisant à l'obtention de ce plasmide sont décrites dans le chapitre *matériel et méthodes*. L'expression du fragment est analysée sur gel SDS-PAGE et par Western Blot (*figure 4.5 A*). L'expression de CR1 CCP 22-30 est détectée 72 H après transfection et le fragment migre à une masse moléculaire supérieure à celle observée lors de sa production en cellules High FiveTM (vers 91 kDa). Cette différence de migration peut s'expliquer par la nature différente des glycosylations et a déjà été observée au laboratoire sur d'autres projets (communication personnelle). De nombreux contaminants étant présents et ce fragment n'étant pas doté d'une étiquette poly-histidine, celui-ci est purifié sur une colonne échangeuse d'anions (*figure 4.5 B*). Comme précédemment, CR1 CCP 22-30 n'est que très faiblement retenu sur ce type de colonne et est majoritairement retrouvé dans le perfusat. L'échantillon final (séquençage N-terminal : G-H-(C)-H-T-P, masse expérimentale par MALDI-TOF : **69118 ± 69 Da**, pureté = 90%) est légèrement contaminé par des fragments de plus basse masse moléculaire (*figure 4.5 D*), ce qui est confirmé par l'analyse sur colonne de chromatographie d'exclusion qui nous donne également une masse moléculaire apparente de 219 kDa (*figure 4.5 E*)

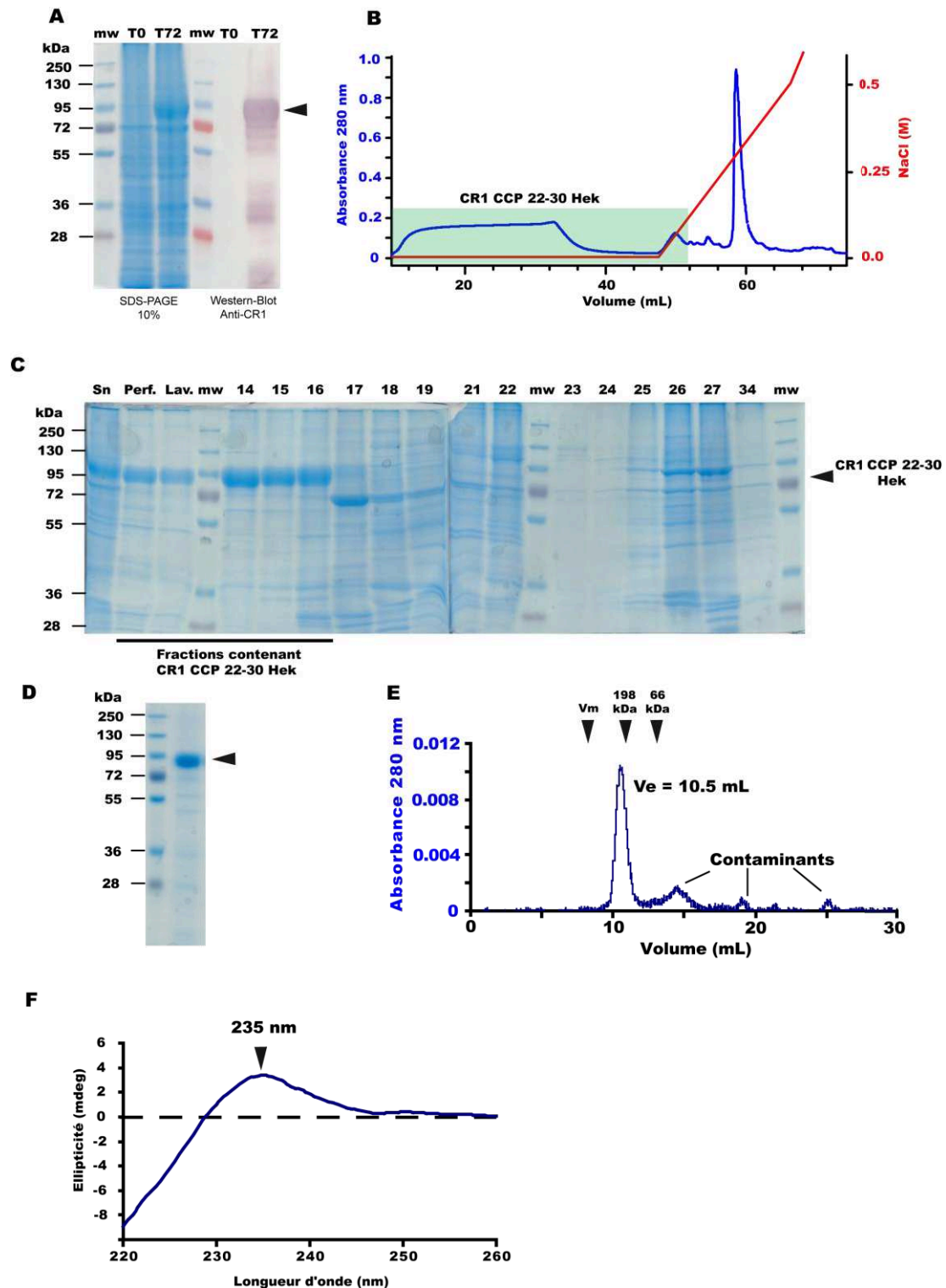


Figure 4.5 : Purification et caractérisation de CR1 CCP 22-30 produit en cellules HEK 293-F

(A) Analyse sur gel SDS-PAGE 10% et par Western Blot (anti-CR1) du surnageant de culture (500 μ l) de CCP 22-30 produit en cellules HEK 293-F aux temps 0 et 72H. (B) Profil d'élution de CR1 CCP 22-30 chargé sur la colonne échangeuse d'anions MonoQ 5/50GL. Les fractions contenant la protéine sont indiquées par le rectangle vert clair. (C) Analyse en condition réduite par SDS-PAGE 10 % des fractions d'élutions. mw : marqueur de poids moléculaire ; Sn : Surnageant de culture (250 μ l) ; Perf. : Perfusé (500 μ l) ; Lav. : Lavage (500 μ l) ; 14 à 34 : Fractions d'élution (250 μ l sauf pour 23-24 : 16 μ L et 25 : 100 μ L). (D) Analyse sur gel SDS-PAGE en condition réductrice de 4 μ g de CR1 CCP 22-30 HEK. (E) Analyse par chromatographie d'exclusion de 60 μ g de CR1 CCP 22-30 Hek purifié. (F) Spectre de dichroïsme circulaire dans la région des UV lointains (220 à 260 nm). Le maximum est indiqué par une flèche.

L'analyse en dichroïsme circulaire (*figure 4.5 F*) donne un spectre présentant les mêmes caractéristiques que précédemment mais avec une intensité plus faible pour le maximum (235 nm) comparativement au minimum. Le fragment produit en cellules de mammifères présente donc des caractéristiques similaires à celui produit en cellules d'insectes et pourra donc être utilisé comme référence. De plus, les rendements obtenus sont largement supérieurs à ceux obtenus en cellules High FiveTM puisque 300 µg sont purifiés à partir de 30 mL de surnageant, soit environ 10 mg par litre de surnageant de culture. Une optimisation avec l'ajout d'une étiquette poly-histidine en position C-terminale a également été réalisée pour améliorer la pureté de l'échantillon et faciliter l'étape de purification. Celle-ci n'a pas été décrite car elle n'était pas encore finalisée au moment d'écrire ce manuscrit.

II. CR1 CCP 22-30 : Site potentiel d'interaction pour les collagènes de défense

L'interaction entre CR1 et les collagènes de défense a été peu étudiée par jusqu'à présent et seules quelques publications traitent du sujet. Une interaction avec C1q (Klickstein et al., 1997; Tas et al., 1999) et avec la MBL (Ghiran et al., 2000) a ainsi pu être mise en évidence, localisant potentiellement le site d'interaction au niveau des CCP 22-30 de CR1. Cependant, peu d'informations mettant en avant la contribution de ce fragment dans l'interaction sont actuellement disponibles, hormis une étude plus récente montrant l'interaction de C1q avec une protéine recombinante contenant les modules CCP 15-25 (Tetteh-Quarcoo et al., 2012). A ce titre, les auteurs indiquent que les CCP 15-17 pourraient contenir le site majoritaire de fixation de C1q, mais n'excluent pas la présence d'un site dans les modules CCP 26 à 28. Ces résultats s'opposent aux premières observations de Klickstein et collaborateurs et nécessitent des approfondissements. La production d'un fragment recombinant contenant les modules CCP 22-30 nous fournit donc un outil d'étude idéal pour réévaluer sa possible interaction avec C1q et la MBL, et ainsi affirmer ou infirmer les précédentes observations. Il nous permettra également de tester la fixation d'autres collagènes de défense.

II.1. C1q et la MBL, ligands du fragment CR1 CCP 22-30 ?

Afin de vérifier si C1q et la MBL sont capables d'interagir avec les modules CCP 22 à 30 de CR1, leur fixation au fragment CR1 CCP 22-30 a tout d'abord été évaluée par SPR en comparaison avec la molécule de CR1 entière (*figure 4.6 A*). Selon Tas et collaborateurs, un seul site d'interaction avec les collagènes de défense serait présent sur le récepteur CR1.

Dans le respect de cette hypothèse, nous avons immobilisé CR1 et son fragment CR1 CCP 22-30 avec une quantité équimolaire comme décrit dans le chapitre *matériel et méthodes*.

Les sensorgrammes de la *figure 4.6* montrent clairement que C1q et la MBL se fixent spécifiquement à CR1 et à CR1 CCP 22-30. Dans les deux cas, la phase d'association de C1q présente un aspect sigmoïdal, suggérant un modèle d'association complexe. Cet aspect est plus ou moins marqué en fonction des essais réalisés. De plus, le complexe formé se dissocie très lentement suggérant une forte stabilité et/ou un phénomène d'avidité. La fixation de la MBL avec CR1 et CR1 CCP 22-30 résulte en un signal plus simple à analyser car elle s'associe très rapidement en présentant un aspect sigmoïdal moins marqué que dans le cas de C1q. La dissociation est ici plus marquée mais reste lente, probablement pour les mêmes raisons que celles avancées pour C1q. Enfin, il est peu probable que la fixation soit liée à la reconnaissance par le domaine C-lectine de la MBL des résidus mannoses présents sur le fragment produit (reconnaissance strictement dépendante du calcium), les injections étant réalisées en absence de calcium et en présence d'EDTA.

C1q se fixe de façon équivalente sur CR1 et son fragment, mais ce n'est pas le cas de la MBL qui interagit beaucoup plus fortement avec CR1 CCP 22-30. Comme l'implication de l'activité lectine de la MBL est à exclure (injections en tampon HBS-EP), il est alors possible que ces deux collagènes de défense n'interagissent pas de la même manière avec CR1. Dans le cas de la MBL, la présence du reste de la molécule (module CCP 1-21) pourrait limiter la fixation alors que dans le cas de C1q, celle-ci n'aurait pas d'importance. La fixation plus importante observée avec C1q par rapport à la MBL sur CR1 CCP 22-30 (environ 2 fois supérieure) et sur CR1 (environ 3-4 fois supérieure), suggère quant à elle soit une meilleure affinité de C1q, soit la présence d'un plus grand nombre de sites d'interaction sur C1q (*figure 4.6 A et B*).

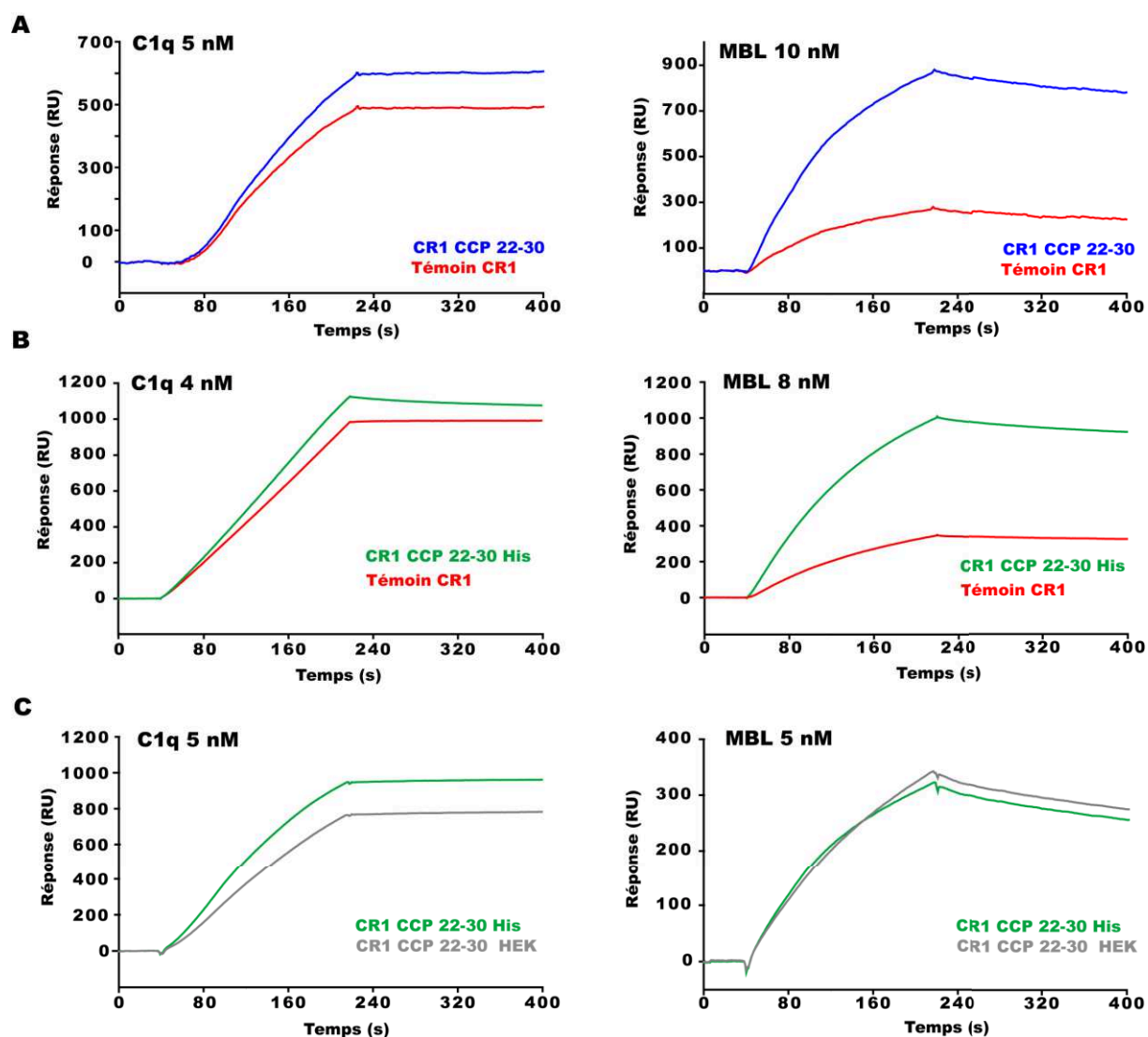


Figure 4.6 : Interaction de C1q et de la MBL avec CR1 et CR1 CCP 22-30

(A) C1q (5 nM) et la MBL recombinante (10 nM) ont été injectés en tampon de course HBS-EP, respectivement sur CR1 et CR1 CCP 22-30 sans étiquette poly-histidine. (B) C1q (4 nM) et la MBL recombinante (8 nM) ont été injectés sur CR1 et CR1 CCP 22-30 avec étiquette poly-histidine, respectivement en tampon de course HBS-EP et TEA. (C) C1q (5 nM) et la MBL recombinante (5 nM) ont été injectés en tampon de course HBS-EP sur CR1 CCP 22-30 produit en cellules High FiveTM (3353 RU) et sur CR1 CCP 22-30 produit en cellules HEK 293-F(4040 RU). Dans chaque cas, C1q ou la MBL ont été injectés sur une même surface.

La présence de l'étiquette poly-histidine (*figure 4.6 B*) tout comme la présence de glycosylations complexes (*figure 4.6 C*) n'ont pas d'effet significatif sur la fixation de C1q et de la MBL au fragment CR1 CCP 22-30. Enfin, le fait que la MBL se fixe de la même manière sur le fragment produit en cellules d'insectes et en cellules de mammifères est un argument supplémentaire nous permettant d'exclure l'implication de l'activité lectine en absence de calcium. La majeure partie des résultats présentés ci-après (sauf indications contraires) pour l'interaction avec CR1 CCP 22-30 a été obtenu avec la construction contenant l'étiquette poly-histidine et produit en cellules d'insectes High FiveTM (CR1 CCP 22-30 HF).

Afin de confronter nos observations aux données disponibles dans la littérature, nous avons approfondi nos résultats en déterminant la constante apparente d'équilibre de dissociation ou K_D pour chaque couple. Des concentrations croissantes de MBL ou de C1q ont ainsi été injectées soit sur CR1 soit sur CR1 CCP 22-30 (*figure 4.7 A et B*). Les résultats obtenus sont indiqués dans le *tableau 4.1*. C1q et la MBL présentent des valeurs de constantes de vitesse d'association (k_a) et de dissociation (k_d) comparables pour l'interaction avec CR1 résultant en des valeurs de K_D apparent de l'ordre du nano-molaire, avec **0,49 nM** pour l'interaction C1q-CR1 et **0,76 nM** pour l'interaction MBL-CR1. Ces valeurs sont légèrement plus faibles que les valeurs de K_D rapportées dans la littérature (3,43 nM pour C1q et 5,2 nM pour la MBL), notamment à cause de k_d plus faibles liées à une dissociation plus lente. Néanmoins, celles-ci restent cohérentes et confirment les résultats publiés par Klickstein et collaborateurs. Pour le fragment CR1 CCP 22-30, nous obtenons des valeurs très similaires à celles obtenues pour CR1 avec un K_D apparent de **0,21 nM** pour C1q et de **0,37 nM** pour la MBL. Les valeurs de k_a et k_d sont elles aussi cohérentes avec celles obtenues pour la molécule entière. CR1 et CR1 22-30 présentent donc une affinité du même ordre à la fois pour la MBL et pour C1q.

L'aspect sigmoïdal de la phase d'association de C1q et sa forte fixation à CR1 et CR1 CCP 22-30 rendent cependant difficile l'analyse des données obtenues par SPR (erreur et χ^2 plus importants), notamment pour la détermination des paramètres cinétiques. En effet, les modèles d'interaction à notre disposition ne sont pas totalement adaptés à ce cas de figure. Afin de conforter les premiers résultats obtenus, le K_D apparent de l'interaction de C1q avec CR1 et CR1 CCP 22-30 a également été déterminé après la mise au point d'un test ELISA (*figure 4.8 A*). Cette constante peut être assimilée au K_D déterminé par SPR puisqu'elle représente dans les deux cas l'affinité d'une protéine pour son partenaire immobilisé.

Ligand	CR1				CR1 CCP 22-30			
	k_a	k_d	K_D	n	k_a	k_d	K_D	n
	$M^{-1}.s^{-1} (x 10^5)$	$s^{-1} (x 10^{-4})$	nM		$M^{-1}.s^{-1} (x 10^5)$	$s^{-1} (x 10^{-4})$	nM	
C1q	$13,03 \pm 2,17$	$6,60 \pm 1,47$	$0,49 \pm 0,04$	3	$20,55 \pm 7,96$	$4,95 \pm 3,07$	$0,21 \pm 0,09$	2
MBL	$7,15 \pm 0,91$	$5,19 \pm 0,54$	$0,76 \pm 0,07$	8	$13,53 \pm 3,68$	$4,93 \pm 1,14$	$0,37 \pm 0,01$	3

Tableau 4.1 : Détermination des constantes cinétiques pour la liaison de C1q et de la MBL sur CR1 et CR1 CCP 22-30

Les constantes cinétiques ont été déterminées à partir d'expériences de cinétique SPR dans lesquelles différentes concentrations de ligands ont été injectées sur CR1 ou CR1 CCP 22-30 immobilisé (figure 4.7). Les données ont été analysées en utilisant un modèle de liaison Langmuir 1 : 1 à l'aide du logiciel BIAevaluation 3.1. La constante de dissociation apparente (K_D) correspond au ratio entre les constantes de vitesse de dissociation et d'association (k_d/k_a). Les erreurs standards sont données pour chaque valeur ainsi que le nombre d'essais (n) utilisés pour le calcul.

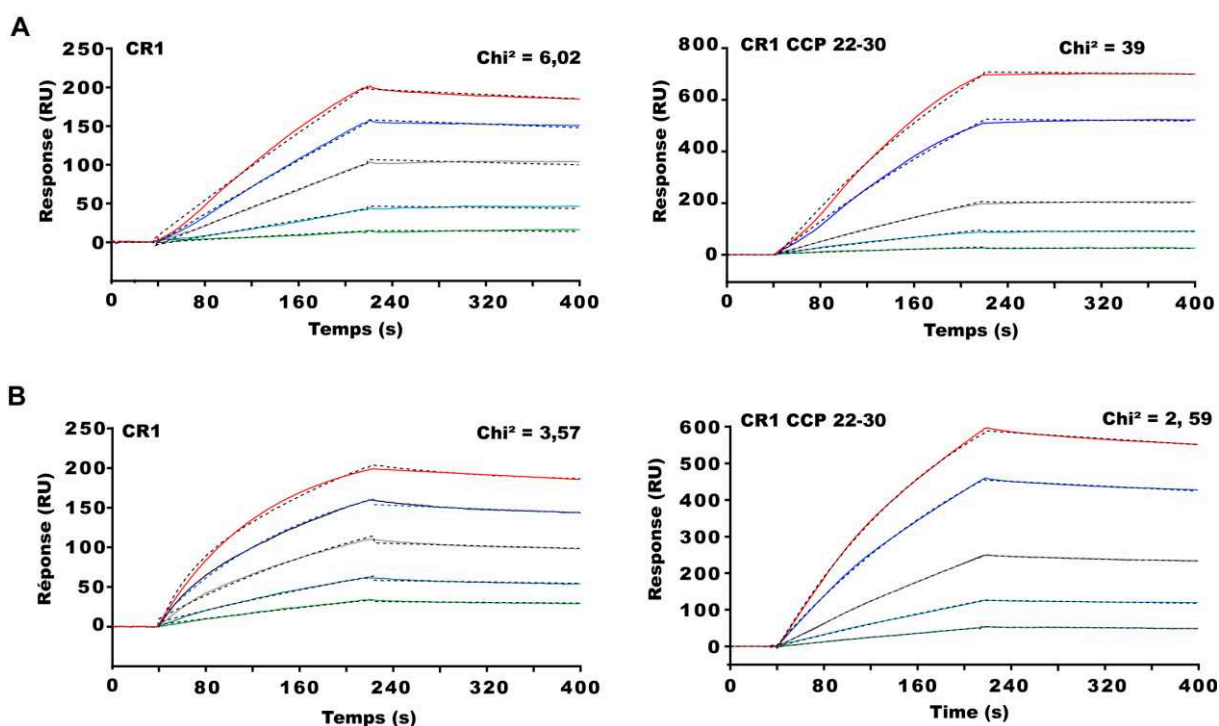


Figure 4.7 : Détermination par SPR des cinétiques de fixation de C1q et de la MBL sur CR1 et CR1 CCP 22-30

(A) C1q a été injecté sur CR1 (9500 RU) en tampon TEA (0,25, 0,5, 1, 1,5 et 2 nM) et sur CR1 CCP 22-30 (1500 RU) en tampon HBS-EP (0,25, 0,5, 1, 2 et 3 nM). (B) La MBL a été injectée en tampon HBS-EP (1,5, 3, 6, 12 et 18 nM) sur CR1 (14700 RU) et sur CR1 CCP 22-30 (5200 RU) (0,5, 1, 2, 4 et 6 nM). Les concentrations sont données du haut vers le bas de la plus (rouge) à la moins (vert) concentrée. Les sensorgrammes sont analysés à l'aide d'un modèle Langmuir 1 : 1 (courbe en pointillé) avec des Rmax locaux et sont représentatifs de plusieurs expériences. Les Chi² des courbes modèles utilisées pour l'analyse sont donnés en haut à droite de chaque courbe.

Ce test nous permet d'observer de nouveau la fixation de C1q sur CR1 et sur CR1 CCP 22-30. Les concentrations en C1q utilisées nous permettent d'atteindre la saturation et le signal dépend de la concentration en CR1 ou CR1 CCP 22-30 immobilisée, confirmant la spécificité de l'interaction. Par cette méthode, nous obtenons également des constantes de dissociation de l'ordre du nano molaire avec respectivement **0,95 nM** pour l'interaction C1q-CR1 et **8,9 nM** pour l'interaction C1q-CR1 CCP 22-30 (*figure 4.8 B*).

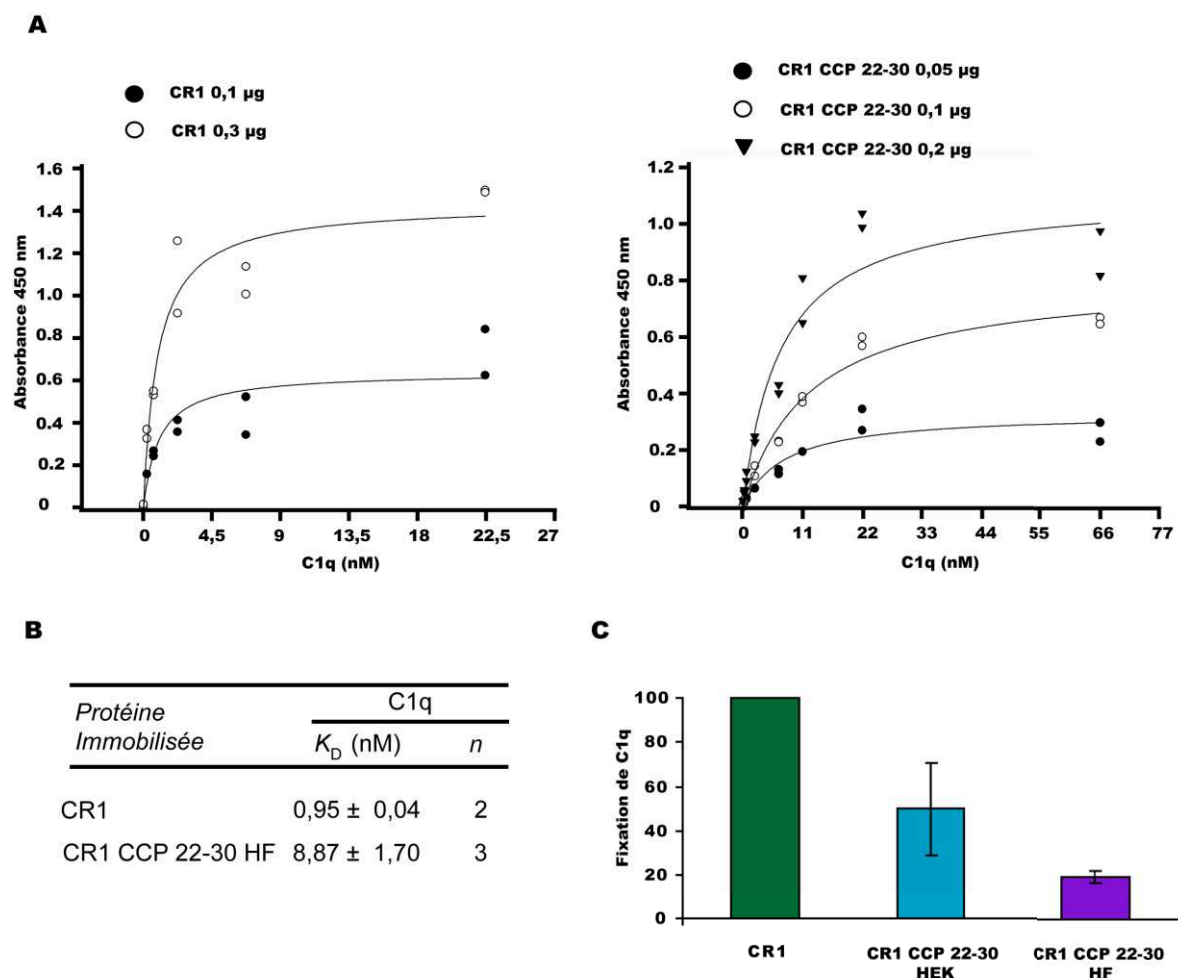


Figure 4.8 : Détermination de la constante d'affinité apparente (K_D) de C1q pour CR1 et CR1 CCP 22-30

(A) CR1 et CR1 CCP 22-30 HF ont été immobilisés sur une plaque ELISA Maxisorp à respectivement 0,1 et 0,3 μg et 0,05, 0,1 et 0,2 μg . Différentes concentrations de C1q ont ensuite été ajoutées sur les protéines immobilisées puis la fixation de C1q a été analysée, comme décrit dans le chapitre *matériel et méthodes*. La constante d'affinité est déterminée pour chaque quantité de CR1 ou CR1 CCP 22-30 HF immobilisée. (B) Tableau récapitulatif des valeurs de K_D déterminées pour la fixation de C1q sur CR1 et CR1 CCP 22-30 HF. (C) C1q (10 $\mu\text{g/mL}$) a été ajouté sur une quantité équimolaire (3,4 picomoles) de CR1, CR1 CCP 22-30 HF ou CR1 CCP 22-30 HEK produit en cellules 293-F. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de fixation par rapport à la fixation de C1q sur CR1 (100%) et sont calculées à partir de 4 essais.

Alors que nous obtenions des valeurs semblables par SPR, nous notons que l'affinité de C1q pour le fragment semble moins importante que pour la molécule entière, la saturation étant atteinte pour des concentrations de C1q plus élevées. De plus, à quantité équimolaire immobilisée, nous avons constaté qu'une même quantité de C1q se fixait d'avantage sur CR1 que sur le fragment CR1 CCP 22-30, que l'expression soit réalisée en cellules d'insectes (HF) ou de mammifères (HEK) (*figure 4.8 C*). Des résultats de tests ELISA publiés récemment avec le fragment CR1 CCP 15-25 semblent également aller dans le même sens que nos observations (Tetteh-Quarcoo et al., 2012). Ce résultat s'oppose cependant aux observations faites par SPR dans lesquelles la fixation sur CR1 et CR1 CCP 22-30 ainsi que les constantes associées étaient similaires. Il est cependant difficile de comparer ces deux méthodes puisque les conditions expérimentales utilisées et la sensibilité sont différentes. De plus, la technique d'immobilisation que nous avons utilisée en SPR implique la formation de liaisons covalentes, alors que l'ELISA met en jeu des phénomènes d'absorption, résultant probablement en des orientations de molécules très différentes entre les deux supports. Ce test ELISA nous permet néanmoins de confirmer que C1q se fixe bien sur les modules CCP 22-30 de CR1 et que l'affinité de cette interaction est de l'ordre du nano molaire, comme celle observée par SPR.

Les expériences décrites ci-dessus nous ont permis de vérifier que CR1 était bien capable d'interagir avec C1q et la MBL. Nous avons démontré pour la première fois à l'aide d'un fragment recombinant purifié que l'interaction prenait place au niveau des CCP 22-30 avec des affinités comparables à celles observées pour la molécule entière, confirmant ainsi l'hypothèse émise par Klickstein et collaborateurs. Nous avons également montré que le fragment produit en cellules d'insectes High FiveTM, avec ou sans étiquette poly-histidine, se comporte comme celui produit en cellules de mammifères, validant par ce fait notre modèle d'étude.

La famille des collagènes de défense n'étant pas limitée à C1q et à la MBL, nous avons souhaité généraliser nos observations en évaluant la possible fixation d'autres représentants de cette famille. Nous nous sommes donc intéressés au cas des ficolines, derniers membres en date de la famille des collagènes de défense activant le complément.

II.2. Les ficolines, nouveaux ligands de CR1

La découverte des ficolines et de leur rôle dans la voie lectine du complément est assez récente (Matsushita et al., 2001) et seules deux protéines ont été identifiées à ce jour comme possibles récepteurs des ficolines : CD91 (Duus et al., 2010b) et la calréticuline (Kuraya et al., 2005) (Honore et al., 2007; Lacroix et al., 2009). Les ficolines possédant une structure et des fonctions proches de celles de la MBL, nous nous sommes interrogés sur leur possible interaction avec le récepteur CR1/CD35, plus spécifiquement au niveau de ses modules CCP 22-30. La disponibilité au sein du laboratoire des ficolines L, H et M nous a permis de tester par SPR leur interaction avec nos constructions.

Les trois ficolines injectées se fixent toutes sur CR1 et sur le fragment CR1 CCP 22-30 (*figure 4.9*). Les sensorgrammes obtenus (association et dissociation) sont très semblables à ceux observés précédemment avec la MBL. Ici aussi, la dissociation est très lente et suggère un comportement identique aux autres collagènes de défense testés, c'est à dire la formation d'un complexe stable et/ou la présence de phénomène d'avidité. La reconnaissance calcium-dépendante de certains motifs oligosaccharidiques par les ficolines, notamment celle des acides sialiques par le domaine fibrinogène de la ficoline M, n'est pas impliquée dans l'interaction observée du fait de la présence d'EDTA, suggérant que le mécanisme de fixation des ficolines sur CR1 ne met pas en jeu leurs domaines fibrinogènes (tout comme pour le domaine C-Lectine de la MBL). Concernant les niveaux d'interaction obtenus, ceux-ci dépendent fortement de la ficoline injectée et de la protéine immobilisée. Ainsi, la ficoline H interagit le plus faiblement sur CR1 et son fragment CR1 CCP 22-30 malgré une concentration injectée 3 fois supérieure à celle des autres collagènes de défense. Sur CR1, la ficoline M et la ficoline L se fixent à des niveaux proches tandis que sur CR1 CCP 22-30, c'est la ficoline M qui interagit le plus fortement (environ 2 fois plus que la ficoline L). Notons également que les ficolines H et M se fixent de façon plus importante sur le fragment comme la MBL, alors que la ficoline L interagit de manière identique sur les deux protéines immobilisées comme observé pour C1q.

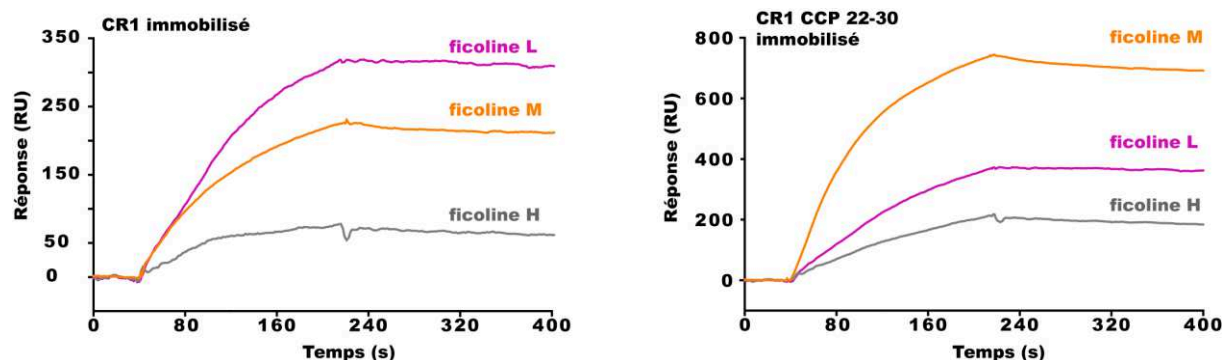


Figure 4.9 : Interaction des ficolines L, H et M avec CR1 et CR1 CCP 22-30

La **ficoline L** (10 nM), la **ficoline M** (10 nM) et la **ficoline H** (30 nM) ont été injectés en tampon de course HBS-EP, respectivement sur CR1 (13732 RU) et CR1 CCP 22-30 sans étiquette poly-histidine (5737 RU). Dans chaque cas, les ficolines ont été injectés sur une même surface de Biacore.

La régénération de la piste fixant la ficoline M étant assez délicate, la ficoline H n'interagissant que très faiblement par rapport aux autres ficolines et la disponibilité en échantillon étant limitée, nous avons concentré nos efforts sur l'étude de l'interaction avec la ficoline L disponible en plus grande quantité (*figure 4.10*)

Nous avons premièrement vérifié que la présence de glycosylations complexes ne modifiait pas l'interaction entre la ficoline L et le fragment CR1 CCP 22-30, puis nous avons déterminé les paramètres cinétiques de cette interaction de la même manière que pour C1q et la MBL. Les valeurs de k_a et k_d obtenues sont très similaires à celles déterminées pour la MBL et résultent en des valeurs de K_D apparent de l'ordre du nano molaire, avec respectivement **0,92 nM** pour l'interaction avec CR1 et **0,63 nM** pour l'interaction avec CR1 CCP 22-30 (*tableau 4.1*). La ficoline L fixe donc avec une même affinité le fragment et la molécule entière, suggérant également la présence d'un seul site de fixation au niveau des modules CCP 22-30 comme pour C1q et la MBL.

Il s'agit ici de la première mise en évidence de l'interaction des ficolines avec CR1. Tout comme pour la MBL et C1q, les modules CCP 22-30 de CR1 sont également capables de fixer les ficolines, et notamment la ficoline L. CR1/CD35 serait donc un récepteur multifonctionnel, capable de fixer à la fois les opsonines C3b et C4b, mais également les collagènes de défense activant le complément.

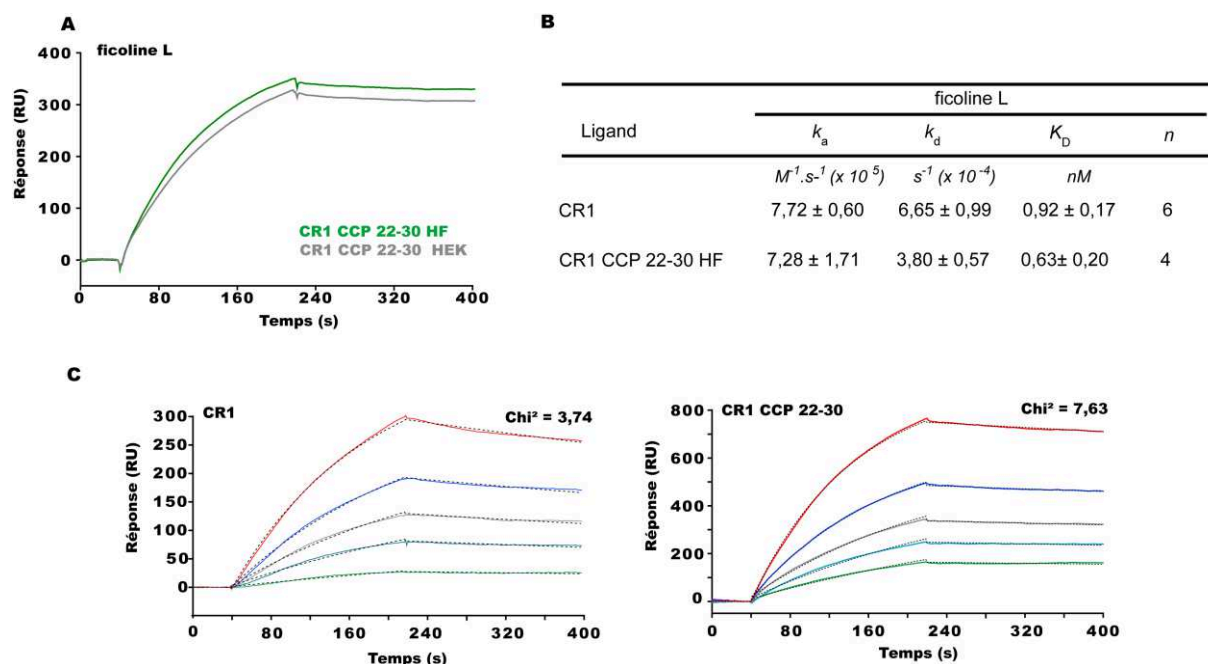


Figure 4.10 : Caractérisation de la fixation de la ficoline L sur CR1 et CR1 CCP 22-30

(A) La ficoline L (5 nM) a été injectée en tampon de course HBS-EP sur CR1 CCP 22-30 HF produit en cellules High FiveTM (3353 RU) et sur CR1 CCP 22-30 HEK produit en cellules 293-F (4040 RU). (B) Tableau récapitulatif des paramètres cinétiques (k_a , k_d et K_D) déterminés pour la ficoline L. Ces valeurs ont été calculées de la même manière que pour C1q et la MBL (Tableau 4.1). (C) La ficoline L a été injectée en tampon HBS-EP (2, 4, 6, 8 et 12 nM) sur CR1 (14700 RU) et en tampon HBS-P (2, 4, 6, 8, 12 et 16 nM) sur CR1 CCP 22-30 HF (2500 RU). Les concentrations sont données du haut vers le bas de la plus (rouge) à la moins (Vert) concentrée. Les sensorgrammes sont analysés à l'aide d'un modèle Langmuir 1 : 1 (courbe en pointillé) avec des Rmax locaux et sont représentatifs de plusieurs expériences. Les Chi² des courbes modèles utilisées pour l'analyse sont donnés en haut à droite de chaque courbe.

II.3. Influence du tampon sur la fixation des collagènes de défense

D'après la littérature, l'interaction de CR1 avec C1q et la MBL est décrite comme étant très sensible à la présence de sel. Dans le cas de la MBL, un effet positif sur la fixation est observé en présence de calcium (Ghiran et al., 2000). Afin de vérifier si nous observons le même type de comportement avec le fragment CR1 CCP 22-30 et les 3 collagènes de défense C1q, MBL et ficoline L, différentes conditions de tampon ont été évaluées par SPR (figure 4.11).

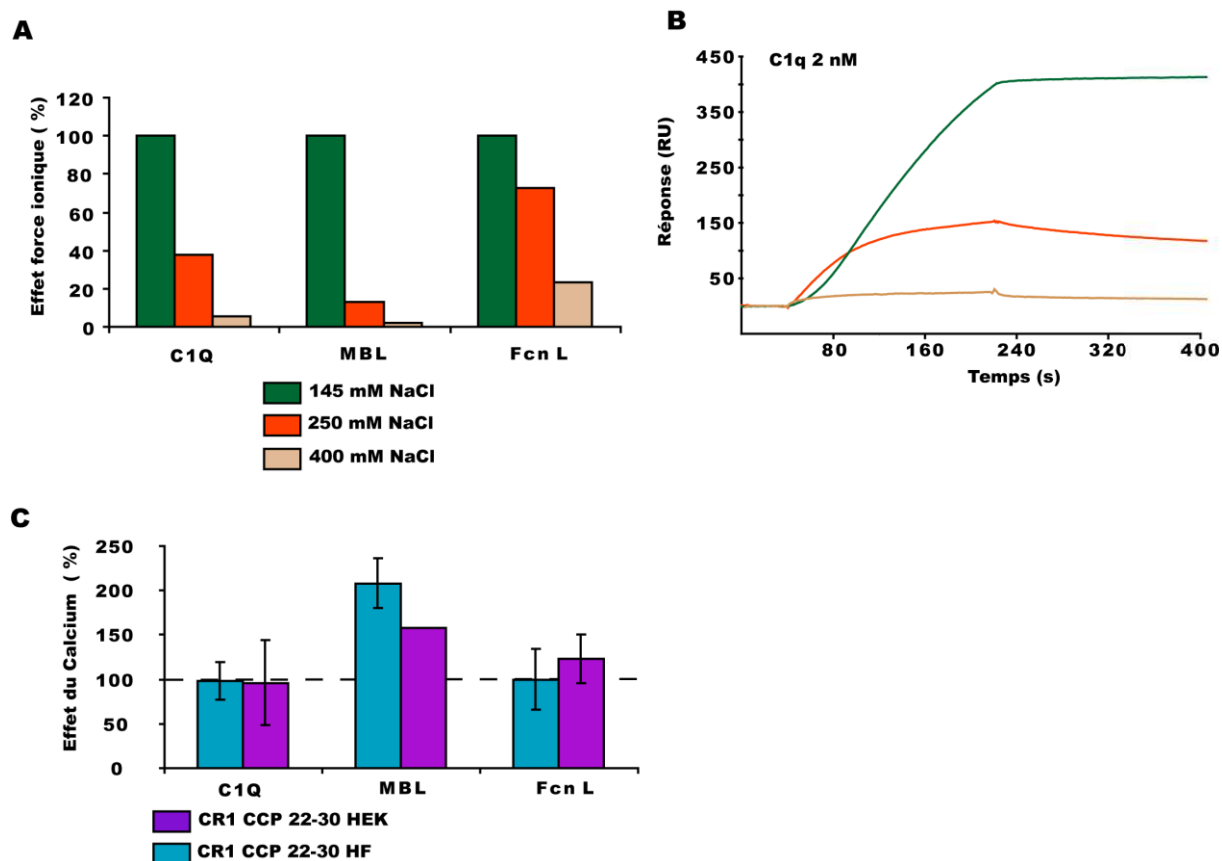


Figure 4.11 : Influence de la composition du tampon sur la fixation de C1q, MBL et ficoline L à CR1 CCP 22-30

(A) Evaluation de la fixation de C1q (2 nM), MBL (10 nM) et ficoline L (10 nM) sur CR1 CCP 22-30 HF dans un tampon de course Hepes 10 mM NaCl 145, 250 ou 400 mM (pH 7.4). Les résultats sont donnés en pourcentage de fixation mesurée par SPR par rapport à la fixation observée dans le tampon Hepes 10 mM NaCl 145 mM (pH 7.4). (B) Analyse par SPR de l'injection de C1q (2 nM) sur CR1 CCP 22-30 HF dans les tampons cités ci-dessus. (C) Effet du calcium sur la fixation de C1q, de la MBL et de la ficoline L (5 nM chacune) sur CR1 CCP 22-30 His produit en cellules d'insectes High Five™ ou en cellules de mammifères HEK 293-F. C1q, la MBL et la ficoline L ont été injectés à plusieurs reprises dans différents tampons en présence ou en absence de CaCl_2 1 mM. Pour la MBL, le tampon contenant le calcium a été supplémenté avec 10 mM mannose pour inhiber son activité lectine. Les résultats sont donnés en pourcentage de la différence de fixation mesurée par SPR entre les deux tampons (avec et sans calcium).

L'augmentation de la force ionique entraîne une diminution importante du signal pour les 3 collagènes de défense (figure 4.11 A). Pour C1q et la MBL, la diminution est très importante dès une concentration en NaCl de 250 mM (62-87%) et seul un faible signal est observé à 400 mM de NaCl. Pour la ficoline L, l'effet de la force ionique est beaucoup moins marqué puisque à 250 mM NaCl, on conserve encore 73 % de l'interaction et 23 % à NaCl 400 mM. Ce résultat confirme la sensibilité des collagènes de défense à l'augmentation de la force ionique et souligne la probable implication d'interactions ioniques. La moindre susceptibilité

de la ficoline L vis-à-vis de l'augmentation de la force ionique pourrait être liée à un nombre plus important de liaisons ioniques impliquées dans l'interaction. Nous n'avons cependant pas été en mesure d'effectuer ces mêmes mesures dans un tampon à faible force ionique (tampon LIS pour « Low Ionic Strength »), les collagènes de défense étant peu stables et s'agréant dans de telles conditions. Dans le cas particulier de C1q, l'aspect sigmoïdal du sensorgramme observé à une concentration en NaCl de 145 mM disparaît à de plus fortes concentrations en sel pour adopter un aspect plus classique (*figure 4.11 B*). Cette observation contribue à l'hypothèse d'une interaction plus complexe, probablement associée à la contribution de différents sites sur C1q plus ou moins sensibles à la présence de sel.

Concernant la présence de calcium (*figure 4.11 C*), celle-ci n'a qu'un très faible effet sur la fixation de C1q et de la ficoline L. Cependant dans le cas de la MBL, une augmentation significative (200 %) est observée. Les injections de la MBL étant effectuées en présence d'un excès de mannose, il est peu probable que l'augmentation du signal soit liée à la reconnaissance par le domaine C-Lectine des motifs oligosaccharidiques du fragment produit en cellules d'insectes. De plus, celle-ci est également observée sur le fragment produit en cellule de mammifères (150%), confirmant l'effet positif du calcium sur la fixation de la MBL. Bien qu'aucun site de fixation du calcium n'ait été encore rapporté sur CR1, cet ion pourrait contribuer à maintenir le récepteur dans une configuration plus favorable à son interaction avec la MBL.

III. Vers une définition du site potentiel d'interaction dans les collagènes de défense

Un certain nombre d'informations tend à montrer que CR1 interagit au niveau des fragments collagéniques de C1q (Klickstein et al., 1997). Des données indirectes semblent également indiquer que le complexe C1, dans lequel C1q est associé au tétramère C1r₂C1s₂, ne se fixe pas ou peu à des érythrocytes exprimant CR1 à leur surface (Tas et al., 1999). L'ensemble de ces informations suggère alors que le site d'interaction de CR1 dans C1q serait localisé dans la partie collagénique à proximité du site de fixation des protéases. Nous avons voulu vérifier ces données et évaluer si la MBL et la ficoline L se fixaient à CR1 de la même manière que C1q, c'est-à-dire via leur partie collagénique. L'ensemble des résultats obtenus nous permettra ainsi de localiser plus finement le site d'interaction de CR1 dans ces 3 collagènes de défense.

III.1. Domaine globulaire vs domaine collagénique

Les fragments collagènes et les têtes globulaires de C1q ont été injectés sur CR1 et CR1 CCP 22-30 afin d'évaluer leur fixation par SPR. Bien que l'injection d'éléments séparés ne permette pas de tenir compte des effets d'avidité précédemment cités, un ratio tête globulaire : C1q (GR) ou queue collagène (CLF) de 6 pour 1 a été utilisé afin d'obtenir un signal reflétant au plus près la contribution de chaque composante de la molécule entière. Les fragments collagéniques de C1q se fixent fortement (environ 60 % du signal de C1q) à la fois sur CR1 et sur CR1 CCP 22-30 mais une contribution non négligeable des têtes globulaires (20% - 40% du signal de C1q) est également observée (*figure 4.12 A et D*). Fait intéressant, le sensorgramme ne présente pas le même aspect selon que l'on injecte l'une ou l'autre partie de C1q (GR ou CLF). Les fragments collagènes se comportent de la même manière que la molécule entière en présentant une cinétique d'association avec un aspect sigmoïdal. Ces résultats semblent confirmer que les CLF contribuent majoritairement à la fixation, indiquant que le site d'interaction serait principalement localisé dans la partie collagénique. Nous apportons cependant l'évidence que les têtes globulaires de C1q participeraient également à cette interaction. En comparant ces résultats avec ceux observés pour l'augmentation de la force ionique, il semblerait que la contribution des CLF soit la plus sensible aux sels puisque le signal sigmoïdal est perdu dès une concentration en NaCl de 250 mM (*figure 4.11 B*). Ceci laisserait supposer que les fragments collagéniques contiendraient des résidus chargés, soit positivement soit négativement, potentiellement impliqués dans la fixation de C1q par des interactions ioniques.

Les têtes globulaires de C1q étant également impliquées dans l'interaction avec CR1, nous avons évalué la fixation des parties globulaires de la MBL (domaine C-Lectine) et de la ficoline-L (domaine fibrinogène) sur CR1 et sur son fragment CCP 22-30. Ces domaines ont été injectés dans un ratio 6 :1 pour le domaine C-Lectine et 4 :1 pour le domaine fibrinogène (FBG), respectant ainsi les proportions respectives présentes en moyenne dans les molécules entières. Le domaine C-lectine de la MBL ne fixe pratiquement pas (inférieur à 5%) CR1 et CR1 CCP 22-30, confirmant ainsi que l'activité lectine de la MBL n'est vraisemblablement pas impliquée dans l'interaction, comme montré par Ghiran et collaborateurs (Ghiran et al., 2000). Le domaine fibrinogène, quant à lui, se fixe sur CR1 (5%) et notamment sur CR1 CCP 22-30 (15%). Ce domaine contribue donc de façon non négligeable à l'interaction de la ficoline L comme cela a été observé pour les têtes globulaires de C1q.

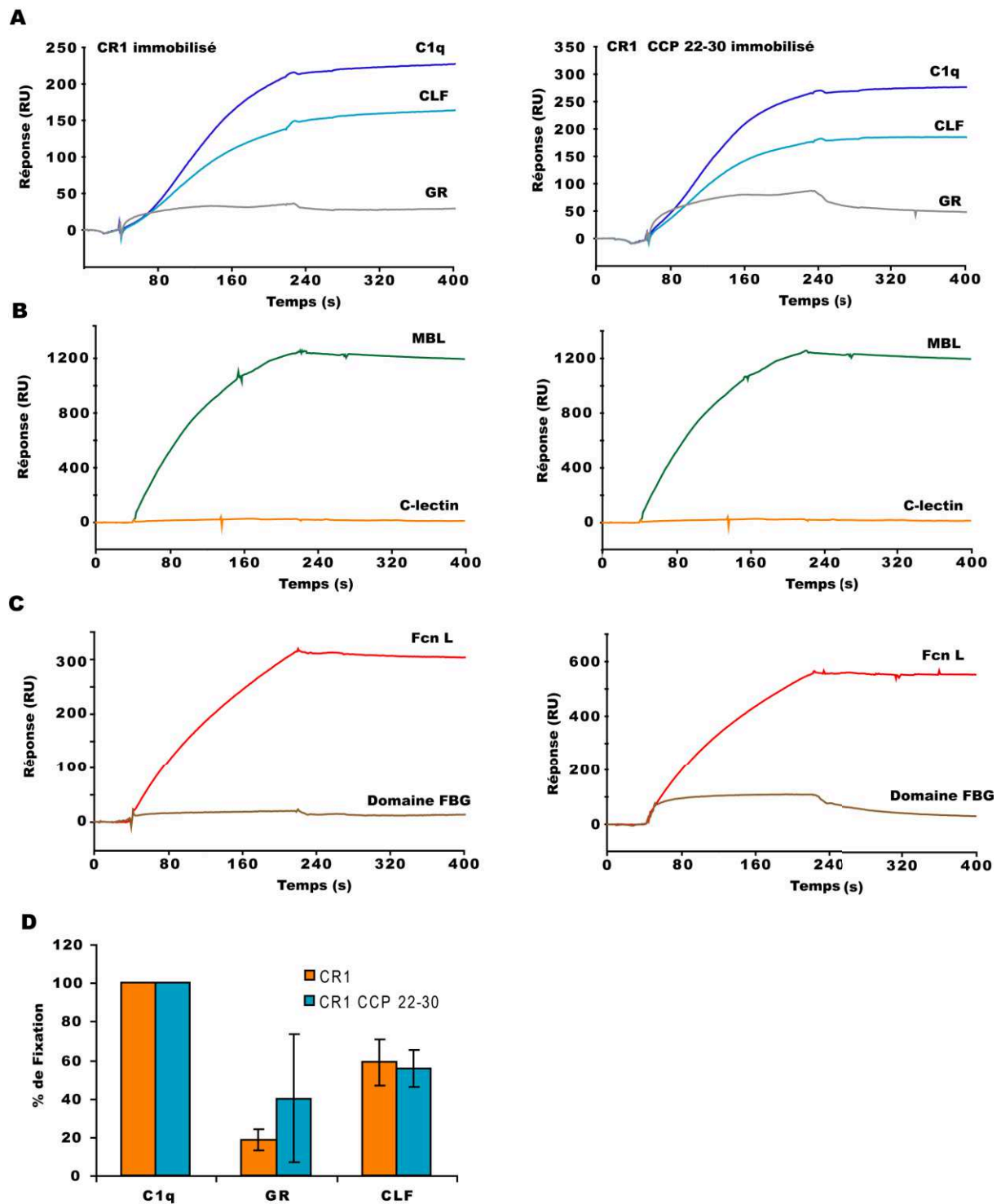


Figure 4.12 : Analyse par SPR de la fixation des différents composants des collagènes de défense C1q, MBL et ficoline L

(A) C1q (2 nM), ses fragments collagéniques (2 nM) et ses têtes globulaires (12 nM), (B) la MBL (10 nM) et son domaine C-Lectine (60 nM) ou (C) la ficoline L (10 nM) et son domaine fibrinogène (40 nM) ont été injectés sur CR1 (15113 RU) et CR1 CCP 22-30 (4513 RU) en tampon HBS en présence de 10 mM mannose et de 1 mM calcium. (D) Contribution des têtes globulaires (GR) et des fragments collagéniques de C1q (CLF) dans l'interaction avec CR1 et CR1 CCP 22-30. Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport à la fixation de la molécule entière et correspondent à une moyenne de 4 essais indépendants obtenus par SPR.

Ces éléments montrent clairement que l'interaction avec CR1 met majoritairement en jeu une autre partie que les domaines globulaires de la MBL et de la ficoline L et suggèrent l'implication de leur partie collagénique, comme cela a été démontré pour C1q. Cependant, ne disposant pas au laboratoire des fragments collagène correspondants, nous ne pouvons pas réaliser le même type de comparaison qu'avec C1q. De plus, compte tenu des phénomènes d'avidité, il est également fort possible que la contribution des têtes globulaires de chaque collagène de défense soit en réalité plus importante. D'autres éléments sont donc nécessaires afin d'étayer notre hypothèse.

III.2. MASPs et CR1, même site de liaison ?

Les MASPs (MASP-1,-2,-3), protéases du complément retrouvées en association dans le sérum aux collagènes de défense de la voie lectine, s'associent sous forme d'homodimères à la MBL et à la ficoline L avec des K_D de l'ordre du nano-molaire (Thielens et al., 2001; Zundel et al., 2004). Il a été également montré que MASP-1 et -2 étaient capables d'interagir avec C1q (Phillips et al., 2009) et des résultats non publiés du laboratoire indiquent qu'il en est de même pour MASP-3. Afin de conforter notre hypothèse concernant l'implication des fragments collagènes et pour localiser encore plus finement le site d'interaction, nous avons réalisé des essais de compétition en présence de MASP-3 et de C1q, de la MBL ou de la ficoline L. Ce type de stratégie a déjà permis avec succès de localiser le site d'interaction de CD91 (Duus et al., 2010b) et de la calréticuline (Pagh et al., 2008) dans la MBL.

Comme la présence de calcium est nécessaire pour former l'homodimère de MASP-3 interagissant avec les collagènes de défense, nos expériences ont été réalisées en présence de calcium et d'un excès de mannose (10 mM) pour inhiber la fixation de la MBL via son domaine lectine aux oligosaccharides de type high mannose de CR1 CCP 22-30. Pour la même raison, la MASP-3 utilisée a été produite en cellules de mammifères.

C1q, la MBL et la ficoline L ont été incubés en présence de différents ratios collagènes de défense : MASP-3 puis la fixation du mélange sur CR1 et sur CR1 CCP 22-30 a été analysée par SPR (*figure 4.13 A, B et C*). La fixation de la MBL sur CR1 et CR1 CCP 22-30 est inhibée en moyenne à plus de 90% par un excès de 2 en (MASP-3)₂ et tend vers une inhibition totale, confirmant ainsi la très faible implication du domaine C-lectine (*figure 4.12 B*). 50 % de la fixation de la MBL est inhibée par un excès de 0,5 en (MASP-3)₂ ce qui est cohérent avec la formation d'un complexe 1 :1.

Le dimère (MASP-3)₂ ne permet cependant pas d'inhiber totalement la fixation de la ficoline L sur CR1 et CR1 CCP 22-30. L'inhibition maximale observée est en moyenne de 73% ce qui n'est pas étonnant puisque nous avons observé que le domaine fibrinogène de la ficoline L contribuait à la fixation à CR1 (*figure 4.12 C*). Un comportement encore plus marqué est observé avec C1q, pour lequel (MASP-3)₂ ne diminue l'interaction que de 44 % en moyenne sur CR1 CCP 22-30. Comme pour la ficoline L, la contribution des têtes globulaires (*figure 4.12 A*) de C1q est probablement à l'origine de la fixation résiduelle observée.

Les mutants K55A et K55E de la MBL, qui sont incapables de fixer les MASPs (Teillet et al., 2007), perdent également leur capacité à fixer CR1 et CR1 CCP 22-30 (*figure 4.13 D*). Nous pouvons donc supposer que le site de fixation de CR1 sur la MBL est le même que celui des MASPs et que la Lys⁵⁵ est un résidu clé dans cette interaction, comme cela a déjà été mis en évidence pour la calréticuline et CD91. Ce résidu, chargé positivement, pourrait être impliqué dans des interactions avec des résidus de CR1 chargés négativement (Glu, Asp) et serait en accord avec la forte sensibilité de la fixation de la MBL à l'augmentation de la force ionique. De plus, comme cette mutation n'altère pas la fonction lectine de la MBL (la Lys⁵⁵ se situe dans la partie collagénique), l'absence de fixation observée est également un argument en faveur de la non-implication du domaine C-lectine dans l'interaction. Des résultats similaires sont attendus avec le mutant K57A de la ficoline L et le mutant K47A de la ficoline H, mais leur indisponibilité n'a pas permis l'évaluation de leur fixation au cours de ce projet.

L'ensemble de ces résultats indique que l'interaction entre CR1 (au niveau des CCP 22-30) et les collagènes de défense C1q, MBL et ficoline L a majoritairement lieu au niveau de la partie collagénique. La fixation aurait alors lieu à proximité ou au niveau du site de fixation de MASP-3 et pourrait impliquer des interactions avec des résidus chargés, à l'image des lysines impliquées dans l'interaction avec MASP-3. Nous mettons également en évidence un effet d'avidité attribué aux têtes globulaires de C1q ou de la ficoline L, puisque l'inhibition partielle observée est supérieure à celle attendue au regard de leur capacité de fixation respective.

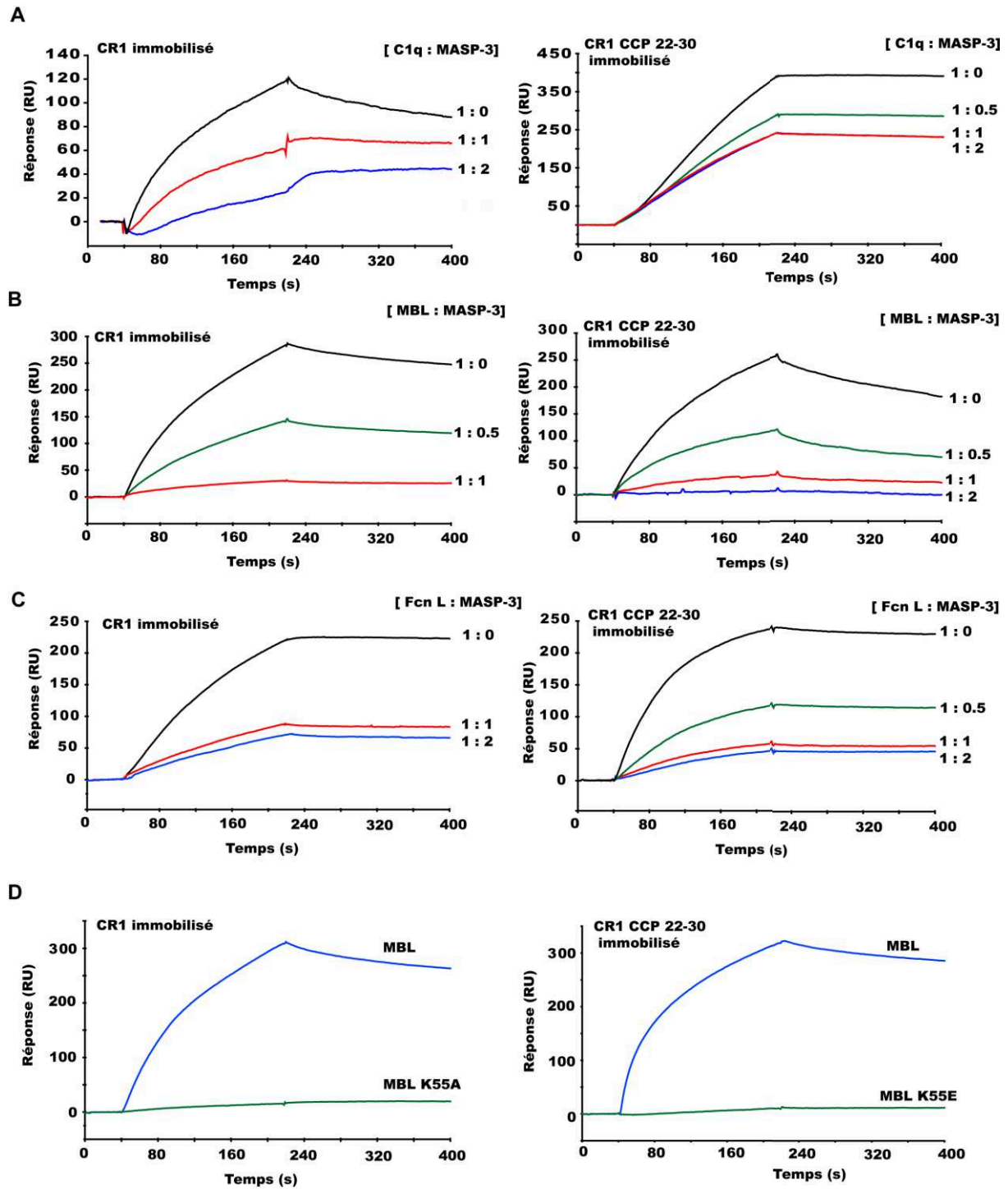


Figure 4.13 : Identification du site d'interaction de CR1 sur les collagènes de défense

(A) C1q, (B) la MBL et (C) la ficoline L ont été incubés en présence d'un excès de 0, 0,5, 1 et 2 en dimère de MASP-3 pendant 20 minutes à température ambiante puis injectés sur une surface immobilisée avec CR1 (15000 RU) et CR1 CCP 22-30 (4000 RU). L'incubation et les injections ont été réalisées en tampon TEA-P en présence de calcium pour C1q et en tampon HBS-P en présence de calcium et de mannose pour MBL et ficoline L. (D) MBL (20 nM) et les mutants K55A ou K55E (20 nM) ont été injectés en tampon TEA-P sur CR1 (15000 RU) et sur CR1 CCP22-30 (6000 RU).

IV. CCP 24-25, site principal d'interaction avec les collagènes de défense

Afin de définir avec plus de précision quels sont les modules CCP de CR1 CCP 22-30 impliqués dans l'interaction avec les collagènes de défense identifiés, nous avons choisi de nous orienter vers une stratégie de délétion progressive. Ainsi, des modules CCPs ont été supprimés aux deux extrémités et dans la partie centrale de CR1 CCP 22-30, permettant ainsi d'obtenir des fragments définissant l'ensemble de la molécule (*figure 4.14 A*). Ces fragments de délétion ont ensuite été produits, caractérisés et leur interaction avec les collagènes de défense C1q, MBL et ficoline L a été évaluée par SPR et ELISA.

IV.1. Production des formes tronquées recombinantes de CR1 CCP 22-30

Les fragments de délétion de CR1 CCP 22-30 ont été exprimés et purifiés de la même manière que la molécule entière (voir chapitre *matériel et méthodes*). L'analyse sur gel SDS-PAGE (*figure 4.14 B*) confirme que ceux-ci migrent à des masses apparentes en accord avec leur masse théorique et suggérant la présence de N-glycosylations comme cela a déjà été observé avec le fragment CR1 CCP 22-30. Ils sont obtenus en quantité suffisante et présentent une bonne pureté. La détermination de la masse moléculaire expérimentale par MALDI-TOF confirme la présence de ces N-glycosylations et permet, de la même manière que pour CR1 CCP 22-30, d'évaluer la contribution massique de celles-ci. La différence de masse est alors utilisée pour déterminer le nombre de sites potentiellement porteurs de N-glycosylations (*Chapitre 4, section IV.2*). Afin de vérifier le bon repliement de ces fragments, ceux-ci sont analysés par dichroïsme circulaire. Les protéines $\Delta 22-23$, $\Delta 22-25$ et $\Delta 25-26$ présentent les mêmes caractéristiques spectrales que CR1 CCP 22-30 avec une bande positive centrée sur 230 nm. La construction CCP 25-26 voit son maximum déplacé vers 223 nm tandis que les constructions $\Delta 29-30$, $\Delta 27-30$ et $\Delta 26-30$ présentent un pic élargi composé des deux composantes précédemment citées (223 et 230 nm). Ces observations ne sont pas étonnantes puisque les modules CCPs sont caractérisés par une bande positive entre 220 et 240 nm en dichroïsme circulaire. De plus, chaque module CCP contribue différemment au signal en fonction de la localisation des résidus de tryptophanes dans la structure et du positionnement des modules CCP entre eux (Blein et al., 2004).

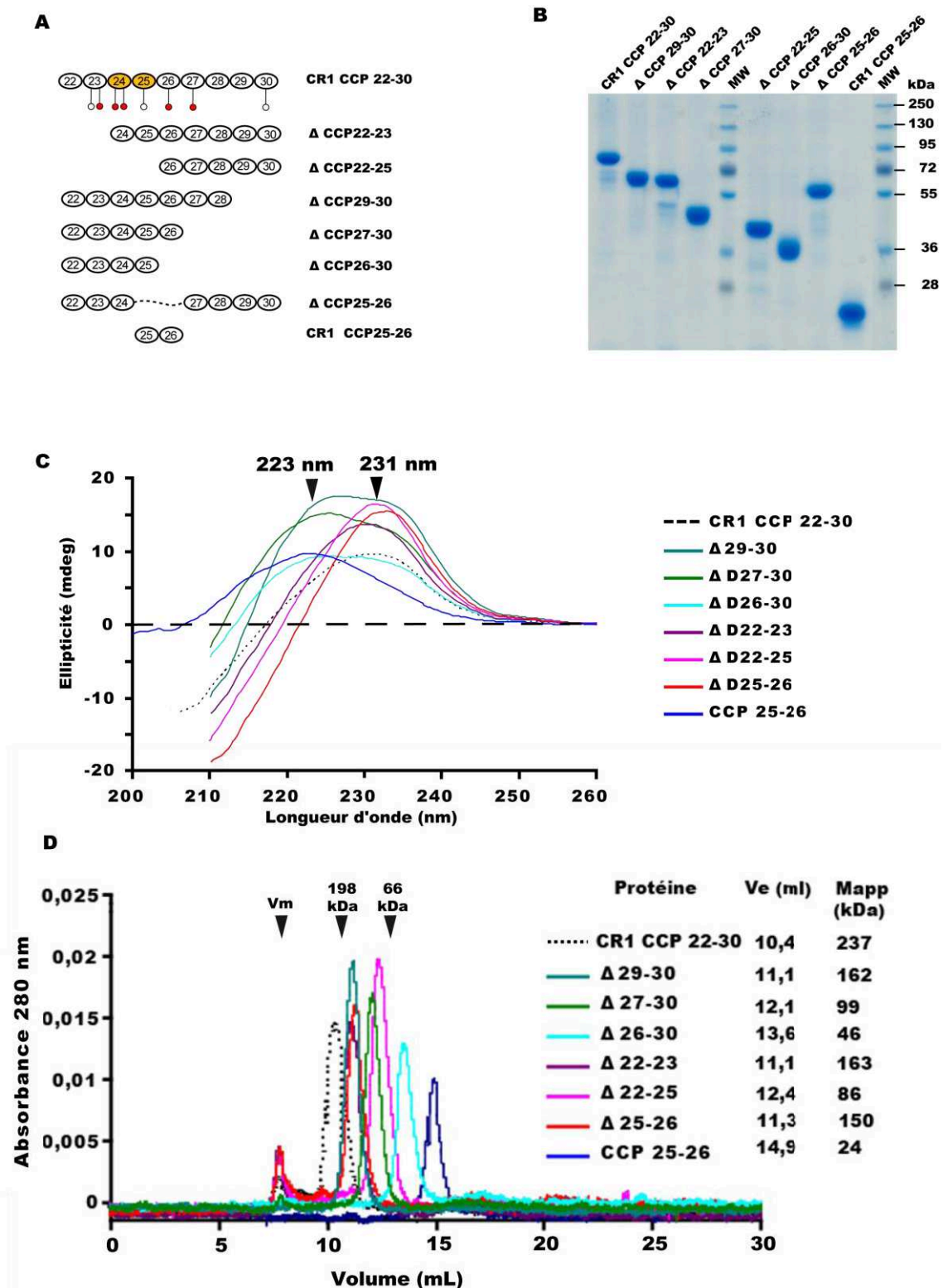


Figure 4.14 : Production et caractérisation des fragments de délétion de CR1 CCP 22-30

(A) Représentation schématique des fragments de délétions produits. Les sites potentiels de N-Glycosylation sont indiqués par des ronds blancs. Les ronds rouges correspondent à notre hypothèse concernant la position des sites de N-Glycosylation. Le site potentiel d'interaction avec les collagènes de défense est indiqué en jaune. (B) Analyse sur gel SDS-PAGE 10% en condition réductrice de 4μg de chacune des constructions produites. (C) Analyse par dichroïsme circulaire dans la région des UV lointains (200 – 260 nm) des fragments de CR1 CCP 22-30 produits en cellules d'insectes. La présence des maxima est indiquée par des flèches. (D) Analyse par chromatographie d'exclusion en tampon PBS de 100μg de chacune des constructions.

Ce résultat confirme donc le bon repliement de nos constructions qui est appuyé par l'injection sur une colonne chromatographie d'exclusion de l'ensemble des fragments de délétion. Pour chaque protéine, nous observons des masses moléculaires apparentes plus élevées que celles attendues, en accord avec le comportement observé pour CR1 CCP22-30 et caractéristiques de molécules présentant une forme allongée. Ces fragments ont donc des caractéristiques physico-chimiques identiques à celles du fragment CR1 CCP 22-30 et pourront être utilisés de la même manière pour évaluer leur fixation aux collagènes de défense.

IV.2. Localisation des sites N-glycosylés

Nous avons précédemment estimé que le nombre de sites N-liés sur CR1 CCP 22-30 était compris entre 4 et 6. De la même manière, à partir des différences de masse moléculaire ou Δ obtenues avec les autres constructions (*tableau 4.2*), nous avons essayé d'émettre une hypothèse quant à la répartition des sites N-glycosylés sur le fragment. Pour ce faire nous émettons les suppositions suivantes :

- 5 sites de N-glycosylation sont portés par le fragment CR1 CCP 22-30
- Les modules CCP 22-25 portent 3 sites N-glycosylés
- Les modules CCP 29-30 ne portent aucune glycosylation
- Les modules CCP 26-30 contiennent 2 sites de N-glycosylations.
- Les modules CCP 22-23 et CCP 25-26 ne contiennent qu'un seul site de glycosylation

Nous supposons alors que les modules CCP 23, 24 (sur les 2 sites potentiels), 26 et 27 seraient ceux qui seraient porteurs de N-glycosylations. Cette hypothèse, reprise à titre d'exemple dans la *figure 4.14 A*, placerait les glycosylations en position centrale dans le fragment. Celles-ci se partageraient alors de façon homogène autour du module CCP 25 (non glycosylé), laissant supposer que cette organisation pourrait contribuer à l'interaction avec les collagènes de défense. L'absence de N-glycosylations sur le module CCP 30 est confortée par l'analyse du modèle structural des modules CCP 22-30 (Furtado et al., 2008). Ce site se situe entre deux modules CCPs, au niveau du « linker ». La présence d'un résidu N-lié à cet endroit introduirait probablement une contrainte qui serait peu favorable au repliement de la molécule, comparativement aux sites présents sur les autres modules CCP qui se localisent sur des boucles bien exposées au solvant.

D'autres expériences sont cependant nécessaires pour déterminer avec précision la position des sites N-liés dans le fragment CR1 CCP 22-30, et ainsi conforter ou infirmer notre hypothèse. De plus, nous sommes également incapables de prédire quel site est préférentiellement glycosylé dans le module CCP 23.

Protéine	MW _{TH}	MW _{SDS} (kDa)	MW _{MS} (Da)	Δ	Sites potentiels	Hypothèse sur les sites N-liés (Supposés)
CR1 CCP 22-30	64502	87	71156 \pm 71	6654	8	4-6 (5)
CR1 CCP 22-30 Δ 22-23	50978	70	56132 \pm 56	5154	6	3-5 (4)
CR1 CCP 22-30 Δ 22-25	36493	44	38894 \pm 39	2401	3	1-2 (2)
CR1 CCP 22-30 Δ 29-30	50470	71	56567 \pm 57	6097	7	4-6 (5)
CR1 CCP 22-30 Δ 27-30	35835	51	40107 \pm 40	4272	6	3-4 (4)
CR1 CCP 22-30 Δ 26-30	29234	37	32708 \pm 33	3474	5	2-3 (3)
CR1 CCP 22-30 Δ 25-26	51163	64	57083 \pm 57	5920	6	3-5 (4)
CR1 CCP 25-26	14408	21	15434 \pm 15	1026	2	1 (1)

Tableau 4.2 : Tableau récapitulatif des masses moléculaire théoriques et expérimentales pour l'ensemble des fragments produits.

Les valeurs déterminées par SDS-PAGE (MW_{SDS}) sont une approximation basée sur la distance de migration en comparaison avec un marqueur de poids moléculaire. Δ correspond à la différence entre la masse moléculaire théorique et la masse moléculaire déterminée par MALDI-TOF (MW_{MS}). Le nombre de sites de N-glycosylation potentiels ainsi que les hypothèses concernant le nombre de sites réellement N-glycosylés sont également indiqués. Les valeurs théoriques de masse tiennent compte de la formation de 2 ponts disulfure par module CCP.

IV.3. Caractérisation par SPR

La fixation de C1q, de la MBL et de la ficoline L sur chaque fragment de délétion a été évaluée par SPR afin d'identifier les modules impliqués dans l'interaction. Afin de pouvoir comparer les niveaux de fixation entre les différentes constructions, une quantité équimolaire a été immobilisée et la fixation a systématiquement été comparée au signal obtenu avec CR1 CCP 22-30 (choisi comme référence). Nous avons alors défini arbitrairement l'effet des délétions selon les critères suivants :

- entre 0-30 % : effet important (rouge)
- entre 30 et 80% : effet modéré (orange)
- Entre 80 et 100% : pas ou peu d'effet (vert)
- Supérieur à 100 % : effet positif (vert)

IV.3.1. Cas de la MBL et de la ficoline L

La MBL et la ficoline L présentent un profil d'interaction très similaire (*figure 4.15*). Alors que les délétions des modules CCPs aux extrémités N- et C- terminales (Δ CCP 22-23 et Δ CCP 27-30) n'ont pas ou peu d'impact sur la capacité de fixation, la suppression des modules centraux (Δ CCP 24-25 et Δ CCP 25-26) réduit de façon très significative l'interaction avec la MBL et la ficoline L. Cet effet semble notamment plus marqué dès lors que l'on supprime le module CCP 24. Il est intéressant de noter que le fragment CR1 CCP 22-25 possède une capacité de fixation accrue par rapport au fragment CR1 CCP 22-26, suggérant que le module CCP 26 aurait un effet négatif en limitant l'interaction avec les deux collagènes de défense (encombrement stérique ?). Ces résultats laissent supposer que le site de fixation se trouverait localisé dans les modules CCP 24 et 25 de CR1. Ceci expliquerait notamment pourquoi le fragment CR1 CCP 25-26 ne possède qu'une faible capacité de fixation d'autant plus que le module CCP 24 semble être fortement impliqué dans l'interaction. Il faut néanmoins garder à l'esprit que la taille du fragment CCP 25-26 puisse être une contrainte pour l'accessibilité des collagènes de défense. Nous ne pouvons pas non plus exclure la possibilité que d'autres modules CCP aient une faible capacité de fixation puisque nous avons été capable d'observer une fixation sur le fragment CCP 26-30. Nous n'expliquons cependant pas pourquoi la délétion des modules CCP 29-30 conduit à une si forte diminution de signal. Il est peu probable que ces modules soient impliqués dans l'interaction puisque d'autres fragments ne les contenant pas présentent des niveaux de fixation équivalents, voire supérieurs à ceux de la molécule entière. Une hypothèse avancée serait que le fragment CR1 CCP 22-28 s'immobiliserait dans une conformation moins favorable à l'établissement des interactions. Concernant les différences notables entre la fixation de la MBL et de la ficoline L, il semble que les modules CCP 27-30 puissent favoriser l'interaction avec la ficoline L car nous observons une capacité de fixation légèrement diminuée dans cette zone par rapport à la MBL. Ceci pourrait s'expliquer par la présence dans ces CCPs de motifs pouvant être reconnus par les domaines fibrinogènes de la ficoline L ou par une stabilisation de l'interaction via un site supplémentaire d'interaction.

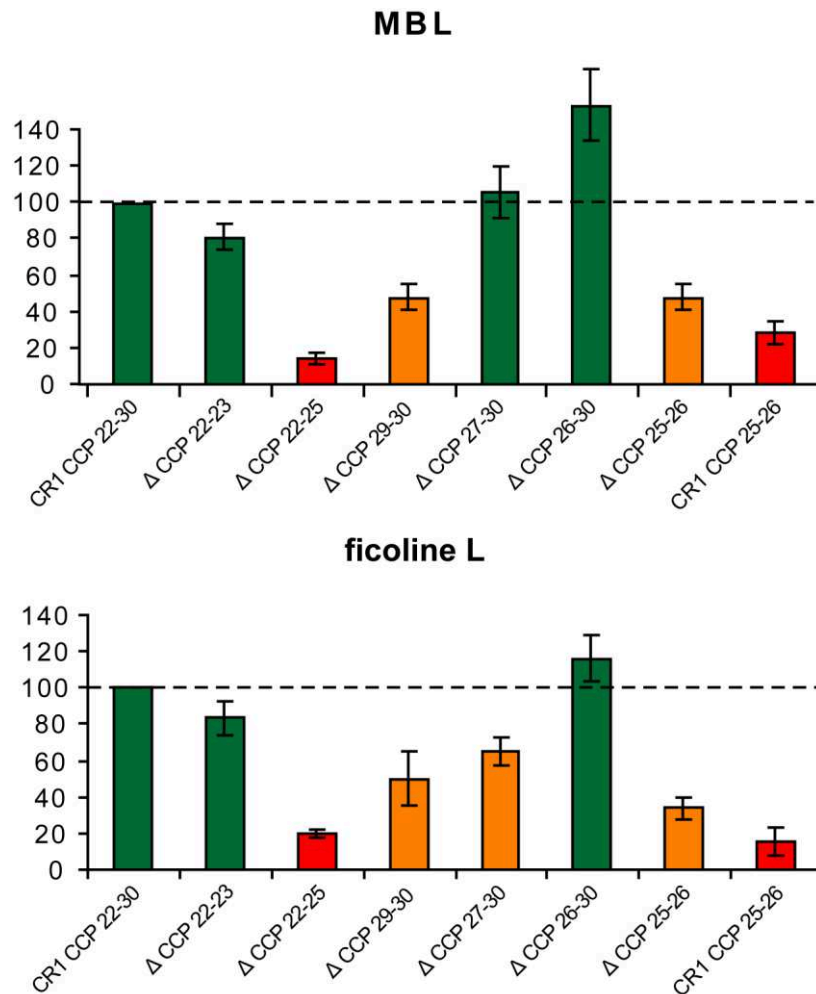


Figure 4.15 : Fixation de la MBL et de la ficoline-L sur les différentes constructions de CR1 CCP 22-30

La fixation de la MBL (haut) et de la ficoline L (bas) sur CR1 CCP 22-30 et ses fragments de délétion a été évaluée par SPR. Les injections ont été réalisées en tampon HBS-P ou TEA-P en présence de calcium et de mannose. La capacité de fixation pour chaque fragment est exprimée en pourcentage de la fixation de CR1 CCP 22-30 qui a été choisi comme référence. Les résultats présentés correspondent à plusieurs injections ($n > 3$) réalisées avec des concentrations variables de MBL ou de ficoline L.

IV.3.2. Cas de C1q

La fixation de C1q aux différents fragments a été évaluée par SPR (*figure 4.15 A*) mais également par ELISA (*figure 4.15 B*). Des variations du profil d'interaction sont observées entre les deux méthodologies et certaines mesures présentent des erreurs importantes, compliquant fortement l'analyse. De façon générale, nous observons des diminutions moins marquées que dans le cas de la MBL et de la ficoline L qui pourraient être liées à la forte contribution des têtes globulaires de C1q. Les délétions de CCPs dans la partie centrale (Δ CCP 24-25 et Δ CCP 25-26) semblent cependant diminuer l'interaction suggérant que C1q se fixerait également à CR1 par les modules CCP 24 et 25. De la même manière, le fragment CCP 22-25 présente une capacité de fixation améliorée.

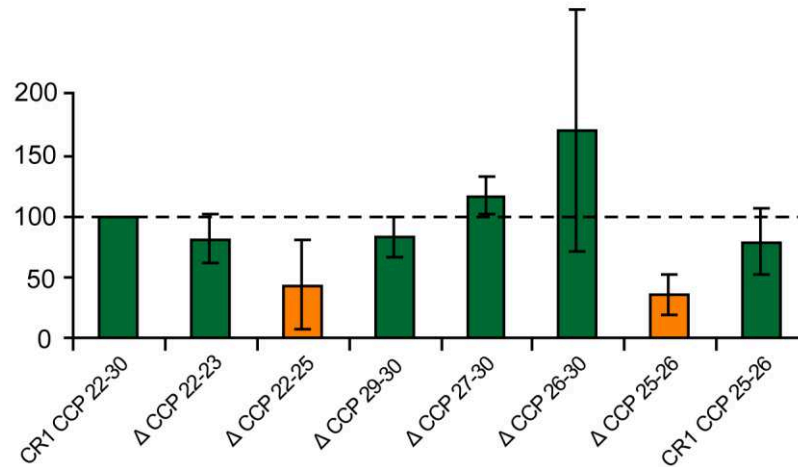
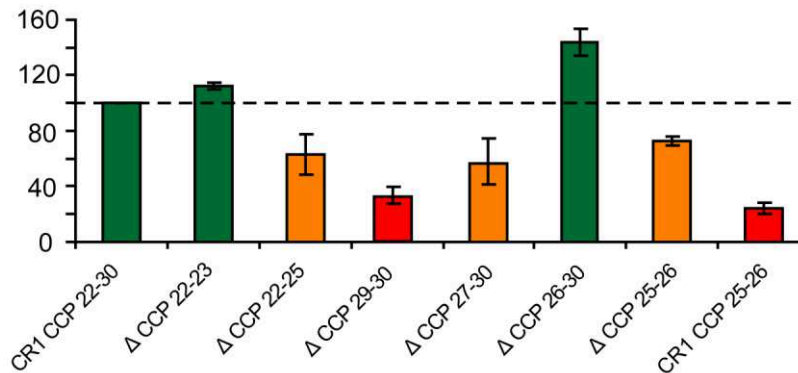
A**B**

Figure 4.16 : Fixation de C1q sur les différentes constructions de CR1 CCP 22-30

La fixation de C1q sur CR1 CCP 22-30 et ses fragments de délétion a été évaluée par SPR (A) et par ELISA (B). Les injections pour l'analyse en SPR ont été réalisées dans différents tampons et le test ELISA en tampon PBS comme décrit dans le chapitre *matériel et méthodes*. La capacité de fixation pour chaque fragment est exprimée en pourcentage de la fixation de CR1 CCP 22-30 qui a été choisi comme référence. Les résultats présentés correspondent à plusieurs mesures ($n > 3$). Pour la SPR, des concentrations variables de C1q ont été injectés.

Bien que le cas de C1q soit plus complexe à analyser, il semble que C1q, la MBL et la ficoline L partagent un même site de fixation sur CR1 CCP 22-30, site localisé au niveau des modules CCP 24 à 25. Il est cependant possible que d'autres sites dans la molécule participent à l'interaction notamment au niveau des modules CCP 27-30 pour la ficoline L. Par manque de temps et de matériel, nous n'avons pas pu mettre au point de test ELISA pour la MBL ou pour la ficoline L. De tels tests pourraient ainsi confirmer ce premier jeu de résultats et permettre d'établir avec certitude le rôle des CCP 24-25 dans l'interaction.

V. Visualiser l'interaction

Nous avons focalisé une grande partie de notre étude sur des caractérisations *in vitro* des interactions en cherchant à mimer la répartition de CR1 à la surface cellulaire (immobilisation de CR1 sur une surface). Nous avons donc souhaité donner une vision plus concrète aux interactions mises en évidence en les visualisant ou en les replaçant dans un contexte plus proche de la réalité, le contexte cellulaire. Pour atteindre cet objectif, nous nous sommes donc basés sur deux approches : 1) soit par microscopie électronique nous permettant ainsi de visualiser l'interaction entre les deux partenaires; 2) soit par biologie cellulaire en élaborant un modèle nous permettant d'évaluer *in cellulo* la fixation des collagènes de défense.

Ces méthodologies étant couteuses en termes de temps et ayant débuté tardivement, les résultats et les conclusions présentées ici ne sont que les prémices de ce que pourrait être une étude plus complète.

V.1. Par microscopie électronique

La MBL, la ficoline L, C1q et CR1 CCP 22-30 ont tout d'abord été observés de façon isolée par microscopie électronique (*figure 4.17*). C1q est facilement identifiable grâce à ses 6 têtes globulaires et à sa région collagène N-terminale très dense. Pour la MBL, comme l'échantillon analysé est composé d'un mélange d'oligomères, nous identifions principalement des formes pentamériques et hexamériques. La ficoline L est quant à elle observée majoritairement sous la forme d'un tétramère mais avec plus de difficulté, probablement à cause d'une plus grande instabilité que les autres collagènes de défense.

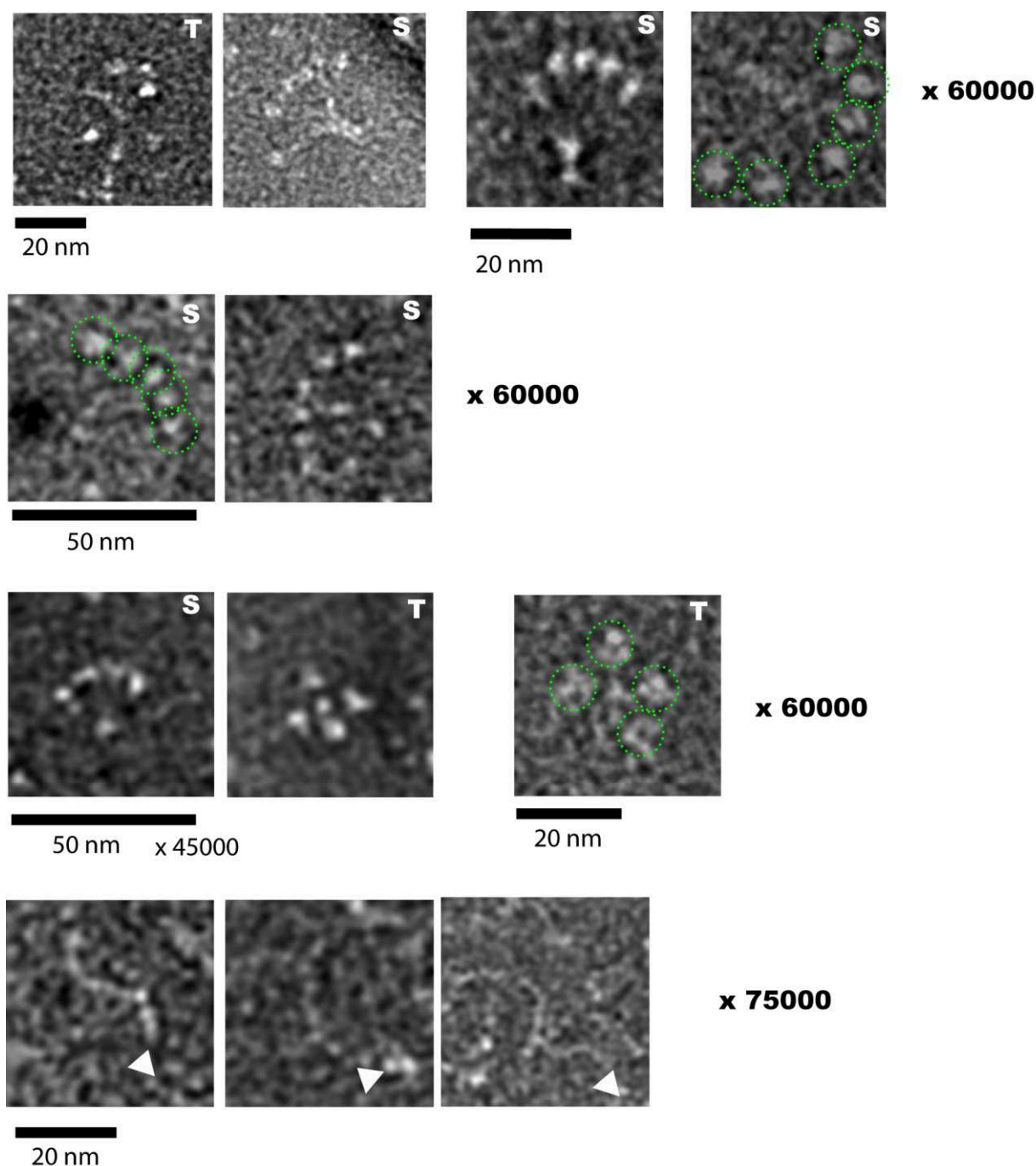


Figure 4.17 : Observation par microscopie électronique de C1q, de la MBL, de la ficoline L et de CR1 CCP 22-30

C1q (20 nM), la MBL (31 nM), la ficoline L (23 nM) et CR1 CCP 22-30 (140 nM) ont été analysés par coloration négative à différents grossissements. Hormis pour la MBL (molybdate d'ammonium 2%), toutes les protéines ont été colorées avec 2% de silico tungstate de sodium. La flèche blanche indique la position du fragment CR1 CCP 22-30 afin de faciliter sa visualisation. Les cercles en pointillés verts localisent les têtes globulaires de C1q, de la MBL et de la ficoline L. S : vue de côté ; T : vue du dessus.

Des filaments de 20 à 25 nm adoptant différentes conformations sont observés pour le fragment CR1 CCP 22-30. La petite taille de cette molécule implique cependant l'utilisation d'un plus fort grossissement (X 75000) rendant la mise au point plus délicate.

Afin de visualiser la formation d'un complexe, un large excès (voir légende des *figures 4.18 et 4.19*) du fragment CR1 CCP 22-30 a été incubé en présence des trois collagènes de défense puis le mélange a été préparé pour l'analyse en microscopie électronique (coloration négative), comme décrit dans la partie *matériel et méthodes*. La petite taille de CR1 CCP 22-30 rend l'analyse plus complexe d'autant plus que l'obtention d'images à un fort grossissement (supérieur à 60000 fois), conduit à une perte de résolution (difficulté pour faire la mise au point). Bien que de nombreux clichés soient nécessaires pour observer notre fragment à proximité des collagènes de défense, nous avons obtenu des résultats intéressants. Avec C1q, nous parvenons à identifier ce qui ressemble à des molécules de CR1 CCP 22-30 au niveau des parties collagéniques (*figure 4.18, haut*). Un grand nombre de clichés montrent également des fragments localisés au niveau des têtes globulaires de C1q (*figure 4.18, bas*), ce qui est en accord avec les observations faites par SPR.

Pour la MBL (*figure 4.19 A*), nous obtenons moins de clichés et ceux-ci sont de moins bonne qualité (molécules mal formées ou bien abîmées). Les quelques images obtenues semblent indiquer une localisation similaire à celle observée pour C1q, c'est-à-dire au niveau des tiges collagènes. Fait intéressant, la présence de CR1 CCP 22-30 dans le mélange avec la MBL aurait un effet stabilisateur sur cette dernière, nous permettant de mieux la visualiser. Cet élément est un argument en faveur d'une probable interaction.

Pour la ficoline L (*figure 4.19 B*), les clichés sont encore de moins bonne qualité et il est très difficile de localiser avec précision le site d'interaction. Tandis que certains clichés montrent des molécules de CR1 interagissant en position centrale, d'autres semblent indiquer une interaction avec les têtes globulaires ce qui n'est pas sans rappeler les résultats de SPR.

Ces résultats ne sont pas une preuve en soi de la localisation de l'interaction mais semblent aller dans le sens de nos précédentes observations (SPR) et indiquer que CR1 CCP 22-30 se fixerait notamment au niveau des tiges collagènes de C1q et peut-être à celles de la MBL et de la ficoline L.

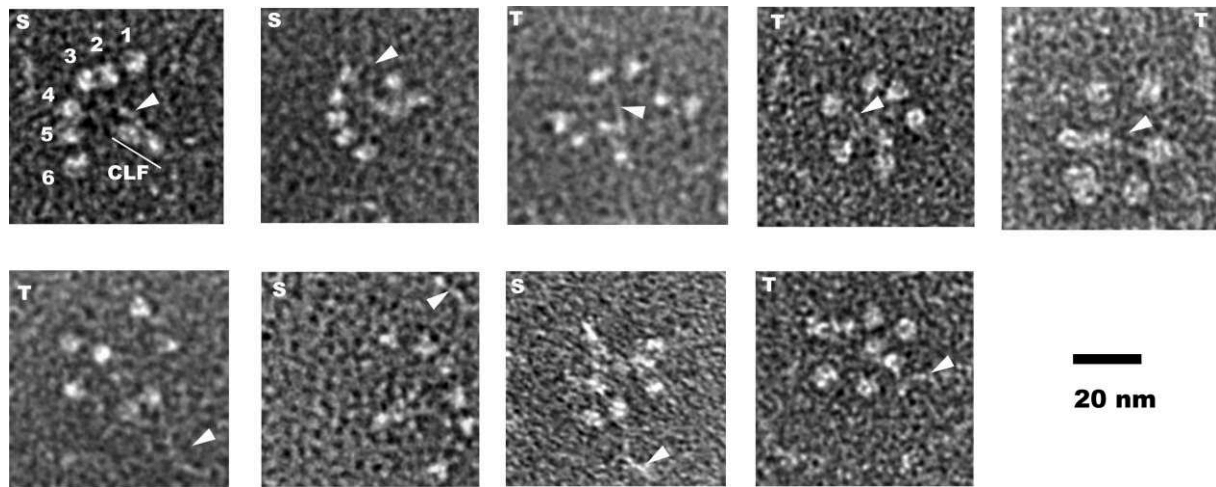


Figure 4.18 : Observation par microscopie électronique du complexe C1q/CR1 CCP 22-30

C1q a été incubé en présence d'un excès de 6-9 fois en CR1 CCP 22-30, puis le mélange a été analysé par microscopie électronique à transmission en coloration négative (2% de silico tungstate de sodium, 60000X). La position des têtes globulaires de C1q (1 à 6) ainsi que de la tige collagénique sont donnés à titre d'exemple. La flèche blanche indique la position du fragment CR1 CCP 22-30 afin de faciliter sa visualisation. S : vue de côté ; T : vue du dessus.

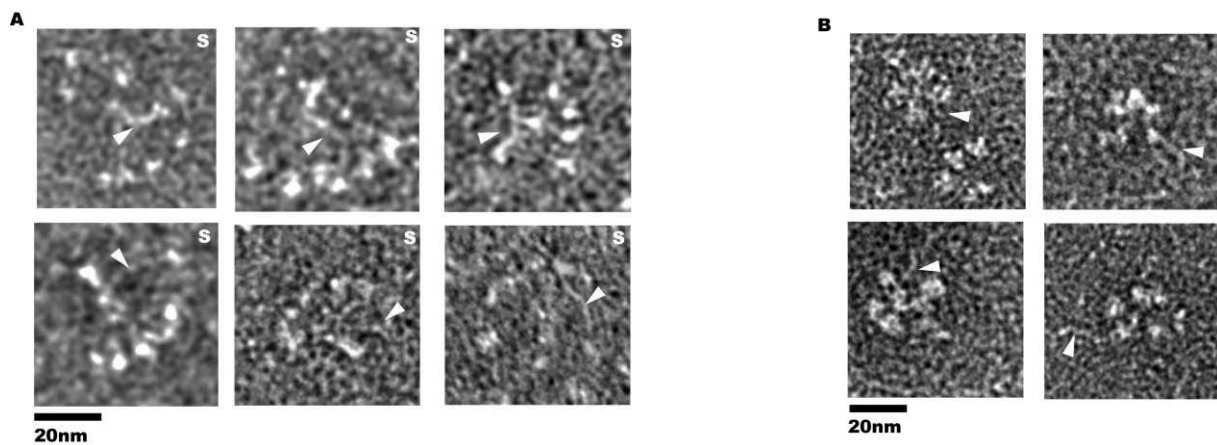


Figure 4.19 : Observation par microscopie électronique du complexe MBL /CR1 CCP 22-30 et ficoline L / CR1 CCP 22-30

La MBL (A) et la ficoline L (B) ont été incubées respectivement en présence d'un excès de 4-6 fois ou 6-8 fois en CR1 CCP 22-30, puis le mélange a été analysé par microscopie électronique à transmission en coloration négative (2% de silico tungstate de sodium, 60000X). La flèche blanche indique la position du fragment CR1 CCP 22-30 afin de faciliter sa visualisation. S : vue de côté ;

Le fait que la molécule de CR1 CCP 22-30 ne soit pas immobilisée, comme en SPR ou en ELISA, contribue très probablement à la difficulté rencontrée pour observer le complexe (affinité plus faible quand le ligand et le récepteur sont en solution). Nous avons également voulu évaluer une stratégie de marquage de CR1 CCP 22-30 avec des billes d'or. Celles-ci portant des ions nickel (Ni^{2+}) à leur surface, elles sont capables de se fixer au niveau de l'étiquette poly-histidine associée à CR1 CCP 22-30. Cependant, nos essais préliminaires indiquent que C1q est également capable d'interagir avec ces billes d'or, probablement via une interaction avec le nickel, ce qui remet en cause l'utilisation de cette stratégie

V.2. Un modèle cellulaire pour l'interaction

De la même manière que pour l'étude de l'interaction de CR1 avec C3b et C3b₂ (Makrides et al., 1992), nous avons exprimé la construction CR1 CCP 22-30 à la surface de cellules de mammifères déficientes en CR1 afin de tester leur capacité de fixation aux collagènes de défense précédemment identifiés. Un tel modèle nous permettra alors de replacer CR1 dans son contexte cellulaire en mimant les événements pouvant se produire à la surface de monocytes, de macrophages ou d'érythrocytes. (*figure 4.20 A*)

V.2.1. Expression de CR1 CCP 22-30 à la surface des cellules

Nous avons jusqu'à présent exprimé des formes solubles de notre récepteur. La réalisation d'un modèle cellulaire nécessite alors que notre récepteur soit associé à la membrane plasmique, ce qui se traduit dans notre cas par l'ajout de la partie hélicoïdale transmembranaire (Ala¹⁹⁷² à Leu¹⁹⁹⁶) et de l'extrémité C-terminale intracellulaire (Lys¹⁹⁹⁷ à Pro²⁰³⁹). Ne disposant pas de ces séquences au laboratoire, nous avons dû les faire synthétiser et les insérer dans le vecteur pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30. La construction détaillée du plasmide d'expression pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 TM/Cyto est décrite dans le chapitre *matériel et méthodes* de ce manuscrit (*Chapitre 2, section I.3.8*).

Nous disposons au laboratoire de deux lignées cellulaires de type mammifère initialement utilisées pour l'expression de protéines recombinantes : les cellules HEK 293-FTM (cellules humaine) et les cellules CHO-K1 (cellules de hamster). Un tour d'horizon de la bibliographie nous apprend que ni les CHO (Sutterwala et al., 1996), ni les HEK 293-F (Fingerroth et al., 1999) ne semblent exprimer à leur surface le récepteur CR1/CD35, rendant alors possible leur utilisation comme base de notre modèle cellulaire. Il est cependant possible que ces lignées

expriment d'autres récepteurs des collagènes de défense et notamment de C1q (calréticuline, CD91, p33). Nous nous baserons donc sur la différence de fixation entre des cellules exprimant CR1 CCP 22-30 TM/Cyto et des cellules ne l'exprimant pas. Notons que l'expression de cette construction a été précédemment réalisée en cellules CHO par Makrides et collaborateurs (Makrides et al., 1992) pour l'étude de la fixation de C3b et C3b₂ confirmant la faisabilité de notre projet. Nous avons dans un premier temps évalué l'expression de notre construction à la surface des cellules CHO-K1 et HEK 293-FTM. (*figure 4.20*). Afin de tenir compte des modifications induites par l'évènement de transfection, ces cellules sont également transfectées avec un vecteur ne contenant aucune séquence codante (vecteur pcDNA 3.1 sans insert) qui servira de témoin négatif pour l'expression mais également pour les expériences d'interaction. CR1 CCP 22-30 TM/Cyto est bien exprimé dans nos conditions expérimentales dans les deux types cellulaires, comme cela est confirmé par l'analyse en Western Blot des lysats totaux des cellules (*figure 4.20 B*). Pour une même quantité de cellules analysée, l'expression de la protéine semble plus importante dans les cellules HEK 293-F. CR1 CCP 22-30 TM/Cyto semble s'exprimer correctement à la membrane des cellules puisque nous obtenons un signal positif en cytométrie en flux et dans des conditions expérimentales non perméabilisantes (*figure 4.20 C*). Seulement 20 à 30% des cellules CHO-K1 transfectées sont positives pour l'expression de CR1 CCP 22-30 TM/Cyto avec un signal assez étalé, traduisant une expression hétérogène à la surface des cellules (toutes les cellules n'expriment pas la même quantité de CR1). Ce résultat diffère des observations faites par Makrides et collaborateurs qui obtenaient une expression plus homogène lors de l'expression de CR1 CCP 22-30 TM/Cyto à la surface de cellules CHO (Makrides et al., 1992). Dans le cas des HEK 293-F, davantage de cellules expriment CR1 CCP 22-30 TM/Cyto (50-75%) et l'expression semble plus uniforme du fait d'une population bien définie. L'analyse des cellules en immunofluorescence (*figure 4.20 D*) vient appuyer ces résultats puisque nous visualisons dans les deux cas la présence de CR1 CCP 22-30 TM/Cyto en surface et dans des proportions équivalentes à celles précédemment observées. Bien que le marquage semble assez diffus par endroit, nous arrivons à distinguer sur quelques clichés des « spots », suggérant la formation de quelques « clusters » de CR1 CCP 22 TM/Cyto à la surface de ces cellules. Ceci serait en accord avec les précédentes observations de Klickstein et collaborateurs qui avaient noté la formation de « clusters » de CR1 à la surface de cellules COS transfectées avec une construction codant pour le récepteur CR1 (Klickstein et al., 1988). Enfin, aucun signal attribuable à CR1 CCP 22-30 TM/Cyto n'est observé sur les cellules transfectées avec le vecteur vide (témoin négatif).

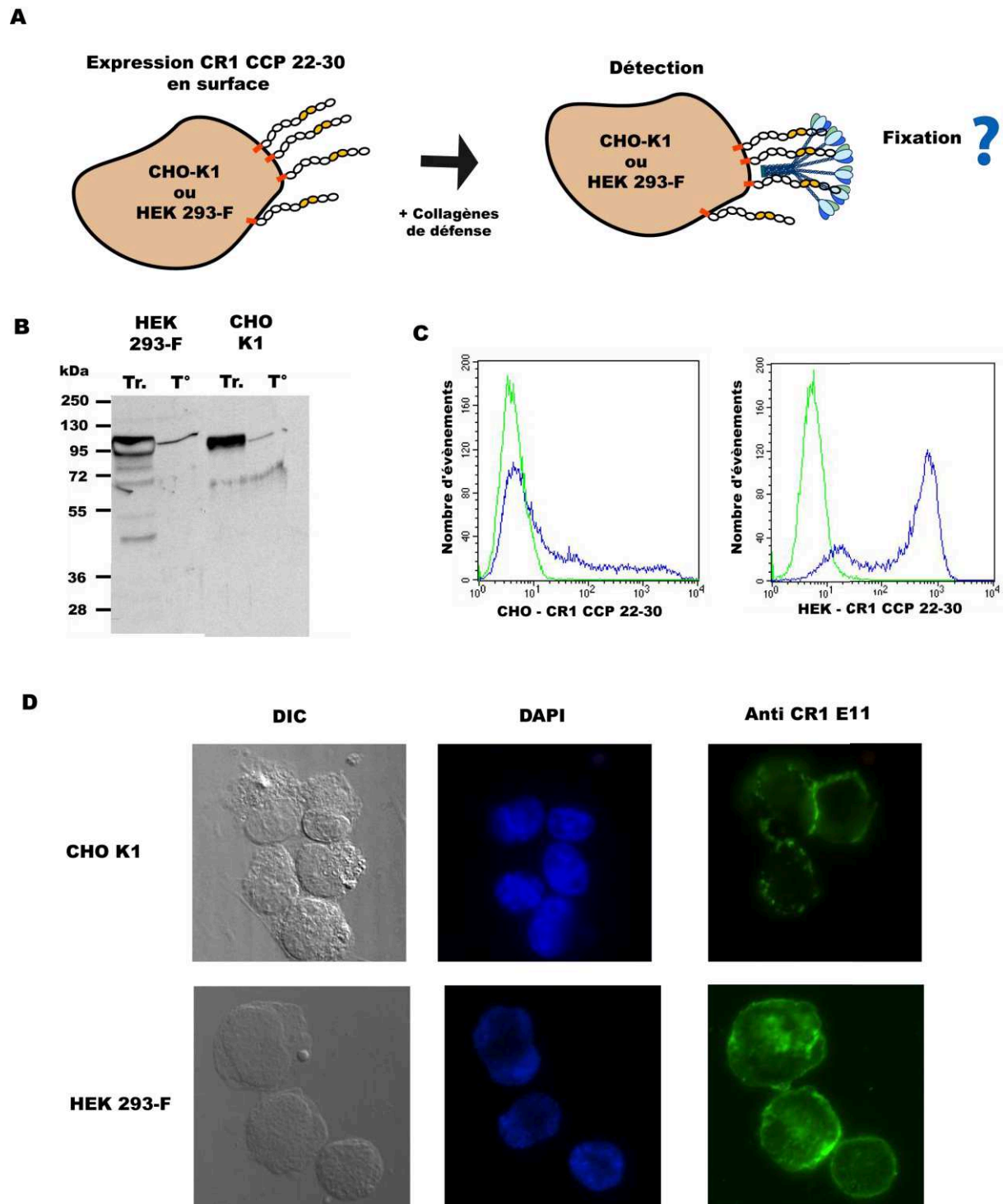


Figure 4.20 : Mise au point du modèle cellulaire pour la mesure de l'interaction CR1 CCP22-30R / Collagènes de défense.

(A) Schéma du modèle cellulaire envisagé. (B) Analyse par Western Blot (anti CR1 H-300) sur SDS-PAGE 10% en condition réduite de 5 µL de lysat total correspondant à 50000 cellules transfectées ou non transfectées par pcDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 TM/Cyto. (C) Analyse par cytométrie en flux de l'expression en surface de CR1 CCP 22-30 avec l'anticorps anti-CR1 E11 sur les cellules transfectées avec le vecteur vide (vert) ou avec pCDNA 3.1 CR1 CCP 22-30 TM/Cyto (bleu). Un total de 20000 évènements est pris en compte pour chaque mesure. (D) Analyse par immunofluorescence de l'expression de CR1 CCP 22-30 à la surface de cellules CHO-K1 et HEK 293-FTM. Le marquage au DAPI permet de révéler le noyau des cellules. Ces images sont représentatives de plusieurs observations.

V.2.2. Interaction avec les collagènes de défense

Dans nos essais préliminaires, C1q et la MBL ont été incubés en présence de cellules CHO-K1 et HEK 293-FTM exprimant ou non CR1 CCP 22-30 TM/Cyto à leur surface. La fixation des collagènes de défense sur les cellules a ensuite été évaluée par cytométrie en flux (*figure 4.21*). Une fixation de C1q est observée sur les cellules CHO-K1 mais nous ne parvenons pas à identifier de différence entre les cellules exprimant CR1 CCP 22-30 TM/Cyto et le témoin négatif (*figure 4.21 A*). Comme il est possible que la présence des anticorps nécessaires au marquage de C1q puisse interférer avec l'interaction des collagènes de défense, nous avons également marqué du C1q avec un fluorophore, l'Alexa 488, afin de procéder à une détection directe. Malheureusement même dans ce cas de figure, nous ne parvenons toujours pas à voir une fixation associée à l'expression du fragment. La fixation basale de C1q sur les cellules CHO-K1 est probablement associée à la reconnaissance d'autres motifs présents à leur surface, ce qui n'est pas impossible puisque C1q est capable d'interagir avec un grand nombre de ligands. C1q étant capable d'interagir avec certaines classes d'anticorps, nous avons également injectés les anticorps primaires et secondaires sans cependant observer le moindre signal, confirmant que ceux-ci n'interviennent pas dans la fixation de C1q observée. A quantité incubée équivalente, la MBL se fixe quant à elle beaucoup plus faiblement à ces cellules que C1q mais ici aussi, aucune différence liée à l'expression de CR1 CCP 22-30 TM/Cyto n'est observée.

Nous avons également évalué la fixation de ces collagènes de défense sur des cellules HEK 293-F (*figure 4.21 B*). Comme CR1 CCP 22-30 TM/Cyto est exprimé de façon plus importante à la surface de ces cellules (*figure 4.20 C*), nous les avons incubées avec des quantités plus faibles de C1q et de MBL. Dans ces conditions, nous observons très peu de fixation et nous n'avons pas été en mesure d'observer la moindre différence associée à l'expression de CR1 CCP 22-30 TM/Cyto. L'incubation avec des quantités plus importantes nous aurait probablement permis d'observer une meilleure fixation basale, mais probablement avec des résultats similaires à ceux obtenus avec les cellules CHO-K1.

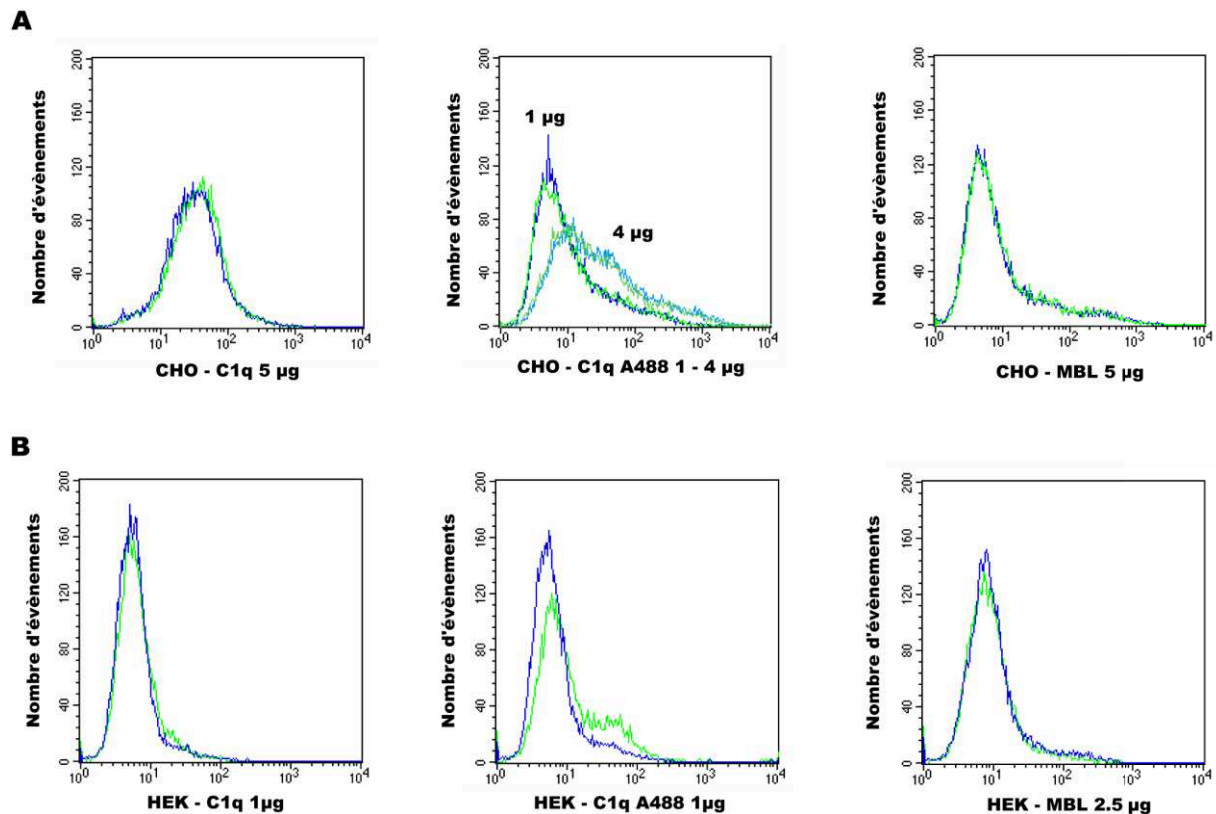


Figure 4.21: Interaction de C1q et de la MBL avec CHO-K1 ou HEK 293-F exprimant CR1 CCP22-30 à leur surface.

Analyse par cytométrie en flux de la fixation de C1q, C1q Alexa488 et MBL sur les cellules CHO-K1 (A) et HEK 293-FTM (B) exprimant CR1 CCP 22-30 TM/Cyto en surface (courbe bleue) ou non (courbe verte). Un total de 20000 évènements est pris en compte pour chaque mesure. Les quantités incubées sont indiquées pour chacune des expériences.

Nous n'avons pas été en mesure de montrer l'interaction de C1q ou de la MBL à la surface de nos cellules exprimant CR1 CCP 22-30 TM/Cyto. Comme il s'agit d'essais préliminaires, nos conditions expérimentales (tampon, température, quantité) n'étaient probablement pas adaptées. Il est également possible que le nombre de récepteurs par cellule (densité) et leur répartition ne soient pas favorables à l'établissement de l'interaction. La formation de cluster de CR1 CCP 22-30 apparaît notamment comme un critère décisif pour assurer la fixation des collagènes de défense. De plus, l'effet de la température sur la taille des clusters a déjà été mentionné dans la littérature (Chen et al., 2007). Le test de nouveaux types cellulaires, l'enrichissement en cellules exprimant le récepteur (établissement de lignées stables) et la quantification du nombre de récepteurs par cellule sont autant de pistes à exploiter pour optimiser et obtenir des résultats concluants avec notre modèle cellulaire. Nous pouvons également envisager de réaliser un modèle cellulaire exprimant le récepteur CR1/CD35 dans sa totalité.

Chapitre 5 : Discussion et perspectives

Contexte

Ce projet de thèse, débuté en octobre 2009, a été l'occasion de s'intéresser à deux récepteurs des collagènes de défense, la calréticuline du parasite *T. cruzi* (TcCRT) et le récepteur du complément 1 (CR1/CD35) présents à la surface de cellules humaines. A la fois proches par leurs ligands respectifs, ces deux récepteurs se distinguent par leur structure, leur origine et leurs fonctions. Alors que l'interaction des collagènes de défense avec la TcCRT semble impliquée dans les **mécanismes d'évasion** du pathogène *T. cruzi* (inactivation du complément, internalisation), celle avec CR1 contribue probablement aux **mécanismes de phagocytose**, soit directement (opsonisation), soit indirectement (induction de la synthèse de médiateurs solubles). La finalité de cette thèse a été de préciser le mode d'interaction des collagènes de défense avec la TcCRT et CR1. Pour cela, nous nous sommes fixés plusieurs objectifs à atteindre. Pour la TcCRT, nous nous sommes intéressés (1) à l'identification des domaines de la TcCRT impliqués dans l'interaction avec les collagènes de défense ainsi qu'à (2) la production d'un fragment recombinant cristallisable nous permettant d'obtenir une structure à haute résolution. Cette structure pourra ensuite être comparée à celle de la calréticuline humaine pour expliquer les différences fonctionnelles observées. Pour CR1, nos objectifs étaient (1) de vérifier les hypothèses émises quant à l'interaction avec C1q et la MBL grâce à la production du fragment recombinant CR1 CCP 22-30, (2) d'identifier de nouveaux ligands de CR1, (3) de localiser le site d'interaction dans les collagènes de défense et dans CR1.

Les projets TcCRT et CR1 ont pu être démarrés en parallèle dès mon arrivée en thèse, me permettant ainsi de jongler facilement entre les deux en fonction de leur avancement propre. J'ai pu bénéficier pour la TcCRT de résultats d'essais préliminaires d'expression avec la construction fournie par notre collaborateur chilien A. Ferreira et de l'expérience accumulée avec le travail effectué sur la calréticuline humaine. Le projet CR1 était quant à lui à un stade très précoce car nous avions uniquement en notre possession un plasmide contenant l'ADN du récepteur.

I. TcCRT, quand l'homologie ne fait pas tout

Pour le sujet portant sur la calréticuline de *T. cruzi*, nous nous sommes inspirés de la stratégie utilisée pour l'étude de la calréticuline humaine (Chouquet et al., 2011; Paidassi et al., 2011), le domaine N des deux protéines présentant notamment une forte similarité. Nos premiers essais pour produire la forme entière ou les formes tronquées se sont soldés par l'impossibilité d'obtenir la protéine sous forme monomérique, et ceci malgré un certain nombre d'optimisations. Il aura fallu encore de nombreux autres essais (optimisation de la séquence de la TcCRT, modification des limites des domaines) pour parvenir à un échantillon compatible avec des études fonctionnelles et cristallographiques, c'est-à-dire pur, produit en quantité suffisante et homogène (monomérique). Du fait de l'homologie entre la calréticuline humaine et celle de *T. cruzi* (43 % d'identité avec la séquence Q4CPZO), nous avons supposé que l'utilisation des mêmes délimitations que celles utilisées pour les fragments issus de la HuCRT (ΔP , $\Delta P/\Delta C$) suffirait à nous conduire à des résultats similaires. Il semble cependant que ceci ne soit possible que lorsque l'identité entre les deux protéines est forte, comme cela a été observé entre la calréticuline humaine et celle de souris. Ces protéines ont en commun plus de 93% de résidus et les études structurales menées par deux équipes distinctes ont conduit au choix de limites de domaines identiques (Chouquet et al., 2011; Kozlov et al., 2010). Avec seulement 43 % d'identité, on comprend d'autant mieux pourquoi le projet TcCRT a nécessité autant de mise au point et d'optimisation. Ces problèmes d'expression étant maintenant résolus, les prochains défis seront d'obtenir des cristaux permettant d'étudier la structure de cette calréticuline et de la comparer à celle de son homologue humaine. Un volet fonctionnel est également à l'étude pour préciser les modalités d'interaction de la TcCRT avec les collagènes de défense, qui est supposé impliquer un site localisé dans le domaine S de la protéine (Ferreira et al., 2004).

II. CR1, récepteur des collagènes de défense

II.1. C1q et la MBL se fixent bien au niveau des CCP 22 -30 de CR1

Plusieurs études ont confirmé au cours des deux dernières décades le rôle de CR1 comme récepteur de C1q et de la MBL (Ghiran et al., 2000; Klickstein et al., 1997; Tas et al., 1999; Tetteh-Quarcoo et al., 2012). Un faisceau d'informations a permis de localiser le site d'interaction de C1q et de la MBL dans les modules CCP 22-30 de CR1. Tetteh-Quarcoo et collaborateurs suggèrent que C1q pourrait également se fixer au niveau des modules CCP 15-17 (site 2). Ces résultats sont en total désaccord avec ceux de Tas et collaborateurs qui ont montré que la fixation d'anticorps Fab' reconnaissant le site 2 ou la fixation de C3b (ligand du site 2) n'empêchaient pas la fixation de C1q à CR1. Nous fournissons ici un autre élément prouvant que les CCP 22-30 de CR1 sont bien impliqués dans l'interaction avec C1q et la MBL. Nous avons produit en cellules de mammifères (HEK 293-FTM) et en cellules d'insectes (High FiveTM) puis caractérisé un fragment recombinant de CR1 contenant les modules CCP 22 à 30. A notre connaissance, aucune autre équipe n'avait produit à ce jour ce fragment sous forme recombinante, si ce n'est à la surface de cellules pour étudier l'interaction avec C3b et C4b (Klickstein et al., 1988; Reilly et al., 1994). Nous avons montré que C1q et la MBL se fixent à CR1 et à CR1 CCP 22-30 avec une affinité comparable, de l'ordre du nanomolaire, et ceci par deux méthodes différentes dans le cas de C1q. Nous rejoignons donc l'hypothèse de Klickstein et collaborateurs mais n'excluons pas la possibilité d'un second site d'interaction (en dehors des CCP 22-30) ou d'effets stabilisateurs de la molécule entière. En effet, dans le cas de C1q nous avons observé par ELISA une fixation plus forte et une meilleure affinité sur la partie extracellulaire de CR1 que sur le fragment CR1 CCP 22-30. Bien que ceci n'ait pas été observé par SPR, nous laissons cependant ouverte la question d'un second site.

II.2. Les ficolines, nouveaux ligands de CR1

Le fait que CR1 soit un récepteur pour C1q et la MBL nous a amenés à supposer qu'il pourrait également être un récepteur pour les ficolines, des collagènes de défense découverts plus récemment. Nous apportons ici la première preuve d'une interaction directe entre CR1 et les ficolines L, H et M, interaction prenant place également au niveau des modules CCP 22-30 de CR1. Dans le cas de la ficoline L, les constantes cinétiques déterminées par SPR sont similaires à celles déterminées pour C1q et la MBL, que ce soit pour CR1 ou son fragment. Ce résultat confirme donc le rôle central de CR1 en tant que récepteur principal des opsonines (C3b, C4b, C1q, MBL et maintenant les ficolines L, H et M), comme cela avait été suggéré

par Ghiran et collaborateurs (Ghiran et al., 2000). Il s'agit également d'une preuve supplémentaire quant à l'implication des modules CCP 22-30 dans l'interaction avec ces collagènes de défense.

III. Vers une meilleure compréhension de ces interactions

L'autre objectif de ce travail était de déterminer avec plus de précision quels étaient les sites de fixation, à la fois sur les collagènes de défense et sur CR1 CCP 22-30. Nous avons pu bénéficier pour cela de nombreux outils développés au laboratoire (variants des collagènes de défense, protéases associées) ayant déjà permis d'étudier l'interaction des collagènes de défense avec d'autres récepteurs comme CD91 et la calréticuline (Duus et al., 2010).

III.1. Quand le choix du partenaire immobilisé compte

En immobilisant CR1 ou CR1 CCP 22-30, nous avons été en mesure d'observer une interaction avec les différents collagènes de défense testés. Cependant, lorsque C1q, la MBL ou la ficoline L étaient à leur tour immobilisés (configuration inverse), nous n'avons visualisé que de très faibles niveaux d'interactions avec CR1 ou CR1 CCP 22-30, et ceci même lorsque CR1 CCP 22-30 était injecté à 1 μ M ou CR1 à 100 nM (résultats non montrés). Les autres auteurs s'étaient déjà retrouvés confrontés à ce problème, n'observant une fixation à C1q immobilisé que pour de fortes concentrations en CR1 (435 à 3480 nM) et obtenant des K_D de l'ordre du μ M (Klickstein et al., 1997; Tetteh-Quarcoo et al., 2012). Cette faible affinité de CR1 pour les collagènes de défense est expliquée par une plus faible valence de CR1 (1 site potentiel) par rapport aux collagènes de défense (1 site par tige collagène soit de 4 à 6 sites en moyenne). Elle explique notamment pourquoi nous n'avons visualisé par microscopie électronique que peu de complexes entre CR1 CCP 22-30 et C1q, la MBL et la ficoline L, les différents constituants étant incubés en solution avant d'être analysés. Il faut donc que CR1 soit immobilisé sur une surface pour que son affinité soit optimale, rejoignant l'idée que le regroupement de molécules de CR1 (clusters) à la surface de cellules potentialise son activité comme cela a été montré pour l'élimination des complexes immuns (Pascual and Schifferli, 1993).

III.2. Du côté des collagènes de défense

Nos résultats indiquent que la partie collagénique de C1q, de la MBL et de la ficoline L semble être le site principal d'interaction avec CR1. Des observations similaires avaient été rapportées avec C1q (Klickstein et al., 1997) mais aucun élément ne précisait si les têtes globulaires de C1q (GR) pouvaient également être impliquées dans cette interaction. Nous apportons ici l'évidence que les GR de C1q interagissent également avec CR1 et CR1 CCP 22-30, à hauteur d'au moins 20-40 % du signal et ceci sans tenir compte du phénomène d'avidité. CR1 est une protéine possédant de nombreuses charges (Lys, Arg, His, Asp, Glu), représentant environ 21% de sa séquence totale (domaine extracellulaire), et dont la plupart sont exposées en surface. Une même proportion de charges est également observée au niveau des modules CCP 22 à 30. Comme C1q est une molécule reconnaissant (par ses GR) des motifs chargés à la surface de ses ligands (Gaboriaud et al., 2003), il n'est donc pas inconcevable d'observer une contribution des têtes globulaires de C1q. Ce résultat peut également expliquer pourquoi Tetteh et collaborateurs ont observé une interaction au niveau des CCP 15-17 de CR1 (Tetteh-Quarcoo et al., 2012). En effet, il est possible que cette interaction soit liée exclusivement aux têtes globulaires de C1q, les CLF n'étant alors pas impliqués dans l'interaction. La calréticuline est elle aussi capable de fixer C1q par ses GR ou ses CLF, ces interactions ayant contribué à la désigner comme un signal « eat-me » à la surface des cellules apoptotiques (Paidassi et al., 2011). Nous n'avons encore aucune idée du rôle que pourrait jouer la reconnaissance de CR1 par les têtes globulaires de C1q. Il n'y a cependant que peu de chances que celle-ci participe à la reconnaissance et à l'élimination des cellules apoptotiques comme dans le cas de la calréticuline (Paidassi et al., 2011). En effet, il a été montré que l'expression de CR1 à la surface de neutrophiles était diminuée lors de l'apoptose (Hart et al., 2000). Nous avons également observé une contribution significative du domaine fibrinogène de la ficoline L mais celle-ci reste minoritaire par rapport à celle de C1q. Le domaine C-lectine de la MBL n'interagit quant à lui que très faiblement, rejoignant ainsi des observations faites précédemment (Ghiran et al., 2000).

L'implication majoritaire des parties collagéniques dans l'interaction avec CR1 a également été confirmée par l'inhibition totale (MBL) ou partielle (C1q et ficoline L) de la fixation de C1q, de la MBL et de la ficoline L en présence d'un excès moyen 1 : 1 en dimère de MASP-3. Les inhibitions partielles observées s'expliquent par la contribution des domaines globulaires de C1q et de la ficoline L dans l'interaction. Notre hypothèse est que la formation du

complexe avec MASP-3 bloque complètement l'accès de CR1 à son site d'interaction dans les parties collagéniques. CR1 ne serait pas non plus capable de déplacer la protéase du complexe car, si le cas se présentait, nous observerions alors un équilibre entre la fixation de CR1 et celle de MASP-3, leurs affinités respectives pour C1q, la MBL et la ficoline L étant du même ordre de grandeur (nM). Cela nécessiterait alors d'augmenter le rapport en dimère pour atteindre l'inhibition maximale observée et ne serait pas compatible avec le rapport 1 : 1 calculé ici.

Notre hypothèse situerait donc le site d'interaction de CR1 au niveau ou à proximité du site d'interaction des MASPs dans les collagènes de défense, sans toutefois oublier qu'une interaction avec les têtes globulaires est présente pour C1q et vraisemblablement pour la ficoline L. Dans la MBL et la ficoline L, ce site est localisé respectivement au niveau des Lys⁵⁵ et Lys⁵⁷. Pour C1q, le site de fixation de MASP-3 est supposé être le même que celui prédit pour C1r₂C1s₂, c'est-à-dire au niveau des Lys⁵⁹ (chaîne A), Lys⁶¹ (chaîne B) ou Lys⁵⁸ (chaîne C). Les positions de ces lysines sont indiquées dans l'alignement de la *figure 5.1*. Dans le cas de la MBL, l'implication de la lysine⁵⁵ dans l'interaction a été clairement établie puisque les mutants K55E et K55A ne se fixent plus à CR1 ou à CR1 CCP 22-30. La Lys⁵⁵ de la MBL pourrait donc être impliquée dans une liaison ionique avec certains résidus chargés négativement de CR1 (Glu, Asp) situés au niveau des modules CCP 22-30. Cette hypothèse pourrait être également élargie aux lysines de la ficoline L et de C1q, mais également à celles des ficolines H (Lys⁴⁷) et M (Lys⁵⁴) dont le rôle doit encore être évalué par des essais d'interaction de mutants ou de compétition avec MASP-3.

L'implication d'interactions ioniques entre CR1 et ces collagènes de défense est également soutenue par la forte sensibilité au sel de la fixation de C1q, de la MBL et de la ficoline L. Nous n'excluons pas la possibilité que d'autres résidus à proximité des lysines puissent participer à la stabilisation de l'interaction avec CR1, à l'image de ce qui est observé pour la fixation des MASPs sur la MBL (Teillet et al., 2007). Ceci est notamment vrai pour la ficoline L dont l'interaction est moins influencée par l'augmentation de la force ionique que la MBL, suggérant que d'autres résidus (en plus de la Lys⁵⁷) pourraient intervenir. A ce titre, des résidus chargés tels que des arginines, des lysines et des acides glutamiques sont retrouvés en amont de la Lys⁵⁷ de la ficoline L.

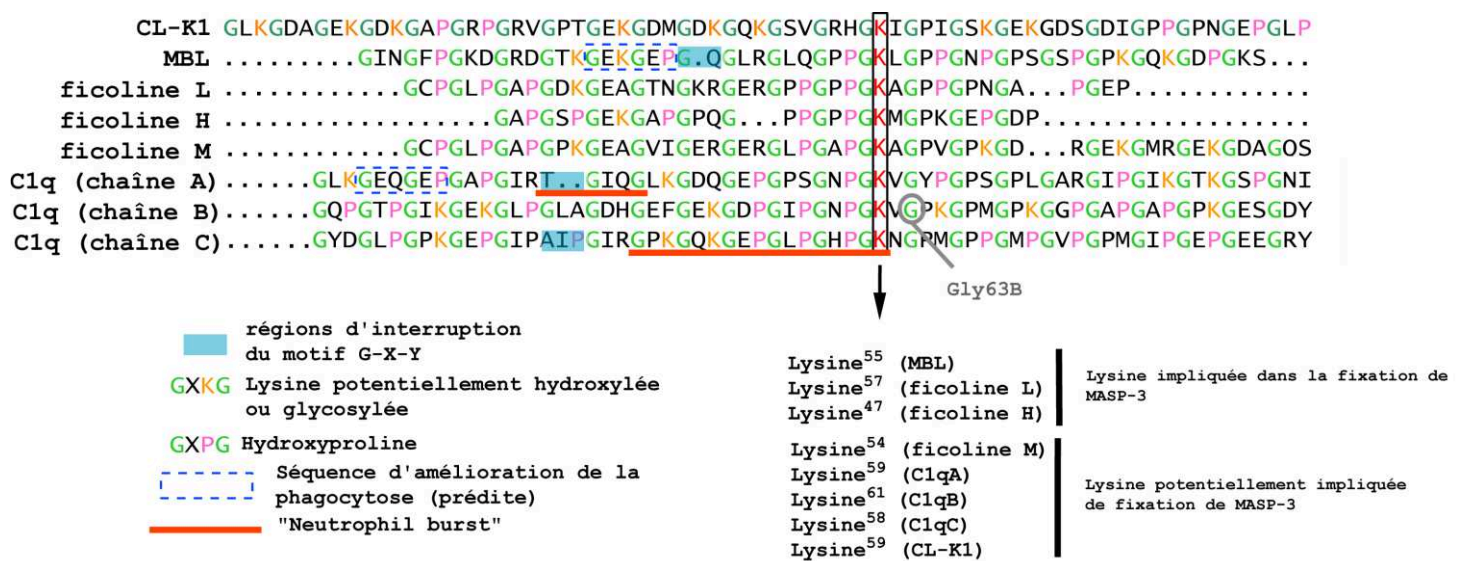


Figure 5.1 : Alignement des séquences des tiges collagènes de C1q, de la MBL, de CL-K1 et des ficolines.

Les interactions entre les collagènes de défense et leurs récepteurs peuvent être impliquées dans le processus de phagocytose, soit directement (opsonisation) soit indirectement (signalisation cellulaire). Une séquence améliorant l'efficacité de la phagocytose (*figure 5.1*) est retrouvée dans la tige collagénique de la MBL à proximité de l'interruption de la séquence G-X-Y (Arora et al., 2011). Ces six résidus successifs (GEKGEF) pourraient être impliqués dans l'interaction entre la MBL et CR1, mais cette possibilité nous semble peu envisageable. En effet, cette séquence est éloignée du site de fixation des MASP et nous avons vu que la mutation de la Lys⁵⁵ avait un effet drastique sur l'interaction entre la MBL et CR1. Il reste aussi la possibilité que CR1 interagisse avec la MBL par le site de fixation des MASPs et présente alors la séquence GEKGEF à d'autres récepteurs (non identifiés), induisant ainsi une amélioration de l'efficacité de la phagocytose. Des séquences similaires sont également retrouvées dans les chaînes A, B et C de C1q et dans les ficolines. Il est cependant difficile de conclure compte-tenu que les résidus clés de cette séquence n'ont pas encore été clairement identifiés. Certains résidus de C1q sont impliqués dans la libération rapide de radicaux libres par les neutrophiles (« neutrophil burst ») (Ruiz et al., 1999). Ils pourraient également constituer un site de fixation potentiel pour CR1, notamment ceux situés dans la continuité de la Lys⁵⁸ de la chaîne C (*figure 5.1*). Ce site englobe en partie le site potentiel de fixation de C1r₂C1s₂ et donc de CR1. Un récepteur hypothétique, C1qR₀₂, présent à la surface des neutrophiles est supposé interagir avec C1q et conduire à la libération des radicaux libres.

Bien que la calréticuline soit un candidat potentiel, il serait intéressant d'étudier également la possibilité que CR1 puisse intervenir dans ce mécanisme. Cette hypothèse est notamment étayée par le fait qu'une interaction multivalente de C1qR₀₂ avec C1q semble nécessaire pour conduire au « neutrophil burst » (Tenner and Cooper, 1982), à l'image du type d'interaction attendue entre CR1 et les collagènes de défense.

III.3. CCP 24-25, un site potentiel de fixation

La production de différents variants du fragment CR1 CCP 22-30, raccourci en position N- ou C-terminale d'un nombre variable de modules CCP, et l'analyse de leur interaction avec C1q, la MBL et la ficoline L nous ont permis d'identifier un site potentiel pour la fixation de ces collagènes de défense. Les constructions dépourvues des modules CCP 24 et/ou 25 présentent une capacité de fixation fortement réduite par rapport à la molécule entière, la suppression des autres modules n'ayant pas un impact aussi important. Sur la base de ces expériences, nous émettons alors l'hypothèse que les modules CCP 24-25 seraient le site potentiel de fixation des parties collagéniques de C1q, de la MBL et de la ficoline L sur CR1 CCP 22-30. Les modules CCP de CR1 ont été classés en 4 groupes (a, b, c et d) en fonction de critères se basant sur l'homologie. Il est intéressant de noter que sur le LHR-D (CCP 22 à 28), les modules CCP 26 à 28 présentent la même homologie que les modules CCP 19 à 21 du LHR-C, alors que les modules CCP 22 à 25 sont uniques et divergent fortement des autres CCPs de CR1 (Klickstein et al., 1988; Barlow et Soares, 2005). Cette divergence suggère un rôle spécifique pour ces modules CCP et est donc en accord avec notre hypothèse expérimentale concernant l'implication des modules CCP 24-25 dans l'interaction avec les collagènes de défense. Notons que la délétion des modules CCP 22-23 n'a aucun effet sur la fixation. Notre hypothèse est également appuyée par la localisation de plusieurs polymorphismes de CR1 (ceux associés au système du Knops group : KN1/2, KN3/6, KN4/7, KN8, KN9) sur ces deux modules CCP (*figure 5.3 A*). Certains de ces polymorphismes (S1610T, K1590E/R1601G) ont même été associés à des pathologies dans lesquelles les collagènes de défense sont susceptibles d'être impliqués. Les variants K1590E/R1601G, bien que conduisant localement à la perte de plusieurs charges positives, ne semblent avoir aucun effet sur la fixation de C1q sur un fragment contenant les modules CCP 15 à 25 de CR1 (Tetteh-Quarcoo et al., 2012). Ce résultat n'est cependant pas incompatible avec nos observations puisque nous pensons que ce sont des charges négatives de CR1 qui sont responsables de l'interaction avec les collagènes de défense et non un patch positif comme dans ce cas de figure.

III.4. Quelles hypothèses pour l'interaction ?

Nous supposons que l'interaction entre CR1 et les collagènes de défense met en jeu au moins une interaction ionique entre la lysine essentielle pour la fixation des MASPs (vérifié pour la MBL et supposé pour les autres) et un ou des résidus chargés négativement (patch) à la surface des modules CCP 24-25. Afin d'identifier des charges négatives (Glu ou Asp) pouvant être impliquées dans cette interaction, nous avons aligné l'ensemble des modules CCP de CR1 et observé si de tels résidus étaient présents spécifiquement dans les CCP 24 et 25 (figure 5.2).

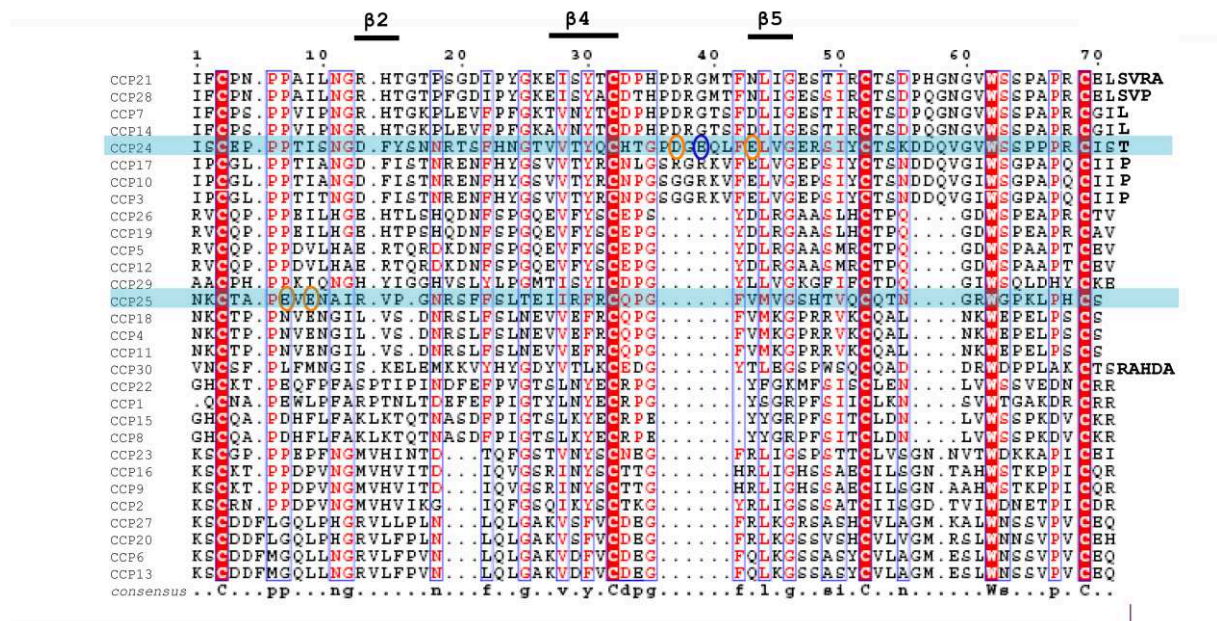


Figure 5.2 : Alignement entre les modules CCP de CR1

Les charges négatives identifiées dans les modules CCP 24 et 25 de CR1 sont indiquées par des cercles oranges et bleu dans le cas précis de Glu¹⁵⁵⁵.

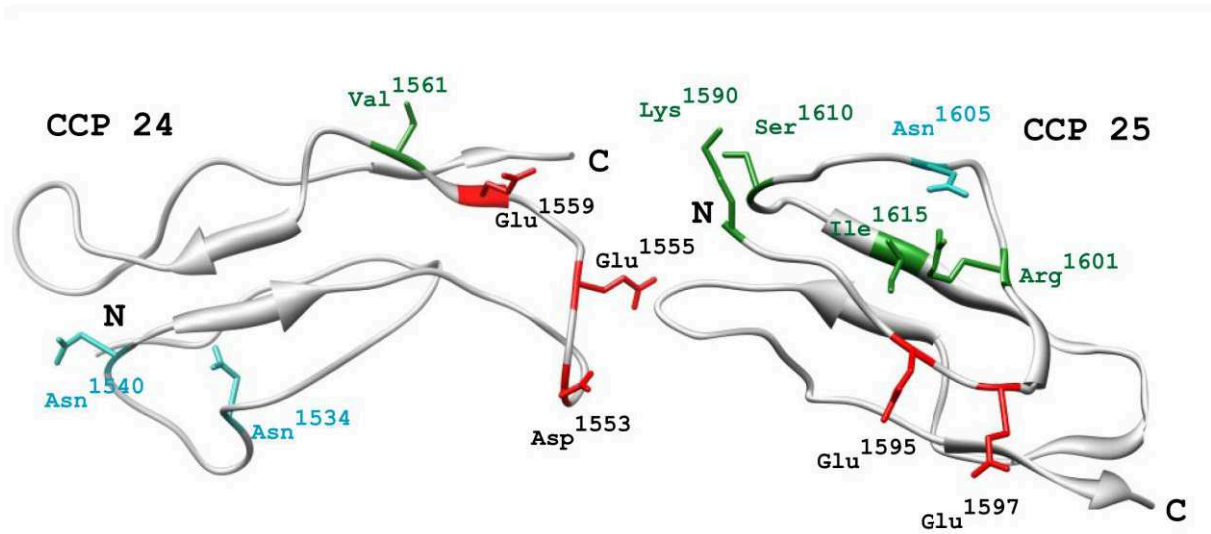
Le résidu Glu¹⁵⁵⁵ semble spécifique du CCP 24 car il n'est retrouvé dans aucun autre module CCP. De plus, il est présent sur une large boucle bien exposée au solvant, entre les brins β4 et β5 (figure 5.3 A), qui n'est partagée que par un nombre restreint de modules CCP (CCPs 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24 et 28). Avec les résidus Asp¹⁵⁵³ et Glu¹⁵⁹⁹ situés à proximité, le résidu Glu¹⁵⁵⁵ forme alors un « patch » de charges négatives qui est spécifique du CCP 24 (patch 1). Dans les boucles des autres modules, ce patch est interrompu par des charges positives. Dans le CCP 25, deux acides glutamiques (Glu¹⁵⁹⁵ et Glu¹⁵⁹⁷) sont situés à proximité l'un de l'autre juste avant le brin β2 (figure 5.3 A). Bien que la présence de ces charges, prises

individuellement, ne soit pas spécifique du CCP 25, une telle proximité entre ces deux résidus n'est retrouvée que sur le CCP 25 (patch 2).

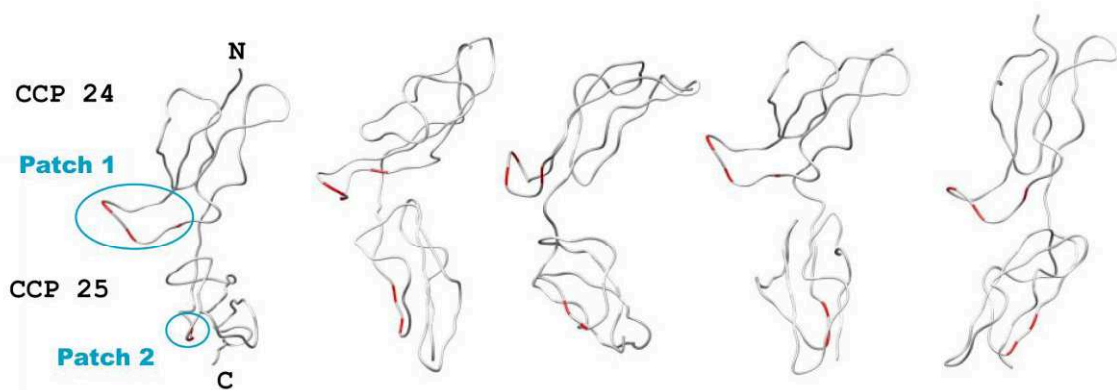
Notons que les sites potentiels de N-glycosylation (Asn¹⁵³⁴ et Asn¹⁵⁴⁰) sont situés à l'opposé du patch 1 dans le CCP 24 et ne devraient donc pas perturber une interaction potentielle. Dans le cas du CCP 25, la situation est moins évidente car le seul site potentiel de N-glycosylation présent est localisé sur la même face que le patch 2. La présence d'un sucre N-lié pourrait alors gêner l'interaction même si cela est peu probable, le sucre pouvant s'orienter différemment ou ne pas être présent (comme nous le supposons dans le *Chapitre 4, section IV.2*). Ces deux patches seraient donc deux candidats potentiels pour l'interaction avec la lysine du fragment collagénique. Leur orientation dans l'espace, présentée dans la *figure 5.3 B*, est obtenue à partir des modèles de CR1 générés par SAXS (Furtado et al., 2008). En fonction des modèles, ces patches sont, soit sur une même face, soit sur des faces opposées. Ces deux patches sont cependant trop éloignés l'un de l'autre pour être impliqués ensemble dans l'interaction avec une même lysine. La tige collagénique est composée de l'assemblage de 3 polypeptides identiques contenant chacun une lysine. Dans cette configuration, 2 lysines (possédant un certain degré de liberté) peuvent alors être situées sur un même plan, suggérant que les deux patches pourraient alors intervenir chacun dans une liaison individuelle avec une lysine, comme suggéré dans la *figure 5.3 C*.

Au vu du caractère unique du résidu Glu¹⁵⁵⁵, de sa présence sur une large boucle exposée au solvant et de son éloignement des sites potentiels de N-glycosylation, nous aurions cependant tendance à favoriser l'idée que ce résidu constituerait le site principal de l'interaction. Cette hypothèse est étayée par le fait que nous avons observé une perte de fixation plus importante de la MBL et de la ficoline L dans les constructions où le CCP 24 était absent, cette différence étant plus délicate à évaluer dans le cas de C1q. Le patch présent sur le CCP 25 pourrait quant à lui être impliqué dans d'autres interactions ioniques qui restent à définir, et notamment dans une interaction avec une autre lysine de la tige collagénique.

A



B



C

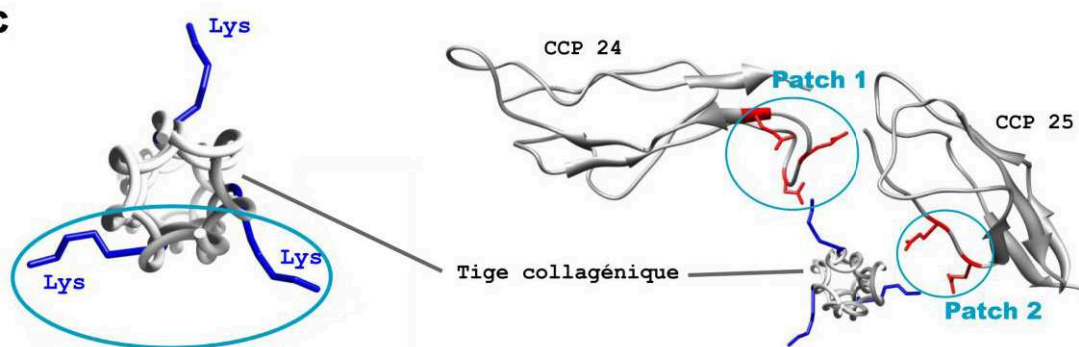


Figure 5.3 : Représentation structurale des modules CCP 24-25 de CR1

(A) Représentation individuelle des modules CCP 24 et 25. Les charges négatives proposées pour l'interaction avec les collagènes de défense sont indiquées en rouge, les polymorphismes en vert et les asparagines potentiellement N-glycosylées en cyan. (B) Orientation dans l'espace des modules CCP 24 et 25 d'après les différents modèles structuraux obtenus par SAXS (Furtado et al., 2008). Les charges négatives proposées pour l'interaction avec les collagènes de défense sont indiquées en rouge. (C) (à gauche) Représentation structurale de la triple hélice de collagène. D'après (Gingras et al., 2011). (à droite) Possible modèle d'interaction entre les modules CCP 24-25 de CR1 et les lysines de la triple hélice de collagène. Les lysines sont représentées en bleu et les résidus acides en rouge. Modèles structuraux des modules CCP 24-25 d'après (Soares et al., 2005).

IV. Conclusion générale et perspectives

CR1 serait donc le récepteur principal des opsonines capable d'interagir avec C4b et C3b, mais également avec l'ensemble des collagènes de défense (C1q, MBL, ficolines). En accord avec les précédentes observations, les modules CCP 24-25 de CR1 constitueraient un site potentiel d'interaction avec les collagènes de défense. Une interaction ionique entre les lysines impliquées dans la fixation des protéases et des résidus chargés négativement comme le résidu Glu¹⁵⁵⁵ du CCP 24 est proposée. Ces premiers résultats ouvrent le champ à de futures études pour élucider de façon détaillée le mécanisme d'interaction entre CR1 et les collagènes de défense. Il s'agira notamment de répondre aux questions suivantes :

- Existe-t-il d'autres sites d'interaction dans le reste de la molécule ?
- Quels sont les résidus clés de cette interaction ? Glu¹⁵⁵⁵ ? Sont-ils identiques pour tous les collagènes de défense ?
- Plusieurs lysines de la triple hélice collagénique sont-elles impliquées ?
- Pouvons-nous généraliser nos résultats à la ficoline H et M ?
- Comment s'organisent dans l'espace les CCP 24 et 25 ?

Nous pouvons opter pour une stratégie par mutagenèse dirigée et évaluer notamment l'impact de la modification des résidus chargés négativement des modules CCP 24-25 sur l'interaction avec les collagènes de défense. Il serait également intéressant de résoudre la structure des modules CCP 24-25, éventuellement en complexe avec un peptide collagénique portant le site de fixation des MASPs, comme cela a été réalisé récemment pour l'étude de l'interaction entre le module CUB2 de MASP-1 et la partie collagénique de la MBL (Gingras et al., 2011). Ces structures constitueraient un réel atout pour élucider l'interaction de CR1 avec les collagènes de défense et évaluer l'impact des polymorphismes identifiés. Le développement d'un modèle cellulaire de l'interaction, dont les premiers essais ont été effectués au cours de cette thèse, serait aussi une voie intéressante d'étude dans laquelle CR1 serait replacé dans son contexte cellulaire et notamment au sein d'un cluster.

Ces nouveaux résultats conduisent également à d'autres perspectives intéressantes. Récemment, il a été montré que la collectine CL-K1, un collagène de défense possédant une structure similaire à la MBL, était capable de fixer MASP-3 (Hansen et al., 2010).

Une lysine (Lys⁵⁹) est également identifiée dans sa séquence au même niveau que la Lys⁵⁵ de la MBL (*figure 5.1*), suggérant que CL-K1 pourrait se fixer par ses parties collagéniques à CR1. Il serait donc intéressant d'évaluer la fixation de cette nouvelle collectine sur CR1 et sur nos constructions.

L'interaction de CR1 avec l'ensemble des collagènes de défense activant le complément renforce également son rôle dans de nombreux processus biologiques. Par ces interactions, CR1 pourrait contribuer à la phagocytose de pathogènes, à l'élimination des cellules apoptotiques et des complexes immuns, soit directement en participant à des « synapses phagocytaires », soit indirectement en transmettant un signal cellulaire conduisant à différentes manifestations (synthèse de cytokines, régulation de gènes). L'incapacité de déplacer les collagènes de défense en complexe avec les protéases suggère cependant que ces rôles ne pourraient être exercés que localement (lors de la synthèse de C1q par des macrophages par exemple), ou nécessiteraient la présence de régulateurs comme C1-INH pour décrocher les protéases et permettre l'interaction avec CR1. Des polymorphismes, que ce soit au niveau du site de fixation dans les collagènes de défense ou dans CR1, pourraient alors influencer ces différents processus biologiques et contribuer à certaines pathologies. La mutation Gly63Ser dans la chaîne B de C1q, retrouvée chez un patient atteint de SLE, empêche la fixation du tétramère C1r₂C1s₂ (Roumenina et al., 2011). Il n'est alors pas inconcevable que cette mutation influence également la fixation de C1q sur CR1, conduisant à une possible diminution de la capacité d'élimination des complexes immuns et favorisant ainsi le développement du SLE. De même, la MBL et C1q sont impliqués dans l'élimination des feuillets β -amyloïdes, suggérant alors que CR1 pourrait également être impliqué dans ce mécanisme. Cette possibilité est d'autant plus plausible qu'un polymorphisme situé dans le LHR-D au niveau du module CCP 25 (Ser1610Thr) a été très récemment identifié (par des études d'association sur l'ensemble du génome ou GWAS) comme un des facteurs de risque dans le déclin de la mémoire épisodique (mais également avec une diminution de la vitesse de perception et de la mémoire sémantique) associés à la maladie d'Alzheimer, une pathologie caractérisée par l'accumulation de ces feuillets β -amyloïdes (Keenan et al., 2012). Bien que la mutation d'une sérine en thréonine ne soit pas, à première vue, déstabilisante pour le CCP 25, ce polymorphisme est associé à la synthèse d'anticorps spécifiques ce qui suggère néanmoins que le changement structural peut être significatif (Moulds et al., 2002). Dans notre cas de figure, la mutation S1610T pourrait alors soit diminuer ou empêcher la fixation de la MBL et de C1q, soit déstabiliser la molécule de CR1 et diminuer sa présence à la surface cellulaire. Ce

polymorphisme pourrait alors conduire à une diminution de l'efficacité d'élimination des feuillets β -amyloïdes, médiée par C3b et par la MBL et C1q, et contribuer ainsi à l'aggravation de la maladie d'Alzheimer. Ce mécanisme n'est cependant pas exclusif puisque d'autres polymorphismes dans la molécule de CR1 (*chapitre I, section IV.5.2*), ainsi que dans d'autres molécules (APOE ϵ 4, CLU, PICALM), ont été associés avec une susceptibilité accrue aux formes tardives de la maladie de Alzheimer.

Ainsi, avec le développement de notre expertise sur l'interaction entre CR1 et les collagènes de défense, il serait alors intéressant d'évaluer l'impact de ces différents polymorphismes au niveau moléculaire sur la fixation des collagènes de défense et sur l'expression de CR1 à la membrane.

V. Le mot de la fin

Le travail réalisé au cours de cette thèse a permis d'aller plus loin dans la compréhension de l'interaction entre CR1 et les collagènes de défense, un sujet dont l'intérêt faiblissait depuis quelques années et qui méritait quelques mises à jour. Il constitue également une base pour de nouvelles études qui contribueront ainsi à une meilleure compréhension du rôle de ces interactions dans les différents mécanismes biologiques où elles sont impliquées.

Liste des publications et presentations

Publications

Abstract de congrès :

M. C. Jacquet, M. Lacroix, C. Gaboriaud, N. M. Thielens and V. Rossi. “Deciphering Complement Receptor 1 (CR1) interaction with defence collagens”. Molecular Immunology 48 14 1705-1705 Aug Meeting Abstract Deciphering Complement Receptor 1 (CR1) interaction with defence collagens. Mol. Immunol. 0161-5890 WOS:000294096100134 ISI Document Delivery No.: 809ZV. 13th European Meeting on Complement in Human Disease Leiden (Pays-Bas), 20-24 août 2011

Article en cours de soumission :

M. C. Jacquet, M. Lacroix, S. Ancelet, C. Gaboriaud, N. M. Thielens and V. Rossi. “Deciphering Complement Receptor 1 (CR1) interactions with recognition proteins of the lectin complement pathway” The journal of Immunology. Submission n° 12-02451-FL.

Posters

M. C. Jacquet, M. Lacroix, C. Gaboriaud, N. M. Thielens and V. Rossi. “Deciphering Complement Receptor 1 (CR1) interaction with defence collagens”. 13th European Meeting on Complement in Human Disease, Leiden (Pays Bas), 20-24 août 2011

M. C. Jacquet, M. Lacroix, C. Gaboriaud, N. M. Thielens and V. Rossi. “Deciphering Complement Receptor 1 (CR1) interaction with defence collagens”. IBS Science Day 2011, Grenoble (France) Juin 2011

M. C. Jacquet, M. Lacroix, C. Gaboriaud, N. M. Thielens and V. Rossi. “Defence collagens receptors : a link between microbial evasion and innate immune effector mechanisms”. IBS Science Day 2010, Grenoble (France) Juin 2011

Présentation orale

M. C. Jacquet, «Complement receptor 1 (CD35/CR1): a potential receptor for defence collagens », Progress report, Axe I2HP, IBS, 12 avril 2011.

Bibliographie

A

- Amara, U., D. Rittirsch, M. Flierl, U. Bruckner, A. Klos, F. Gebhard, J. D. Lambris, and M. Huber-Lang, 2008, Interaction between the coagulation and complement system: Current Topics in Complement II, v. 632, p. 71-79.
- F. Alyaman, B. Genton, D. Mokela, A. Raiko, S. Kati, S. Rogerson, J. Reeder and M. Alpers 1995 Human cerebral malaria – Lack of significant association between erythrocyte resetting and disease severity: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 89 1 Jan-Feb Human Cerebral Malaria
- Arlaud, G. J., C. Gaboriaud, N. M. Thielens, M. Budayova-Spano, V. Rossi, and J. C. Fontecilla-Camps, 2002, Structural biology of the C1 complex of complement unveils the mechanisms of its activation and proteolytic activity: Molecular Immunology, v. 39, p. 383-394.
- Arlaud, G. J., R. B. Sim, A.-M. Duplaa, and M. G. Colomb, 1979, Differential elution of Clq, C1r and C1s from human CT bound to immune aggregates. use in the rapid purification of C1 sub-components: Molecular Immunology, v. 16, p. 445-450.
- Arora, M., E. Munoz, and A. J. Tenner, 2001, Identification of a site on mannan-binding lectin critical for enhancement of phagocytosis: Journal of Biological Chemistry, v. 276, p. 43087-43094.
- Arora, V., R. Grover, A. Kumar, D. Anand, and N. Das, 2011, Relationship of leukocyte CR1 transcript and protein with the pathophysiology and prognosis of systemic lupus erythematosus: A follow-up study: Lupus, v. 20, p. 1010-1018.
- Arora, V., A. M. Mondal, R. Grover, A. Kumar, P. Chattopadhyay, and N. Das, 2007, Modulation of CR1 transcript in systemic lupus erythematosus (SLE) by IFN-gamma and immune complex: Molecular Immunology, v. 44, p. 1722-1728.
- Asghar, S. S., and M. C. Pasch, 2000, Therapeutic inhibition of the complement system. Y2K update: Frontiers in Bioscience, v. 5, p. E63-E82A.
- Asgharzadeh, M., A. Mazloumi, H. S. Kafil, and A. Ghazanchaei, 2007, Mannose-binding lectin gene and promoter polymorphism in visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum: Pakistan journal of biological sciences: PJBS, v. 10, p. 1850-4.

B

- Ballanti, E., C. Perricone, G. di Muzio, B. Kroegler, M. S. Chimenti, D. Graceffa, and R. Perricone, 2011, Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: Relationship with anti-TNF inhibitors: Autoimmunity Reviews, v. 10, p. 617-623.

- Bally, I., V. Rossi, T. Lunardi, N. M. Thielens, C. Gaboriaud, and G. J. Arlaud, 2009, Identification of the C1q-binding Sites of Human C1r and C1s a refined three-dimensional model of the C1 complex of complement : *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 19340-19348.
- Banki, Z., H. Stoiber, and M. P. Dierich, 2005, HIV and human complement: inefficient virolysis and effective adherence: *Immunology Letters*, v. 97, p. 209-214.
- Barlow, P. and Soares, D., 2005, Complement Control Protein Modules in the Regulators of Complement Activation, *Structural Biology of the Complement System*, CRC Press, p. 19-62.
- Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson, and P. K. Srivastava, 2000, Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway: *International Immunology*, v. 12, p. 1539-1546.
- Beck, Z., B. K. Brown, G. R. Matyas, V. R. Polonis, M. Rao, and C. R. Alving, 2011, Infection of human peripheral blood mononuclear cells by erythrocyte-bound HIV-1: Effects of antibodies and complement: *Virology*, v. 412, p. 441-447.
- Beer, A., 1852, Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten: *Annalen der Physik und Chemie*, vol. 86, p. 78-88.
- Birmingham, D. J., F. Irshaid, K. F. Gavit, H. N. Nagaraja, C. Y. Yu, B. H. Rovin, and L. A. Hebert, 2007, A polymorphism in the type one complement receptor (CR1) involves an additional cysteine within the C3b/C4b binding domain that inhibits ligand binding: *Molecular Immunology*, v. 44, p. 3510-3516.
- Blein, S., R. Ginham, D. Uhrin, B. O. Smith, D. C. Soares, S. Veltel, R. A. J. McIlhinney, J. H. White, and P. N. Barlow, 2004, Structural analysis of the complement control protein (CCP) modules of GABA(B) receptor 1a - Only one of the two CCP modules is compactly folded: *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 48292-48306.
- Blom, A. M., T. Hallstrom, and K. Riesbeck, 2009, Complement evasion strategies of pathogens-Acquisition of inhibitors and beyond: *Molecular Immunology*, v. 46, p. 2808-2817.
- Bobak, D. A., M. M. Frank, and A. J. Tenner, 1987, Complement Receptor-1 (CR-1)-mediated phagocytosis by human cultured-macrophages (M0) – Synergistics effects of phorbol dibutyrate (PDBU) and C1Q: *Federation Proceedings*, v. 46, p. 610-610.
- Bohlson, S. S., D. A. Fraser, and A. J. Tenner, 2007, Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions: *Molecular Immunology*, v. 44, p. 33-43.
- Bradley, K., J. North, D. Saunders, W. Schwaeble, M. Jeziorska, D. E. Woolley, and K. Whaley, 1996, Synthesis of classical pathway complement components by chondrocytes: *Immunology*, v. 88, p. 648-656.

Brouwers, N., C. Van Cauwenberghe, S. Engelborghs, J. C. Lambert, K. Bettens, N. Le Bastard, F. Pasquier, A. G. Montoya, K. Peeters, M. Mattheijssens, R. Vandenberghe, P. P. De Deyn, M. Cruts, P. Amouyel, K. Sleegers, and C. Van Broeckhoven, 2012, Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites: *Molecular Psychiatry*, v. 17, p. 223-233.

Buckle, A. M., and N. Hogg, 1989, The effect of IFN-Gamma and Colony-Stimulating Factors on the expression of neutrophil cell-membrane receptors : *Journal of Immunology*, v. 143, p. 2295-2301.

Bussolino, F., E. Fischer, F. Turrini, M. D. Kazatchkine, and P. Arese, 1989, Platelet-activating factor enhances complement-dependent phagocytosis of diamide-treated erythrocytes by human-monocytes through activation of protein kinase-C and phosphorylation of complement receptor type one (CR-1): *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, p. 21711-21719.

C

Carroll, M. V., and R. B. Sim, 2011, Complement in health and disease: *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, p. 965-975.

Changelian, P. S., and D. T. Fearon, 1986, Tissue-specific phosphorylation of complement receptor CR1 and receptor CR2 : *Journal of Experimental Medicine*, v. 163, p. 101-115.

Chen, C. H., I. Ghiran, F. J. M. Beurskens, G. Weaver, J. A. Vincent, A. Nicholson-Weller, and L. B. Klickstein, 2007, Antibody CR1-2B11 recognizes a non-polymorphic epitope of human CR1 (CD35): *Clinical and Experimental Immunology*, v. 148, p. 546-554.

Chen, L. H., P. Y. P. Kao, Y. H. Fan, D. T. Y. Ho, C. S. Y. Chan, P. Y. Yik, J. C. T. Ha, L. W. Chub, and Y. Q. Song, 2012, Polymorphisms of CR1, CLU and PICALM confer susceptibility of Alzheimer's disease in a southern Chinese population: *Neurobiology of Aging*, v. 33, p. 7.

Chevalier, J., and M. D. Kazatchkine, 1989, Distribution in clusters of complement receptor type-one (CR-1) on human erythrocytes: *Journal of Immunology*, v. 142, p. 2031-2036.

Chouquet, A., H. Paidassi, W. L. Ling, P. Frachet, G. Houen, G. J. Arlaud, and C. Gaboriaud, 2011, X-ray structure of the human calreticulin globular domain reveals a peptide-binding area and suggests a multi-molecular mechanism: *PloS one*, v. 6, p. e17886.

A. Claessens, Y. Adams, A. Ghumra, G. Lindergard, C. C. Buchan, C. Andisi, P. C. Bull, S. Mok, A. P. Gupta, C. W. Wang, L. Turner, M. Arman, A. Raza, Z. Bozdech and J. A. Rowe 2012 A subset of group A-like var genes encodes the malaria parasite ligands for binding to human brain endothelial cells *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 26 Jun 26

Clarke, T. F. I. V., and P. L. Clark, 2008, Rare Codons Cluster: Plos One, v. 3.

Cockburn, I. A., M. J. Mackinnon, A. O'Donnell, S. J. Allen, J. M. Moulds, M. Baisor, M. Bockarie, J. C. Reeder, and J. A. Rowe, 2004, A human complement receptor 1 polymorphism that reduces *Plasmodium falciparum* rosetting confers protection against severe malaria: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, p. 272-277.

J. H. M. Cohen, H. U. Lutz, J. L. Pennaforte, A. Bouchard and M. D. Kazatchkine 1992 Peripheral catabolism of CR1 (the C3B receptor, CD35) on erythrocytes from healthy-individuals and patients with systemic lupus-erythematosus (SLE) : Clinical and Experimental Immunology 87 3 Mar

J. H. M. Cohen, J. P. Aubry, J. P. Revillard, J. Banchereau, and M. D. Kazatchkine, 1989, Human lymphocytes-T expressing the C3B/C4B complement receptor type-one (CR-1, CD35) belong to Fc-Gamma receptor-positive CD4-positive T-Cells : Cellular Immunology, v. 121, p. 383-390.

J. H. M. Cohen, B. Autran, M. H. Jouvin, J. P. Aubry, W. Rozenbaum, J. Banchereau, P. Debre, J. P. Revillard and M. Kazatchkine 1988 Decreased expression of the receptor for the C3B fragment of complement on erythrocytes of patients with acquired immunodeficiency syndrome : Presse Medicale 17 15 Apr 23.

Couser, W. G., R. J. Johnson, B. A. Young, C. G. Yeh, C. A. Toth, and A. R. Rudolph, 1995, The effects of soluble recombinant complement receptor 1 on complement-mediated experimental Glomerulonephritis : Journal of the American Society of Nephrology, v. 5, p. 1888-1894.

H. Crehan, P. Holton, S. Wray, J. Pocock, R. Guerreiro and J. Hardy 2012 Complement receptor 1 (CR1) and Alzheimer's disease Immunobiology 217 2 244-250 Feb

D

Dahl, M. R., S. Thiel, M. Matsushita, T. Fujita, A. C. Willis, T. Christensen, T. Vorup-Jensen, and J. C. Jensenius, 2001, MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway: Immunity, v. 15, p. 127-135.

Danielsson, C., M. Pascual, L. French, G. Steiger, and J. A. Schifferli, 1994, Soluble complement receptor –type 1 (CD35) is released from leukocytes by surface cleavage : European Journal of Immunology, v. 24, p. 2725-2731.

Dacruz, O. J., C. A. Toth, and G. G. Haas, 1996, Recombinant soluble human complement receptor type 1 inhibits antisperm antibody- and neutrophil-mediated injury to human sperm: Biology of Reproduction, v. 54, p. 1217-1228.

De Cordoba, S. R., M. A. Diaz-Guillen, and D. Heine-Suner, 1999, An integrated map of the human regulator of complement activation (RCA) gene cluster on 1q32: Molecular Immunology, v. 36, p. 803-808.

- Degn, S. E., A. G. Hansen, R. Steffensen, C. Jacobsen, J. C. Jensenius, and S. Thiel, 2009, MAp44, a Human Protein Associated with Pattern Recognition Molecules of the Complement System and Regulating the Lectin Pathway of Complement Activation: *Journal of Immunology*, v. 183, p. 7371-7378.
- Degn, S. E., L. Jensen, P. Gal, J. Dobo, S. H. Holmvaad, J. C. Jensenius, and S. Thiel, 2010, Biological variations of MASP-3 and MAp44, two splice products of the MASP1 gene involved in regulation of the complement system: *Journal of Immunological Methods*, v. 361, p. 37-50.
- Degn, S. E., J. C. Jensenius, and S. Thiel, 2011, Disease-Causing Mutations in Genes of the Complement System: *American Journal of Human Genetics*, v. 88, p. 689-705.
- Delibrias, C. C., M. D. Kazatchkine, and E. Fischer, 1993, Evidence for the role of CR-1 (CD35), in addition to CR-2 (CD21), in facilitating infection of human T-cells with opsonized HIV: *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 38, p. 183-189.
- Delibrias, C. C., A. Mouhoub, E. Fischer, and M. D. Kazatchkine, 1994, CR1(CD35) and CR2(CD21) complement C3 receptors are expressed on normal human thymocytes and mediate infection of thymocytes with opsonized human-immunodeficiency-virus (HIV) : *European Journal of Immunology*, v. 24, p. 2784-2788.
- Dobson, N. J., J. D. Lambris, and G. D. Ross, 1981, Characteristics of isolated erythrocyte complement receptor-type one (CR-1, C4B-C3B receptor) and CR1-specific antibodies : *Journal of Immunology*, v. 126, p. 693-698.
- Doi, T., S. Takemura, H. Onodera, M. Ueda, M. Deguchi, R. Nakahara, N. Ichio, S. Nakanishi, N. Seto, K. Yanagida, and M. Kondo, 1997, Small increase of CR1 and CR3 by C5a-receptors on polymorphonuclear leukocytes in systemic lupus erythematosus: *Arerugi = [Allergy]*, v. 46, p. 1108-13.
- Dominguez, M., and A. Torano, 1999, Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: The mechanism of Leishmania infection: *Journal of Experimental Medicine*, v. 189, p. 25-35.
- DosReis, G. A., 2011, Evasion of immune responses by Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas disease: *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 44, p. 84-90.
- Duus, K., E. W. Hansen, P. Tacnet, P. Frachet, G. J. Arlaud, N. M. Thielens, and G. Houen, 2010a, Direct interaction between CD91 and C1q: *Febs Journal*, v. 277, p. 3526-3537.
- Duus, K., N. M. Thielens, M. Lacroix, P. Tacnet, P. Frachet, U. Holmskov, and G. Houen, 2010b, CD91 interacts with mannan-binding lectin (MBL) through the MBL-associated serine protease-binding site: *Febs Journal*, v. 277, p. 4956-4964.

E

- Edelhoch, H., 1967, Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins : Biochemistry, v. 6, p. 1948-&.
- Edman, P., 1949, A method for the determination of the amino acid sequence in peptides : Archives of Biochemistry, v. 22, p. 475-476.
- Endo, Y., M. Matsushita, and T. Fujita, 2011, The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity: International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 43, p. 705-712.
- Erdei, A., A. Isaak, M. Kremlitzka, and G. Poor, 2009a, Physiological upregulation of CR1 and Fc gamma RII on memory B cells is lacking in SLE patients, but is not related to the cells' activation state: Molecular Immunology, v. 46, p. 2829-2829.
- Erdei, A., A. Isaak, K. Torok, N. Sandor, M. Kremlitzka, J. Prechl, and Z. Bajtay, 2009b, Expression and role of CR1 and CR2 on B and T lymphocytes under physiological and autoimmune conditions: Molecular Immunology, v. 46, p. 2767-2773.
- Ernst, J. D., J. L. Rosales, and S. Zimmerli, 1995, Calcium signaling initiated by CR-1 (CD35) cross-linking is mediated by phagocyte Fc-Gamma receptors in cis : Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 209, p. 1032-1038.

F

- Faik, I., S. I. Oyedeji, Z. Idris, I. J. de Messias-Reason, B. Lell, P. G. Kremsner, and J. F. J. Kun, 2011, Ficolin-2 levels and genetic polymorphisms of FCN2 in malaria: Human Immunology, v. 72, p. 74-79.
- Fallman, M., R. Andersson, and T. Andersson, 1993, Signaling properties of CR3 (CD11B/CD18) and CR-1 (CD35) in relation to phagocytosis of complement-opsonized particles : Journal of Immunology, v. 151, p. 330-338.
- Fearon, D. T., 1980, Identification of the membrane glycoprotein that is the C3B receptor of the human-erythrocytes polymorphonuclear leukocytes, lymphocyt-B, and monocyte : Journal of Experimental Medicine, v. 152, p. 20-30.
- Fearon, D. T., and R. H. Carter, 1995, The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B-lymphocytes-linking natural to acquired-immunity : Annual Review of Immunology, v. 13, p. 127-149.
- Ferreira, A., G. Ramirez, G. Sanchez, C. H. Ribeiro, N. Lopez, I. Maldonado, T. Fujita, W. Schwaeble, and C. Valck, 2010, Trypanosoma cruzi calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-Ficolin: Molecular Immunology, v. 47, p. 2265-2265.

- Ferreira, V., M. C. Molina, C. Valck, A. Rojas, L. Aguilar, G. Ramirez, W. Schwaeble, and A. Ferreira, 2004a, Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts: *Molecular Immunology*, v. 40, p. 1279-1291.
- Ferreira, V., C. Valck, G. Sanchez, A. Gingras, S. Tzima, M. C. Molina, R. Sim, W. Schwaeble, and A. Ferreira, 2004b, The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*: *Journal of Immunology*, v. 172, p. 3042-3050.
- Fingerroth, J. D., M. E. Diamond, D. R. Sage, J. Hayman, and J. L. Yates, 1999, CD21-dependent infection of an epithelial cell line, 293, by Epstein-Barr virus: *Journal of Virology*, v. 73, p. 2115-2125.
- Fischer, E., M. Capron, L. Prin, J. P. Kusnierz, and M. D. Kazatchkine, 1986, Human eosinophils express CR-1 and CR3 complement receptors for cleavage fragments of C-3: *Cellular Immunology*, v. 97, p. 297-306.
- Fraser, D. A., S. S. Bohlson, N. Jasinskiene, N. Rawal, G. Palmarini, S. Ruiz, R. Rochford, and A. J. Tenner, 2006, C1q and MBL, components of the innate immune system, influence monocyte cytokine expression: *Journal of Leukocyte Biology*, v. 80, p. 107-116.
- Frederiksen, P. D., S. Thiel, C. B. Larsen, and J. C. Jensenius, 2005, M-ficolin, an innate immune defence molecule, binds patterns of acetyl groups and activates complement: *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 62, p. 462-473.
- Freskgard, P. O., L. G. Martensson, P. Jonasson, B. H. Jonsson, and U. Carlsson, 1994, Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the circular-dichroism spectrum of human carbonic-anhydrase 2: *Biochemistry*, v. 33, p. 14281-14288.
- Funkhouser, T. A., and D. P. Vik, 1999, Complement receptor type I gene regulation: Retinoic acid and cytosine arabinoside increase CR1 expression: *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 49, p. 21-28.
- Furtado, P. B., C. Y. Huang, D. Ihyembe, R. A. Hammond, H. C. Marsh, and S. J. Perkins, 2008, The partly folded back solution structure arrangement of the 30 SCR domains in human complement receptor type 1 (CR1) permits access to its C3b and C4b ligands: *Journal of Molecular Biology*, v. 375, p. 102-118.

G

- Gaboriaud, C., J. Juanhuix, A. Gruez, M. Lacroix, C. Darnault, D. Pignol, D. Verger, J. C. Fontecilla-Camps, and G. J. Arlaud, 2003, The crystal structure of the globular head of complement protein C1q provides a basis for its versatile recognition properties: *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 46974-46982.
- Gaboriaud, C., F. Teillet, L. A. Gregory, N. M. Thielens, and G. J. Arlaud, 2007, Assembly of C1 and the MBL- and ficolin-MASP complexes: Structural insights: *Immunobiology*, v. 212, p. 279-288.

- Gal, P., L. Barna, A. Kocsis, and P. Zavodszky, 2007, Serine proteases of the classical and lectin pathways: Similarities and differences: *Immunobiology*, v. 212, p. 267-277.
- Gao, B., R. Adhikari, M. Howarth, K. Nakamura, M. C. Gold, A. B. Hill, R. Knee, M. Michalak, and T. Elliott, 2002, Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin: *Immunity*, v. 16, p. 99-109.
- Garlatti, V., N. Belloy, L. Martin, M. Lacroix, M. Matsushita, Y. Endo, T. Fujita, J. C. Fontecilla-Camps, G. J. Arlaud, N. M. Thielens, and C. Gaboriaud, 2007, Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins: *Embo Journal*, v. 26, p. 623-633.
- Garred, P., C. Honore, Y. J. Ma, L. Munthe-Fog, and T. Hummelshoj, 2009, MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3-The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement: *Molecular Immunology*, v. 46, p. 2737-2744.
- Garred, P., H. O. Madsen, U. Balslev, B. Hofmann, C. Pedersen, J. Gerstoft, and A. Svejgaard, 1997, Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin: *Lancet*, v. 349, p. 236-240.
- Geiser, M., R. Cebe, D. Drewello, and R. Schmitz, 2001, Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase: *Biotechniques*, v. 31, p. 88-+.
- Gelebart, P., M. Opas, and M. Michalak, 2005, Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum: *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 37, p. 260-266.
- Ghebrehiwet, B., B. L. Lim, R. Kumar, X. D. Feng, and E. I. B. Peerschke, 2001, gClq-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection: *Immunological Reviews*, v. 180, p. 65-77.
- Ghiran, I., S. F. Barbashov, L. B. Klickstein, S. Tas, J. C. Jensenius, and A. Nicholson-Weller, 2000, Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin: *Journal of Experimental Medicine*, v. 192, p. 1797-1807.
- Ghiran, I., L. B. Klickstein, and A. Nicholson-Weller, 2003, Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule: *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 21024-21031.
- Ghiran, I. C., L. Klickstein, P. Karchanaphanurach, D. Golan, and A. Nicholson-Weller, 2006, CR1 (complement receptor 1, or CD35) ligation triggers association with Fas-Associated Phosphatase-1 (FAP-1) in human erythrocytes: *Journal of Immunology*, v. 176, p. S76-S76.
- Ghiran, I., A. M. Glodek, G. Weaver, L. B. Klickstein, and A. Nicholson-Weller, 2008, Ligation of erythrocyte CR1 induces its clustering in complex with scaffolding protein FAP-1: *Blood*, v. 112, p. 3465-3473.

- Gingras, A. R., U. V. Girija, A. H. Keeble, R. Panchal, D. A. Mitchell, P. C. E. Moody, and R. Wallis, 2011, Structural Basis of Mannan-Binding Lectin Recognition by Its Associated Serine Protease MASP-1: Implications for Complement Activation: *Structure*, v. 19, p. 1635-1643.
- Gjelstrup, L. C., J. D. Kaspersen, M. A. Behrens, J. S. Pedersen, S. Thiel, P. Kingshott, C. L. P. Oliveira, N. M. Thielens, and T. Vorup-Jensen, 2012, The Role of Nanometer-Scaled Ligand Patterns in Polyvalent Binding by Large Mannan-Binding Lectin Oligomers: *Journal of Immunology*, v. 188, p. 1292-1306.
- Glodek, A. M., R. Mirchev, D. E. Golan, J. A. Khoory, J. M. Burns, S. S. Shevkoplyas, A. Nicholson-Weller, and I. C. Ghiran, 2010, Ligation of complement receptor 1 increases erythrocyte membrane deformability: *Blood*, v. 116, p. 6063-6071.
- Gold, L. I., P. Eggleton, M. T. Sweetwyne, L. B. Van Duyn, M. R. Greives, S.-M. Naylor, M. Michalak, and J. E. Murphy-Ullrich, 2010, Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease: *Faseb Journal*, v. 24, p. 665-683.
- Gordon, D. L., G. M. Johnson, and M. K. Hostetter, 1986, Ligand-receptor interactions in the phagocytosis of virulent streptococcus-pneumoniae by polymorphonuclear leukocytes : *Journal of Infectious Diseases*, v. 154, p. 619-626.
- Gout, E., V. Garlatti, D. F. Smith, M. Lacroix, C. Dumestre-Perard, T. Lunardi, L. Martin, J.-Y. Cesbron, G. J. Arlaud, C. Gaboriaud, and N. M. Thielens, 2010, Carbohydrate recognition properties of human Ficolins. Glycan array screening reveals the sialic acid binding specificity of M-Ficolin : *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, p. 6612-6622.
- Grattone, M. L., C. L. Villiers, M. B. Villiers, C. Drouet, and P. N. Marche, 1999, Co-operation between human CR1 (CD35) and CR2 (CD21) in internalization of their C3b and iC3b ligands by murine-transfected fibroblasts: *Immunology*, v. 98, p. 152-157.
- Gupta, K., R. K. Gupta, and K. Hajela, 2008, Disease associations of mannose-binding lectin & potential of replacement therapy: *Indian Journal of Medical Research*, v. 127, p. 431-440.
- Gurne, D. H., M. O. M. Tso, D. P. Edward, and H. Ripps, 1991, Antiretinal antibodies in serum of patients with age-related macular degeneration (AMD) : *Ophthalmology*, v. 98, p. 602-607.

H

- Haas, P., T. Aggermann, M. Nagl, K. Steindl-Kuscher, W. Krugluger, and S. Binder, 2011, Implication of CD21, CD35, and CD55 in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration: *American Journal of Ophthalmology*, v. 152, p. 396-399.

- Hager Ribeiro, C., N. C. Lopez, G. A. Ramirez, C. E. Valck, M. Carmen Molina, L. Aguilar, M. Rodriguez, I. Maldonado, R. Martinez, C. Gonzalez, R. Troncoso, S. Lavandero, A. R. Gingras, W. Schwaeble, and A. Ferreira, 2009, Trypanosoma cruzi calreticulin: A possible role in Chagas' disease autoimmunity: *Molecular Immunology*, v. 46, p. 1092-1099.
- Hakansson, K., and K. B. M. Reid, 2000, Collectin structure: A review: *Protein Science*, v. 9, p. 1607-1617.
- Hamer, I., J. P. Paccaud, D. Belin, C. Maeder, and J. L. Carpentier, 1998, Soluble form of complement C3b/C4b receptor (CR1) results from a proteolytic cleavage in the C-terminal region of CR1 transmembrane domain: *Biochemical Journal*, v. 329, p. 183-190.
- Hansen, S., L. Selman, N. Palaniyar, K. Ziegler, J. Brandt, A. Kliem, M. Jonasson, M.-O. Skjoedt, O. Nielsen, K. Hartshorn, T. J. D. Jorgensen, K. Skjodt, and U. Holmskov, 2010, Collectin 11 (CL-11, CL-K1) Is a MASP-1/3-Associated Plasma Collectin with Microbial-Binding Activity: *Journal of Immunology*, v. 185, p. 6096-6104.
- Harboe, M., and T. E. Mollnes, 2008, The alternative complement pathway revisited: *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 12, p. 1074-1084.
- Hart, S. P., J. A. Ross, K. Ross, C. Haslett, and I. Dransfield, 2000, Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: Implications for functional downregulation and recognition by phagocytes: *Cell Death and Differentiation*, v. 7, p. 493-503.
- Hatano, Y., S. Taniuchi, M. Masuda, S. Tsuji, T. Ito, M. Hasui, Y. Kobayashi, and K. Kaneko, 2009, Phagocytosis of heat-killed Staphylococcus aureus by eosinophils: comparison with neutrophils: *Apmis*, v. 117, p. 115-123.
- Hebert, L. A., D. J. Birmingham, J. J. Dillon, F. G. Cosio, and X. P. Shen, 1994, Erythropoietin therapy in humans increases erythrocytes expression of complement receptor-type-1 (CD35) : *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 4, p. 1786-1791.
- Heja, D., A. Kocsis, J. Dobo, K. Szilagyi, R. Szasz, P. Zavodszky, G. Pal, and P. Gal, 2012, Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 109, p. 10498-503.
- Henderson, A. L., M. A. Lindorfer, A. D. Kennedy, P. L. Foley, and R. P. Taylor, 2002, Concerted clearance of immune complexes bound to the human erythrocyte complement receptor: development of a heterologous mouse model: *Journal of Immunological Methods*, v. 270, p. 183-197.
- Hojrup, P., P. Roepstorff, and G. Houen, 2001, Human placental calreticulin - Characterization of domain structure and post-translational modifications: *European Journal of Biochemistry*, v. 268, p. 2558-2565.

Honore, C., T. Hummelshoj, B. E. Hansen, H. O. Madsen, P. Eggleton, and P. Garred, 2007, The innate immune component ficolin 3 (Hakata antigen) mediates the clearance of late apoptotic cells: *Arthritis and Rheumatism*, v. 56, p. 1598-1607.

Honore, C., S. Rorvig, L. Munthe-Fog, T. Hummelshoj, H. O. Madsen, N. Borregaard, and P. Garred, 2008, The innate pattern recognition molecule Ficolin-1 is secreted by monocytes/macrophages and is circulating in human plasma: *Molecular Immunology*, v. 45, p. 2782-2789.

Horakova, E., O. Gasser, S. Sadallah, J. M. Inal, G. Bourgeois, I. Ziekau, T. Klimkait, and J. A. Schifferli, 2004, Complement mediates the binding of HIV to erythrocytes: *Journal of Immunology*, v. 173, p. 4236-4241.

Hotamisligil, G. S., 2006, Inflammation and metabolic disorders: *Nature*, v. 444, p. 860-867.

Huegel, R., P. Velasco, M. D. L. Sierra, E. Christophers, J. M. Schroder, T. Schwarz, G. Tosato, and B. Lange-Asschenfeldt, 2007, Novel anti-inflammatory properties of the angiogenesis inhibitor vasostatin: *Journal of Investigative Dermatology*, v. 127, p. 65-74.

I

Ikewaki, N., H. Yamao, J. K. Kulski, and H. Inoko, 2010, Flow Cytometric Identification of CD93 Expression on Naive T Lymphocytes (CD4(+)-CD45RA(+) Cells) in Human Neonatal Umbilical Cord Blood: *Journal of Clinical Immunology*, v. 30, p. 723-733.

Ishii, N., H. Kato, and P. C. Wang, 2003, Observation by electron microscopy on recombinant soluble human complement receptor type 1 (sCR1) and its derivative, aglyco-sCR1, from CHO cells: *Enzyme and Microbial Technology*, v. 33, p. 482-487.

J

Jack, R. M., B. A. Lowenstein, and A. Nicholsonsweller, 1994, Regulation of C1Q receptor expression on human polymorphonuclear leukocytes : *Journal of Immunology*, v. 153, p. 262-269.

H. Janes, C. P. Wang, E. Levin-Edens, I. Vigan-Womas, M. Guillotte, M. Melcher, O. Mercereau-Pujalon and J. D. Smith 2011 Investigating the Host Binding Signature on the Plasmodium falciparum PfEMP1 Protein Family *Plos Pathogens* 7 5 May

Jarvis, J. N., and S. H. Wang, 1999, Phosphorylation of the complement receptor CR1 (CD35), and its association with the syk tyrosine kinase in immune complex-stimulated HL-60 cells: *Pediatric Research*, v. 45, p. 358A-358A.

Jaumouille, V., and S. Grinstein, 2011, Receptor mobility, the cytoskeleton, and particle binding during phagocytosis: *Current Opinion in Cell Biology*, v. 23, p. 22-29.

- Jepsen, H. H., H. P. T. Ekre, and S. E. Svehag, 1987, Interaction of complement-solubilized immune-complexes (IC) with CR-1 receptors on human-erythrocytes – Polysulfated compounds inhibit IC binding and induce IC-release from CR-1: *International Journal of Immunopharmacology*, v. 9, p. 587-595.
- Jiang, H. X., D. Burdick, C. G. Glabe, C. W. Cotman, and A. J. Tenner, 1994, Beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A-chain : *Journal of Immunology*, v. 152, p. 5050-5059.
- Johnson, S., M. Michalak, M. Opas, and P. Eggleton, 2001, The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space: *Trends in Cell Biology*, v. 11, p. 122-129.
- Jorgensen, C. S., L. R. Ryder, A. Steino, P. Hojrup, J. Hansen, N. H. Beyer, N. H. H. Heegaard, and G. Houen, 2003, Dimerization and oligomerization of the chaperone calreticulin: *European Journal of Biochemistry*, v. 270, p. 4140-4148.
- Jouvin, M. H., J. G. Wilson, P. Bourgeois, D. T. Fearon, and M. D. Kazatchkine, 1986, Decreased expression of C3b receptor (CR1) on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus contrasts with its normal expression in other systemic diseases and does not correlate with the occurrence or severity of SLE nephritis: *Complement (Basel, Switzerland)*, v. 3, p. 88-96.
- Jozsi, M., J. Prechl, Z. Bajtay, and A. Erdei, 2002, Complement receptor type 1 (CD35) mediates inhibitory signals in human B lymphocytes: *Journal of Immunology*, v. 168, p. 2782-2788.
- Jun, G., A. C. Naj, G. W. Beecham, L. S. Wang, J. Buross, P. J. Gallins, J. D. Buxbaum, N. Ertekin-Taner, D. Fallin, R. Friedland, R. Inzelberg, P. Kramer, E. Rogaeva, P. S. George-Hyslop, L. B. Cantwell, B. A. Dombroski, A. J. Saykin, E. M. Reiman, D. A. Bennett, J. C. Morris, K. L. Lunetta, E. R. Martin, T. J. Montine, A. M. Goate, D. Blacker, D. W. Tsuang, D. Beekly, L. A. Cupples, H. Hakonarson, W. Kukull, T. M. Foroud, J. Haines, R. Mayeux, L. A. Farrer, M. A. Pericak-Vance, G. D. Schellenberg, and C. Alzheimers Dis Genetics, 2010, Meta-analysis Confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer Disease Risk Loci and Reveals Interactions With APOE Genotypes: *Archives of Neurology*, v. 67, p. 1473-1484.

K

- Kang, H. J., S.-M. Lee, H.-H. Lee, J. Y. Kim, B.-C. Lee, J.-S. Yum, H. M. Moon, and B. L. Lee, 2007, Mannose-binding lectin without the aid of its associated serine proteases alters lipopolysaccharide-mediated cytokine/chemokine secretion from human endothelial cells: *Immunology*, v. 122, p. 335-342.
- Kask, L., B. O. Villoutreix, M. Steen, B. Ramesh, B. Dahlback, and A. M. Blom, 2004, Structural stability and heat-induced conformational change of two complement inhibitors: C4b-binding protein and factor H: *Protein Science*, v. 13, p. 1356-1364.

- Kask, L., A. Hillarp, B. Ramesh, B. Dahlback, and A. M. Blom, 2002, Structural requirements for the intracellular subunit polymerization of the complement inhibitor C4b-binding protein: *Biochemistry*, v. 41, p. 9349-9357.
- Kasper, G., A. Brown, M. Eberl, L. Vallar, N. Kieffer, C. Berry, K. Girdwood, P. Eggleton, R. Quinnell, and D. I. Pritchard, 2001, A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signalling domains of some integrins: *Parasite Immunology*, v. 23, p. 141-152.
- Katyal, M., B. Sivasankar, and N. Das, 2001, Complement receptor 1 in autoimmune disorders: *Current Science*, v. 81, p. 907-914.
- Keenan, B. T., J. M. Shulman, L. B. Chibnik, T. Raj, D. Tran, M. R. Sabuncu, A. N. Allen, J. J. Corneveaux, J. A. Hardy, M. J. Huentelman, C. A. Lemere, A. J. Myers, A. Nicholson-Weller, E. M. Reiman, D. A. Evans, D. A. Bennett, P. L. De Jager, and N. Alzheimers Dis, 2012, A coding variant in CR1 interacts with APOE- ϵ 4 to influence cognitive decline: *Human Molecular Genetics*, v. 21, p. 2377-2388.
- Kemper, C., J. P. Atkinson, and D. E. Hourcade, 2010, Properdin: Emerging Roles of a Pattern-Recognition Molecule, *in* W. E. Paul, D. R. Littman, and W. M. Yokoyama, eds., *Annual Review of Immunology*, Vol 28: *Annual Review of Immunology*, v. 28: Palo Alto, Annual Reviews, p. 131-155.
- Khan, M. Y., G. Villanueva, and S. A. Newman, 1989, On the origin of the positive band in the far-ultraviolet circular dichroic spectrum of Fibronectin : *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, p. 2139-2142.
- Khera, R., and N. Das, 2009, Complement Receptor 1: Disease associations and therapeutic implications: *Molecular Immunology*, v. 46, p. 761-772.
- Kim, C. H., Y. G. Ma, J. S. Ju, H. H. Lee, J. W. Park, E. K. Seo, N. C. Ha, M. Matsushita, H. J. Kang, and B. L. Lee, 2007, MBL and L-ficolin regulate inflammatory cytokine secretion on mast cells stimulated with non-peptidoglycan pattern molecule of *Staphylococcus aureus*: *Molecular Immunology*, v. 44, p. 194-195.
- Kirkitadze, M. D., M. Krych, D. Uhrin, D. T. F. Dryden, B. O. Smith, A. Cooper, X. F. Wang, R. Hauhart, J. P. Atkinson, and P. N. Barlow, 1999, Independently melting modules and highly structured intermodular junctions within complement receptor type 1: *Biochemistry*, v. 38, p. 7019-7031.
- E. Kiss, I. Csipo, J. H. M. Cohen, B. Reveil, M. Kawai and G. Y. Szegedi 1996 CR1 density polymorphism and expression on erythrocytes of patients with systemic lupus erythematosus *Autoimmunity* 25 1 53-58
- Klickstein, L. B., S. F. Barbashov, T. Liu, R. M. Jack, and A. NicholsonWeller, 1997, Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q: *Immunity*, v. 7, p. 345-355.

- Klickstein, L. B., T. J. Bartow, V. Miletic, L. D. Rabson, J. A. Smith, and D. T. Fearon, 1988, Identification of distinct C3B and C4B recognition sites in the human C3B/C4B receptor (CR-1, CD35) by deletion mutagenesis : *Journal of Experimental Medicine*, v. 168, p. 1699-1717.
- Kojouharova, M., K. Reid, and M. Gadjeva, 2010, New insights into the molecular mechanisms of classical complement activation: *Molecular Immunology*, v. 47, p. 2154-2160.
- Kook, S., and J. H. Exton, 2005, Identification of interaction sites of protein kinase C alpha on phospholipase D1: *Cellular Signalling*, v. 17, p. 1423-1432.
- Kozlov, G., C. L. Pocanschi, A. Rosenauer, S. Bastos-Aristizabal, A. Gorelik, D. B. Williams, and K. Gehring, 2010, Structural Basis of Carbohydrate Recognition by Calreticulin: *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, p. 38612-38620.
- Krych, M., L. Clemenza, D. Howdeshell, R. Hauhart, D. Hourcade, and J. P. Atkinson, 1994, Analysis of the functional domains of complement receptor-type-1 (C3B/C4B receptor, CD35) by substitution mutagenesis : *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 13273-13278.
- Krych-Goldberg, M., and J. P. Atkinson, 2001, Structure-function relationships of complement receptor type 1: *Immunological Reviews*, v. 180, p. 112-122.
- Krych-Goldberg, M., R. E. Hauhart, T. Porzukowiak, and J. P. Atkinson, 2005, Synergy between two active sites of human complement receptor type 1 (CD35) in complement regulation: Implications for the structure of the classical pathway C3 convertase and generation of more potent inhibitors: *Journal of Immunology*, v. 175, p. 4528-4535.
- Krych-Goldberg, M., R. E. Hauhart, V. B. Subramanian, B. M. Yurcisin, D. L. Crimmins, D. E. Hourcade, and J. P. Atkinson, 1999, Decay accelerating activity of complement receptor type 1 (CD35) - Two active sites are required for dissociating C5 convertases: *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 31160-31168.
- Kuraya, M., Z. P. Ming, X. Z. Liu, M. Matsushita, and T. Fujita, 2005, Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation: *Immunobiology*, v. 209, p. 689-697.

L

- Laarman, A., F. Milder, J. van Strijp, and S. Rooijackers, 2010, Complement inhibition by gram-positive pathogens: molecular mechanisms and therapeutic implications: *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, v. 88, p. 115-120.
- Lacroix, M., C. Dumestre-Perard, G. Schoehn, G. Houen, J. Y. Cesbron, G. J. Arlaud, and N. M. Thielens, 2009, Residue Lys(57) in the Collagen-Like Region of Human L-Ficolin and Its Counterpart Lys(47) in H-Ficolin Play a Key Role in the Interaction with the Mannan-Binding Lectin-Associated Serine Proteases and the Collectin Receptor Calreticulin: *Journal of Immunology*, v. 182, p. 456-465.

- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4: *Nature*, v. 227, p. 680-&.
- Lambris, J. D., Z. Lao, T. J. Oglesby, J. P. Atkinson, C. E. Hack, and J. D. Becherer, 1996, Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component: *Journal of Immunology*, v. 156, p. 4821-4832.
- Lambris, J. D., D. Ricklin, and B. V. Geisbrecht, 2008, Complement evasion by human pathogens: *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, p. 132-142.
- Lapin, Z. J., C. Höppener, H. A. Gelbard, and L. Novotny, 2012, Near-field Quantification of Complement Receptor 1 (CR1/CD35) Protein Clustering in Human Erythrocytes.: *J Neuroimmune Pharmacol*.
- Larvie, M., T. Shoup, W.-C. Chang, L. Chigweshe, K. Hartshorn, M. R. White, G. L. Stahl, D. R. Elmaleh, and K. Takahashi, 2012, Mannose-Binding Lectin Binds to Amyloid beta Protein and Modulates Inflammation: *Journal of biomedicine & biotechnology*, v. 2012, p. 929803.
- Lee, J. H., Y. M. Kim, N. W. Kim, J. W. Kim, E. Her, B. K. Kim, J. H. Kim, S. H. Ryu, J. W. Park, D. W. Seo, J. W. Han, M. A. Beaven, and W. S. Choi, 2006, Phospholipase D2 acts as an essential adaptor protein in the activation of Syk in antigen-stimulated mast cells: *Blood*, v. 108, p. 956-964.
- Lepse, N., P. Van Bommel, M. R. Daha, C. G. M. Kallenberg, and P. Heeringa, 2011, Complement receptor 1 (CR1, CD35) binds CpG-DNA: *Molecular Immunology*, v. 48, p. 1687-1687.
- Levitz, S. M., A. Tabuni, T. R. Kozel, R. S. MacGill, R. R. Ingalls, and D. T. Golenbock, 1997, Binding of *Cryptococcus neoformans* to heterologously expressed human complement receptors: *Infection and Immunity*, v. 65, p. 931-935.
- Li, L. M., J. B. Li, Y. Zhu, and G. Y. Fan, 2010, Soluble complement receptor type 1 inhibits complement system activation and improves motor function in acute spinal cord injury: *Spinal Cord*, v. 48, p. 105-111.
- Li, Z. J., W. F. Stafford, and M. Bouvier, 2001, The metal ion binding properties of calreticulin modulate its conformational flexibility and thermal stability: *Biochemistry*, v. 40, p. 11193-11201.
- Limb, G. A., A. S. Hamblin, R. A. Wolstencroft, and D. C. Dumonde, 1992, Rapid cytokine up-regulation of integrins, complement receptor-1 and HLA-DR on monocytes but not on lymphocytes : *Immunology*, v. 77, p. 88-94.
- Lindahl, G., U. Sjöbring, and E. Johnsson, 2000, Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms: *Current Opinion in Immunology*, v. 12, p. 44-51.

- Liu, D., and Z.-X. Niu, 2009, The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35): *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, v. 31, p. 524-535.
- Liu, Y., Y. Endo, D. Iwaki, M. Nakata, M. Matsushita, I. Wada, K. Inoue, M. Munakata, and T. Fujita, 2005, Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway: *Journal of Immunology*, v. 175, p. 3150-3156.
- Lopez, N. C., C. Valck, G. Ramirez, M. Rodriguez, C. Ribeiro, J. Orellana, I. Maldonado, A. Albini, D. Anaconda, D. Lemus, L. Aguilar, W. Schwaeble, and A. Ferreira, 2010, Antiangiogenic and Antitumor Effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin: *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 4.
- Lu, J., B. K. Teh, L. Wang, Y. Wang, Y. S. Tan, M. C. Lai, and K. B. M. Reid, 2008, The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity: *Cellular & Molecular Immunology*, v. 5, p. 9-21.
- Lublin, D. M., R. C. Griffith, and J. P. Atkinson, 1986, Influence of glycosylation on allelic and cell-specific MR variation, receptor processing, and ligand-binding of the human-complement C3B/C4B receptor: *Journal of Biological Chemistry*, v. 261, p. 5736-5744.

M

- MacDonald, S. L., I. Downing, M. Turner, and D. C. Kilpatrick, 2008, Is mannan-binding lectin (MBL) detectable on monocytes and monocyte-derived immature dendritic cells?: *Biochemical Society Transactions*, v. 36, p. 1497-1500.
- M. Maier, Y. Peng, L. Jiang, T. J. Seabrook, M. C. Carroll and C. A. Lemere 2008 Complement C3 deficiency leads to accelerated amyloid beta plaque deposition and neurodegeneration and modulation of the microglia/macrophage phenotype in amyloid precursor protein transgenic mice *Journal of Neuroscience* 28 25 Jun 18
- Makarova, O., E. Kamberov, and B. Margolis, 2000, Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning: *Biotechniques*, v. 29, p. 970-972.
- Makrides, S. C., P. A. Nygren, B. Andrews, P. J. Ford, K. S. Evans, E. G. Hayman, H. Adari, J. Levin, M. Uhlen, and C. A. Toth, 1996, Extended in vivo half-life of human soluble complement receptor type 1 fused to a serum albumin-binding receptor: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 277, p. 534-542.
- Makrides, S. C., S. M. Scesney, P. J. Ford, K. S. Evans, G. R. Carson, and H. C. Marsh, 1992, Cell-surface expression of the C3B/C4B receptor (CR-1) protects Chinese-Hamster Ovary cells (CHO) from lysis by human-complement : *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 24754-24761.
- Maley, F., R. B. Trimble, A. L. Tarentino, and T. H. Plummer, 1989, Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosydases : *Analytical Biochemistry*, v. 180, p. 195-204.

- Malhotra, R., A. C. Willis, J. C. Jensenius, J. Jackson, and R. B. Sim, 1993, Structure and homology of human C1q receptor (Collectin receptor) : *Immunology*, v. 78, p. 341-348.
- Manderson, A. P., M. Botto, and M. J. Walport, 2004, The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus: *Annual Review of Immunology*, v. 22, p. 431-456.
- Markiewski, M. M., and J. D. Lambris, 2007, The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight: *American Journal of Pathology*, v. 171, p. 715-727.
- Martin, B. K., 2007, Transcriptional control of complement receptor gene expression: *Immunologic Research*, v. 39, p. 146-159.
- Martin, V., J. Groenendyk, S. S. Steiner, L. Guo, M. Dabrowska, J. M. R. Parker, W. Muller-Esterl, M. Opas, and M. Michalak, 2006, Identification by mutational analysis of amino acid residues essential in the chaperone function of calreticulin: *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 2338-2346.
- Matsushita, M., Y. Endo, N. Hamasaki, and T. Fujita, 2001, Activation of the lectin complement pathway by ficolins: *International Immunopharmacology*, v. 1, p. 359-363.
- Mercereau-Puijalon, O., M. Guillotte, and I. Vigan-Womas, 2008, Rosetting in *Plasmodium falciparum*: A cytoadherence phenotype with multiple actors: *Transfusion Clinique Et Biologique*, v. 15, p. 62-71.
- Molina, M. C., V. Ferreira, C. Valck, L. Aguilar, J. Orellana, A. Rojas, G. Ramirez, R. Billetta, W. Schwaeble, D. Lemus, and A. Ferreira, 2005, An in vivo role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis: *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 140, p. 133-140.
- Moore, M. D., R. G. Discipio, N. R. Cooper, and G. R. Nemerow, 1989, Hydrodynamic, electron-microscopic, and ligand-binding analysis of the Epstein-Barr virus C3DG receptor (CR-2): *Journal of Biological Chemistry*, v. 264, p. 20576-20582.
- Moreno-Amaral, A. N., E. Gout, C. Danella-Polli, F. Tabarin, P. Lesavre, G. Pereira-da-Silva, N. M. Thielens, and L. Halbwachs-Mecarelli, 2012, M-ficolin and leukosialin (CD43): new partners in neutrophil adhesion: *Journal of Leukocyte Biology*, v. 91, p. 469-474.
- Mossakowska, D., I. Dodd, W. Pindar, and R. A. G. Smith, 1999, Structure-activity relationships within the N-terminal short consensus repeats (SCR) of human CR1 (C3b/C4b receptor, CD35): SCR 3 plays a critical role in inhibition of the classical and alternative pathways of complement activation: *European Journal of Immunology*, v. 29, p. 1955-1965.
- Moulds, J. M., P. A. Zimmerman, O. K. Doumbo, D. A. Diallo, J. P. Atkinson, M. Krych-Goldberg, D. E. Hourcade, and J. J. Moulds, 2002, Expansion of the Knops blood group system and subdivision of Sl(a): *Transfusion*, v. 42, p. 251-256.

C. A. Moxon, R. S. Heyderman and S. C. Wassmer 2009 Dysregulation of coagulation in cerebral malaria *Molecular and Biochemical Parasitology* 166 2 Aug

L. G. Munson, M. E. Scott, A. L. Landay and G. T. Spear 1995 Decreased levels of complement receptor-1 (CD35) on B-Lymphocytes in persons with HIV-infection : *Clinical Immunology and Immunopathology* 75 1 Apr

N

Nakamura, K., M. Robertson, G. Liu, P. Dickie, J. Q. Guo, H. J. Duff, M. Opas, K. Kavanagh, and M. Michalak, 2001, Complete heart block and sudden death in mice overexpressing calreticulin: *Journal of Clinical Investigation*, v. 107, p. 1245-1253.

Nauta, A. J., G. Castellano, W. Xu, A. M. Woltman, M. C. Borrias, M. R. Daha, C. van Kooten, and A. Roos, 2004, Opsonization with C1q and mannose-binding lectin targets apoptotic cells to dendritic cells: *Journal of Immunology*, v. 173, p. 3044-3050.

Nayak, A., J. Ferluga, A. G. Tsolaki, and U. Kishore, 2010, The non-classical functions of the classical complement pathway recognition subcomponent C1q: *Immunology Letters*, v. 131, p. 139-150.

Nguyen Minh, L., Y. Teramura, and H. Iwata, 2011, Layer-by-layer co-immobilization of soluble complement receptor 1 and heparin on islets: *Biomaterials*, v. 32, p. 6487-6492.

Nickells, M., R. Hauhart, M. Krych, V. B. Subramanian, K. Geoghegan-Barek, H. C. Marsh, and J. P. Atkinson, 1998, Mapping epitopes for 20 monoclonal antibodies to CR1: *Clinical and Experimental Immunology*, v. 112, p. 27-33.

Nilsson, U. R., L. Funke, B. Nilsson, and K. N. Ekdahl, 2011, Two conformational forms of target-bound iC3b that distinctively bind complement receptors 1 and 2 and two specific monoclonal antibodies: *Uppsala Journal of Medical Sciences*, v. 116, p. 26-33.

Noumsi, G. T., A. Tounkara, H. Diallo, K. Billingsley, J. J. Moulds, and J. M. Moulds, 2011, Knops blood group polymorphism and susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection: *Transfusion*, v. 51, p. 2462-2469.

O

Ohtani, K., Y. Suzuki, and N. Wakamiya, 2012, Biological Functions of the Novel Collectins CL-L1, CL-K1, and CL-P1: *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

Oikonomopoulou, K., D. Ricklin, P. A. Ward, and J. D. Lambris, 2012, Interactions between coagulation and complement-their role in inflammation: *Seminars in Immunopathology*, v. 34, p. 151-165.

- Oladiran, A., and M. Belosevic, 2010, Trypanosoma carassii calreticulin binds host complement component C1q and inhibits classical complement pathway-mediated lysis: *Developmental and Comparative Immunology*, v. 34, p. 396-405.
- Oladiran, A., and M. Belosevic, 2012, Immune evasion strategies of trypanosomes : A review : *Journal of Parasitology*, v. 98, p. 284-292.
- Ormsby, R. J., T. S. Jokiranta, T. G. Duthy, K. A. Griggs, T. A. Sadlon, E. Giannakis, and D. L. Gordon, 2006, Localization of the third heparin-binding site in the human complement regulator factor H-1: *Molecular Immunology*, v. 43, p. 1624-1632.
- Oudin, S., M. T. Libyh, D. Goossens, X. Dervillez, F. Philbert, B. Reveil, F. Bougy, T. Tabary, P. Rouger, D. Klatzmann, and J. H. M. Cohen, 2000, A soluble recombinant multimeric anti-Rh(D) single-chain Fv/CR1 molecule restores the immune complex binding ability of CR1-deficient erythrocytes: *Journal of Immunology*, v. 164, p. 1505-1513.

P

- Paccaud, J. P., J. L. Carpentier, and J. A. Schifferli, 1990a, Difference in the clustering of complement receptor type-1 (CR-1) on polymorphonuclear leukocytes and erythrocytes – Effect on immune adherence : *European Journal of Immunology*, v. 20, p. 283-289.
- Paccaud, J. P., J. L. Carpentier, and J. A. Schifferli, 1990b, Exudation induces clustering of CR-1 receptors at the surface of human polymorphonuclear leukocytes : *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 172, p. 1203-1208.
- Pace, C. N., F. Vajdos, L. Fee, G. Grimsley, and T. Gray, 1995, How to measure and predict the molar absorption-coefficient of a protein : *Protein Science*, v. 4, p. 2411-2423.
- Pagh, R., K. Duus, I. Laursen, P. R. Hansen, J. Mangor, N. Thielens, G. J. Arlaud, L. Kongerslev, P. Hojrup, and G. Houen, 2008, The chaperone and potential mannan-binding lectin (MBL) co-receptor calreticulin interacts with MBL through the binding site for MBL-associated serine proteases: *Febs Journal*, v. 275, p. 515-526.
- Paidassi, H., P. Tacnet-Delorme, M. Verneret, C. Gaboriaud, G. Houen, K. Duus, W. L. Ling, G. J. Arlaud, and P. Frachet, 2011, Investigations on the C1q-Calreticulin-Phosphatidylserine Interactions Yield New Insights into Apoptotic Cell Recognition: *Journal of Molecular Biology*, v. 408, p. 277-290.
- Pascual, M., and J. A. Schifferli, 1993, Erythrocytes complement receptor type-1 – Binding and transport of immune-complexes through the circulation : *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*, v. 123, p. 39-43.
- Pascual, M., G. Steiger, S. Sadallah, J. P. Paccaud, J. L. Carpentier, R. James, and J. A. Schifferli, 1994, Identification of membrane-bound CR-1 (CD35) in human urine – Evidence for its release by glomerular podocytes : *Journal of Experimental Medicine*, v. 179, p. 889-899.

- Pascual, M., C. Danielsson, G. Steiger, and J. A. Schifferli, 1994, Proteolytic cleavage of CR-1 on human erythrocytes in-vivo – Evidence for enhanced cleavage in AIDS : *European Journal of Immunology*, v. 24, p. 702-708.
- Payne, N. R., and M. A. Horwitz, 1987, Phagocytosis of *Legionella-Pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors : *Journal of Experimental Medicine*, v. 166, p. 1377-1389.
- Peerschke, E. I. B., R. Malhotra, B. Ghebrehiwet, K. B. M. Reid, A. C. Willis, and R. B. Sim, 1993, Isolation of a human endothelial-cell C1Q receptor (C1QR) : *Journal of Leukocyte Biology*, v. 53, p. 179-184.
- Peerschke, E. I. B., K. B. M. Reid, and B. Ghebrehiwet, 1994, Identification of an novel 33-kDa C1Q-binding site on human blood-platelets : *Journal of Immunology*, v. 152, p. 5896-5901.
- Peng, Y. F., R. Kowalewski, S. J. Kim, and K. B. Elkon, 2005, The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells: *Molecular Immunology*, v. 42, p. 781-787.
- Phelan, M. C., 2007, Basic techniques in mammalian cell tissue culture: Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.], v. Chapter 1.
- Phillips, A. E., J. Toth, A. W. Dodds, U. V. Girija, C. M. Furze, E. Pala, R. B. Sim, K. B. M. Reid, W. J. Schwaeble, R. Schmid, A. H. Keeble, and R. Wallis, 2009, Analogous Interactions in Initiating Complexes of the Classical and Lectin Pathways of Complement: *Journal of Immunology*, v. 182, p. 7708-7717.
- Picard, M. D., C. L. Pettey, H. C. Marsh, and L. J. Thomas, 2000, Characterization of N-linked oligosaccharides bearing sialyl Lewis x moieties on an alternatively glycosylated form of soluble complement receptor type I (sCRI): *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 31, p. 5-13.
- Piccoli, A. K., A. P. Alegretti, L. Schneider, P. S. Lora, and R. M. Xavier, 2011, Expression of complement regulatory proteins CD55, CD59, CD35, and CD46 in rheumatoid arthritis: *Revista brasileira de reumatologia*, v. 51, p. 503-10.
- Pickering, M. C., M. Botto, P. R. Taylor, P. J. Lachmann, and M. J. Walport, 2001, Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis: *Advances in Immunology*, Vol. 76, v. 76, p. 227-324.

R

- Rabinovici, R., M. Sofrinski, L. Hillegass, K. Esser, J. Vernick, and G. Feuerstein, 1992, Complement mediates IL-2 induced lung injury – Studies with soluble complement receptor type-1 : *Circulation*, v. 86, p. 566-566.

- Ramirez, G., C. Valck, V. P. Ferreira, N. Lopez, and A. Ferreira, 2011a, Extracellular *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the host-parasite interplay: Trends in Parasitology, v. 27, p. 115-122.
- Ramirez, G., C. Valck, M. C. Molina, C. H. Ribeiro, N. Lopez, G. Sanchez, V. P. Ferreira, R. Billetta, L. Aguilar, I. Maldonado, P. Cattán, W. Schwaebler, and A. Ferreira, 2011b, *Trypanosoma cruzi* calreticulin: A novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity: Immunobiology, v. 216, p. 265-273.
- Rendic, D., I. B. H. Wilson, and K. Paschinger, 2008, The glycosylation capacity of insect cells: Croatica Chemica Acta, v. 81, p. 7-21.
- Reilly, B. D., S. C. Makrides, P. J. Ford, H. C. Marsh, and C. Mold, 1994, Quantitative-analysis of C4B dimer binding to distinct sites on C3B/C4B receptor (CR-1) : Journal of Biological Chemistry, v. 269, p. 7696-7701.
- Ricklin, D., G. Hajishengallis, K. Yang, and J. D. Lambris, 2010, Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis: Nature Immunology, v. 11, p. 785-797.
- Ricklin, D., and J. D. Lambris, 2007, Complement-targeted therapeutics: Nature Biotechnology, v. 25, p. 1265-1275.
- Rimoldi, M. T., A. J. Tenner, D. A. Bobak, and K. A. Joiner, 1989, Complement component C1Q enhances invasion of human mononuclear phagocytes and fibroblasts by *Trypanosoma-Cruzi* trypomastigotes : Journal of Clinical Investigation, v. 84, p. 1982-1989.
- Rizvi, S. M., L. Mancino, V. Thammavongsa, R. L. Cantley, and M. Raghavan, 2004, A polypeptide binding conformation of calreticulin is induced by heat shock, calcium depletion, or by deletion of the C-terminal acidic region: Molecular Cell, v. 15, p. 913-923.
- Rodgaard, A., B. S. Thomsen, G. Bendixen, and K. Bendtzen, 1995, Increased expression of complement receptor type-1 (CR1,CD35) on human peripheral-blood T-lymphocytes after polyclonal activation in-vitro : Immunologic Research, v. 14, p. 69-76.
- Roecklein, J. A., R. P. Swartz, and H. Yeager, 1992, Non-opsonic uptake of *Mycobacterium-Avium* complex by human monocytes and alveolar macrophages : Journal of Laboratory and Clinical Medicine, v. 119, p. 772-781.
- Rogers, J., R. Li, D. Mastroeni, A. Grover, B. Leonard, G. Ahern, P. Cao, H. Kolody, L. Vedders, W. P. Kolb, and M. Sabbagh, 2006, Peripheral clearance of amyloid beta peptide by complement C3-dependent adherence to erythrocytes: Neurobiology of Aging, v. 27, p. 1733-1739.
- Rooney, I. A., J. E. Heuser, and J. P. Atkinson, 1996, GPI-anchored complement regulatory proteins in seminal plasma - An analysis of their physical condition and the mechanisms of their binding to exogenous cells: Journal of Clinical Investigation, v. 97, p. 1675-1686.

- Rooryck, C., A. Diaz-Font, D. P. S. Osborn, E. Chabchoub, V. Hernandez-Hernandez, H. Shamseldin, J. Kenny, A. Waters, D. Jenkins, A. Al Kaissi, G. F. Leal, B. Dallapiccola, F. Carnevale, M. Bitner-Glindzicz, M. Lees, R. Hennekam, P. Stanier, A. J. Burns, H. Peeters, F. S. Alkuraya, and P. L. Beales, 2011, Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome: *Nature Genetics*, v. 43, p. 197-U36.
- Rossi, V., I. Bally, N. M. Thielens, A. F. Esser, and G. J. Arlaud, 1998, Baculovirus-mediated expression of truncated modular fragments from the catalytic region of human complement serine protease C1s - Evidence for the involvement of both complement control protein modules in the recognition of the C4 protein substrate: *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, p. 1232-1239.
- Roumenina, L. T., D. Sene, M. Radanova, J. Blouin, L. Halbwachs-Mecarelli, M. A. Dragon-Durey, W. H. Fridman, and V. Fremeaux-Bacchi, 2011, Functional Complement C1q Abnormality Leads to Impaired Immune Complexes and Apoptotic Cell Clearance: *Journal of Immunology*, v. 187, p. 4369-4373.
- Rowe, J. A., S. J. Rogerson, A. Raza, J. M. Moulds, M. D. Kazatchkine, K. Marsh, C. I. Newbold, J. P. Atkinson, and L. H. Miller, 2000, Mapping of the region of complement receptor (CR) 1 required for *Plasmodium falciparum* resetting and demonstration of the importance of CR1 in resetting in field isolates: *Journal of Immunology*, v. 165, p. 6341-6346.
- Ruiz, S., A. H. Henschen-Edman, H. Nagase, and A. J. Tenner, 1999, Digestion of C1q collagen-like domain with MMPs-1,-2,-3, and-9 further defines the sequence involved in the stimulation of neutrophil superoxide production: *Journal of Leukocyte Biology*, v. 66, p. 416-422.
- Ruiz, S., A. H. Henschen-Edman, and A. J. Tenner, 1995, Localization of the site on the complement component C1q required for the stimulation of neutrophil superoxide production: *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 30627-30634.
- Rutkowski, M. J., M. E. Sughrue, A. J. Kane, B. J. Ahn, S. Fang, and A. T. Parsa, 2010, The complement cascade as a mediator of tissue growth and regeneration: *Inflammation Research*, v. 59, p. 897-905.

S

- Sadallah, S., C. Hess, M. Trendelenburg, C. Vedeler, M. Lopez-Trascasa, and I. A. Schifferli, 2003, Autoantibodies against complement receptor 1 (CD35) in SLE, liver cirrhosis and HIV-infected patients: *Clinical and Experimental Immunology*, v. 131, p. 174-181.
- Sambrook, J., and D. Russell, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sardi, F., L. Fassina, L. Venturini, M. Inguscio, F. Guerriero, E. Rolfo, and G. Ricevuti, 2011, Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly: Autoimmunity Reviews, v. 11, p. 149-153.
- Schlesinger, L. S., C. G. Bellingerkawahara, N. R. Payne, and M. A. Horwitz, 1990, Phagocytosis of Mycobacterium-Tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component-C3 : Journal of Immunology, v. 144, p. 2771-2780.
- Schlesinger, L. S., and M. A. Horwitz, 1990, Phagocytosis of Leprosy Bacilli is mediated by complement receptors CR-1 and CR3 on human monocytes and complement component-C3 in serum : Journal of Clinical Investigation, v. 85, p. 1304-1314.
- Schlesinger, L. S., and M. A. Horwitz, 1991, Phagocytosis of Mycobacterium-Leprae by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR-1 (CD35), CR3 (CD11B/CD18), and CR4 (CD11C/CD18) and IFN-Gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium : Journal of Immunology, v. 147, p. 1983-1994.
- Sengelov, H., 1995, Complement receptors in neutrophils : Critical Reviews in Immunology, v. 15, p. 107-131.
- Seya, T., V. M. Holers, and J. P. Atkinson, 1985, Purification and functional-analysis of the polymorphic variants of the C3B/C4B receptor (CR-1) and comparison with H, C4B-binding protein (C4BP), and decay accelerating factor (DAF) : Journal of Immunology, v. 135, p. 2661-2667.
- Shapiro, S., D. Kohn, B. Miller, and H. Gershon, 1994, Erythrocytes from young but not elderly donors can bind and degrade immune complex-bound and antibody-bound C3 in-vitro : Clinical and Experimental Immunology, v. 95, p. 181-190.
- Y. Shen, L. F. Lue, L. B. Yang, A. Roher, Y. M. Kuo, R. Strohmeyer, W. J. Goux, V. Lee, G. V. W. Johnson, S. D. Webster, N. R. Cooper, B. Bradt and J. Rogers 2001 Complement activation by neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease Neuroscience Letters, 305 3 Jun 15
- Sim, R. B., S. K. Moestrup, G. R. Stuart, N. J. Lynch, J. H. Lu, W. J. Schwaeble, and R. Malhotra, 1998, Interaction of clq and the collectins with the potential receptors calreticulin (cC1qR/collectin receptor) and megalin: Immunobiology, v. 199, p. 208-224.
- R. B. Sim, J. J. Roord and E. Sim 1983 Loss of complement receptor-CR1 on ageing of human red-blood-cells : Immunobiology, 164 3-4
- Sivasankar, B., A. K. Dinda, S. C. Tiwari, L. M. Srivastava, and N. Das, 2004, Modulation of urinary CR1 in systemic lupus erythematosus: Lupus, v. 13, p. 228-233.
- Sjoberg, A. P., L. A. Trouw, and A. M. Blom, 2009, Complement activation and inhibition: a delicate balance: Trends in Immunology, v. 30, p. 83-90.

- Skattum, L., M. van Deuren, T. van der Poll, and L. Truedsson, 2011, Complement deficiency states and associated infections: *Molecular Immunology*, v. 48, p. 1643-1655.
- Smith, B. O., R. L. Mallin, M. Krych-Goldberg, X. F. Wang, R. E. Hauhart, K. Bromek, D. Uhrin, J. P. Atkinson, and P. N. Barlow, 2002, Structure of the C3b binding site of CR1 (CD35), the immune adherence receptor: *Cell*, v. 108, p. 769-780.
- Soares, D. C., D. L. Gerloff, N. R. Syme, A. F. W. Coulson, J. Parkinson, and P. N. Barlow, 2005, Large-scale modelling as a route to multiple surface comparisons of the CCP module family: *Protein Engineering Design & Selection*, v. 18, p. 379-388.
- Sola, R. J., and K. Griebenow, 2009, Effects of Glycosylation on the Stability of Protein Pharmaceuticals: *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 98, p. 1223-1245.
- Sørensen, H. P., H. U. Sperling-Petersen, and K. K. Mortensen, 2003, Production of recombinant thermostable proteins expressed in *Escherichia coli*: completion of protein synthesis is the bottleneck: *Journal of Chromatography B*, v. 786, p. 207-214.
- Sorensen, R., S. Thiel, and J. C. Jensenius, 2005, Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations: *Springer Seminars in Immunopathology*, v. 27, p. 299-319.
- Souto-Padron, T., C. A. Labriola, and W. de Souza, 2004, Immunocytochemical localisation of calreticulin in *Trypanosoma cruzi*: *Histochemistry and Cell Biology*, v. 122, p. 563-569.
- Souza, D. G., D. Esser, R. Bradford, A. T. Vieira, and M. M. Teixeira, 2005, APT070 (Mirococept), a membrane-localised complement inhibitor, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury: *British Journal of Pharmacology*, v. 145, p. 1027-1034.
- Spadafora, C., G. A. Awandare, K. M. Kopydlowski, J. Czege, J. K. Moch, R. W. Finberg, G. C. Tsokos, and J. A. Stoute, 2010, Complement Receptor 1 Is a Sialic Acid-Independent Erythrocyte Receptor of *Plasmodium falciparum*: *Plos Pathogens*, v. 6.
- Stoute, J. A., 2011, Complement receptor 1 and malaria: *Cellular Microbiology*, v. 13, p. 1441-1450.
- Stuart, G. R., N. J. Lynch, A. J. Day, W. J. Schwaeble, and R. B. Sim, 1997, The C1q and collectin binding site within C1q receptor (cell surface calreticulin): *Immunopharmacology*, v. 38, p. 73-80.
- Suchitra, S., and P. Joshi, 2005, Characterization of *Haemonchus contortus* calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite: *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, v. 1722, p. 293-303.
- Sutterwala, F. S., L. A. Rosenthal, and D. M. Mosser, 1996, Cooperation between CR1 (CD35) and CR3 (CD11b/CD18) in the binding of complement-opsonized particles: *Journal of Leukocyte Biology*, v. 59, p. 883-890.

T

- Tacnet, P., M. Galvan, S. Chevallier, A. J. Tenner, and G. J. Arlaud, 2001, beta-amyloid fibrils bind C1q through its globular regions and activate C1 under physiological conditions: *Molecular Immunology*, v. 38, p. 124-124.
- Tang, Y., N. Drentin, R. C. Duncan, L. C. Wijeyewickrema, and R. N. Pike, 2012, Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: Two genes, five proteins and many functions?: *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, v. 1824, p. 253-262.
- Tas, S. W., L. B. Klickstein, S. F. Barbashov, and A. Nicholson-Weller, 1999, C1q and C4b bind simultaneously to CR1 and additively support erythrocyte adhesion: *Journal of Immunology*, v. 163, p. 5056-5063.
- Teillet, F., B. Dublet, J. P. Andrieu, C. Gaboriaud, G. J. Arland, and N. M. Thielens, 2005, The two major oligomeric forms of human mannan-binding lectin: Chemical characterization, carbohydrate-binding properties, and interaction with MBL-associated serine proteases: *Journal of Immunology*, v. 174, p. 2870-2877.
- Teillet, F., M. Lacroix, S. Thiel, D. Weilguny, T. Agger, G. J. Arlaud, and N. M. Thielens, 2007, Identification of the site of human mannan-binding lectin involved in the interaction with its partner serine proteases: The essential role of Lys55: *Journal of Immunology*, v. 178, p. 5710-5716.
- Teillet, F., C. Gaboriaud, M. Lacroix, L. Martin, G. J. Arlaud, and N. M. Thielens, 2008, Crystal structure of the CUB1-EGF-CUB2 domain of human MASP-1/3 and identification of its interaction sites with mannan-binding lectin and ficolins: *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, p. 25715-25724.
- Tenner, A. J., and N. R. Cooper, 1982, Stimulation of a human polymorphonuclear leukocyte oxidative response by the C1Q subunit of the 1st complement component : *Journal of Immunology*, v. 128, p. 2547-2552.
- Tetteh-Quarcoop, P. B., C. Q. Schmidt, W.-H. Tham, R. Hauhart, H. D. T. Mertens, A. Rowe, J. P. Atkinson, A. F. Cowman, J. A. Rowe, and P. N. Barlow, 2012, Lack of Evidence from Studies of Soluble Protein Fragments that Knops Blood Group Polymorphisms in Complement Receptor-Type 1 Are Driven by Malaria: *PloS one*, v. 7, p. e34820.
- Tham, W. H., C. Q. Schmidt, R. E. Hauhart, M. Guariento, P. B. Tetteh-Quarcoop, S. Lopaticki, J. P. Atkinson, P. N. Barlow, and A. F. Cowman, 2011, Plasmodium falciparum uses a key functional site in complement receptor type-1 for invasion of human erythrocytes: *Blood*, v. 118, p. 1923-1933.
- Tham, W. H., D. W. Wilson, S. Lopaticki, C. Q. Schmidt, P. B. Tetteh-Quarcoop, P. N. Barlow, D. Richard, J. E. Corbin, J. G. Beeson, and A. F. Cowman, 2010, Complement receptor 1 is the host erythrocyte receptor for Plasmodium falciparum PfRh4 invasion ligand: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, p. 17327-17332.

- Thieblemont, N., N. Haeflencavaillon, A. Haeffner, B. Cholley, L. Weiss, and M. D. Kazatchkine, 1995, Triggering of complement receptors CR-1 (CD35) and CR3 (CD11B/CD18) induces nuclear translocation of Nf-Kappa-B (P50/P65) in human monocytes and enhances viral replication in HIV-infected monocytic cells : *Journal of Immunology*, v. 155, p. 4861-4867.
- Thieblemont, N., N. Haeflencavaillon, A. Ledur, J. Lagestehr, H. W. L. Zieglerheitbrock, and M. D. Kazatchkine, 1993, CR-1 (CD35) and CR3 (CD11B/CD18) mediate infection of human monocytes and monocytic cell-lines with complement-opsonized HIV independently of CD4 : *Clinical and Experimental Immunology*, v. 92, p. 106-113.
- Thiel, S., 2007, Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins: *Molecular Immunology*, v. 44, p. 3875-3888.
- Thielens, N. M., I. M. Bally, C. F. Ebenbichler, M. P. Dierich, and G. J. Arlaud, 1993, Further characterization of the interaction between the C1q subcomponent of human C1 and the transmembrane envelope glycoprotein GP41 of HIV-1 : *Journal of Immunology*, v. 151, p. 6583-6592.
- Thielens, N. M., S. Cseh, S. Thiel, T. Vorup-Jensen, V. Rossi, J. C. Jensenius, and G. J. Arlaud, 2001, Interaction properties of human mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases-1 and -2, MBL-associated protein 19, and MBL: *Journal of Immunology*, v. 166, p. 5068-5077.
- Thomas, B. N., B. Donvito, I. Cockburn, T. Fandeur, J. A. Rowe, J. H. M. Cohen, and J. M. Moulds, 2005, A complement receptor-1 polymorphism with high frequency in malaria endemic regions of Asia but not Africa: *Genes and Immunity*, v. 6, p. 31-36.
- Thomas, L. J., K. Panneerselvam, D. T. Beattie, M. D. Picard, B. Xu, C. W. Rittershaus, H. C. Marsh, R. A. Hammond, J. Qian, T. Stevenson, D. Zopf, and R. J. Bayer, 2004, Production of a complement inhibitor possessing sialyl Lewis X moieties by in vitro glycosylation technology: *Glycobiology*, v. 14, p. 883-893.
- Trouw, L. A., A. M. Blom, and P. Gasque, 2008, Role of complement and complement regulators in the removal of apoptotic cells: *Molecular Immunology*, v. 45, p. 1199-1207.

V

- Vaithilingam, A., J. E. Teixeira, P. J. Miller, B. T. Heron, and C. D. Huston, 2012, Entamoeba histolytica Cell Surface Calreticulin Binds Human C1q and Functions in Amebic Phagocytosis of Host Cells: *Infection and Immunity*, v. 80, p. 2008-2018.
- Valck, C., G. Ramirez, N. Lopez, C. H. Ribeiro, I. Maldonado, G. Sanchez, V. P. Ferreira, W. Schwaeble, and A. Ferreira, 2010, Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by Trypanosoma cruzi calreticulin: *Molecular Immunology*, v. 47, p. 1516-1521.

- van den Berg, R. H., M. C. Faber-Krol, R. B. Sim, and M. R. Daha, 1998, The first subcomponent of complement, C1q, triggers the production of IL-8, IL-6, and monocyte chemoattractant peptide-1 by human umbilical vein endothelial cells: *Journal of Immunology*, v. 161, p. 6924-6930.
- van den Berg, R. H., C. E. H. Siegert, M. C. Faber-Krol, T. W. J. Huizinga, L. A. Van Es, and M. R. Daha, 1998b, Anti-C1q receptor/calreticulin autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): *Clinical and Experimental Immunology*, v. 111, p. 359-364.
- Van Durme, J., S. Maurer-Stroh, R. Gallardo, H. Wilkinson, F. Rousseau, and J. Schymkowitz, 2009, Accurate Prediction of DnaK-Peptide Binding via Homology Modelling and Experimental Data: *Plos Computational Biology*, v. 5.
- Van Es, M. A., and L. H. van den Berg, 2009, Alzheimer's disease beyond APOE: *Nature Genetics*, v. 41, p. 1047-1048.
- Veerhuis, R., H. M. Nielsen, and A. J. Tenner, 2011, Complement in the brain: *Molecular Immunology*, v. 48, p. 1592-1603.
- Verthelyi, D., and R. A. Zeuner, 2003, Differential signaling by CpG DNA in DCs and B cells: not just TLR9: *Trends in Immunology*, v. 24, p. 519-522.
- I. Vigan-Womas, M. Guillotte, A. Juillerat, A. Hessel, B. Raynal, P. England, J. H. Cohen, O. Bertrand, T. Peyrard, G. A. Bentley, A. Lewit-Bentley and O. Mercereau-Puijalon 2012 Structural Basis for the ABO Blood-Group Dependence of Plasmodium falciparum Rosetting *Plos Pathogens* 8 7 Jul
- Villamil Giraldo, A. M., M. Lopez Medus, M. Gonzalez Lebrero, R. S. Pagano, C. A. Labriola, L. Landolfo, J. M. Delfino, A. J. Parodi, and J. J. Caramelo, 2010, The Structure of Calreticulin C-terminal Domain Is Modulated by Physiological Variations of Calcium Concentration: *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, p. 4544-4553.
- Vorup-Jensen, T., E. S. Sorensen, U. B. Jensen, W. Schwaeble, T. Kawasaki, Y. Ma, K. Uemura, N. Wakamiya, Y. Suzuki, T. G. Jensen, K. Takahashi, R. A. B. Ezekowitz, S. Thiel, and J. C. Jensenius, 2001, Recombinant expression of human mannan-binding lectin: *International Immunopharmacology*, v. 1, p. 677-687.

W

- Wagner, C., C. Ochmann, M. Schoels, T. Giese, S. Stegmaier, R. Richter, F. Hug, and G. M. Hansch, 2006, The complement receptor 1, CR1 (CD35), mediates inhibitory signals in human T-lymphocytes: *Molecular Immunology*, v. 43, p. 643-651.
- Wallis, R., and K. Drickamer, 1999, Molecular determinants of oligomer formation and complement fixation in mannose-binding proteins: *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 3580-3589.

- Wallis, R., D. A. Mitchell, R. Schmid, W. J. Schwaeble, and A. H. Keeble, 2010, Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation: *Immunobiology*, v. 215, p. 1-11.
- Wang, W. Y., and B. A. Malcolm, 1999, Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange (TM) site-directed mutagenesis: *Biotechniques*, v. 26, p. 680-682.
- Wang, M. Y., Y. N. Zhang, Z. Li-Yun, X. Lu, M. Lei, R. F. Li, and Z. L. Chen, 2008, Characterization of the binding of mannan-binding lectin to Raji cells: *Progress in Biochemistry and Biophysics*, v. 35, p. 335-340.
- Wang, W.-A., J. Groenendyk, and M. Michalak, 2012, Calreticulin signaling in health and disease: *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 44, p. 842-6.
- Weisman, H. F., T. Bartow, M. K. Leppo, M. P. Boyle, H. C. Marsh, Jr., G. R. Carson, K. H. Roux, M. L. Weisfeldt, and D. T. Fearon, 1990a, Recombinant soluble CR1 suppressed complement activation, inflammation, and necrosis associated with reperfusion of ischemic myocardium: *Transactions of the Association of American Physicians*, v. 103, p. 64-72.
- Weisman, H. F., T. Bartow, M. K. Leppo, H. C. Marsh, G. R. Carson, M. F. Concino, M. P. Boyle, K. H. Roux, M. L. Weisfeldt, and D. T. Fearon, 1990b, Soluble human-complement receptor type-1 – In vivo inhibitor of complement suppressing postischemic myocardial inflammation and necrosis : *Science*, v. 249, p. 146-151.
- Wickham, T. J., T. Davis, R. R. Granados, M. L. Shuler, and H. A. Wood, 1992, Screening of insect cell-lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system : *Biotechnology Progress*, v. 8, p. 391-396.
- Wilson, J. G., E. E. Murphy, W. W. Wong, L. B. Klickstein, J. H. Weis, and D. T. Fearon, 1986a, Identification of a restriction-fragment-length- polymorphism (RFLP) by a CR-1 cDNA that correlates with the number of CR-1 on erythrocytes : *Journal of Experimental Medicine*, v. 164, p. 50-59.
- Wilson, J. G., W. D. Ratnoff, P. H. Schur, and D. T. Fearon, 1986b, Decreased expression of the C3B/C4B receptor (CR-1) and the C3D receptor (CR-2) on lymphocytes-B and of CR-1 on neutrophils of patients with systemic lupus-erythematosus (SLE) : *Arthritis and Rheumatism*, v. 29, p. 739-747.
- Wittenborn, T., S. Thiel, L. Jensen, H. J. Nielsen, and J. C. Jensenius, 2010, Characteristics and Biological Variations of M-Ficolin, a Pattern Recognition Molecule, in Plasma: *Journal of Innate Immunity*, v. 2, p. 167-180.
- Wong, W. W., J. M. Cahill, M. D. Rosen, C. A. Kennedy, E. T. Bonaccio, M. J. Morris, J. G. Wilson, L. B. Klickstein, and D. T. Fearon, 1989, Structure of the human CR-1 gene – Molecular-basis of the structural and quantitative polymorphisms and identification of a new-CR1-like allele : *Journal of Experimental Medicine*, v. 169, p. 847-863.

Y

- Yaskanin, D. D., and F. J. Waxman, 1995, Expression of the CR-1 receptor on human leukemia-derived CD4(+) T-cell lines : *Cellular Immunology*, v. 163, p. 139-147.
- Yazdanbakhsh, K., 2005, Review: complement receptor 1 therapeutics for prevention of immune hemolysis: *Immunohematology / American Red Cross*, v. 21, p. 109-18.
- Yoshizaki, T., K. Ohtani, W. Motomura, S. J. Jang, K. Mori, N. Kitamoto, I. Yoshida, Y. Suzuki, and N. Wakamiya, 2012, Comparison of human blood concentrations of collectin kidney 1 and mannan-binding lectin: *Journal of Biochemistry*, v. 151, p. 57-64.
- Young, P. J., D. Szeszakowska, R. Morse, P. Winyard, J. Whatmore, K. B. M. Reid, S. J. Johnson, and P. Eggleton, 2006, Purification, Isolation and Characterization of Native and Recombinant Calreticulin: Analysis of Structural Integrity and Functional Implications: *Calcium Binding Proteins*, v. 1, p. 160-169.

Z

- Zhang, Q., J.-T. Yu, Q.-X. Zhu, W. Zhang, Z.-C. Wu, D. Miao, and L. Tan, 2010, Complement receptor 1 polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer's disease: *Brain Research*, v. 1348, p. 216-221.
- Zimmerli, S., S. Edwards, and J. D. Ernst, 1996, Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages: *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 15, p. 760-770.
- Zundel, S., S. Cseh, M. Lacroix, M. R. Dahl, M. Matsushita, J. P. Andrieu, W. J. Schwaeble, J. C. Jensenius, T. Fujita, G. J. Arlaud, and N. M. Thielens, 2004, Characterization of recombinant mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-3 suggests an activation mechanism different from that of MASP-1 and MASP-2: *Journal of Immunology*, v. 172, p. 4342-4350.

Résumé

Les collagènes de défense (C1q, MBL, ficolines) sont capables de reconnaître de nombreux motifs à la surface des éléments du non soi ou du soi altéré, via leurs domaines globulaires C-terminaux. Ils peuvent également interagir avec certains récepteurs présents à la surface des cellules humaines ou de pathogènes. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la calréticuline de *Trypanosoma Cruzi* (TcCRT), une protéine qui interviendrait dans les mécanismes d'évasion de ce parasite. Dans le but de réaliser des études fonctionnelles et structurales de la TcCRT, nous avons produit différents fragments recombinants. Nous ne sommes cependant pas parvenus à obtenir un échantillon nous permettant d'accomplir nos objectifs, nous conduisant à reporter nos efforts sur l'étude d'un autre récepteur, CR1/CD35. Il a été montré précédemment que CR1/CD35 pouvait interagir avec C1q et la MBL, probablement par ses modules CCP 22-30. Cette interaction pourrait être impliquée dans l'élimination des complexes immuns, la phagocytose ou encore des mécanismes de signalisation cellulaire. A l'aide d'un fragment recombinant comprenant les modules CCP 22-30 de CR1, nous avons confirmé par SPR l'interaction avec C1q et la MBL. Nous avons également montré pour la première fois que CR1 pouvait interagir avec les ficolines L, H et M par ce même domaine. Nos résultats indiquent que cette interaction prendrait majoritairement place dans la région collagène de C1q, de la MBL et de la ficoline L, probablement à proximité du site de fixation des protéases. L'utilisation de fragments tronqués de CR1 CCP 22-30, nous permet de proposer l'hypothèse que les modules CCP 24 et 25 de CR1 seraient le site majoritaire de fixation des collagènes de défense. Ces données ouvrent la voie à des études structurales et fonctionnelles visant à approfondir notre connaissance des interactions CR1 – collagène de défense et de leur rôle physiologique.

Mots-clés : immunité innée, complément, C1q, MBL, ficoline, CR1, CD35, TcCRT, interactions moléculaires

Abstract

The defence collagens (C1q, MBL, ficolins) are able to recognize various patterns on non-self or altered-self surfaces through their globular domains. They can also interact with receptors at the surface of human cells or pathogens. First, we were interested in the calreticulin from *Trypanosoma cruzi*, a protein which may be involved in the evasion mechanisms of that parasite. To achieve structural and functional studies, we produced recombinant fragments from TcCRT. Unfortunately, we couldn't obtain any sample suitable for our studies, so we decided to focus on another receptor, CR1/CD35. It has been shown previously by other teams that C1q and MBL bind to CR1/CD35, probably through CCP modules 22 to 30, close to the cell membrane. This interaction could be involved in several biologic mechanisms: elimination of immune complexes, phagocytosis, cell signaling. We produced a recombinant fragment including the CCP modules 22 to 30 of CR1 and confirmed its interaction with C1q and MBL using SPR. We also showed for the first time that L-, H- and M-ficolins bind to CR1 through CCP modules 22 to 30. Our results point out that the CR1 binding site of C1q, MBL and L-ficolin is located in the collagen stalks, most probably at or in close proximity to the serine protease interaction site. By using CR1 CCP 22-30 truncated fragments, we suggest that CCP modules 24 to 25 could be the main binding site for the defence collagens. These data open the way for structural and functional studies aiming at improving our knowledge of the CR1 – defense collagen interactions and of their physiological role.

Keywords : innate immunity, complement, C1q, MBL, ficolin, CR1, CD35, TcCRT, molecular interactions.