

**UNIVERSITE DE LIMOGES**

École Doctorale Thématique 524 : Biologie, Santé, "Bio-santé"

Faculté des Sciences et Techniques

**Laboratoire CNRS UMR 6101**

« **Physiologie moléculaire de la réponse immune et des lymphoproliférations** »

Thèse N°

**THESE**

**pour obtenir le grade de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie

présentée et soutenue publiquement par

**Virginie Pascal**

**le 03 Décembre 2009**

# **Vers l'utilisation des Immunoglobulines A humaines ou de leurs variants à des fins thérapeutiques**

**Thèse dirigée par Pr. Michel Cogné et Dr. Arnaud Debin**

## **JURY**

**Président :** Jean Feuillard, Professeur-Praticien Hospitalier (CNRS UMR6101, Limoges)

**Rapporteurs :** Renato Monteiro, Directeur de Recherche (INSERM U699, Paris)  
Pierre Aucouturier, Professeur-Praticien Hospitalier (INSERM UMRS712, Paris)

**Examineur :** Hervé Watier, Professeur-Praticien Hospitalier (CNRS UMR6239, Tours)

**Invité :** Gérard Tiraby, Docteur - PDG fondateur de Cayla-Invivogen (Toulouse)



## Résumé

Parmi le nouvel ordre de médicaments représenté par les anticorps monoclonaux, la classe des immunoglobulines G occupe une place écrasante mais commence à révéler quelques limitations. Afin d'essayer de dépasser d'une façon originale ces limites, il nous est apparu judicieux de nous consacrer à une classe d'anticorps jusqu'ici peu étudiée sous l'angle d'applications thérapeutiques éventuelles : les IgA. Cette classe présente en effet des caractéristiques différentes et ainsi potentiellement complémentaires de celles des IgG. L'IgA est l'immunoglobuline la plus abondamment synthétisée dans l'organisme. Elle présente de plus un tropisme préférentiel pour les muqueuses, qui en fait un « candidat médicament » particulièrement intéressant pour cibler les nombreuses tumeurs à localisation muqueuse. Un autre argument plaidant pour le développement d'anticorps IgA thérapeutiques réside dans la récente mise en évidence du potentiel anti-tumoral des neutrophiles via une cytotoxicité médiée par le récepteur des IgA (Fc $\alpha$ RI / CD89). Le travail présenté dans ce manuscrit concerne principalement l'évaluation *in vitro* et en « phase 0 » (à l'aide de modèles animaux) d'anticorps monoclonaux de classe IgA spécifiques de l'antigène CD20 (exprimé par la majorité des lymphomes B humains). Dans ce cadre, nous avons aussi étudié la fonction de divers glycanes portés par la chaîne lourde de l'IgA afin d'évaluer la possibilité de leur élimination au sein d'IgA variantes, dont la production et la caractérisation pourrait être facilitées. Ce travail identifie ainsi des modifications de la glycosylation potentiellement responsables de la formation de dépôts rénaux en cas d'administration *in vivo*. Il identifie aussi des variants hypoglycosylés des IgA gardant une innocuité apparente *in vivo* et dont les propriétés fonctionnelles sont intactes.

# *Abréviations*

**[-/-]** : Homozygote négatif  
**[-/+]** : Hétérozygote  
**[+/+]** : Homozygote positif  
**Ac** : Anticorps  
**Ac-bs** : Anticorps bi-spécifique  
**AcM** : Anticorps monoclonal  
**ACE** : Antigène carcino-embryonnaire  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**ADCC** : Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'Ac (*Antibody dependant cellular cytotoxicity*)  
**Ag** : Antigène  
**AHAC** : Anticorps humains anti-chimériques (*anti-human-chimeric antibodies*)  
**APRIL** : *A proliferation-inducing ligand*  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARNm** : Acide ribonucléique messenger  
**BAFF** : *B-cell activating factor*  
**BCR** : Récepteur des cellules B  
**C** : Région constante  
**CDC** : Cytotoxicité dépendante du complément (*Complement dependant cytotoxicity*)  
**CDR** : Régions déterminant la complémentarité de l'Ig (*Complementary determining region*)  
**CH** : Région constante de chaîne lourde  
**ch.H** : chaîne lourde  
**ch.L** : chaîne légère  
**CL** : Région constante de chaîne légère  
**CMH** : Complexe majeur d'histocompatibilité  
**CRP** : Protéines régulatrices du complément (*complement-regulatory protein*)  
**CSR** : Commutation isotypique (*class switch recombination*)  
**D** : Région de diversité  
**Da** : Dalton  
**EBV** : Virus d'Epstein-Barr (*Epstein-Barr Virus*)  
**G-CSF** : *granulocyte colony-stimulating factor*  
**GM-CSF** : *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*  
**Fab** : Domaine de liaison à l'antigène de l'Ig = VL/CL+VH/CH1 (*fragment antigen binding*)  
**Fc** : Domaine effecteur d'une immunoglobuline  
**FcγR** : Récepteur de fragment constant de l'IgG  
**FcRn** : Récepteur néonatal de la partie Fc de l'IgG (*neonatal Fc receptor*)  
**Fv** : fragments variable d'anticorps = VL+VH  
**FDA** : *Food and drug administration*  
**H** : Région constante de chaîne lourde  
**Hama** : Anticorps humains anti-anticorps de souris (*human antimouse antibody*)  
**Ig** : Immunoglobulines  
**IgAd** : IgA dimérique  
**IgAm** : IgA monomérique  
**IgAp** : IgA polymérique  
**IgAs** : IgA sécrétoire  
**IgH** : Locus de chaîne lourde d'immunoglobulines  
**IL** : Interleukine

**J** : Région de jonction  
**L** : Région constante de chaîne légère  
**NK** : *natural killer*  
**NHL** : Lymphomes non-hodgkinien (*non-Hodgkin's lymphoma*)  
**pIgR** : récepteurs d'immunoglobulines polymériques (*polymeric Ig receptor*)  
**sdAb** : Anticorps à domaine unique (*single domain antibody*)  
**scFv** : Fv simple chaîne (*single chain Fv*)  
**SDR** : Résidus déterminants spécifiques de l'Ig (*specificity determining residues*)  
**SHM** : Hypermutation somatique (*somatic hypermutation*)  
**TAA** : Antigènes associés aux tumeurs (*tumor-associated antigen*)  
**TNF** : Tumor necrosis factor  
**TLR** : Récepteur de type *Toll* (*Toll-like receptors*)  
**V** : Région variable  
**VH** : Région variable de chaîne lourde  
**VIH** : virus de l'immunodéficience humaine  
**VL** : Région variable de chaîne légère

# SOMMAIRE

<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>
-----------------------------------	----------

<b>Rappels bibliographique.....</b>	<b>5</b>
-------------------------------------	----------

<u>I. Immunothérapie anti-tumorale.....</u>	<u>6</u>
---	----------

1. Cytokines et immunothérapie non spécifique.....	6
2. Antigènes tumoraux et immunothérapie active.....	7
3. Immunothérapie cellulaire.....	8
4. La place des anticorps monoclonaux en immunothérapie.....	8

<u>II. L'anticorps et sa machinerie cellulaire ; le lymphocyte B.....</u>	<u>10</u>
---	-----------

1. Structure des Immunoglobulines.....	10
2. Ontogenèse B et conception du futur anticorps.....	11
2.1 Différenciation indépendante de l'antigène : Organisation et expression des gènes d'immunoglobuline .....	11
2.1.1 Réarrangement du locus des chaînes lourdes au stade pro-B.....	11
2.1.2 Réarrangement du locus des chaînes légères au stade pré-B.....	12
2.2. La phase dépendante des antigènes.....	14
2.2.1. L'hypermutation somatique.....	15
2.2.2. Le mécanisme de la commutation de classe.....	15
2.2.3 Les stades terminaux de la différenciation lymphocytaire...16	

<u>III. Obtention et développement des Ac monoclonaux.....</u>	<u>18</u>
--	-----------

1. Découverte des anticorps monoclonaux.....	18
2. Humanisation de l'anticorps monoclonal.....	19
2.1 Ingénierie cellulaire.....	19
2.2. Approche moléculaire.....	20
2.2.1 Construction d'Ac chimérique.....	20
2.2.2. Construction d'Ac humanisés.....	21
3. Génération de bibliothèques d'anticorps monoclonaux.....	22
4. Les modèles murins humanisés.....	24
5. Marché des anticorps monoclonaux.....	26

<u>IV. Mécanisme d'action des Ac thérapeutique.....</u>	<u>29</u>
---	-----------

1. Pharmacocinétique sérique des IgG.....	29
2. Mode d'action des IgG.....	30
2.1. Mécanismes directs.....	30

2.2 Antibody dependant cellular cytotoxicity (ADCC).....	31
2.3 Complement dependant cytotoxicity (CDC).....	33
3. Les nouveaux formats d'anticorps.....	34
3.1 Les fragments d'anticorps.....	34
3.2 Les anticorps bi-spécifique (Ac-bs).....	35
3.3 Les anticorps fusionnés.....	37
3.4 Intrabodies.....	37
4. Limites des AcM d'isotype IgG.....	38
<b>IV. Structure et fonction de l'immunoglobuline de classe A (IgA).....</b>	<b>40</b>
1. Caractéristiques structurales des IgA.....	40
1.1 Généralités.....	40
1.2 Structure des IgA.....	41
1.2.1 IgA monomérique (IgAm).....	41
1.2.2 IgA dimérique (IgAd).....	42
1.2.3 IgA sécrétoire (IgAs).....	42
2. Switch $\alpha$ et site de synthèse de l'IgA.....	43
3. Récepteurs aux IgA.....	45
3.1 Le récepteur Fc $\alpha$ RI ou CD89.....	45
3.2 Récepteurs des immunoglobulines polymériques (pIgR).....	47
3.3. Les autres récepteurs des IgA.....	48
4. Fonctions effectrices de l'IgA... un anticorps bien tempéré !.....	50
4.1 Mécanismes effecteurs directs médiée par l'IgA.....	51
4.2 Mécanismes effecteurs indirects de l'IgA.....	52
5. Rôle des glycanes dans les fonctions effectrices des IgA et implication dans la maladie de Berger.....	53
<b>Résultats.....</b>	<b>56</b>
<b>Article 1 → “IgA-class anti-CD20 chimeric antibodies outperform IgG for direct effect on target cells but less efficiently recruit cytotoxic effectors”.....</b>	<b>57</b>
<b>Article 2 → “Feasibility of using glycosylation-deficient variants of human IgA as therapeutic antibodies”.....</b>	<b>61</b>
<b>Article 3 → “Premature replacement of <math>\mu</math> with <math>\alpha</math> immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation”.....</b>	<b>65</b>

## **Discussion & Perspectives.....67**

1. Amélioration des outils biotechnologiques pour la production et l'évaluation des Immunoglobulines IgA.....	68
2. Glycosylation et risque de pathogénicité des IgA.....	70
3. IgA et immunothérapie anticancéreuse : l'approche anti-CD20.....	72
4. Dualité des fonctions de l'IgA via le récepteur Fc $\alpha$ RI.....	74
5. Potentiel thérapeutique des immunoglobulines d'isotype IgA.....	76
5.1 Fonctions bloquantes ou agonistes.....	76
5.2. Prédominance des muqueuses dans les applications thérapeutiques.....	78

## **Annexes.....81**

### **Création de modèles murins rapporteurs de l'activité NF $\kappa$ B.....82**

1. Etude des TLR et systèmes rapporteurs NF $\kappa$ B.....	82
2. Création des lignées murines transgéniques.....	83
3. Caractérisation fonctionnelle des souris transgéniques : données préliminaires.....	85
3.1. Souris luciférase.....	85
3.2. Souris GFP.....	86

### **Article 4 → “Glycotranscriptome study reveals a genetic switch modulating glycosaminoglycan synthesis along B cell development and activation”.....88**

### **Revue Médecine science → Transgénése animale et humanisation des anticorps.....90**

## **Références bibliographiques.....91**

# INTRODUCTION GENERALE

La fonction du système immunitaire est d'assurer la défense de l'organisme contre les pathogènes ainsi que de contrôler certains dérèglements cellulaires aboutissant à la formation de tumeurs. Il possède pour cela une capacité d'apprentissage permettant la tolérance des antigènes du soi et l'élimination des antigènes du non soi (le plus souvent d'origine bactérienne, virale, parasitaire), au moins lorsque l'irruption de ces derniers dans l'organisme se fait dans un contexte d'agression et d'inflammation (selon la théorie « du danger » de Polly Matzinger). A l'intérieur de ce système, la réponse immunitaire humorale aboutit à la sécrétion d'immunoglobulines solubles ou anticorps. Ces anticorps, sécrétés par les cellules de la lignée lymphocytaire B, sont capables de lier spécifiquement un antigène dans le but de le neutraliser ou de l'éliminer. Dans les années 1970, afin d'élucider la structure fine des anticorps, leur liaison aux antigènes ainsi que les règles gouvernant la synthèse et l'association des chaînes lourdes et légères, les immunologistes ont cherché à maîtriser le processus d'immortalisation des cellules B. En 1975, César Milstein et Georges Köhler décrivaient pour la première fois la technique de fusion cellulaire et de sélection des cellules hybrides appliquées aux lymphocytes B primaires d'animaux immunisés. En dehors de son intérêt pour la recherche fondamentale, cette technique constituait le premier pas vers le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) à usage thérapeutique et l'espoir de la concrétisation de la vision des « *magic bullets* » de Paul Ehrlich.

En effet, très rapidement après la publication de l'article de César Milstein et de Georges Köhler, de nombreux AcM furent générés tant à des fins de recherche fondamentale que pour le diagnostic. Il a fallu, néanmoins, atteindre le début des années 90 et l'avènement de l'ADN recombinant pour assister à l'essor du développement des AcM pour la thérapie humaine. A ce jour, plus de 30% des essais cliniques sont consacrés aux AcM recombinants avec des indications aussi diverses que les cancers, le rejet de greffe, les maladies infectieuses, ou encore le traitement de pathologies inflammatoires ou allergiques. Dans ce domaine, la plupart des anticorps thérapeutiques approuvés par la FDA et la grande majorité des anticorps en phase de tests cliniques sont des immunoglobulines d'isotype  $\gamma 1$ . Cette sous-classe des IgG possède, en effet, des caractéristiques fonctionnelles particulièrement intéressantes lors d'une utilisation en immunothérapie et notamment pour les traitements anti-cancéreux associés à des pathologies touchant le compartiment leucocytaire. Plus rarement, certaines indications thérapeutiques nécessitent l'utilisation d'anticorps portant des régions Fc dérivées d'autres isotopes tels qu'IgG2 ou IgG4, en particulier lorsqu'il importe d'éviter l'activation de mécanismes effecteurs et/ou pro-inflammatoires. Le « monopole » thérapeutique de l'IgG1 au

cours des vingt dernières années et les très nombreuses études qui en ont découlé ont néanmoins permis d'entrevoir certaines limites dans l'utilisation des anticorps conventionnels de classe IgG, et encouragent aujourd'hui au développement de nouvelles formes d'anticorps capables de relever de nouveaux défis thérapeutiques.

La prise de conscience de l'importance du système immunitaire des muqueuses, la meilleure compréhension des propriétés structurales et fonctionnelles des IgA ainsi que les progrès dans l'ingénierie moléculaire des anticorps, ont suscité un intérêt pour les anticorps de classe IgA, jusqu'ici négligés au profit des IgG. Ainsi, quelques études publiées au cours des dix dernières années ont abordé l'évaluation du potentiel thérapeutique des IgA. Elles laissent entrevoir de nouvelles applications pour les AcM qui, par un changement de classe vers l'IgA, pourraient intervenir dans des contextes thérapeutiques différents de ceux ciblés avec les IgG.

Les travaux présentés dans ce manuscrit constituent une contribution à l'évaluation thérapeutique d'anticorps monoclonaux de classe IgA, en particulier dans le cadre du traitement des lymphomes B. Les résultats que nous avons obtenus au cours de ces études ont permis, dans une certaine mesure de montrer la capacité cytotoxique et donc potentiellement anti-tumorale de cette classe mais ont également contribué à préciser ses limites par rapport aux anticorps thérapeutiques classiques. Dans ces travaux, nous avons également cherché à aborder de façon préliminaire des questions à ce jour quasi-inexplorées, celles de la pharmacocinétique et la toxicité de cette classe d'anticorps. A l'instar de l'ingénierie moléculaire des IgG, nous avons ainsi testé des variants des IgA présentant une structure chimérique IgA1/IgA2 et des niveaux réduits de glycosylation. En effet, l'une des limites freinant le développement des IgA pour des applications thérapeutiques réside certainement dans la présence de nombreux glycanes sur la chaîne lourde, potentiellement immunogènes et à l'origine d'une grande hétérogénéité des glycoprotéines finalement synthétisées. L'évaluation du rôle de ces résidus glucidiques dans la fonction biologique des IgA et de leur importance dans la stabilité de la molécule nous a permis de sélectionner un variant hypo-glycosylé d'isotype IgA2(m1) chimérisé avec l'IgA1 afin de réduire sa N-glycosylation, et présentant une activité effectrice préservée. Le développement de variants conçus selon ce modèle pourrait permettre de faciliter la production homogène et la caractérisation d'anticorps produits de façon industrielle pour des applications thérapeutiques, tout en veillant à leur innocuité et en essayant de maintenir au minimum leur immunogénicité.

Ce travail s'intègre à un programme de recherche, mené en collaboration entre notre laboratoire CNRS, un partenaire industriel fortement investi dans l'exploration du potentiel des IgA thérapeutiques, CAYLA INVIVOGEN, et une « start-up » née dans l'objectif de valoriser un certain nombre de modèles établis au laboratoire pour la production d'anticorps à l'aide de souris humanisées. Notre programme collaboratif avait pour ambition d'améliorer les connaissances scientifiques sur l'immunoglobuline de classe A, d'évaluer son potentiel thérapeutique sur des cibles cellulaires ou solubles et de créer de nouveaux outils biotechnologiques dédiés à cette étude. Pour ces derniers, l'un des outils obtenus au sein du laboratoire concerne la création d'une lignée murine transgénique modifiée de telle sorte que les anticorps qu'elle produit sont presque exclusivement des immunoglobulines chimériques de classe IgA. L'utilisation de la technologie classique d'isolement d'hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux a permis d'obtenir, à partir de ces souris, une très large diversité d'IgA spécifiques d'un antigène donné. En parallèle de son utilisation à des fins industrielles, cette lignée transgénique a également fait l'objet d'une étude plus fondamentale pour évaluer l'impact de l'expression prématurée et permanente d'une chaîne lourde  $\alpha$  dans le développement lymphocytaire B. Les résultats de cette étude à laquelle j'ai été associée sont également présentés dans ce manuscrit.

# RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

# **I. Immunothérapie anti-tumorale**

Au cours des deux dernières décennies, l'immunologie des tumeurs a connu un réel bouleversement et un foisonnement de découvertes fondamentales qui se sont traduites en applications cliniques. On peut notamment citer l'identification d'une variété de nouveaux antigènes tumoraux, l'élucidation de la biologie des cellules dendritiques et la mise en œuvre de stratégies tentant de les utiliser à des fins thérapeutiques, mais aussi la création d'un formidable arsenal d'anticorps monoclonaux anti-cancéreux très efficaces et donc rapidement intégrés à la pharmacopée. L'émergence de ces nouveaux concepts et des outils qui en découlent a fait de l'immunothérapie une nouvelle option de traitement pour certains cancers, en complément des méthodes traditionnelles, qui améliore considérablement le pronostic des patients qui peuvent en bénéficier.

## **1. Cytokines et immunothérapie non spécifique**

La stimulation non spécifique du système immunitaire fait l'objet de premières expériences dès 1890, lorsque William Coley, un chirurgien new-yorkais, utilise des toxines bactériennes pour traiter des patients atteints de sarcomes. Cette approche ne peut prendre son essor qu'après la découverte, au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, de molécules régulant l'activité et la fonction de la réponse immunitaire. Dénommées cytokines en 1974, ces substances, à l'instar des hormones dans le système endocrinien et des neuromédiateurs dans le système nerveux, participent à la communication entre les cellules du système immunitaire.

Les techniques de génie génétique permettent progressivement de les produire en quantité suffisante et plusieurs cytokines deviennent des standards thérapeutiques. Même si leur mécanisme d'action n'est pas toujours entièrement élucidé, ces molécules sont couramment utilisées ; l'interféron alpha dans le cancer du rein, l'interleukine 2 (IL-2) pour la leucémie myéloïde chronique ou encore les facteurs de croissance G-CSF et GM-CSF pour la reconstitution hématopoïétique.

Néanmoins, ces traitements sont par définition non spécifiques et donc souvent accompagnés d'effets secondaires. Ainsi, lorsqu'une tumeur s'y prête, l'utilisation de

cytokines peut être avantageusement substituée par une immunothérapie anti-tumorale spécifique, visant à l'optimisation ciblée de la réponse anticancéreuse.

## **2. Antigènes tumoraux et immunothérapie active**

Au cours des années 1980, plusieurs équipes identifient de nombreux antigènes spécifiques de tumeurs humaines capables d'induire une réponse T cytotoxique aboutissant à l'élimination ciblée des cellules cancéreuses (Van Pel and Boon 1982; Muul et coll. 1987; van der Bruggen et coll. 1991). Il est alors clairement établi que les cellules tumorales subissent de nombreuses altérations génétiques et épigénétiques qui entraînent une modification de leur profil d'expression génique qui peuvent aboutir à l'expression d'antigènes associés aux tumeurs (TAA) (Pardoll 2003).

L'identification de différents TAA a rendu les stratégies d'immunisation active contre les tumeurs de plus en plus spécifiques. Ainsi, différents types de vaccins ont été développés pour immuniser les patients, tels que des antigènes de tumeurs purifiés, des peptides synthétiques, de l'ADN nu (Restifo 2000), des virus recombinants (Marshall et al., 2000) ou encore des bactéries recombinantes. D'autres essais ont été réalisés en administrant au patient des cellules dendritiques chargées avec des TAA recombinants (Gregoire et coll. 2003).

Ces méthodes sont encore loin d'avoir atteint leur maturité et leur bilan reste à ce jour décevant. En effet et même si des résultats encourageants ont été obtenus dans les modèles murins, les réponses immunologiques induites chez les patients, bien que détectables, ne s'accompagnent pas nécessairement d'une réponse clinique. Une explication de ces échecs réside dans le fait que ces essais ont été menés sur des patients atteints de cancers avancés et ayant déjà subi divers traitements. L'enjeu majeur du développement des vaccins anti-tumoraux est donc de pouvoir les utiliser chez des patients à un stade précoce de la maladie (Salem Chouaib 2006).

### **3. Immunothérapie cellulaire**

L'immunothérapie adoptive a fait son entrée dans la panoplie des approches thérapeutiques contre certains types de cancers. Elle consiste à injecter aux patients une population polyclonale TIL (tumor infiltrating lymphocyte), fortement enrichie en lymphocytes de spécificité connue ou une population clonale de lymphocytes T spécifiques. Le groupe de Rosenberg a introduit une approche fondée sur l'immuno-déplétion du patient avec un cocktail cyclophosphamide/fludarabine avant l'implantation des TIL afin d'éliminer les lymphocytes T régulateurs qui jouent un rôle potentiel dans l'inhibition des effecteurs antitumoraux. Ce traitement associant un transfert de cellules T autologues, de fortes doses d'IL2 et une préalable chimiothérapie lympho-spécifique qui préserve le compartiment myéloïde aboutie à une rapide expansion *in vivo* des cellules T cytotoxique implantées qui s'accompagnent, dans cette étude, d'une rapide destruction de tumeurs métastatique exprimant l'antigène ciblé (Dudley et coll. 2002).

Malgré les quelques résultats indiquant une meilleure survie des patients, le transfert adoptif reste expérimentalement lourd, et sa difficulté majeure réside dans la production d'un grand nombre de cellules T spécifiques d'un antigène déterminé, possédant des facultés fonctionnelles adéquates et des propriétés de survie appropriées.

### **4. La place des anticorps monoclonaux en immunothérapie**

Dès le début du siècle dernier, un immunologiste, Paul Ehrlich, eut la vision que les anticorps seraient utilisés en thérapeutique comme des « *magic bullets* » (revue dans Strebhardt and Ullrich 2008; Dimitrov and Marks 2009). Il a fallu près d'un siècle et la découverte des anticorps monoclonaux en 1975 par Georges Kohler et Cesar Milstein pour que cette vision se transforme en réalité. Cette découverte permettait enfin d'obtenir un anticorps de spécificité choisie en quantité importante, et l'équipe de Ron Levy décrivait en 1982 le premier succès de l'utilisation d'un anticorps monoclonal (AcM) en thérapeutique (Miller et al., 1982). Celui-ci, utilisé pour le traitement de lymphomes B, laissait entrevoir une large utilisation thérapeutique des anticorps monoclonaux. Pourtant, au cours des 12 années suivantes, un seul AcM, l'anticorps Orthoclone OKT®3 (Muromonab-CD3), recevra une autorisation des autorités réglementaires américaines (*Food and drug administration, FDA*)

Tableau 1. Anticorps monoclonaux à usage thérapeutique approuvés par la FDA

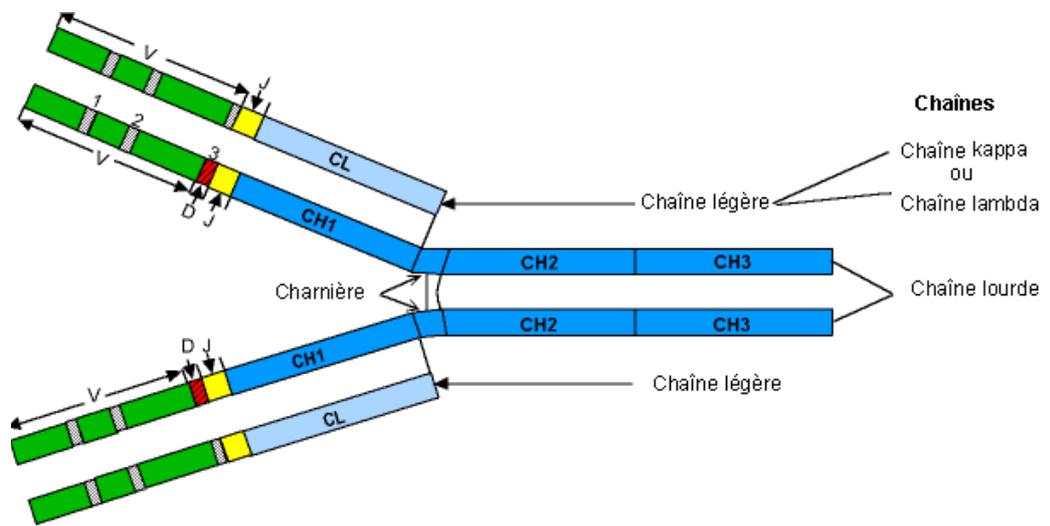
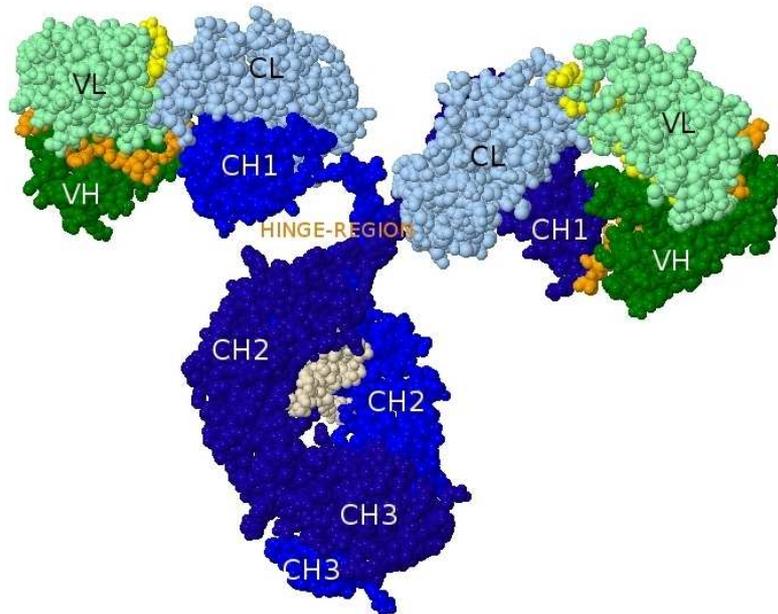
Désignation	Compagnie	Cible	Source	Année	Indications
<b>Orthoclone®</b> (Muromomab)	<i>Ortho Biotech, Inc.</i>	CD3	murin IgG2a	1986	Rejet de greffe
<b>ReoPro™</b> (Abciximab)	<i>Centocor, Inc. and Eli Lilly</i>	GPIIb, IIIa	chimérique (Fab)	1994	Maladie cardiovasculaire
<b>Rituxan™</b> (Rituximab)	<i>Biogen Idec and Genentech, Inc.</i>	CD20	chimérique IgG1	1997	Lymphome non hodgkiniens, arthrite rhumatoïde
<b>Zenapax®</b> (Daclizumab)	<i>Hoffmann-La Roche Inc., Protein Design Labs</i>	CD25	humanisé IgG1	1997	Rejet de greffe
<b>REMICADE®</b> (Infliximab)	<i>Centocor, Inc.</i>	TNF- $\alpha$	chimérique IgG1	1998	Maladie de Crohn
<b>Simulect®</b> (Basiliximab)	<i>Novartis</i>	CD25	chimérique IgG1	1998	Rejet de greffe
<b>Synagis™</b> (Palivizumab)	<i>Medimmune</i>	RSV F	humanisé IgG1	1998	Infection virus respiratoire syncytial
<b>Herceptin®</b> (Trastuzumab)	<i>Genentech</i>	HER-2	humanisé IgG1	1998	Cancer du sein
<b>Mylotarg™</b> (Gemtuzumab)	<i>UCB and Wyeth</i>	CD33	humanisé IgG4	2000	Leucémie Myéloïde Aiguë
<b>Campath®</b> (Alemtuzumab)	<i>Millenium Pharmaceuticals, Inc. and Berlex Laboratories, Inc.</i>	CD52	humanisé IgG1	2001	Leucémie lymphoïde chronique, lymphoma T
<b>Zevalin®</b> (Ibritumomab)	<i>Pharmaceuticals Corporation</i>	CD20	murin IgG1	2002	Lymphome non hodgkiniens
<b>HUMIRA™</b> (Adalimumab)	<i>Abbott Laboratories/Cambridge Antibody Technology</i>	TNF- $\alpha$	humain IgG1	2002	Maladie inflammatoire auto-immune

Désignation	Compagnie	Cible	Source	Année	Indications
<b>Bexxar®</b> (Tositumomab)	<i>Corixa Corp. and GlaxoSmithKline</i>	CD20	murin IgG2a	2003	Lymphome non hodgkiniens
<b>Xolair®</b> (Omalizumab)	<i>Genentech, Tanox, Inc., Novartis Pharmaceuticals</i>	IgE	humanisé IgG1	2003	Asthme sévère (allergique)
<b>Avastin™</b> (Bevacizumab)	<i>Genentech</i>	VEGF	humanisé IgG1	2004	Cancer colorectal métastatique, Cancers du poumon, cancer du sein métastatique
<b>TYSABRI®</b> (Natalizumab)	<i>Biogen Idec and Elan Corp.</i>	$\alpha$ 4sub de $\alpha$ 4 $\beta$ 1	humanisé IgG4	2004	Sclérose multiple, maladie de Crohn
<b>Erbtux™</b> (Cetuximab)	<i>Merck KG aA / Bristol-Myers Squibb / ImClone Systems</i>	EGFR	chimérique IgG1	2004	Cancer colorectal, cancer ORL
<b>Vectibix™</b> (Panitumumab)	<i>Amgen</i>	EGFR	humanisé (IgG2)	2006	Carcinome colorectal métastatique
<b>LUCENTIS™</b> (Ranibizumab)	<i>Genentech</i>	VEGF -A	humanisé (Fab)	2006	Dégénération maculaire sèche
<b>Soliris®</b> (Eculizumab)	<i>Alexion Pharmaceuticals, Inc.</i>	CD59	humanisé IgG2/4	2007	Hémogloburie Paroxysmique Nocturne
<b>CIMZIA®</b> (Certolizumab)	<i>UCB</i>	TNF- $\alpha$	humanisé (Fab)	2008	Maladie de Crohn, arthrite rhumatoïde
<b>Simponi™</b> (Golimumab)	<i>Centocor</i>	TNF $\alpha$	humain IgG1	2009	Arthrite rhumatoïde et psoriasique, Spondylite ankylosante
<b>Ilaris</b> (canakinumab)	<i>Novartis pharmaceuticals</i>	IL-1 beta	humanisé IgG1	2009	Syndrôme cryopyrin

pour une utilisation clinique, en l'occurrence le traitement du rejet aigu d'allogreffes rénales, hépatiques ou cardiaques (**Tableau 1**). Il faudra attendre 1994 pour qu'un autre AcM, le ReoPro (Abxisimab), reçoive l'autorisation de la FDA pour une seconde utilisation clinique. Cet anticorps, dirigé contre un récepteur présent sur les plaquettes, est utilisé pour éviter la formation de caillots chez les patients ayant bénéficié d'une chirurgie cardiovasculaire.

Les nombreuses années qui ont séparées l'approbation de ces deux anticorps résultent de nombreux échecs d'essais cliniques réalisés avec des anticorps monoclonaux, en particulier pour le traitement des cancers. Ces échecs avaient pour principale cause l'origine murine des anticorps utilisés induisant, chez le patient, la formation d'anticorps humains dirigés contre les anticorps murins (AHAM). En effet, les AHAM entraînent une élimination rapide des anticorps murins et des effets adverses parfois fatals. De plus, les anticorps murins ont une demi-vie courte dans le sérum, ainsi qu'une capacité limitée pour recruter des effecteurs cellulaires ou protéiques humains (Bellet and Dangles-Marie 2005). L'ingénierie génétique des anticorps a permis de transformer progressivement les anticorps murins en anticorps humains. La création d'anticorps chimériques, pour lesquels environ 70% de la séquence peptidique est humaine, a contribué à une diminution importante des réponses immunes dirigées contre les régions murines et a conduit, à la fin des années 90, au succès clinique de plusieurs anticorps thérapeutiques. Outre le ReoPro, le Rituxan (Rituximab) a été approuvé en 1997 pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens, le Simulect (Basiliximab) et le Remicade (Infliximab), en 1998, pour la prévention des rejets de greffe et le traitement de la maladie de Crohn, respectivement. Malgré le bénéfice thérapeutique incontestable apporté par les anticorps chimériques, les praticiens constatent cependant, l'apparition chez 40% des patients, d'anticorps humains dirigés contre les anticorps chimériques (AHAC) (Hwang and Foote 2005). Une nouvelle génération d'anticorps est alors créée, on parle d'anticorps « humanisés », moins de 10 % de leurs séquences peptidiques sont d'origine murine. En 1997, le Zenapax® (Daclizumab), premier anticorps humanisé utilisé en clinique, marque le début d'une utilisation thérapeutique de plus en plus fréquente de ce type d'anticorps.

**A****B****Figure 1 : Structure des immunoglobulines (Ig)****A. Représentation bi-dimensionnelle d'une Ig****B. Représentation tri-dimensionnelle d'une IgG**

VH, VL: régions variables des chaînes lourdes et légères ; CH, CL: régions constantes des chaînes lourdes et légères ; Hinge: région charnière (Site IMGT)

## **II. L'anticorps et sa machinerie cellulaire ; le lymphocyte B**

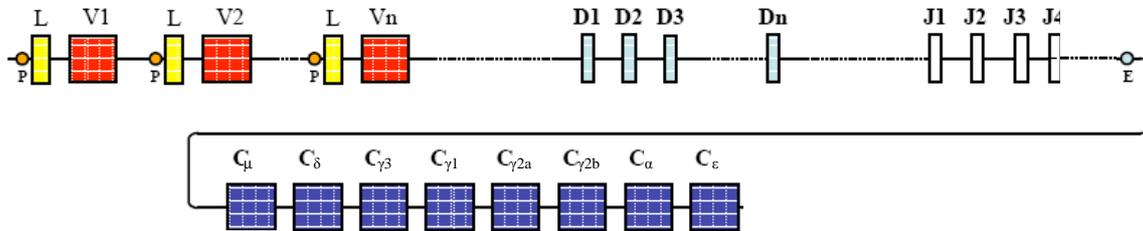
### **1. Structure des Immunoglobulines**

La structure des immunoglobulines (Ig), qu'elles soient exprimées à la surface des lymphocytes B (où elles ont la fonction de récepteur de l'Ag) ou excrétées par les plasmocytes (dans ce cas on les appelle aussi anticorps), repose sur l'assemblage de deux chaînes lourdes (H pour Heavy) identiques entre elles et deux chaînes légères (L pour Light) également identiques. Les chaînes lourdes sont unies entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures. Les chaînes légères sont unies aux chaînes lourdes par un pont disulfure proche de leur extrémité carboxyterminale. Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des domaines V des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'antigène tandis que les domaines C des chaînes lourdes confèrent ses propriétés effectrices à l'immunoglobuline (**Figure 1A**).

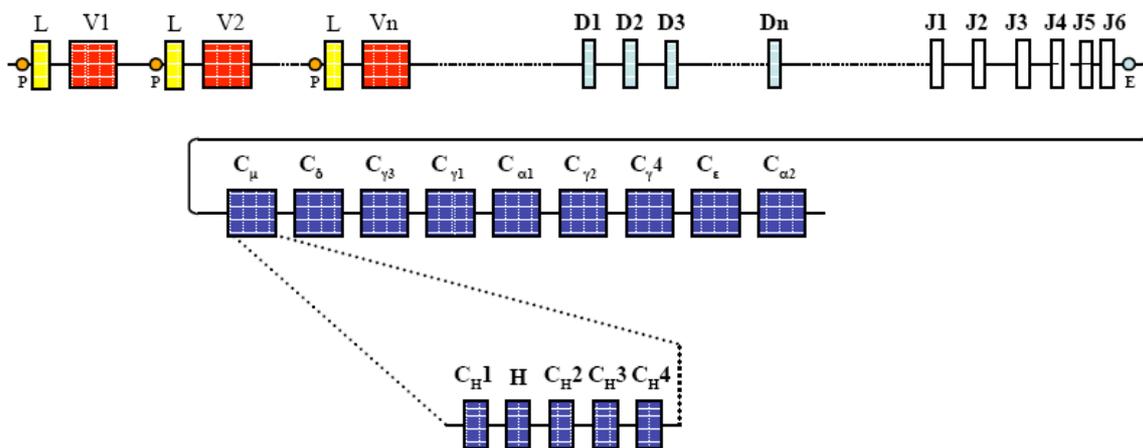
L'homme et la souris possèdent deux types de chaînes légères, appelés  $\kappa$  et  $\lambda$ , qui peuvent s'associer à chacune des cinq classes de chaînes lourdes ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  et  $\alpha$ ) définissant respectivement les IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Les IgG sont subdivisées en 4 sous-classes : IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 chez la souris et IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 chez l'homme qui possède également deux sous-classes d'IgA : IgA1 et IgA2. Les chaînes lourdes comportent, selon l'isotype, trois ou quatre domaines C :  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  et  $C_{H4}$ . Les domaines  $CH1$  et  $CH2$  sont séparées par une région flexible, la région « charnière » (ou « hinge ») (**Figure 1B**).

Sur le plan structural, les régions V et C partagent une structure tri-dimensionnelle répondant à la définition de la superfamille des Ig et sont caractérisée par des domaines d'homologie organisés en feuillets  $\beta$ -plissés. La structure tertiaire de ces domaines est maintenue par quatre régions très conservées : les régions d'armature ou "framework regions" (FR1, FR2, FR3, FR4). Au sein des parties variables, trois régions d'une dizaine d'acides aminés, dites hypervariables ou encore appelées régions déterminant la complémentarité avec l'Ag (CDR1, CDR2, CDR3), s'associent pour former le site de liaison à l'Ag.

**A**



**B**



**Figure 2 : Organisation du locus des chaînes lourdes**

**A. Locus IgH murin**

**B. Locus IgH humain**

V : gènes codants les segments variables

D : gènes codants les segments de diversité

J : gènes codants les segments de jonction

L : séquence leader

## 2. Ontogenèse B et conception du futur anticorps

La fonctionnalité et la formidable diversité des anticorps produits dans notre organisme sont les fruits d'un processus de différenciation complexe à l'issue duquel chaque lymphocyte B fabrique et produit un récepteur unique à l'antigène.

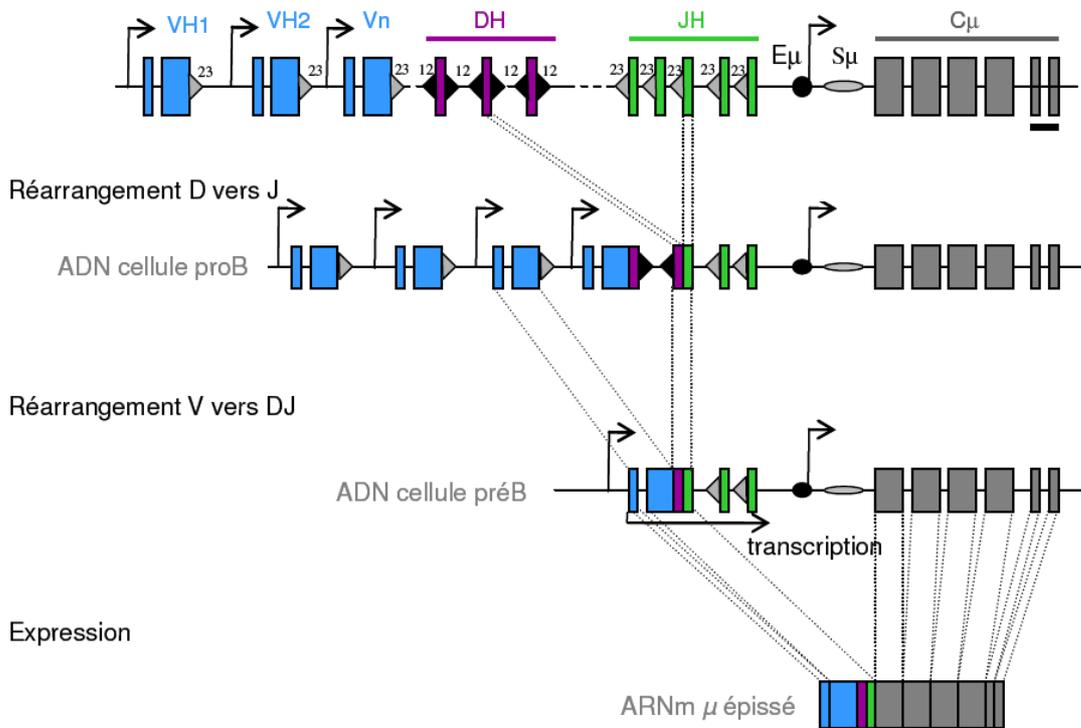
Le grand nombre de segments V, D et J disponibles, les multiples combinaisons entre ces éléments (diversité combinatoire) ainsi que l'imprécision de leurs jonctions (diversité jonctionnelle) contribuent considérablement à la diversité des Ig.

### 2.1 Différenciation indépendante de l'antigène : Organisation et expression des gènes d'immunoglobulines

La différenciation B débute dès le stade embryonnaire et se poursuit tout au long de la vie. La phase indépendante des antigènes se déroule dans la moelle osseuse et correspond à la différenciation de cellules précurseur hématopoïétiques en cellules B matures immunocompétentes. Cette étape implique les réarrangements des gènes d'Ig, qui ne donnent que des transcrits stériles dans leur disposition germinale. Ces recombinaisons somatiques respectent globalement l'ordre précis suivant : (selon le modèle " ordonné " proposé par Alt et Baltimore) jonctions DJ dans le locus IgH, puis VDJ (avec exclusion allélique), suivies de jonctions VJ dans le locus Ig $\kappa$  puis Ig $\lambda$  (avec à nouveau exclusion allélique) (Alt et coll. 1984). Ces réarrangements séquentiels se produisent en l'absence d'antigène exogène et caractérisent les divers stades précoces de la maturation B.

#### 2.1.1 Réarrangement du locus des chaînes lourdes au stade pro-B

Le locus des chaînes lourdes (locus IgH) est situé sur le chromosome 12 chez la souris et sur le chromosome 14 chez l'homme. Il comprend chez la souris 97 segments VH (dont environ 55 pseudogènes), regroupés en 15 sous-familles, 12 à 14 segments DH regroupés en 4 sous-familles et 4 segments JH suivis de huit gènes codant les régions constantes des 8 classes et sous-classes d'Ig, répartis selon l'ordre suivant:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2a$ ,  $\gamma 2b$ ,  $\alpha$ , et  $\epsilon$ , (**Figure 2A**). Chez l'homme, ce locus comprend 38 à 46 segments VH fonctionnels regroupés en 7 sous-familles, 23 segments DH, 6 segments JH suivis de neuf gènes codant les régions constantes



**Figure 3 : Réarrangements des gènes variables du locus IgH.**

Les rectangles représentent les exons codants, les traits fins correspondent aux introns, les triangles symbolisent les signaux de recombinaisons et les flèches et les cercles situent les promoteurs et les activateurs, respectivement.

(D'après Dudley et coll. 2005).

des 9 classes et sous-classes d'Ig, répartis selon l'ordre suivant:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 1$ ,  $\alpha 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 4$ ,  $\epsilon$  et  $\alpha 2$  (**Figure 2B**).

Les exons V sont précédés d'une petite séquence de 60 à 90 paires de bases (pb), l'exon signal ou leader (L), codant la majeure partie (N-terminale) du peptide signal de la protéine. Chaque gène C est composé de multiples exons codant les domaines structuraux propres à chaque chaîne lourde ainsi que les régions charnières pour certaines Ig. Enfin, des exons codent les régions intra-cytoplasmiques et transmembranaires pour chaque isotype (**Figure 2B**).

C'est au stade *proB* que débutent les réarrangements des gènes d'Ig par le rapprochement d'une région DH vers une région JH sur les deux allèles. Vient ensuite se recombiner sur cet assemblage DJ un gène VH afin de former l'exon VDJ codant la région variable de la chaîne lourde (Tonegawa 1983). Les segments géniques codant les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères sont ensuite associés aux exons codant la région C des chaînes correspondantes par épissage, formant ainsi des ARN messagers matures prêts à être traduits en protéines (**Figure 3**)

Si ces réarrangements permettent l'expression d'un ARN messager fonctionnel, la chaîne lourde  $\mu$  est alors synthétisée et exportée à la membrane en association avec d'une part la « pseudo-chaîne » légère et d'autre part, les molécules de transduction du signal intracellulaire Ig- $\alpha$  et Ig- $\beta$ , formant ainsi le pré-BCR caractéristique du *stade pré-B*.

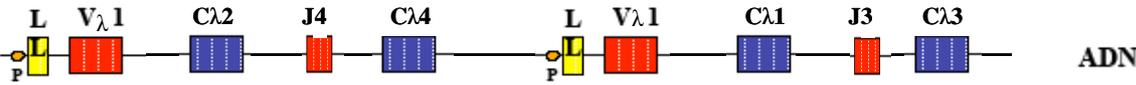
### 2.1.2 Réarrangement du locus des chaînes légères au stade pré-B

L'expression d'un pré-BCR normal permet aux cellules pré-B d'interagir physiquement avec les niches des cellules stromales et d'y recevoir un signal de survie et de prolifération qui conditionne la poursuite de sa maturation. Toute cellule incapable d'assembler son pré-BCR ou d'associer et de transporter à la membrane une chaîne lourde  $\mu$  avec une chaîne légère sera éliminée (Kitamura et coll. 1991). Les réarrangements se construisant de façon aléatoire avec de nombreuses jonctions hors phase et de nombreux réarrangements non fonctionnels, la sélection des lymphocytes B implique un taux très élevé d'apoptose tout au long de leur développement (Zhang et coll. 2004). L'expression avec succès du pré-BCR est également un pré-requis pour l'induction des réarrangements des gènes des chaînes légères.

**Locus Igκ**



**Locus Igλ**



**Figure 4 : Locus des chaînes légères**  
 V : gènes codant les segments variables  
 J : gènes codant les segments de jonction  
 L : séquence leader

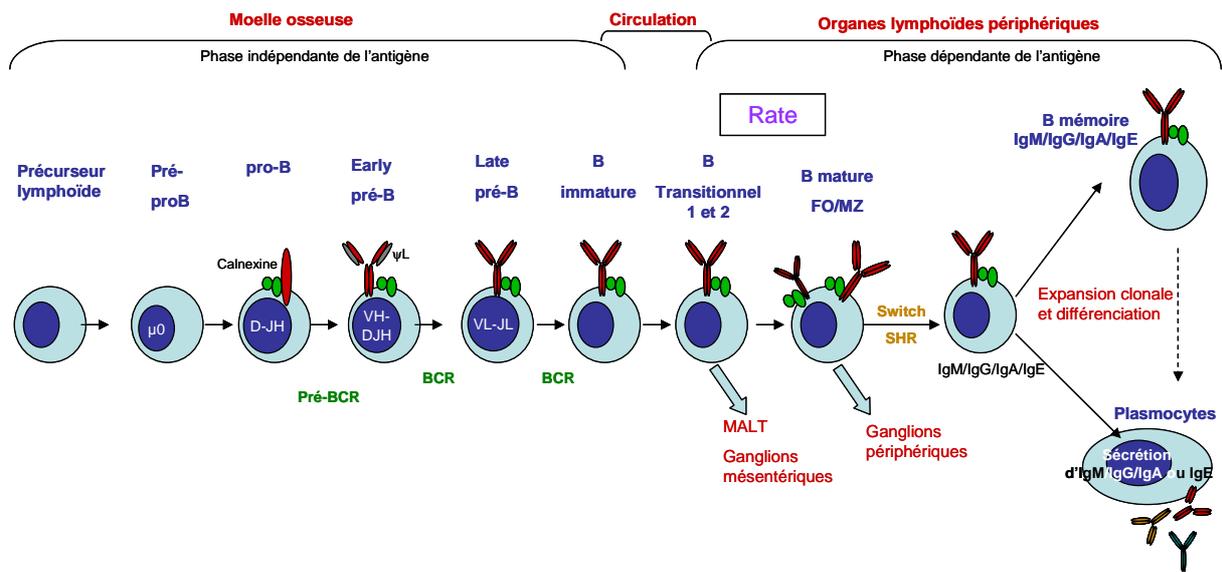
Les gènes des chaînes légères d'Ig occupent deux locus indépendants : le locus  $\kappa$  est situé sur le chromosome 6 chez la souris et sur le 2 chez l'homme alors que le locus  $\lambda$  est localisé sur le chromosome 16 chez la souris et sur le 22 chez l'homme.

- Le locus Ig  $\kappa$  murin, en configuration germinale, comporte 94 à 96 segments  $V\kappa$  (dont environ 70 pseudogènes) et 5 segments  $J\kappa$  (dont seulement 4 fonctionnels) tandis que le locus Ig $\kappa$  humain comporte quant à lui 31 à 35 segments  $V\kappa$  fonctionnels répartis en 5 sous-familles ainsi que 5 segments  $J\kappa$ . Les segments  $V\kappa$  et  $J\kappa$  codent la partie variable de la chaîne légère. Un seul segment  $C\kappa$  code la partie constante chez l'homme comme chez la souris (**Figure 4**). Comme pour les gènes de chaînes lourdes, l'assemblage d'un gène fonctionnel nécessite des réarrangements durant lesquels un segment  $V\kappa$  est accolé à un des quatre segments  $J\kappa$  fonctionnels. Après transcription de ce gène, les régions variables (VJ) et constantes sont associées lors de la transcription par épissage de l'ARN messenger.

- Les gènes des régions variables de chaînes légères  $\lambda$  sont répartis en 4 familles comprenant chacune une paire de segments  $J\lambda$  et  $C\lambda$  ( $J\lambda 1$  à  $J\lambda 4$  et  $C\lambda 1$  à  $C\lambda 4$ ). Le locus de la souris ne comporte que trois segments  $V\lambda$  : le segment  $V\lambda 1$  s'associe préférentiellement à  $J\lambda 1$  et  $J\lambda 3$  tandis que les segments  $V\lambda 2$  et  $V\lambda 3$  s'associent préférentiellement à  $J\lambda 2$  ( $J\lambda 4$  et  $C\lambda 4$  étant défectifs). Le répertoire  $V\lambda$  très restreint de la souris explique probablement en partie le faible pourcentage de lymphocytes B exprimant une chaîne légère  $\lambda$  (environ 5% de cellules  $\lambda+$  par rapport à 95% de cellules  $\kappa+$  soit un rapport de 1/20). Ce rapport est largement supérieur chez l'homme (1/3) qui possède presque autant de gènes codant les régions variables  $\kappa$  que de gènes codant les régions variables  $\lambda$  (Lefranc et coll. 1999).

Habituellement les gènes des chaînes légères sont réarrangés de façon séquentielle, gènes  $\kappa$  d'abord puis gènes  $\lambda$ , lorsque les réarrangements  $\kappa$  n'ont pas permis d'aboutir à un exon VJ fonctionnel (Brauninger et coll. 2001).

Le *stade B immature* est caractérisé par l'expression à la membrane de la cellule d'une IgM composée de la chaîne lourde  $\mu$  et d'une chaîne légère  $\kappa$  ou  $\lambda$ . A ce stade, un processus de sélection négative aboutit à l'élimination de 40 à 60% des cellules immatures possédant des Ig membranaires spécifiques pour les antigènes du soi (Melchers et coll. 1995).



**Figure 5 : Etapes de l'ontogénèse B**

Les principales étapes de réarrangements des gènes d'Ig sont représentées ainsi que les récepteurs à l'antigène

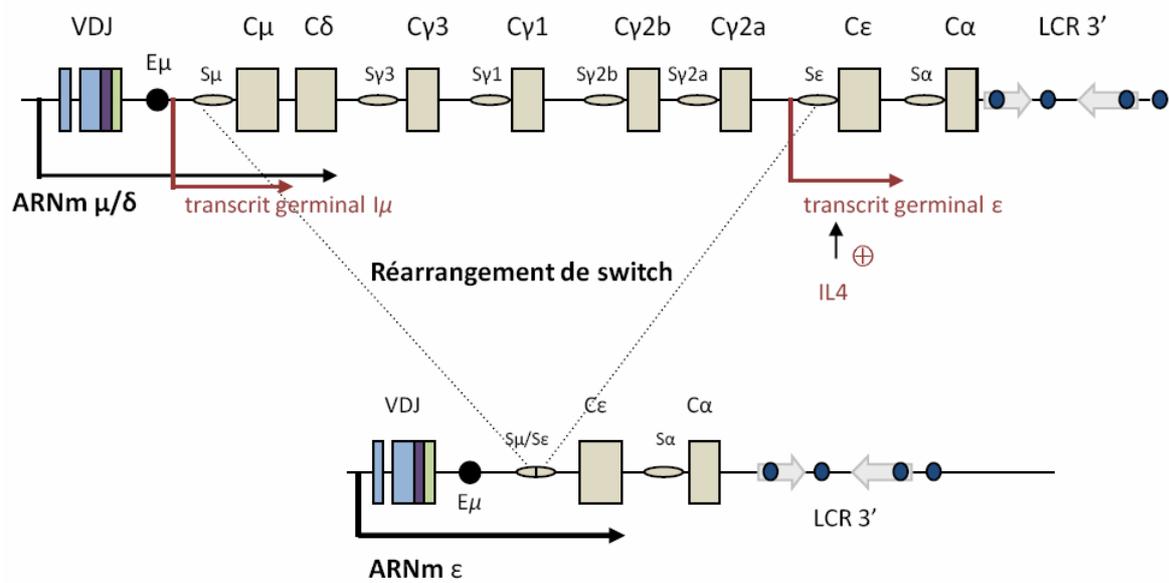
(D'après Hardy et coll. 2007)

## 2.2. La phase dépendante des antigènes

Immunocompétent, le lymphocyte B naïf va alors quitter la moelle osseuse via la circulation sanguine et gagner les organes lymphoïdes secondaires tels la rate et les ganglions lymphatiques. Les cellules B immatures passent alors par un stade intermédiaire, le **stade B transitionnel**, qui constitue la dernière étape avant la rencontre avec des antigènes exogènes. Loder *et coll.* en 1999, ont été les premiers à montrer que le compartiment B immature de la rate pouvait se subdiviser en deux populations bien distinctes : les B transitionnelles de type 1 (T1) et les B transitionnels de type 2 (T2) (**Figure 5**) (Loder et coll. 1999).

Les cellules T1 circulent dans le sang et se situent dans la partie externe des manchons lymphoïdes péri-artériolaires (PALS) de la rate tandis que les T2 sont uniquement retrouvées dans la rate, aussi bien dans les PALS que dans les follicules où ont lieu la présentation des antigènes exogènes et l'activation T-dépendante des cellules B matures. A la différence des T1, les cellules T2 sont capables de proliférer suite à la stimulation par le BCR (Petro et coll. 2002). La population T1 est la cible de la sélection négative en périphérie : seulement un petit pourcentage de cellules T1 se différenciera en cellules T2 (délétion clonale et anergie). Les cellules T2 vont finir d'émigrer dans les zones centrales des follicules où vont leur être présentés des antigènes exogènes dans un micro-environnement constitué notamment par des lymphocytes T auxiliaires ou « helpers » (T<sub>H</sub>) et des cellules présentatrices d'antigènes, les cellules dendritiques folliculaires. A ce stade, elles deviennent des cellules **B matures folliculaires**. Après stimulation antigénique, ces cellules B seront activées et vont initier la formation de centres germinatifs (CG).

Les CG apparaissent quelques jours après la stimulation antigénique et persistent de quelques jours à quelques semaines. Ils sont associés à l'expansion clonale des cellules B blastiques et sont le siège de l'hypermutation somatique (SHM pour «*somatic hypermutation*»), de la commutation isotypique (CSR pour «*class switch recombination*»), deux processus supplémentaires de diversification du récepteur B modifiant respectivement ses domaines V (maturation de l'affinité) et C (diversification des propriétés effectrices).



**Figure 6 : Exemple de réarrangement de « switch » : commutation de classe vers les IgE.**  
 Les exons codants sont représentés par des rectangles beiges, les introns par des traits fins, les régions S par des ellipses et les activateurs par des cercles.

### 2.2.1. L'hypermutation somatique

Les cellules B folliculaires vont accumuler des mutations somatiques au niveau des séquences de leur domaine variable modifiant ainsi leur affinité pour l'antigène. Ces cellules expriment faiblement la protéine anti-apoptotique bcl-2 et fortement le récepteur Fas (CD95).

Elles semblent donc destinées à mourir sauf si des signaux de survie leur sont adressés par des lymphocytes T<sub>H</sub> spécifiques du même pathogène, lors d'une interaction physique où les cellules B leur présentent l'antigène (Yoshino et coll. 1994).

Ainsi, si les mutations accumulées améliorent l'affinité pour l'antigène, les cellules seront sélectionnées ou « sauvées » et pourront proliférer puis entrer dans les compartiments B mémoires ou plasmocytes. Au contraire, si les mutations ne changent pas, voire diminuent l'affinité, ou si les interactions avec les lymphocytes T<sub>H</sub> n'ont pas lieu (cas d'anticorps autoréactifs), ces cellules sont alors éliminées par apoptose (MacLennan 1994).

### 2.2.2. Le mécanisme de la commutation de classe

La spécificité antigénique des Ig est déterminée par les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères. Les fonctions effectrices, en revanche, dépendent des régions constantes des chaînes lourdes et varient selon les isotypes. Les IgM sont majoritairement produites au cours de la réponse primaire, alors que les IgG, IgA ou IgE sont produites au cours d'une réponse secondaire ou tertiaire.

La commutation isotypique cible des points chauds de recombinaisons appelés régions « switch » ou S, situées en amont de tous les domaines constants à l'exception de C $\delta$ . Au cours du changement d'isotype, un processus de recombinaison somatique entre différentes régions S aboutit à l'association d'un gène réarrangé VDJ (éventuellement remanié par SHM) avec un nouveau segment constant de classe différente (**Figure 6**). Les cellules B matures peuvent alors exprimer et sécréter des IgG, IgA ou IgE spécifiques de l'antigène. Ce processus se révèle donc primordial pour la diversité fonctionnelle des réponses anticorps. La délétion quasi complète de S $\mu$  aboutit à un blocage sévère mais incomplet de la commutation de classe vers tous les domaines constants en aval (Khamlichi et coll. 2004).

Différents modèles d'études ont mis en évidence le contrôle de la production des différents isotypes par les cytokines, différentes interactions cellulaires directes (notamment via les récepteurs B CD40 et Ox40L) et différents mitogènes ou ligands des récepteurs de la

famille TLR (*Toll-like receptor*). L'action des cytokines semble s'exercer essentiellement au niveau des promoteurs germinaux et modulerait ainsi la CSR, tandis que les autres types de signaux d'activation cellulaire induiraient la machinerie enzymatique de recombinaison. Les cytokines induiraient l'expression ou l'activité de facteurs transcriptionnels capables de former des complexes activateurs en se liant à leurs promoteurs germinaux cibles (Stavnezer 2000).

### 2.2.3 Les stades terminaux de la différenciation lymphocytaire

**Les cellules B mémoires** constituent un groupe minoritaire de cellules à longue durée de vie, capables de persister à l'état quiescent sans proliférer (de plusieurs mois à plusieurs dizaines d'années chez l'homme). Elles ont la faculté de répondre très rapidement à des pathogènes externes. Elles peuvent, en effet, présenter rapidement et efficacement l'antigène aux lymphocytes T lors d'une réponse secondaire et se différencier en plasmocytes. Cette différenciation peut se faire en dehors des centres germinatifs bien que les cellules B mémoires puissent aussi recommencer de nouveaux cycles de sélection et d'hypermutation dans les centres germinatifs, permettant ainsi d'optimiser encore la mémoire immunitaire de l'individu (Berek and Milstein 1988).

**Les plasmocytes** sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale. Ce sont de vraies usines de production et de sécrétion d'anticorps à destination de l'ensemble de l'organisme. Deux sortes de plasmocytes peuvent être générées : à durée de vie longue (plusieurs mois ou années) ou à durée de vie courte (de l'ordre de deux semaines) en fonction de l'antigène et des signaux reçus suite à la stimulation antigénique.

D'autres cellules B périphériques interviennent dans les réponses immunes T-indépendantes. Leurs origines restent encore controversées mais leur action est essentielle puisque ce sont ces cellules qui vont constituer la première ligne de défense contre les micro-organismes : ce sont **les cellules B MZ** de la zone marginale folliculaire (MZ) de la rate et les **cellules B1** présentes notamment dans la cavité péritonéale. Les B MZ sont spécialisées dans les réponses contre les polysaccharides capables d'assurer un pontage multivalent du BCR (tels qu'un certain nombre de polysaccharides microbiens constituant des antigènes T-indépendants). Les cellules B1 ainsi que les B MZ sont à l'origine des auto-anticorps «naturels» poly-réactifs et de faible affinité dont les fonctions sont multiples : élimination des débris cellulaires, transports de cytokines ou encore formation des complexes

antigènes/anticorps présentés aux cellules B folliculaires par les FDC dans les centres germinatifs (Coutinho et coll. 1995).

### **III. Obtention et développement des Anticorps monoclonaux**

#### **1. Découverte des anticorps monoclonaux**

L'immortalisation d'une cellule plasmocytaire par un processus malin comme le myélome aboutit volontiers à la production d'une Ig monoclonale, dont la spécificité est aléatoire et le plus souvent indéterminée. Dans les années 1970, afin d'élucider la structure fine des anticorps, leur liaison aux antigènes ainsi que les règles gouvernant la synthèse et l'association des chaînes lourdes (H) et légères (L), les immunologistes ont cherché à maîtriser le processus d'immortalisation des cellules B. Ils ont d'abord eu l'idée de créer des cellules hybrides dans le simple but d'analyser l'expression et l'assemblage des chaînes d'Ig, en fusionnant entre elles des cellules tumorales B dérivées de myélome de souris, ayant la propriété de pousser *in vitro* en culture de façon indéfinie. Les Ig produites par ces cellules hybrides (ou « hydridomes ») n'avaient d'utilité que pour élucider la structure des anticorps, mais n'avaient pas de spécificité prédéfinie.

C'est en 1975 que César Milstein et Georges Köhler ont appliqué la technique de fusion cellulaire et de sélection des cellules hybrides aux lymphocytes B primaires d'animaux immunisés. L'expérience reposait sur la fusion d'une part de lymphocytes B sains provenant d'une souris immunisée contre des globules rouges de mouton avec d'autre part des cellules de myélome ayant perdu la capacité de synthétiser leurs propres chaînes lourdes et légères d'Ig (Kohler and Milstein 1975). Les hydridomes ainsi obtenus héritaient de deux propriétés : d'une part, elles se multipliaient indéfiniment comme les cellules de myélome, en donnant naissance à des populations de cellules filles identiques entre elles ; d'autre part, chaque clone de cellules filles produit un même anticorps (dit monoclonal) et un certain nombre d'entre eux étaient spécifiques de l'antigène utilisé pour immuniser les souris donneuses de cellules B.

Les avantages d'un tel anticorps par rapport aux anticorps polyclonaux trouvés dans le sérum sont importants. Les hydridomes sont gardés pendant des années en culture *in vitro* ou congelés, théoriquement sans modification de l'anticorps qu'ils produisent. On dispose donc

d'une source illimitée de cellules produisant, au moins en théorie, toujours le même anticorps avec la même affinité et les mêmes propriétés physicochimiques (Siberil et coll. 2005).

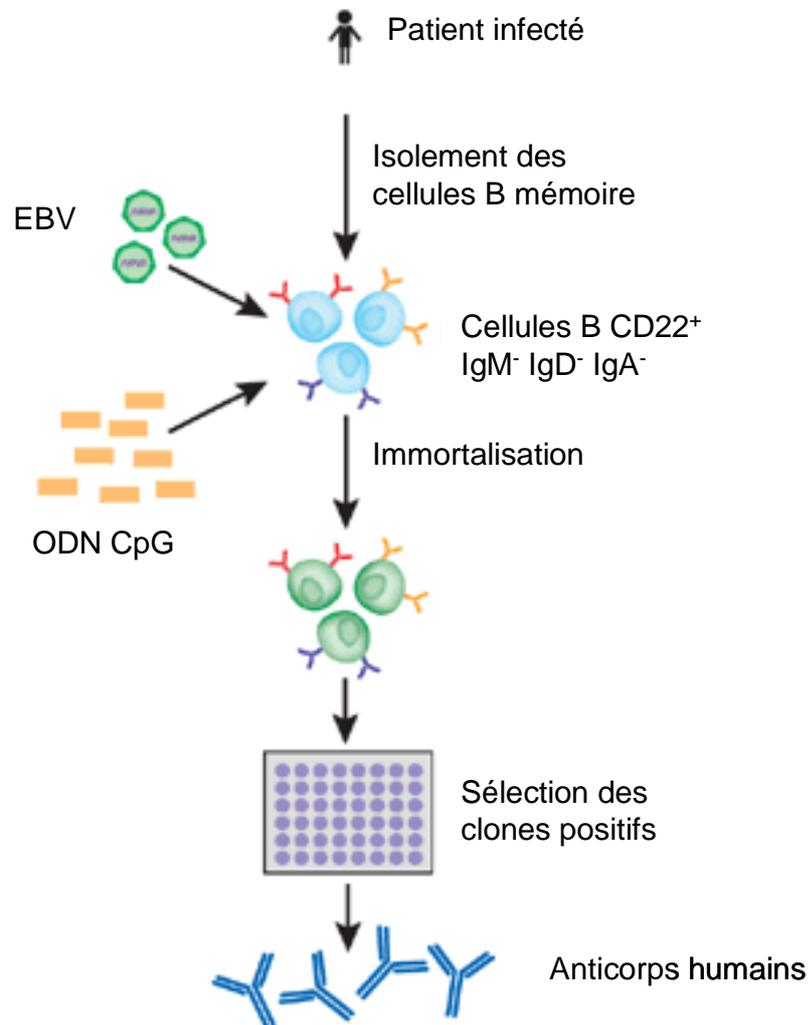
## **2. Humanisation de l'anticorps monoclonal**

### 2.1 Ingénierie cellulaire

La technique d'obtention des anticorps monoclonaux suscita immédiatement de grands espoirs thérapeutiques. Cependant, alors que cette découverte permettait des avancées considérables et rapides dans le domaine de la recherche fondamentale et dans celui du diagnostic, la plupart des premiers essais thérapeutiques aboutirent à des échecs.

En effet, l'administration d'un Ac monoclonal de souris chez l'humain provoque, dans 84% des essais cliniques réalisés (Hwang and Foote 2005), l'apparition d'anticorps humains anti-anticorps de souris (« Hama », pour *human antimouse antibody*). Les complexes immuns Ac murin/Hama entraînent de nombreux effets secondaires indésirables. De plus, les interactions des Ac murins avec les partenaires humains impliqués dans la réponse immune (récepteurs présents à la surface des cellules effectrices ou protéines du complément) souffrent d'une spécificité d'espèce et ne sont pas optimales, réduisant ainsi l'efficacité biologique de ces anticorps (Hulett and Hogarth 1994).

Afin de palier à ces problèmes, des hybridations de lymphocytes humains avec des cellules de myélome d'autres espèces (souris et rat) ou avec des cellules de myélome humains ont été tentées avec plus ou moins de succès (Olsson and Kaplan 1980). A la fin des années 1970, la technique cellulaire la plus utilisée dans ce but consiste à immortaliser les lymphocytes B d'un donneur au moyen du virus d'Epstein-Barr (EBV) (Casali et coll. 1986), puis à fusionner ces lignées B immortalisées avec des cellules d'un myélome humain pour obtenir des hétéromyéomes sécrétant un anticorps produit par les lymphocytes B humains (Kozbor et coll. 1982). Cependant, la palette d'antigènes contre lesquels il est possible d'obtenir des anticorps est relativement restreinte. De plus, l'instabilité de ces hétéromyéomes rend impossible une production d'anticorps thérapeutique à une échelle industrielle.



**Figure 7 : Immortalisation des cellules B mémoires humaines**

Les cellules B mémoires (CD22 + IgM, IgD, IgA) sont isolées à partir de cellules mononucléées du sang périphérique. Elles sont immortalisés par l'EBV en présence d'oligodésoxynucléotide CpG. Les surnageants de cultures sont ensuite testés afin de sélectionner les clones cellulaires produisant des anticorps humains spécifiques de la cible d'intérêt. (D'après Marasco et coll. 2007)

Plus récemment, les approches visant à la production d'anticorps humains se sont beaucoup diversifiées. Les travaux de Lanzavecchia et ses collaborateurs ont notamment abouti à la mise au point d'une méthode novatrice d'ingénierie cellulaire pour l'obtention d'anticorps monoclonaux humains. La transformation par l'EBV de lymphocytes B mémoires CD22+ IgM-, IgD-, IgA- isolés à partir de patients infectés et victimes du SRAS (*syndrome respiratoire aigu sévère*), suivie de leur stimulation *in vitro* par des motifs CpG (qui stimulent la prolifération lymphocytaire B par l'intermédiaire des récepteurs TLR9) a ainsi permis d'isoler un grand nombre de lignées productrices d'anticorps anti-coronavirus de forte affinité (Traggiai et coll. 2004) (**Figure 7**).

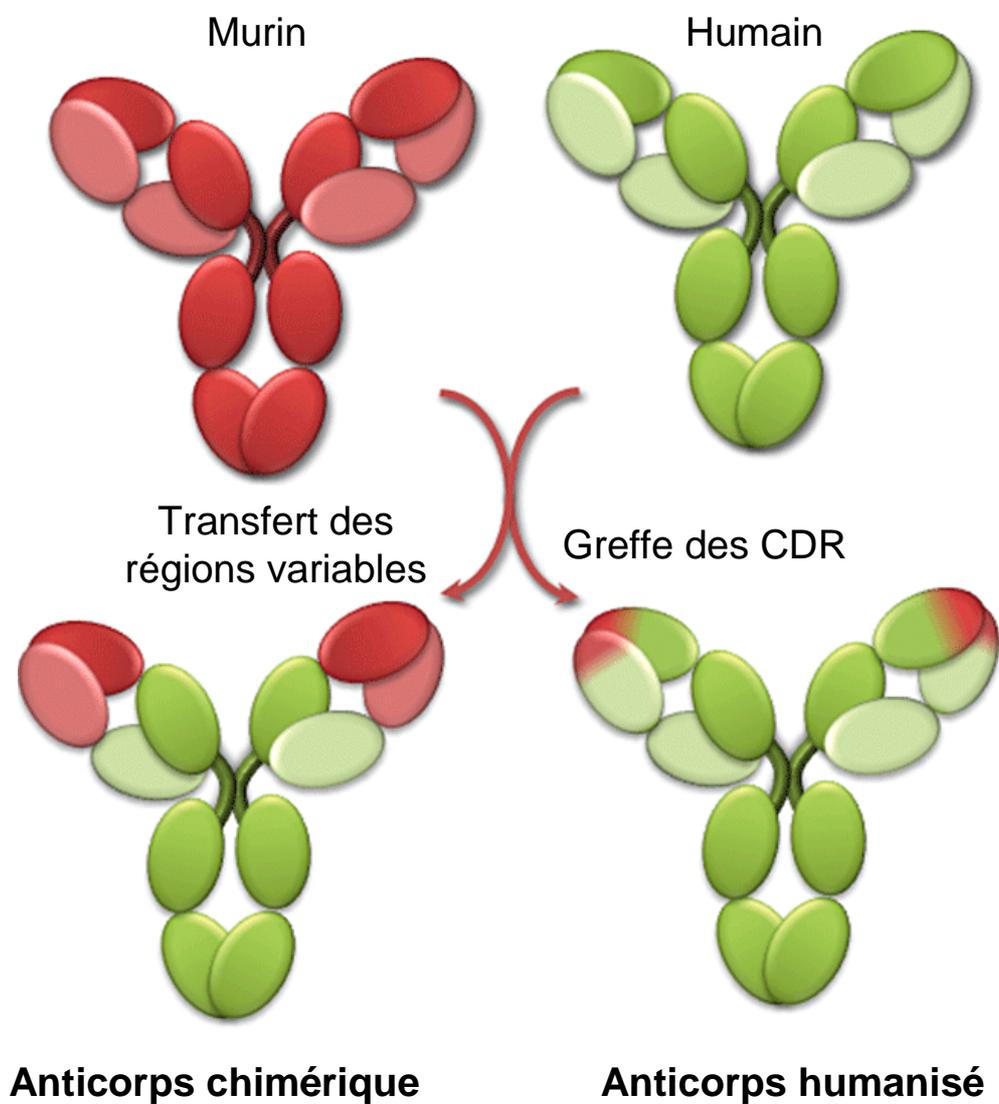
Egalement, la possibilité de reconstituer des souris immunodéficientes ( $Rag2^{-/-} \times \gamma c^{-/-}$ ) avec des cellules immunitaires humaines par injection intrahépatique de cellules CD34+ du sang de cordon ouvre la voie à la génération d'anticorps humains après immunisation de ces souris, comme le suggère l'apparition d'une réponse de type IgG, après immunisation avec l'anatoxine tétanique (Traggiai et coll. 2004).

## 2.2. Approche moléculaire

La manipulation des anticorps monoclonaux par génie génétique a commencé au début des années 1980. Les principaux objectifs de ces manipulations ont été alors l'obtention d'anticorps chimériques, humanisés ou humains, ainsi que la modification de leur affinité, ou la capacité à les exprimer sous forme de fragments ou de protéines de fusion avec des molécules leur conférant par exemple une cytotoxicité accrue.

### 2.2.1 Construction d'Ac chimérique (Morrison et coll. 1984; Takeda et coll. 1985)

La construction d'un anticorps chimérique nécessite, dans un premier temps, l'isolement de l'ADN codant pour le domaine VH et le domaine VL d'un anticorps monoclonal de souris ou de rat. Ces fragments sont ensuite liés à l'ADN codant les domaines constants H (d'isotype  $\gamma$  dans la majeure partie des cas) et L d'une immunoglobuline humaine (**Figure 8**). De tels anticorps possèdent, ainsi, un fragment Fc entièrement humain qui les rend considérablement moins immunogéniques chez le patient (les épitopes immunodominants interspèces d'IgG sont principalement localisés dans les domaines CH2 et CH3) et capables d'interagir de manière efficace avec les effecteurs humains et la cascade du complément.



**Figure 8 : Anticorps chimérique et humanisés.**

Les séquences murines sont représentées en rouge et les séquences humaines en vert, avec des couleurs claires pour la chaîne légère et des couleurs foncées pour les chaînes lourdes.  
(D'après Chames et coll. 2009)

Néanmoins, et même si de nombreux succès thérapeutiques ont été obtenus grâce à de tels anticorps, la formation d'anticorps humains dirigés contre les anticorps chimériques (AHAC) est encore détectée chez 40 % des patients (Hwang and Foote 2005).

### 2.2.2. Construction d'Ac humanisés

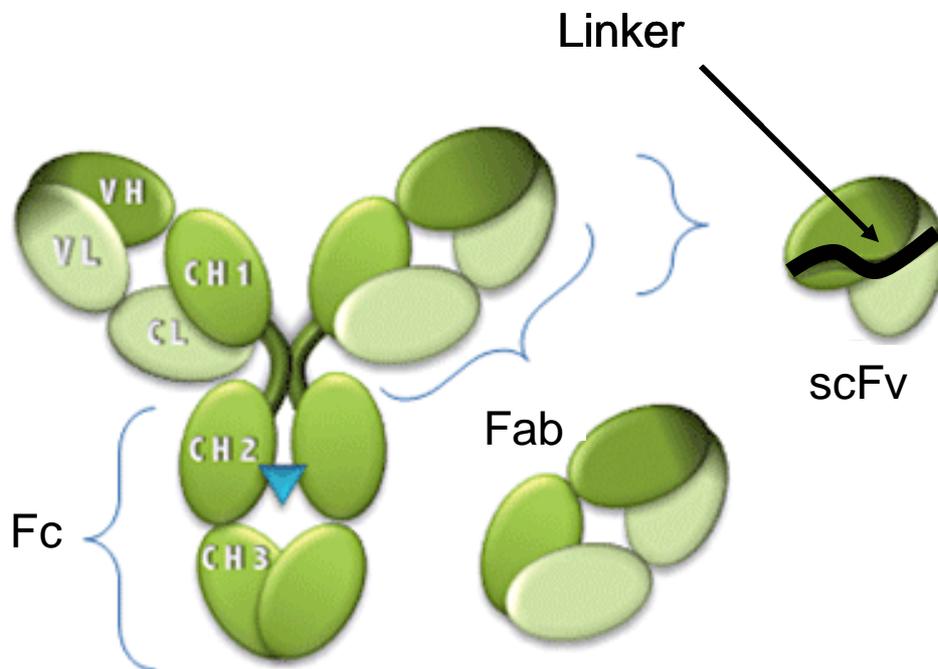
En 1986, l'équipe de Greg Winter crée une nouvelle génération d'anticorps thérapeutiques, les anticorps « humanisés » dont moins de 10% de la séquences peptidique est d'origine murine. Cette nouvelle technique consiste à transférer dans un cadre humain «accepteur» des acides aminés des régions CDR provenant de l'anticorps monoclonal «donneur» d'origine murine (**Figure 8**). Ce concept repose sur le fait que les six CDR des régions variables des chaînes lourdes et légères contiennent la majorité des acides aminés constituant le site de liaison de l'antigène (Jones et coll. 1986).

Certains acides aminés situés en dehors des régions hypervariables sur la région charpente jouent, néanmoins, un rôle essentiel dans le maintien de la conformation et leur substitution peut modifier considérablement l'affinité de l'anticorps humanisé obtenu. Le choix des domaines VH et VL humains sur lesquels s'effectue la substitution des CDR est donc déterminant. La modélisation de la structure tridimensionnelle de la région Fab de l'anticorps murin parental, notamment par cristallographie et diffraction aux rayons X donne des informations majeures pour orienter ce choix.

De plus, la présence d'éventuels sites de glycosylation doit être recherchée. Bien que la N-glycosylation de régions VH ou VL soit assez peu fréquente, elle est loin d'être marginale ( $\leq 10-15$  % des anticorps) (Wright and Morrison 1993) et entraîne généralement un impact important sur les capacités de liaison à l'antigène. Le maintien de sites de glycosylation peut donc s'avérer être indispensable lors de l'humanisation.

Lors de la conception du Zenapax, les CDR de l'anticorps murin anti-Tac ont été insérés sur l'anticorps humain Eu : 67% des acides aminés des régions charpentes des chaînes lourdes et 65 % des acides aminés des régions charpentes des chaînes légères étaient identiques entre les deux anticorps. L'anticorps Eu est, avec les anticorps NEWM, KOL et REI, parmi les plus utilisés comme cadre «accepteur» pour la construction d'Ac humanisés (Bellet and Dangles-Marie 2005).

Depuis la conception et la construction des premiers anticorps humanisés, des améliorations constantes tentent d'être apportées dans l'ingénierie des ces molécules. La



**Figure 9 : Fragments d'anticorps : Fab et fragments simple chaîne (scFv)**

Un anticorps conventionnel et ses fragments dérivés sont représentés en vert (clair pour la chaîne légère, sombre pour la chaîne lourde, le triangle bleu indique un site de glycosylation). Les zones ombrées représentent les sites de liaison.

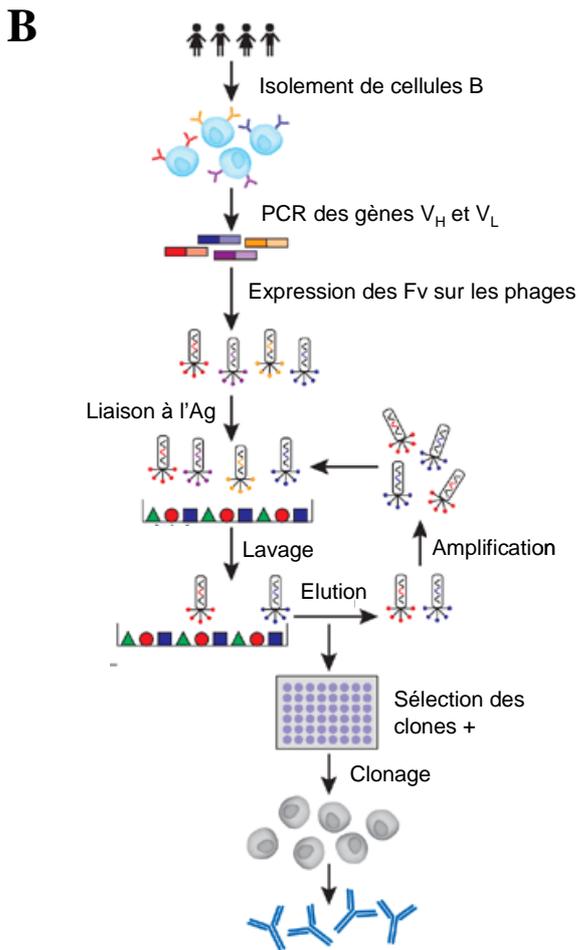
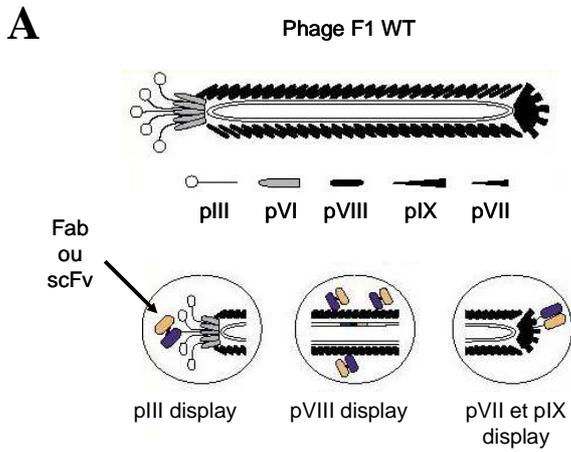
(D'après Chames et coll. 2009)

technique de greffage de résidus déterminants spécifiques (*specificity determining residues*, SDR) repose sur l'analyse de multiples structures en 3-D des sites de liaison de l'antigène. Cette analyse suggère que seuls 20% à 33% des acides aminés des régions CDR sont critiques dans l'interaction antigène-anticorps. Ces résidus, les SDR, sont uniques pour chaque anticorps. Une nouvelle approche de l'humanisation est donc fondée sur le greffage non plus de l'ensemble des régions CDR, mais seulement des SDR de l'anticorps murin dans les régions variables humaines (Tamura et coll. 2000)

De même, la technique de *variable domain resurfacing* (Zhang et coll. 2005) est toujours proposée comme une alternative à la technique de greffage des régions CDR. Elle est fondée sur la notion que les anticorps humains anti-V murin sont dirigés contre les résidus «physiquement accessibles» des chaînes variables de l'anticorps de souris (Padlan 1991). Cette technique repose donc sur l'analyse systématique de la distribution des acides aminés exposés aux solvants dans les domaines variables murins et humains. La présence de tel ou tel acide aminé à une position exposée aux solvants signe en effet un profil particulier, spécifique de chaque anticorps («surface residues patterns»). On peut alors, par mutagenèse dirigée, remplacer les résidus exposés à la surface dans les régions charpentes des anticorps murins par les résidus habituellement trouvés à la surface des anticorps humains. Malgré la difficulté de conception de l'anticorps à humaniser et la faible maîtrise de l'influence des modifications effectuées sur l'affinité des anticorps, cette technique a permis d'humaniser plusieurs anticorps monoclonaux (Roguska et coll. 1994; Delagrave et coll. 1999).

### 3. Génération de bibliothèques d'anticorps monoclonaux

En 1988, l'équipe de Marc Whitlow crée une nouvelle protéine recombinante de liaison à l'antigène. Cette petite protéine d'une trentaine de kilodaltons est composée des séquences des parties variables (VH et VL) d'un anticorps préexistant lié par un peptide de liaison («linker») qui accroche l'extrémité carboxy-terminale d'un domaine VL avec l'extrémité amino-terminale d'un domaine VH, en une chaîne polypeptidique unique (Bird et coll. 1988) (**Figure 9**). Cette technique de fabrication de fragments simple chaîne («scFv», pour *single chain Fv*) a permis d'obtenir des fragments d'anticorps de type Fv qui font l'objet de modifications ultérieures en fonction de leur usage désiré : fragment divalent, bispécifique, addition de séquences codant des fragments actifs d'enzymes ou de toxines (Reiter and Pastan



**Figure 10 : Technique du phage display**

**A. Phage filamentueux :**

Représentation de l'exposition des fragments V sur les protéines d'enveloppe du phage.

(D'après Konthur et coll. 2002)

**B. Technique du phage display en 3 étapes :**

-construction de la banque d'anticorps et expression des fragments variables à la surface du phage,

-sélection des phages spécifiques par liaison avec l'Ag d'intérêt,

-clonage des gènes variables sélectionnés en amont de gènes constants d'Ig humain.

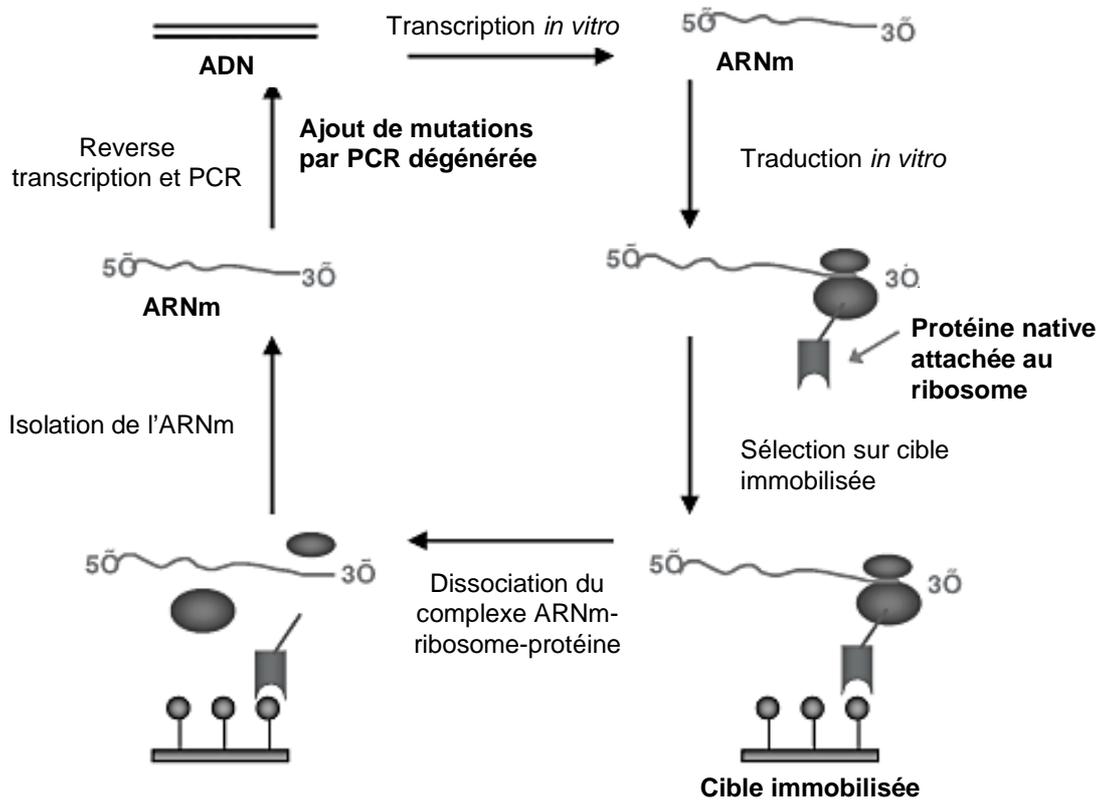
(D'après Marasco et coll. 2007)

1998). Ce procédé permet de plus la production en masse de fragments d'anticorps dans des bactéries, contrairement aux anticorps entiers, toxiques pour ces dernières (Ward et coll. 1989).

De nombreuses librairies de fragments Fv ont depuis lors été constituées à partir de répertoires entiers de gènes V réarrangés *in vivo* provenant de populations de lymphocytes B d'animaux immunisés ou de patients. Elles comprennent, également, les librairies de gènes V « semi-synthétiques » construits *in vitro* (Winter et coll. 1994; de Kruif et coll. 1995).

Des méthodes stringentes ont été développées pour sélectionner le fragment Fv capable de lier l'antigène parmi le large choix de ligands potentiels au sein d'une librairie. La plus répandue reste encore la technique de « phage display » qui consiste à exprimer les fragments Fv à la surface de bactériophages (McCafferty et coll. 1990; Clackson et coll. 1991). De façon schématique, une librairie d'ADNc codant des fragments variables d'anticorps humain de type scFv ou Fab est clonée dans le génome de phages (Huse et coll. 1989) ou de « phagemides » (Clackson et coll. 1991) de manière ciblée, en amont d'une séquence codant une protéine de l'enveloppe du phage (**Figure 10.A**). On utilise préférentiellement la protéine pIII pour laquelle la fusion pIII/Fv aboutit à l'expression d'un seul fragment d'anticorps par phage, permettant de sélectionner des anticorps de très bonne affinité (Vaughan et coll. 1996). La protéine pVIII, protéine prépondérante à la surface du phage, est également utilisée mais la sélection d'anticorps de bonne affinité est alors biaisée par l'effet «bonus» de la multivalence ainsi créée (Kang et coll. 1991). La sélection des phages portant les séquences variables spécifiques de l'antigène d'intérêt est réalisée au cours de plusieurs cycles successifs d'interaction phage/Ag et de propagation du phage (**Figure 10.B**). De très nombreuses adaptations et variations de la technique initiale du «phage display» ont permis d'isoler, au cours des quinze dernières années, des phages ayant des activités de liaison contre un grand nombre d'antigènes et d'auto-antigènes comme le TNF $\alpha$ , l'antigène carcinoembryonnaire, la molécule CD4, ainsi que des antigènes des groupes sanguins ABO et du système Rhésus (pour revue Aujame et coll. 1997).

D'autres approches de sélection de fragments d'anticorps, moins répandues, ont été également décrites : le « ribosome display » est fondé sur la production d'ARNm d'une banque de scFv, transcrits et traduits *in vitro* dans un système acellulaire. Cette bibliothèque de scFv est caractérisée par l'absence de codon stop aux extrémités 3' des régions codantes.



**Figure 11 : Principe de la technique du ribosome display.**

Une bibliothèque de scFv est transcrite et traduite *in vitro*. Les ARNm résultants qui ne possèdent pas de codon stop, donnent naissance à des complexes liés ARNm-ribosome-scFv. Ces complexes sont directement utilisés pour une sélection sur la cible immobilisée. L'ARNm incorporé dans les complexes liés est élué, purifié et rétro-transcrit dans des conditions favorables à l'incorporation de mutations. Le pool d'ADN codant pour des scFv spécifiques de la cible d'intérêt est enrichi au cours de plusieurs cycles successifs.

(D'après Hanes et coll. 2000)

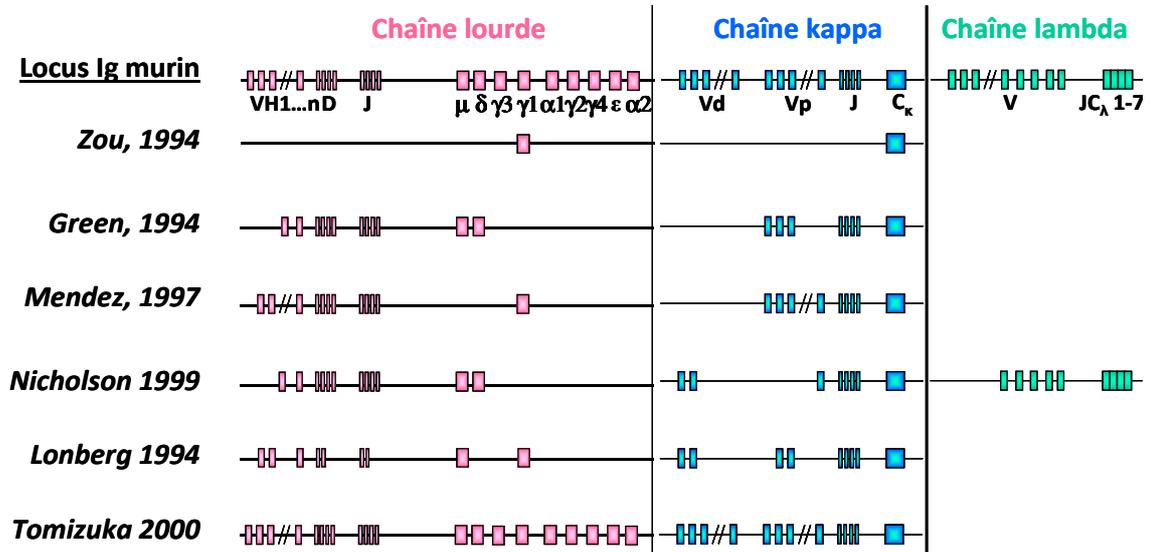
Lors de la traduction, l'absence de codon stop provoque l'apparition de complexe mRNA/ribosome/scFv, qui vont directement se fixer sur une cible immobilisée par l'intermédiaire du fragment Fv néo-synthétisé. L'ARN codant le scFv spécifique de l'antigène est ainsi isolé et de nouvelles mutations sont apportés lors de la reverse transcription afin de favoriser, après plusieurs cycles, l'obtention de fragment Fv de haute affinité (Hanes et coll. 2000) (**Figure 11**). La technique du « phage display » et plus récemment celle du « ribosome display » ont permis de d'obtenir des fragments d'anticorps qui possèdent pour l'antigène une affinité extrêmement forte surpassant, pour la plupart, les affinités mesurées avec les AcM conventionnels (Luginbuhl et coll. 2006).

#### **4. Les modèles murins humanisés**

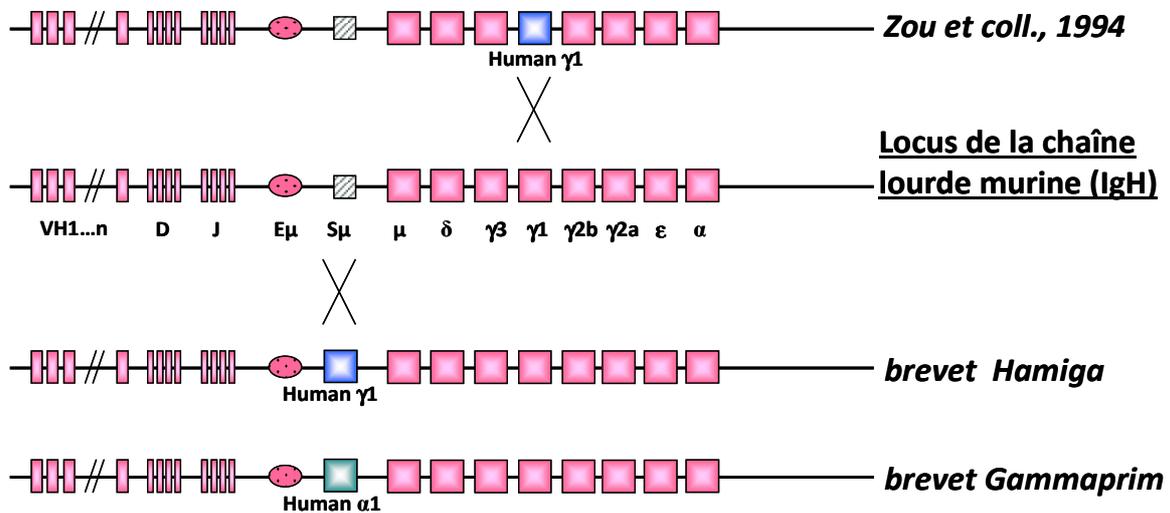
Une autre approche, visant à l'obtention d'anticorps monoclonaux humains directement chez la souris, a vu le jour grâce au développement des techniques de transgénèse. Cette approche consiste à remplacer une partie des loci des gènes d'Ig de souris par les loci équivalents humains. Après immunisation, ces animaux sont capables de produire des anticorps humanisés pour tout ou partie de leurs séquences, avec la possibilité de dériver aussi bien des anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes que des polyclonaux à partir du sérum des animaux.

La première description de souris capables d'exprimer un répertoire restreint de gènes d'Ig humains date de 1989 (Bruggemann et coll. 1989). Par la suite, une inactivation des gènes d'Ig endogènes de la souris a été combinée à une utilisation de longs transgènes humains qui incluent plusieurs régions variables capables de réarrangements V(D)J et plusieurs gènes constants (**Figure 12.A**). Les souris obtenues produisent des anticorps humains de type IgM, ou IgG lors de réponses secondaires, indiquant que les fragments introduits permettent un certain degré de commutation de classe. De plus, l'analyse des anticorps monoclonaux obtenus montre que des mutations somatiques affectent les régions variables indiquant l'existence d'une maturation apparemment correcte de la réponse anticorps (Green et coll. 1994; Lonberg et coll. 1994). Ces animaux ayant un faible nombre de segments V présentent cependant des lacunes dans leur répertoire, en particulier contre des antigènes polysaccharides, habituellement ciblés par des anticorps provenant d'un répertoire V(D)J quasi germinal avec peu d'hypermutations somatiques (Adderson et coll. 1992).

**A**



**B**



**Figure 12 : Séquences d'immunoglobulines humaines introduites dans le génome de souris transgéniques.**

**A. Introduction de gènes d'Ig humains dans le génome des souris transgénique.**

**B. Approche chimérique.** Expression de réarrangements VDJ endogènes en association à une région constante de chaîne lourde humaine

Par la suite, des lignées transgéniques disposant d'un nombre plus élevé de segments V ont donc été générées, améliorant l'étendue du répertoire et permettant la reconstitution de compartiments B de volume plus proche de la normale (Mendez et coll. 1997; Green and Jakobovits 1998) (**Figure 12.A**). Ces lignées ont été produites par transgénèse classique ou par fusion de cellules ES avec des protoplastes pour le transfert de chromosomes de levure porteurs de larges transgènes humains ou encore par fusion d'ES avec des microcellules dérivées de fibroblastes humains et apportant un minichromosome humain. Les lignées portant les locus IgH et Igk entiers (HuMAb mouse de Medarex), ou portant en plus le locus Igλ (Xenomouse d'ABgenix) ainsi créées, ont permis d'obtenir des anticorps de haute affinité (Popov et coll. 1999; Kuroiwa et coll. 2000).

En parallèle, des approches chimériques ont également été réalisées avec l'établissement de lignées murines dans lesquelles les réarrangements VDJ endogènes s'expriment en association à une région constante de chaîne lourde humaine. Ainsi, Zou et Rajewsky ont remplacé les exons codant la partie sécrétée de la chaînes  $\gamma 1$  de l'IgG1 murine par des exons  $\gamma 1$  humains, aboutissant à un remplacement efficace de la forme murine par l'IgG1 humaine dans le système immunitaire de ces animaux, tout en gardant le répertoire VDJ murin (Zou et coll. 1994) (**Figure 12B**).

La plupart de ces animaux mutants sont caractérisés par une maturation B relativement normale en termes de taille des compartiments B, de réarrangements VDJ, de réarrangements de switch et d'hypermutation (Harding and Lonberg 1995). Ils ont ainsi permis de dériver un certain nombre d'anticorps d'intérêt commercial, aussi bien contre des protéines de pathogènes (Chang et coll. 2002), des polysaccharides (Chang et coll. 2002), des protéines humaines solubles (Yang et coll. 1999) ou membranaires (Teeling et coll. 2004) et des Ag variants associés à des tumeurs (Imakiire et coll. 2004).

Dans ce cadre, notre équipe a récemment créé deux lignées de souris désignées HAMIGA et GAMMAPRIM dont le génome a été modifié au niveau du locus de la chaîne lourde par introduction d'un gène constant humain ( $\alpha 1$  pour HAMIGA et  $\gamma 1$  pour GAMMAPRIM) positionné en remplacement du premier site de commutation des gènes constants de la chaîne lourde des différentes Ig (**Figure 12B**). Les anticorps produits par ces animaux sont majoritairement des IgA humaines (HAMIGA) ou IgG1 humaine (GAMMAPRIM); ils ne contiennent pas d'IgM et seulement de très faibles quantités des

autres classes d'Ig endogènes. L'utilisation et la caractérisation des souris HAMIGA sera abordée plus en détail dans la partie résultats.

## **5. Marché des anticorps monoclonaux**

Au cours de la dernière décennie, le marché des anticorps thérapeutique a littéralement explosé, atteignant 33 milliards de dollar en 2008 ce qui correspond à une augmentation de 22,2% par rapport à 2007 et de 220% par rapport à 2004. Le couple Genentech/Roche est leader du marché avec 5 AcM acceptés par la FDA, suivis de trois grands groupes pharmaceutiques : Johnson & Johnson, Abbott et Astra Zeneca/MedImmune. Quatre autres compagnies tiennent également une place importante dans le secteur ; Biogen Idec, Amgen, Novartis et UCB Pharma (Dimitrov and Marks 2009). La formidable croissance du marché des anticorps thérapeutiques durant ces dix dernières années a rapidement incité les grandes entreprises pharmaceutiques à acquérir les petites compagnies dédiées aux anticorps. Aujourd'hui, toutes les « big pharma » et un nombre croissant de plus petites entreprises de biotechnologie identifient et développent des anticorps thérapeutiques.

Le marché des anticorps monoclonaux a commencé son ascension avec la commercialisation en 1997 du Rituxan (Rituximab) pour le traitement des lymphomes non-hodgkinien (NHL). Cette molécule est très vite devenue le médicament standard dans le traitement de cette maladie et le premier anticorps monoclonal qui atteignait le statut de « blockbuster » avec un chiffre d'affaire de plus de 1 milliard de dollars par an (Dimitrov and Marks 2009). A présent, le Remicade est le leader du marché avec des ventes qui ont atteint 6,5 milliards de dollars en 2008, suivi par le Rituxan (5,6 Md\$) l'Herceptin (4,8 Md\$), l'Avastin (4,7 Md\$) et l'Humira (4,4 Md\$).

Actuellement, 23 anticorps monoclonaux ont reçu une autorisation de la FDA pour une utilisation thérapeutique notamment dans le traitement de cancers, de maladies inflammatoires ou cardio-vasculaires. De manière générale, ces différents domaines mobilisent plusieurs anticorps qui ciblent les mêmes maladies aboutissant à une forte compétition entre les différents anticorps. L'oncologie semble, à l'heure actuelle, le domaine qui présente la plus forte expansion avec une multitude de candidats-médicaments en cours de développement ; AMG 479 dans le traitement des carcinomes pancréatique (Beltran et coll.

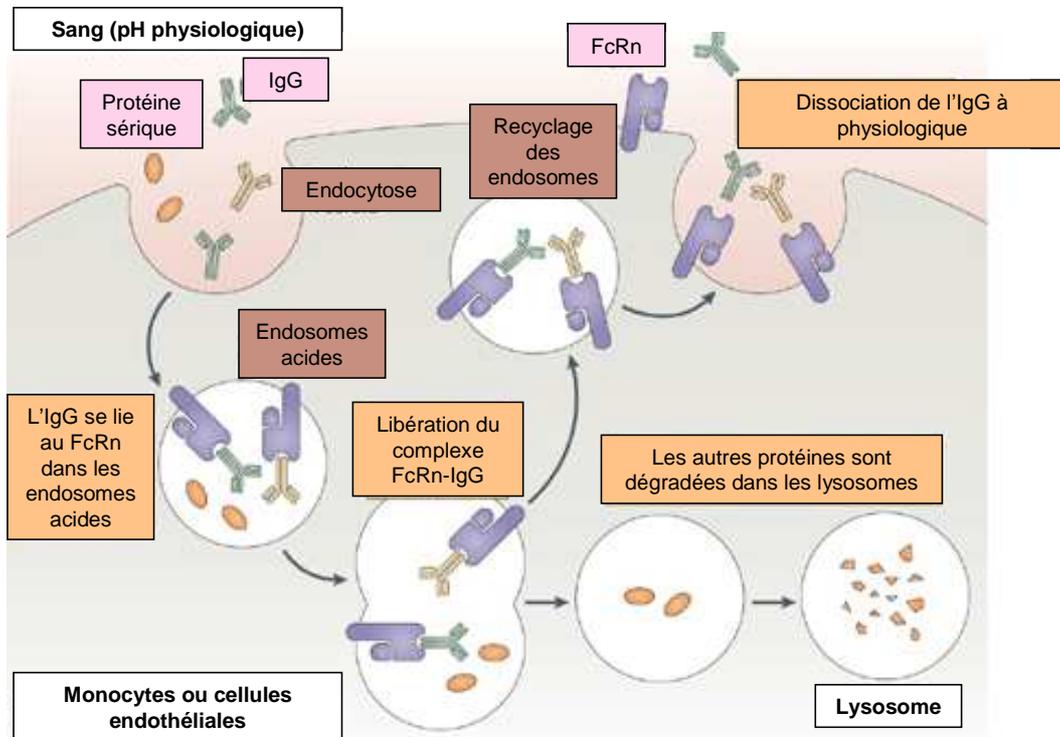
2009), Ramucirumab pour bloquer l'angiogénèse (Krupitskaya and Wakelee 2009), Adecatumumab pour le cancer du sein métastatique (Schmidt et coll. 2009), Oregovomab pour le cancer ovarien (Braly et coll. 2009), Etaracizumab pour les sarcomes (Delbaldo et coll. 2008). Les traitements anti-infectieux sont moins représentés avec un seul anticorps approuvé par la FDA mais ce secteur semble également en voie de développement avec une recherche intensive d'AcM dirigé notamment contre le VIH (pour revue Chen and Dimitrov 2009).

A la fin de 2008, on dénombrait 25 anticorps thérapeutiques en phase clinique III, au moins une trentaine en phase II et 7 qui avaient échoué dans leur approbation. En moyenne, uniquement 15% des essais cliniques aboutissent à la mise sur le marché d'un nouvel anticorps. Malgré la croissance persistante de ce marché, plusieurs données freinent encore son développement. Notamment, le coût du développement des AcM, rendent les candidats-médicaments de faibles portées thérapeutiques, moins attractifs pour les grands groupes pharmaceutiques. De plus, le coût du traitement maintient les Ac en compétition constante avec d'autres molécules moins onéreuses. Ces inconvénients majeurs ont favorisé la percée de nouvelles formes d'anticorps thérapeutiques venant concurrencer les AcM entiers, actuellement dominants du marché.

Les fragments Fab devraient, ainsi, prendre une place croissante dans le marché des anticorps thérapeutique au cours des 5 prochaines années. L'un des exemples de développement industriel de ces nouveaux anticorps sont les Fab «PEGylés» de UCB Celltech qui utilise des Fab couplé à des chaînes de polyéthylène glycol pour augmenter la demi-vie des fragments dans l'organisme. Parmi les 450 AcM actuellement en essai clinique, 54 sont des fragments, dont 30 des Fab, 19 des scFv et 5 qui font partie de la troisième génération d'anticorps (Ac miniatures). Deux Fab sont notamment en phase III : le Naptumomab estafenatox, un fragment Fab couplé à l'entérotoxine A staphylococcique et le VB4-845, un scFv conjugué à l'endotoxine A de *Pseudomonas*, tout les deux utilisés pour le traitement de carcinomes (Nelson and Reichert 2009).

Les AcM sont pour l'instant uniquement délivrés par injection ou perfusion intraveineuse. Le développement de nouvelles voies d'administration d'anticorps par ingestion ou inhalation représente un domaine d'application plus pratique et indolore et un large marché potentiel pour les entreprises pharmaceutiques. Pour ces approches, les groupes pharmaceutiques font souvent appel à des plus petites «biotech» qui possèdent des

technologies innovantes dans ce domaine. Ce fut le cas, d'Enzon pour le développement d'un scFv couplé à la «pulmonary particle technology» de Nektar. De la même façon, MedImmune s'est associé avec Alkermes pour développer un AcM inhalable contre le virus respiratoire (Riley 2006). Le développement d'Ac administré par voie orale fait appel, notamment, à l'«Emisphere technologies» développé par Eligen qui utilise des agents «carriers» pour protéger les protéines des enzymes digestives et qui facilite le transport à travers les muqueuses intestinales. Une autre approche concerne la technologie «cobalamin» d'Acess Pharmaceutical qui utilise les propriétés d'ingestion de la vitamine B12 associée au candidat-médicament (Petrus et coll. 2009).



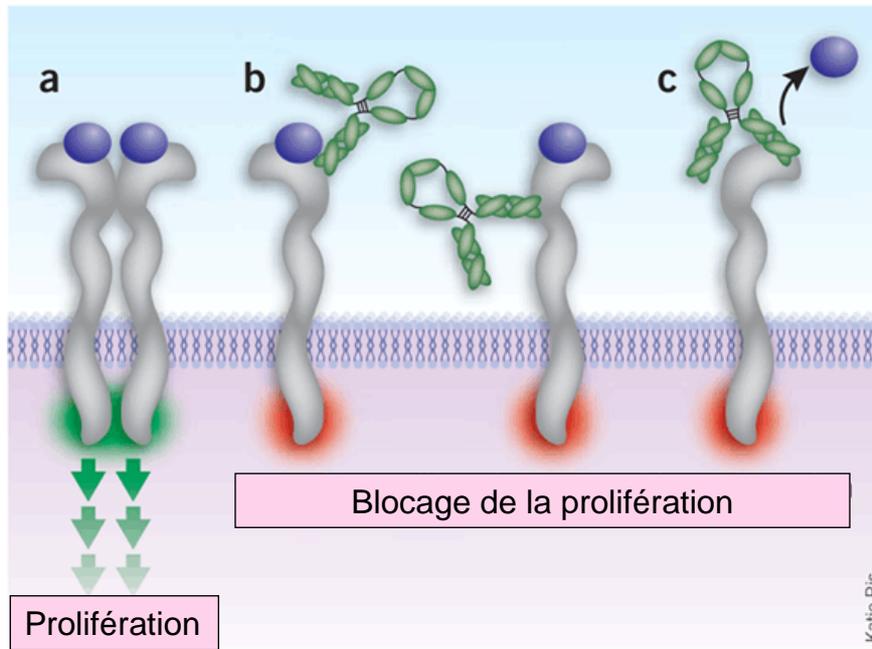
**Figure 13 : Recyclage des IgG endocytées par les monocytes ou les cellules endothéliales. par le récepteur Fc néonatal (FcRn).** Ces cellules internalisent les IgG sériques, qui se lient au récepteur FcRn dans le compartiment endosomal. Le cycle permanent de recyclage de ce récepteur ramène l'IgG vers la circulation, améliorant ainsi sa demi-vie sérique. (D'après Roopenian et coll. 2007)

## ***IV. Mode d'action des Ac thérapeutiques***

A l'heure actuelle, la plupart des anticorps thérapeutiques approuvés par la FDA et la grande majorité des anticorps en phase de tests cliniques sont des immunoglobulines d'isotype  $\gamma 1$ . Cette sous-classe possède, en effet, des caractéristiques fonctionnelles particulièrement intéressantes lors d'une utilisation en immunothérapie et notamment pour les traitements anticancéreux associés à des pathologies touchant le compartiment leucocytaire. Plus rarement, certaines situations thérapeutiques nécessitent l'utilisation d'anticorps portant des régions Fc dérivées d'autres isotypes tels qu'IgG2 ou IgG4 lorsque l'on veut, par exemple, éviter l'activation de mécanismes effecteurs. Le « monopole » thérapeutique de l'IgG1 au cours des vingt dernières années et les très nombreuses études qui en ont découlé ont permis d'entrevoir certaines limites dans l'utilisation de cette molécule qui encouragent aujourd'hui au développement de nouvelles formes d'anticorps capables de relever de nouveaux défis thérapeutiques.

### **1. Pharmacocinétique sérique des IgG**

Les anticorps monoclonaux d'isotype  $\gamma$  sont caractérisés par une demi-vie sérique très longue. Leur masse est suffisante pour échapper à une filtration et une élimination par les glomérules rénaux et leur association avec divers récepteurs exprimés à la surface des leucocytes favorise leur maintien dans la circulation sanguine. Le mécanisme prépondérant de rétention des IgG dans le sérum résulte de l'interaction de la partie Fc avec le récepteur néonatal FcRn exprimé à la surface des cellules endothéliales vasculaires, des monocytes et des macrophages. Ce récepteur est également présent au niveau de la barrière hémato-encéphalique, sur les glomérules rénaux et dans l'épithélium intestinal (Roopenian and Akilesh 2007). Initialement, l'existence du FcRn a été démontrée lors de l'isolement d'un récepteur hétérodimérique impliqué dans le transport des IgG maternelles à travers l'épithélium intestinal de rongeurs nouveau-nés (Simister and Mostov 1989). En dehors de ce rôle dans la protection immunitaire néo-natale, ce récepteur est déterminant pour l'homéostasie sérique des IgG (**Figure 13**). Le renouvellement des protéines sériques implique en effet la pinocytose cellulaire non spécifique (concernant toutes les protéines présentes) notamment par les monocytes et les cellules épithéliales, suivie d'une dégradation par acidification dans



**Figure 14 : Exemple d'inhibition de signalisation cellulaire par un anticorps.**

La liaison d'un récepteur de facteur de croissance avec son ligand déclenche sa dimérisation et l'activation d'une cascade de signalisation conduisant à la prolifération cellulaire et la résistance aux agents cytotoxiques (a). (b, c) L'inhibition de signalisation provoquée par la présence d'un anticorps peut se produire en bloquant l'événement de dimérisation (b) ou en interférant avec la liaison du ligand (c).

(D'après Adams et coll. 2005)

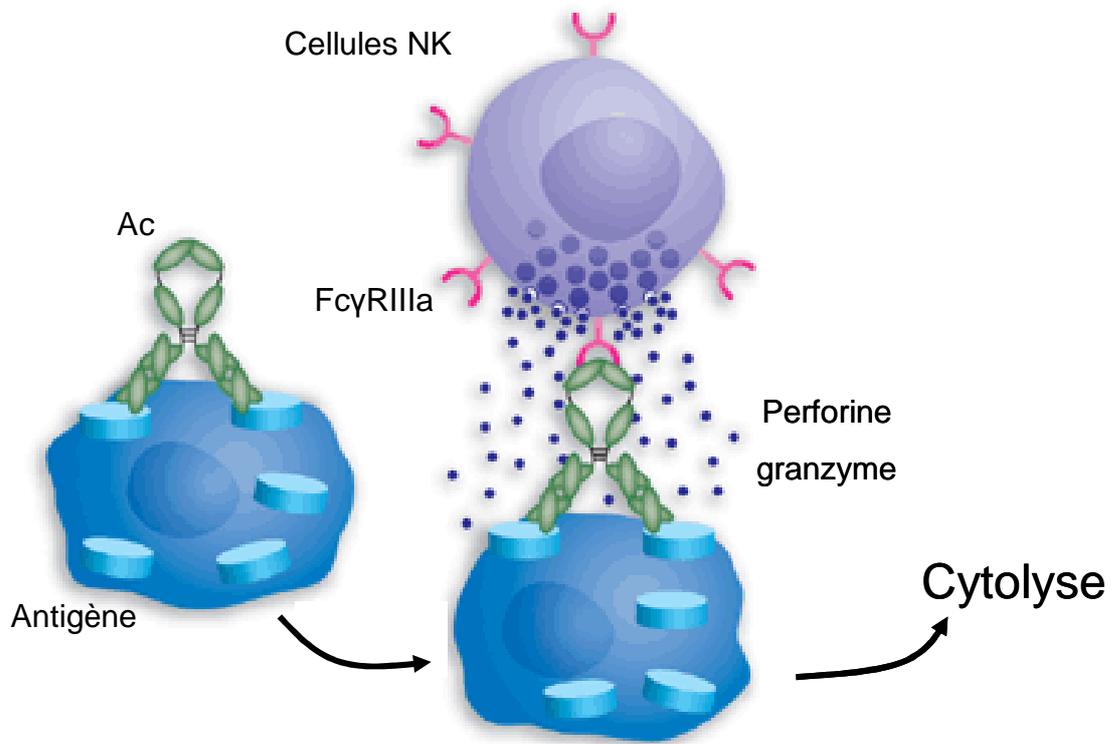
les compartiments endosomaux. Dans ce compartiment, l'IgG rencontre un récepteur qui suit un cycle permanent de recyclage, le FcRn. La fixation de l'IgG capturée sur le FcRn est optimale dans les conditions d'acidité des endosomes. Le FcRn y capte donc l'IgG, puis la reconduit vers la membrane cellulaire et le sérum où il la libère sous l'effet de la brusque augmentation du pH. Ce mécanisme contribue considérablement à l'augmentation de la demi-vie plasmatique des IgG qui peut atteindre plusieurs semaines (Roopenian and Akilesh 2007).

## 2. Mode d'action des IgG

Bien que le mécanisme d'action d'un anticorps thérapeutique ne soit pas toujours évident à mettre en évidence chez le patient, les différentes voies cytotoxiques que peuvent emprunter ces molécules monoclonales sont très bien décrites *in vitro*. De manière conceptuelle, les modes d'action des anticorps thérapeutiques peuvent être divisés en mécanismes directs, médiés par les régions variables de l'anticorps et en mécanismes indirects, provoqués par la liaison des domaines constants avec un effecteur moléculaire ou cellulaire. Dans ce chapitre, nous développerons essentiellement les mécanismes mis en jeu dans les traitements anti-tumoraux.

### 2.1. Mécanismes directs

L'une des familles d'antigènes associés aux tumeurs (TAA) les plus communs concerne les récepteurs de facteurs de croissance qui sont surexprimés sur un grand nombre de cellules tumorales. En condition normale, leur activation favorise les réponses prolifératives et la survie cellulaire qui se manifeste lors d'une surexpression sur les cellules cancéreuses par une induction de la croissance tumorale et l'apparition d'une insensibilité aux agents chimio-thérapeutiques. L'interaction d'un AcM avec ces récepteurs peut potentiellement bloquer leur signalisation et de ce fait inhiber la croissance tout en restaurant la sensibilité des cellules tumorales pour les agents cytotoxiques (**Figure 14**). Les Anticorps qui ciblent les membres de la famille des EGFR font partie des meilleurs inhibiteurs de croissance tumorale. Certains d'entre eux, comme le Cetuximab ou le Panitumumab, bloquent de manière physique l'interaction du récepteur avec son ligand (Sunada et coll. 1986) ou préviennent l'activation cellulaire en empêchant la dimérisation du récepteur (Adams and



**Figure 15 : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)**

Engagement du récepteur Fc $\gamma$ RIIIa et le recrutement d'une cellule NK par la partie Fc d'un anticorps spécifique d'une cellule cible, conduisant à la destruction de cette dernière par exocytose de granules cytotoxiques à partir de la cellule effectrice.

(D'après Adams et coll. 2005)

Weiner 2005). D'autres, comme le Pertuzumab, permettent la liaison avec le ligand mais inhibent l'hétéro-dimérisation nécessaire à la transduction du signal (Franklin et coll. 2004).

## 2.2. Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

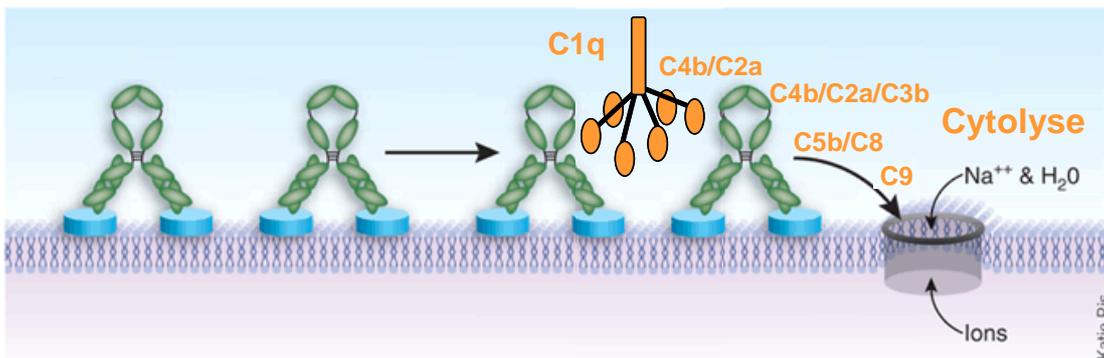
Un des mécanismes importants par lequel les IgG recrutent le système immunitaire cellulaire réside dans l'interaction du domaine Fc avec les récepteurs Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ Rs) (Nimmerjahn and Ravetch 2008). Chez l'homme, la famille des Fc $\gamma$ R contient six membres connus dans trois sous-groupes ; Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RIIa, b, c (CD32a, b, c) et Fc $\gamma$ RIIIa, b (CD16a, b), exprimés par diverses cellules effectrices dont les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les natural killer (NK). Ces dernières constituent l'agent principal de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps d'isotype  $\gamma$  (ADCC). Ainsi, l'interaction d'une cellule NK avec une cellule cancéreuse, par l'intermédiaire d'une liaison Fc $\gamma$ RIIIa/IgG, peut aboutir à la formation d'une synapse immunologique dans laquelle le NK libère un mélange de granzymes et de perforines qui vont lyser la cellule cible (**Figure 15**). Le recrutement des autres types cellulaires, par l'IgG fixée sur la cellule tumorale, aboutit principalement à la phagocytose de la cellule cible (Adams and Weiner 2005).

Néanmoins, le déclenchement de l'ADCC par les anticorps thérapeutiques fait face à plusieurs limitations ou rétro-contrôles telles que la liaison possible des IgG avec des récepteurs inhibiteurs comme le Fc $\gamma$ RIIb exprimé à la surface des cellules B, des macrophages, des cellules dendritiques et des neutrophiles (Nimmerjahn and Ravetch 2007). À la différence des récepteurs activateurs pour lesquels le domaine cytoplasmique est associé à un motif d'activation type ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif), le Fc $\gamma$ RIIb est caractérisé par la présence au niveau intra-cellulaire d'un motif inhibiteur (ITIM) qui régule de manière négative les fonctions effectrices de la cellule qui l'exprime, conduisant à l'inhibition de ses capacités cytotoxiques. Une autre limitation réside dans le système cellulaire utilisé pour la production des AcM. Les IgG présentent un site de glycosylation sur leur domaine CH2 (Asn 297). Ce glycan est extrêmement important car il module l'affinité du Fc pour le Fc $\gamma$ RIIIa, déterminant de ce fait l'efficacité des anticorps dans l'induction de l'ADCC. Plus précisément, la présence des résidus fucoses greffés sur la chaîne glucidique semble diminuer l'efficacité de liaison au Fc $\gamma$ R (Shinkawa et coll. 2003). La nature de la chaîne glucidique dépend des enzymes exprimées par la lignée cellulaire utilisée pour la production d'anticorps (Siberil et coll. 2006). Par exemple, une IgG1 anti-CD20 chimérique

produite par l'hybridome de rat YB2/0 déclenche une ADCC 50 fois supérieure en présence de PBMC humains que celle observée avec le même anticorps produit en CHO, lignée cellulaire traditionnellement utilisée pour la production des protéines thérapeutiques. Cette différence est attribuée à l'expression élevée dans la lignée CHO du gène FUT8 codant pour la fucosyltransferase  $\alpha$ 1,6 (Shinkawa et coll. 2003).

Jusqu'ici, peu de preuves cliniques démontraient clairement l'implication de l'ADCC dans l'efficacité thérapeutique des AcM. Néanmoins, plusieurs équipes ont récemment montré que l'efficacité du Rituximab dans le traitement des lymphomes est significativement augmentée chez les patients qui expriment un récepteur Fc $\gamma$ RIIIa polymorphe de haute affinité (acide aminé 158 Val/Val contre Val/Phe ou Phe/Phe) (Cartron et coll. 2002). *In vitro*, une affinité cinq fois plus élevée est observée lors de l'interaction Fc/Fc $\gamma$ RIIIa-V158 comparé à celle observée avec Fc $\gamma$ RIII-F158 aboutissant à une ADCC beaucoup plus efficace (Koene et coll. 1997). Ces résultats indiquent que l'interaction entre le domaine de Fc de l'anticorps et le récepteur Fc $\gamma$ RIIIa entre, au moins en partie, dans l'efficacité clinique du Rituximab et démontre l'importance de l'ADCC dans ce traitement. Des corrélations similaires ont été effectuées pour le Trastuzumab (Gennari et coll. 2004), le Cetuximab (Taylor et coll. 2009) et l'Infliximab (Louis et coll. 2004). Ainsi, le renforcement de l'activité ADCC des IgG fait partie des enjeux technologiques mises en œuvre dans le développement des nouvelles générations d'anticorps thérapeutiques.

L'une des approches utilisées pour augmenter cette activité réside dans la modification de la séquence aminée du domaine Fc par mutagénèse aléatoire afin d'augmenter son affinité pour les récepteurs Fc $\gamma$ R, (Shields et coll. 2001; Lazar et coll. 2006). Des résultats impressionnants ont été obtenus avec des variants possédant une affinité jusqu'à 100 fois supérieure pour Fc $\gamma$ RIIIa, aboutissant à une forte augmentation de l'ADCC *in vitro* (Desjarlais et coll. 2007). La mutagénèse de la région Fc n'est pas la seule manière d'améliorer son affinité pour les Fc $\gamma$ R. Comme cité précédemment, la nature de la chaîne glucidique du domaine CH2 a une influence importante sur l'affinité du Fc/RFc. Plusieurs groupes universitaires et entreprises pharmaceutiques se concentrent actuellement sur le développement de nouvelles variétés de lignées cellulaires, tels que des lignées CHO déficientes pour le gène FUT8 menant à la production d'Ac enrichis en oligosaccharides non-fucosylés (Yamane-Ohnuki et coll. 2004). Plusieurs de ces anticorps peu ou pas fucosylés,



**Figure 16 : Cytotoxicité dépendante du complément (CDC)**

Les anticorps monoclonaux initient la cascade du complément, provoquant la formation du complexe d'attaque membranaire, qui entraîne la lyse des cellules cibles.

(D'après Adams et coll. 2005)

possédant une activité ADCC améliorée, sont aujourd'hui en phase d'évaluation de leur efficacité thérapeutique dans des essais clinique (Beliard et coll. 2008).

### 2.3. Cytotoxicité dépendante du Complément (CDC)

La cytotoxicité dépendante du complément est une réaction cytolitique qui empreinte, dans le cas des IgG, la voie classique d'activation en cascade des protéines du complément (de C1 à C9) très abondantes dans le sérum. Cette cascade est initiée par la liaison de la protéine C1q sur le domaine Fc de l'anticorps fixé à la surface de la cellule tumorale. Le complexe Ac/Ag/C1q recrute une série d'autres protéines du complément aboutissant à l'activation des agents protéolytiques C3a et C5a et à la formation d'un complexe d'attaque membranaire qui provoque la lyse de la cellule cible (**Figure 16**). De nombreux anticorps anti-tumoraux dirigés contre diverses cibles (CD20, CD52, HLA-classe II, ACE...) ont montré leur capacité d'activation de la CDC *in vitro*. Une étude réalisée chez la souris a clairement démontré que le Rituximab agissait principalement chez cet animal par le recrutement de la voie classique du complément (Di Gaetano et coll. 2003). Chez les patients atteints d'une leucémie lymphoïde chronique, une rapide consommation des éléments du complément est observée après une injection de Rituximab suggérant une forte implication de la CDC dans ce traitement (Kennedy et coll. 2004).

Cependant, certains mécanismes de résistance des cellules tumorales sont mis en œuvre pour résister à cette réaction cytolitique. En effet, il n'est pas rare d'observer sur les lignées tumorales une surexpression de protéines membranaires régulatrices aboutissant à l'inhibition de la cascade du complément sur la surface cellulaire et réduisant significativement la CDC : « complement receptor type 1 » (CR1 / CD35), « membrane cofactor protein » (MCP / CD46), « decay-accelerating factor » (DAF / CD55), et protectine (MACIF / CD59). Ce phénomène a été mis en évidence pour le Rituximab dans le traitement de lymphomes non-hodgkiniens et sur des lignées cellulaires provenant de lymphomes de Burkitt (Golay et coll. 2000). Comme pour l'ADCC, le renforcement des capacités CDC des nouveaux anticorps est un domaine très étudié. Des modifications de la séquence aminée du domaine CH2 ou de la région charnière ont, par exemple, abouti à la création d'Ac avec une affinité améliorée pour C1q (Dall'Acqua et coll. 2006). Une équipe japonaise a récemment imaginé un Ac recombinant dont le domaine Fc possède des éléments d'une IgG3 et d'une

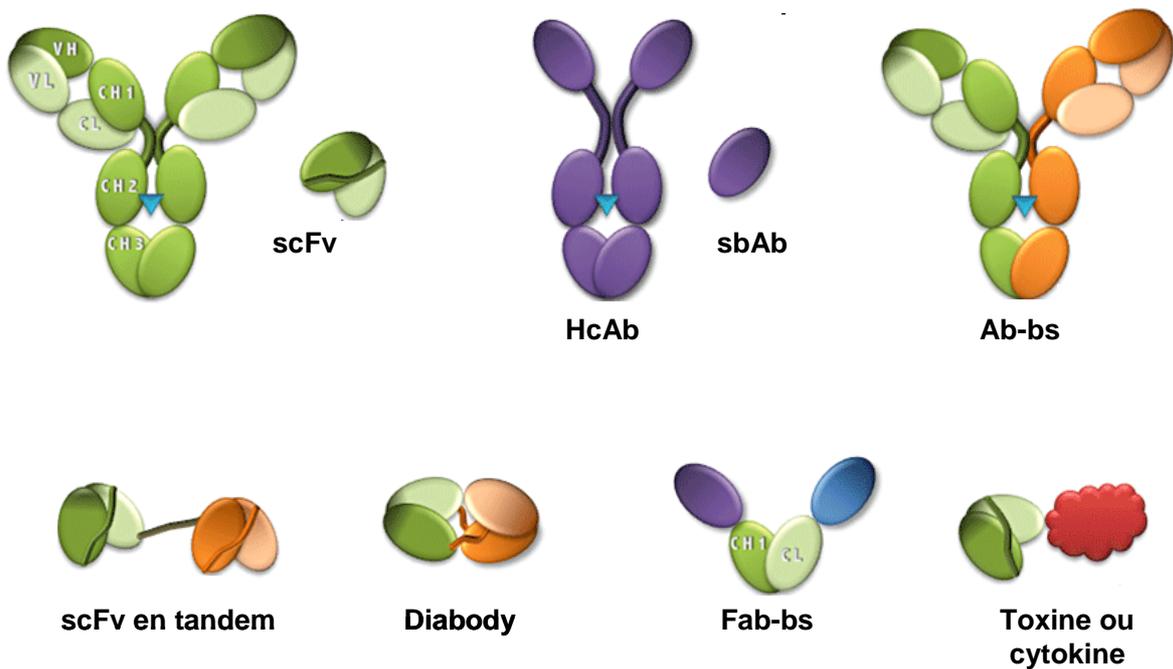
IgG1. De manière surprenante cet anticorps possède une activité CDC plus importante que celles observées avec l'IgG1 ou l'IgG3 parentales, individuellement (Natsume et coll. 2008).

La deuxième génération d'anticorps humanisés a déjà mené à l'approbation de plus de 20 AcM utilisés en thérapie (**Tableau 1**). Les résultats cliniques guident maintenant l'amélioration de ces anticorps vers de nouvelles approches afin de les rendre encore plus efficaces. Une troisième génération d'anticorps, avec des caractéristiques thérapeutiques différentes de celles des IgG conventionnelles, est actuellement évaluée dans des tests cliniques précoces.

### **3. Les nouveaux formats d'anticorps**

#### 3.1 Les fragments d'anticorps

L'ingénierie des anticorps et en particulier le fait de pouvoir cloner les gènes des Ig a permis de développer de nouveaux formats d'anticorps possédant des caractéristiques thérapeutiques innovantes. Il était déjà possible d'obtenir un fragment Fab (50 kDa contre 150 kDa pour l'anticorps entier) responsable de l'activité de liaison. L'ingénierie a permis d'obtenir un fragment plus petit, le scFv de 25 kDa constitué par les domaines variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère reliés par un peptide de liaison (Dreher et coll. 1991) (**Figure 17**). La petite taille de ce fragment lui permet d'être produit de façon efficace dans *Escherichia coli*, ce qui simplifie grandement sa production, mais permet aussi de produire différentes fusions protéiques. En raison de leur taille réduite, ces fragments d'anticorps ont la capacité de pénétrer les tumeurs solides beaucoup plus efficacement que l'IgG complète, mais cet avantage est déséquilibré par une demi-vie sérique très courte qui diminue les capacités globales d'accès aux tumeurs pour ces petites molécules. Plusieurs groupes universitaires et compagnies pharmaceutique étudient des approches alternatives pour augmenter leur demi-vie sérique. L'approche la plus prometteuse concerne l'addition chimique d'un résidu de polyéthylène glycol (PEG), qui augmente considérablement la taille des fragments. Un exemple récent est le Certolizumab pegol (Blick and Curran 2007), un fragment anti-TNF $\alpha$ , récemment approuvé par la FDA, dont la demi-vie sérique peut atteindre 14 jours. La liaison PEG (PEGylation) est très efficace pour augmenter la stabilité des scFv, conférant une activité



**Figure 17 : Nouveaux formats d'Ac (1)**

Un anticorps conventionnel est représenté en vert (claire pour la chaîne légère, sombre pour la chaîne lourde, le triangle bleu indique un site de glycosylation). Les zones ombrées représentent les sites de liaison. Les HcAd des camélidés et leur fragment (sdAb) sont représentés en mauve et en bleu. La couleur orange symbolise une spécificité différente. scFv, Fragment simple chaîne ; HcAb, anticorps de chaîne lourde ; sdAb, anticorps simple domaine; Ab-bs, Anticorps bispécifique ; Fab, fragment (D'après Chames et coll. 2009)

anti-tumorale améliorée mais également une immunogénicité réduite (Holliger and Hudson 2005).

Plus récemment, il est apparu possible d'utiliser un seul domaine variable (12 à 15 kDa) pour générer une bonne affinité et spécificité. Ce type de fragment est alors appelé sdAb (*single domain antibody*) (Ward et coll. 1989) (**Figure 17**). Ce phénomène, qui avait été démontré sur quelques rares exceptions dans le cas des anticorps murins ou humains, s'est avéré être aussi utilisé par la nature. En effet, les camélidés ainsi que les requins expriment naturellement une proportion d'anticorps ne possédant pas de chaîne légère (HcAb pour heavy chain Ab) et dont l'activité de liaison est due au seul domaine variable de la chaîne lourde (Muyldermans 2001). De façon intéressante, ces domaines très bien produits chez *Escherichia coli* sont extrêmement stables, se lient de préférence à des épitopes non accessibles aux anticorps conventionnels tels que des sites actifs d'enzyme (Holliger and Hudson 2005).

### 3.2 Les anticorps bi-spécifique (Ac-bs)

Un grand nombre d'anticorps bispécifiques (**Figure 17**), capables de lier fortement deux cibles différents, ont été développés au cours des 20 dernières années. Ils ont été employés de diverses manières, l'application la plus passionnante étant la possibilité de recruter simultanément plusieurs cellules effectrices du système immunitaire (Stockmeyer et coll. 2000; Fischer and Leger 2007; Muller and Kontermann 2007).

Une des premières approches imaginées pour créer des Ac-bs a consisté à fusionner deux variétés d'hybridomes (produisant respectivement une IgG2a de souris et une IgG2b de rat) afin d'obtenir une nouvelle lignée cellulaire dite quadroma. Cette combinaison spécifique confère aux Ac obtenus des propriétés essentielles pour leur production et leur purification. En effet, un appariement préférentiel en fonction de l'espèce conduit à une association correcte des chaînes lourdes et légères de chaque spécificité sans production d'hétéromolécules inactives. De plus, le fragment Fc chimérique obtenu permet une purification des molécules bi-spécifiques en une étape par gradient de pH sur colonne d'affinité (Lindhofer et coll. 1995). De manière étonnante, plusieurs études ont montré que ces anticorps chimérique étaient capables de recruter, via leur fragment Fc, des cellules effectrices humaines (Zeidler et

coll. 1999). L'un des anticorps bispécifiques développés avec cette méthode combine la reconnaissance tumorale via l'un des Fab, le recrutement de cellules T avec l'autre Fab et l'activation de cellules effectrices via le fragment Fc. Des données précliniques de l'utilisation de cet anticorps ont démontré l'induction d'une immunité anti-tumorale durable, découlant probablement de l'interaction des différentes cellules effectrices recrutées sur le site de la tumeur (Ruf and Lindhofer 2001). Le seul inconvénient de ces molécules concerne leur nature non-humaine, limitant les doses et le nombre d'injections qui peuvent être administrées aux patients. Cependant, l'une d'entre elle, le Catumaxomab, un anti-EpCAM x CD3, a récemment démontré son potentiel thérapeutique dans le traitement d'ascite maligne en test clinique II/III (Shen and Zhu 2008).

L'ingénierie des anticorps a également permis d'obtenir rapidement des anticorps bispécifiques par simple liaison de deux scFv par un peptide de liaison (tandem scFv) (**Figure 17**). Un peu plus tard, l'équipe de Greg Winter a démontré la possibilité de créer des molécules bispécifiques (*diabodies*) voire même trispécifiques (*triabodies*) et plus compactes en raccourcissant le peptide de liaison d'un scFv, forçant ainsi la dimérisation ou la trimérisation de la molécule sous la forme d'une molécule compacte (Holliger and Hudson 2005). Bien que plusieurs études précliniques aient démontré l'efficacité de ces molécules, aucun test clinique n'a encore été rapporté (Fischer and Leger 2007). Tous les fragments bispécifiques décrits comportent un linker peptidique qui entraîne parfois une réponse immune non désirée. En outre, ce linker est sensible à la coupure protéolytique dans le sérum, conduisant potentiellement à la production d'anticorps de faible stabilité, qui s'agrègent et dont l'immunogénicité est accrue (Fischer and Leger 2007). Récemment ces difficultés ont été surmontées avec le développement d'un nouveau format obtenu par la fusion directe de deux sdAc de lama associé à un domaine constant humain CH1 ou Cκ (**Figure 17**). Cette molécule sans linker ressemble étroitement à un fragment Fab humain capable de lier simultanément deux antigènes différents tels qu'un marqueur de tumeur par exemple l'antigène carcino-embryonnaire et un récepteur activateur comme le CD16a (Chames et coll. 2009). Des méthodes se développent également par l'utilisation de linkers non protéiques (molécules de PEG bi-fonctionnelles).

### 3.3. Les anticorps fusionnés

Comme ils sont petits et faciles à produire dans *Escherichia coli* ou la levure, les fragments d'anticorps ont également été employés comme l'une des parties d'une nouvelle molécule artificielle dotée de nouvelles fonctions. Des résultats intéressants ont, par exemple, été obtenus avec des immunotoxines comme la RNase liée à un scFv humain anti-HER-2, avec l'observation de la réduction drastique du volume d'une tumeur dans un modèle animal (De Lorenzo et coll. 2004). Des fragments d'anticorps ont été également liés à des cytokines. Ces molécules ont le potentiel d'activer le système immunitaire des patients à proximité de la tumeur, évitant de ce fait des effets secondaires importants traditionnellement associés à l'administration systémique des cytokines. Des scFvs tumeur-spécifiques ont été liés à diverses cytokines, y compris IL-2, IL-15, le GM-CSF, IFN- $\gamma$ , aboutissant à des résultats impressionnants (Ebbinghaus et coll. 2005; Gillies et coll. 2005; Kaspar et coll. 2007). Plusieurs de ces constructions sont maintenant examinées en clinique. Enfin, le scFv peut également être lié à des protéines membranaires, pour créer les récepteurs chimériques. Les « T-bodies » sont des cellules T génétiquement re-ciblées, armées de récepteurs chimériques dont l'unité extracellulaire de reconnaissance est un scFv et dont la région intracellulaire est dérivée des parties activatrices du lymphocyte T, tel que CD3 $\zeta$  et Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  (Willemsen et coll. 2003). Ces récepteurs chimériques sont introduits *ex vivo* dans les lymphocytes T périphériques d'un patient en utilisant des vecteurs retro-viraux. Cette approche a été employée avec succès contre plusieurs cibles, y compris des tumeurs, des cellules HIV-infectées et des cellules effectrices auto-immunes (Eshhar 2008).

### 3.4 Intrabodies

Un intrabody est un anticorps conçu pour être exprimé de manière intra-cellulaire par l'incorporation dans sa structure d'un peptide signal de trafic intracellulaire. Les intrabodies ont été développés contre différents antigènes présent dans divers compartiments cellulaires tels que le cytosol, le noyau, le réticulum endoplasmique (ER), les mitochondries, les peroxisomes et la membrane plasmique (Beliard et coll. 2008). Leur liaison avec l'antigène cible offre la possibilité de bloquer ou de modifier des interactions moléculaires spécifiques menant à des changements dans l'activité biologique des protéines cibles. De tels intrabodies ont été, par exemple, employés pour diminuer l'expression membranaire du récepteur de

facteur de croissance endothélial vasculaire oncogénique, menant à une inhibition significative de la croissance tumorale (Boldicke 2007). Assurément, l'obstacle principal dans l'utilisation des intrabodies demeure l'absence de méthodes efficaces *in vivo* pour introduire le matériel génétique codant l'Ac dans des cellules cibles vivantes. Jusqu'ici, toutes les études ont employé des systèmes *in vitro* où les cellules sont transfectées en employant des vecteurs d'expression, tandis que les applications cliniques exigeraient des protocoles efficaces de thérapie génique qui ne sont pas encore disponibles. Actuellement, des tentatives sont faites pour délivrer les gènes d'intrabody en employant des génomes de virus ou des immuno-liposomes (Luginbuhl et coll. 2006). Cette technologie ne pourra montrer son potentiel thérapeutique que lorsque ce goulot technologique aura été franchi.

#### **4. Limites des AcM d'isotype IgG**

Au cours des vingt dernières années, l'intensive recherche fondamentale et les très nombreux essais cliniques réalisés avec les anticorps thérapeutiques d'isotype  $\gamma$  ont laissé entrevoir certaines limitations fonctionnelles de ces anticorps qui permettent de mettre en évidence les domaines pour lesquels des outils additionnels sont nécessaires. Dans les modèles murins de xénogreffe, les AcM dirigés contre les antigènes tumoraux demeurent en grande partie dans le sang et en moyenne, pas plus de 20% de la dose administrée agit réellement sur la tumeur (Beckman et coll. 2007). Ceci représente probablement une des limitations principales observées avec les AcM thérapeutiques. Le dépôt d'anticorps sur la tumeur dépend d'un équilibre subtil entre pharmacocinétique, pénétration de la tumeur, conservation de l'efficacité dans le tissu visé et caractéristiques des AcM utilisés, telles que la taille, l'affinité et la valence. Tandis que la grande taille des AcM et la présence de la région Fc d'isotype  $\gamma$  peuvent être avantageuses en termes de pharmacocinétique notamment par la liaison avec le FcRn, elles peuvent également représenter un handicap sérieux. Excepté dans le cas d'événements tumoraux touchant le compartiment hématologique, les anticorps thérapeutiques doivent pénétrer les tissus et la matrice extracellulaire pour atteindre leurs cellules cibles. De façon saisissante, parmi les neuf AcM approuvés en thérapie anti-cancéreuse, seulement deux (Trastuzumab, Cetuximab) visent les tumeurs solides, alors que ce type de tumeurs représente plus de 85% des cancers humains. L'une des approches développées pour palier à ces problèmes concerne le développement de fragments d'anticorps, plus petits que les IgG, et donc capables de diffuser plus librement à travers les tissus. Malgré

de nombreux essais pour tenter d'améliorer leur demi-vie dans l'organisme, ces molécules restent encore relativement instables et parfois immunogènes pour l'organisme.

Dans ce domaine et afin d'essayer de dépasser les limites imposées par l'utilisation d'IgG thérapeutiques il apparaît maintenant judicieux de s'intéresser aux autres isotopes d'immunoglobulines jusqu'ici délaissées, qui peuvent présenter des caractéristiques différentes et complémentaires de celles des IgG. Dans ce cadre, nous avons choisi de développer des anticorps thérapeutiques d'isotype  $\alpha$ . L'IgA est l'anticorps le plus abondant dans l'organisme. De plus, cet isotype présente un tropisme préférentiel pour les muqueuses qui en fait un candidat thérapeutique particulièrement intéressant pour cibler les nombreuses tumeurs à localisation muqueuse. En effet, dans un modèle oncologique, il est possible d'imaginer que les IgA pourraient cibler des tumeurs trop petites et trop peu irriguées par le réseau sanguin pour être accessibles aux IgG. Pour des tumeurs ou des récidives tumorales de petite taille, à un stade *in situ* peu vascularisé, les IgA pourraient potentiellement se concentrer naturellement au niveau des muqueuses et des glandes associées, indépendamment du système sanguin. Aucun anticorps monoclonal de classe IgA n'est en développement pour une application clinique. Ce contraste avec la situation des IgG, résulte certainement de divers verrous technologiques concernant les IgA aussi bien dans leur isolement, caractérisation, propriétés que dans leur production (Woof and Mestecky 2005; Yoo and Morrison 2005). Autant de limitations pour lesquelles nous avons essayé, au sein du laboratoire CNRS en partenariat avec la société CAYLA/Invivogen, d'apporter un certain nombre de solutions.

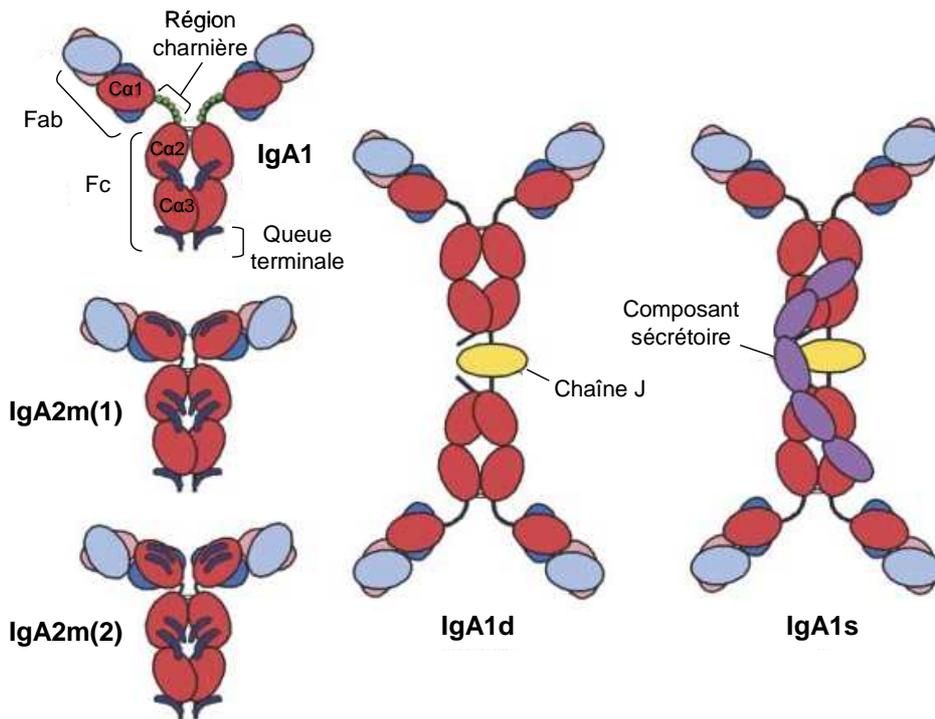
## **IV. Structure et fonction de l'immunoglobuline de classe A (IgA)**

L'immunoglobuline de classe A est découverte, à la fin des années 50, par les équipes de Gugler, et d'Heremans, lors de l'isolement dans des échantillons de lait et de sérum humain d'une protéine de type  $\beta$ -globulin possédant une glycosylation importante (Gugler et coll. 1958; Heremans et coll. 1959). Cette découverte et la prise de conscience de la domination de cet isotype dans l'immunité humorale des muqueuses, par opposition à l'IgG dans le système immunitaire systémique, ont stimulé la recherche fondamentale pour l'étude et la compréhension du mode d'action de cet anticorps.

### **1. Caractéristiques structurales des IgA**

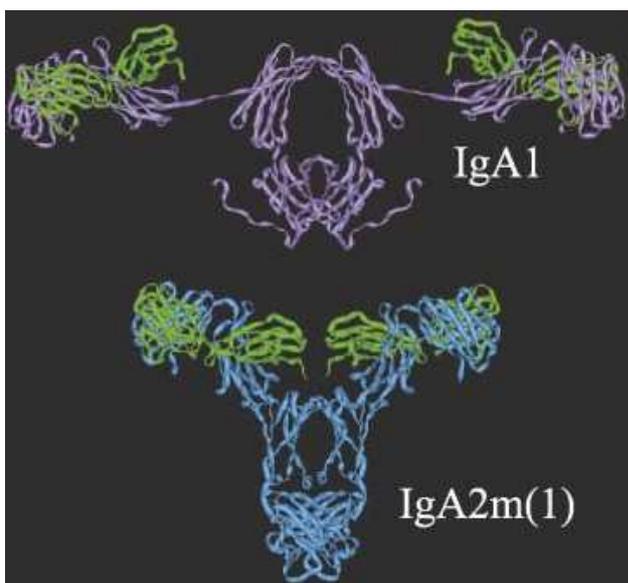
#### **1.1 Généralités**

Largement représentée au niveau sérique et prédominante dans les sécrétions muqueuses, l'IgA joue un rôle clé dans la protection immunitaire. La production quotidienne d'IgA (environ 3-5g/jour) est supérieure à celle de toutes les autres classes d'anticorps combinées. Avec une concentration de l'ordre de 2-3 mg/ml, l'IgA représente 15 à 20% des Ig sériques (Woof and Kerr 2006). Plus de 80% de l'IgA sérique humaine est sous forme de monomères, alors que chez la plupart des autres espèces de mammifères, elle est essentiellement sous forme de dimères. Ces dimères s'associent à une autre protéine, le composant sécrétoire, et forment l'IgA sécrétoire qui constitue la principale classe d'Ig des sécrétions. Les muqueuses qui tapissent les voies respiratoires, gastro-intestinales et urogénitales représentent une énorme surface d'exposition potentielle (environ 400 m<sup>2</sup>) aux micro-organismes inhalés ou ingérés. En tant que principale classe d'anticorps présente dans ces sites, l'IgA-s peut être considérée comme une première arme de défense contre ces nombreux agents potentiellement pathogènes.



**Figure 18 : Représentation schématique des formes monomériques, dimériques (IgA1d) et sécrétoires (IgA1s) d'IgA humaine.**

Les régions constantes de la chaîne lourde sont indiquées en rouge et les domaines variables des chaînes lourdes en rose. Pour les chaînes légères, les régions constantes apparaissent en bleu foncé et les régions variables en bleu pâle. Sur les formes monomériques, les O-glycanes sont représentés par des cercles verts, tandis que les N-glycanes sont indiqués en bleu foncé. (D'après Woof et coll. 2006)



**Figure 19 : Modèles moléculaires des IgA1 et IgA2m(1) humaines.**

Les chaînes légères sont représentées en vert, les chaînes lourdes sont en violet pour l'IgA1 et en bleu pour IgA2m(1). (D'après Woof et coll. 2006)

## 1.2 Structure des IgA

### 1.2.1 IgA monomérique (IgAm)

Comme toutes les Ig, l'unité structurelle monomérique de l'IgA est composée de deux chaînes lourdes et légères identiques entre elles, disposées en deux régions Fab et une région Fc, séparées par une région charnière (**Figure 18**). Chez l'homme, deux sous-classes d'IgA, IgA1 et IgA2, co-existent, chacune produite par un gène distinct. La différence majeure entre ces deux isoformes se situe dans la région charnière, pour laquelle l'IgA1 présente une séquence riche en proline, absente sur l'IgA2. Cette région est la cible de plusieurs protéases bactériennes, qui sont inefficace sur l'IgA2 (Kilian et coll. 1996). Deux variants allotypiques de l'IgA2, nommé IgA2m(1) et IgA2m(2), ont été caractérisés. La différence la plus notable entre ces deux formes réside dans le fait que l'IgA2m(2) présente, comme pour la plupart des immunoglobulines, des ponts disulfures permettant la liaison des chaînes lourdes et légères, qui sont généralement absents sur la forme IgA2m(1). Pour cette dernière, les deux chaînes légères s'associent l'une à l'autre et l'interaction avec les chaînes lourdes est stabilisée grâce à des liaisons non-covalentes (Woof and Kerr 2006). Par la suite, un troisième allotype, IgA2n, a également été décrit (Chintalacharuvu et coll. 1994).

Les deux sous-classes d'IgA humaine portent plusieurs sites de N-glycosylation qui contribuent à 6-7% de la masse moléculaire de l'IgA1 et à 8-10% de l'IgA2 (Tomana et coll. 1976) (**Figure 18**). La région charnière de l'IgA1 porte également trois à six O-glycanes liés à des résidus Ser ou Thr (Mattu et coll. 1998; Tarelli et coll. 2004). Au niveau de leur région C-terminale, les deux isotypes d'IgA contiennent une région additionnelle de 18 acides aminés appelée pièce basale (ou *tailpiece*). Cette région contient un résidu cystéine impliqué dans la formation des dimères lors de la liaison avec la chaîne J, mais peut également déclencher spontanément la multimérisation des IgA.

Au début des années 2000, les techniques de diffraction des rayons X et des neutrons, ont permis de proposer un modèle moléculaire des formes IgA1 et IgA2 humaines (**Figure 19**)(Boehm et coll. 1999; Furtado et coll. 2004). Ces modèles prédisent que les extrémités des bras Fab de l'IgA1 sont plus espacées que celles de l'IgA2m(1). L'IgA1 peut donc potentiellement interagir simultanément avec deux molécules d'antigènes distantes, tandis que l'IgA2m(1) aurait une capacité plus limitée à cet égard. Cette caractéristique prévoit des

avantages pour l'IgA1 tels qu'une meilleure avidité et la possibilité de se lier à des structures antigéniques répétées et espacées le long de la surface de certains agents pathogènes.

### 1.2.2 IgA dimérique (IgAd)

Contrairement aux IgA sériques, qui existent essentiellement sous forme monomérique, les cellules plasmocytaires des muqueuses produisent principalement des IgA dimériques. Ces dimères sont constitués par deux molécules d'IgA monomérique, qui se lient de façon covalente à une petite protéine de jonction appelée chaîne J. La chaîne J est un polypeptide de 15 kDa composé de 137 acides aminés dont 8 résidus cystéine. Le gène codant la chaîne J, situé sur le chromosome 4 chez l'homme (Max et coll. 1986) et sur le chromosome 5 chez la souris (Yagi et coll. 1982), est principalement exprimé par la lignée lymphocytaire B. En 2001, l'équipe de Brandtzaeg proposent une prédiction de sa structure secondaire dans laquelle les résidus cystéine 15 et 69 forment des ponts disulfures avec les extrémités du domaine CH3 des chaînes lourdes  $\alpha$  (Johansen et coll. 2001).

La chaîne J est détectée dans plusieurs vertébrés y compris les mammifères, oiseaux, reptiles, amphibiens et les poissons. Sa structure est très conservée tout au long de l'évolution avec une homologie de 77% entre l'homme et la souris. Étonnamment, la chaîne J est également détectée dans des espèces animales comme les invertébrés qui ne produisent pas d'Ig, suggérant qu'il s'agit d'un polypeptide primitif apparu avant l'évolution des molécules d'Ig (Takahashi et coll. 1996).

### 1.2.3 IgA sécrétoire (IgAs)

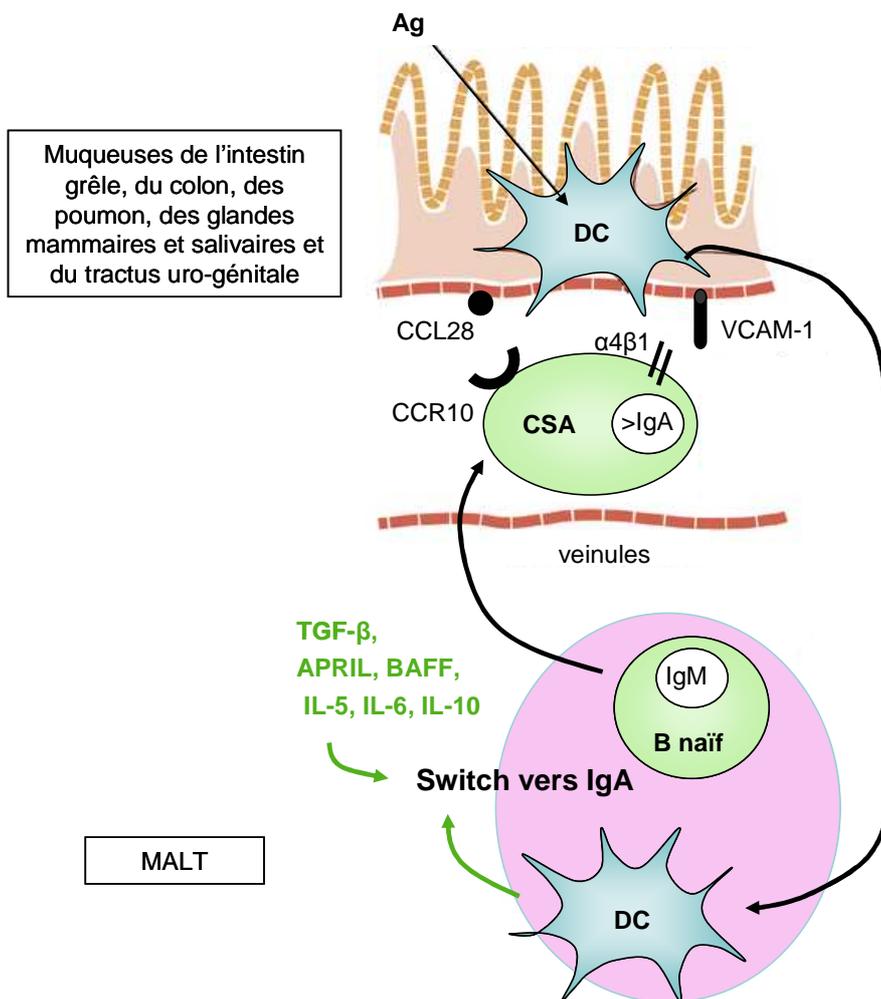
L'IgA dimérique néo-synthétisée se lie aux récepteurs d'immunoglobulines polymériques (pIgR), présents au pôle basal des cellules épithéliales qui tapissent les muqueuses (**Figure 22**). Le complexe IgAd/pIgR est alors endocyté, transporté à travers la cellule par l'intermédiaire du compartiment endosomal et transloqué au pôle apical des cellules épithéliales. A la surface luminale, le pIgR est clivé et son domaine extracellulaire, un polypeptide de 80 kD, la « pièce sécrétoire », est libéré avec l'IgA sous forme d'IgA sécrétoire (IgAs) (Mostov et coll. 1984).

Les formes d'IgA polymériques (IgAd et IgAs) ont montré une efficacité supérieure (d'un facteur cinq) par rapport à la forme monomérique dans les mécanismes d'inhibition virale par agglutination, voir d'un facteur sept à dix dans le cas de l'infection par le virus de l'influenza (Renegar et coll. 1998). Ainsi, la dimérisation de l'IgA contribuerait à sa stabilité et augmenterait considérablement son efficacité. De plus, la présence de la pièce sécrétoire rend l'IgA beaucoup plus résistante à l'action des protéases fortement présentes dans les fluides intestinaux (Crottet and Corthesy 1998).

## 2. Switch $\alpha$ et site de synthèse de l'IgA

L'induction de la production d'IgA et la redistribution des plasmablastes IgA<sup>+</sup> au sein des muqueuses se décompose en plusieurs étapes: la commutation de classe vers l'isotype  $\alpha$  dans les cellules B; la recirculation des plasmablastes IgA<sup>+</sup> et leur implantation au niveau des muqueuses ; la différenciation terminale en cellules plasmocytaire productrices d'IgA.

En général, la commutation isotypique vers l'isotype  $\alpha$  (CSR $\alpha$ ) dans la cellule B mature naïve passe par deux signaux. Le premier concerne les cytokines, le second est délivré par la liaison du CD40 des cellules B avec son ligand CD40L sur les cellules T (Bergqvist et coll. 2006). La cytokine majeure pour l'induction de la CSR $\alpha$  est le facteur de croissance TGF $\beta$  avec des contributions des interleukine2 (IL-2), IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10 (pour revue Motegi and Kita 1998; Macpherson et coll. 2001). Toutefois, plusieurs études ont montré que la production d'IgA pouvait également être T-indépendante (Macpherson et coll. 2000). En effet, d'autres signaux de co-stimulation peuvent aboutir à la CSR $\alpha$  dans les cellules B. Deux membres de la famille du Tumor Necrosis Factor (TNF) ; BAFF (*B-cell activating factor*), également connu chez l'homme sous le nom de BLyS (*B-lymphocyte stimulator*) et APRIL (*A proliferation-inducing ligand*) se sont révélées stimuler la CSR des cellules B vers les isotypes  $\gamma$  et  $\alpha$  chez l'homme (Litinskiy et coll. 2002) et chez la souris (Castigli et coll. 2005). Ces deux cytokines sont exprimées par les monocytes et les cellules dendritiques (BAFF et APRIL) et par les macrophages et les lymphocytes T activés (APRIL uniquement) (Mackay et coll. 2003). He et coll. ont récemment montré qu'en réponse à une stimulation Toll, les cellules épithéliales humaines du colon pouvaient également sécréter BAFF et APRIL, participant à l'induction de la CSR $\alpha$  directement au niveau du compartiment muqueux (Beckman et coll. 2007).



**Figure 20 : Commutation de classe des cellules B vers l'IgA dans les MALT et migration vers les muqueuses.**

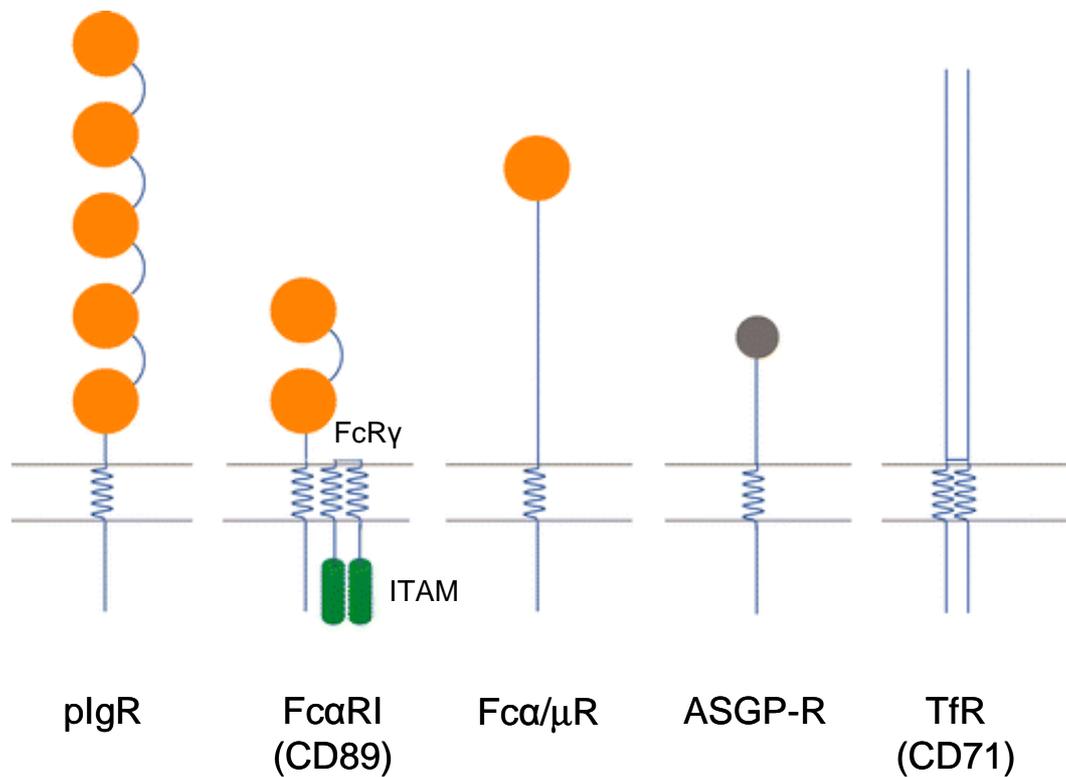
Les cellules dendritiques des tissus périphériques des muqueuses capturent les antigènes et migrent vers les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT). Les sécrétions des DC activées participent à la constitution d'un environnement cytokinique induisant la commutation de classe vers l'IgA dans les cellules B naïves. Cette recombinaison génique s'accompagne, entre autres, d'une surexpression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  et du récepteur CCR10 impliqués dans le maintien des cellules productrices d'IgA au niveau des muqueuses.

DC, cellules dendritique ; CSA, cellules sécrétrices d'anticorps  
(D'après Mora, 2007)

La partie basse de l'intestin est un habitat exceptionnellement riche en bactéries avec des densités allant parfois jusqu'à  $10^{12}$  micro-organismes/g de mucus (Whitman et coll. 1998). Une des premières découvertes sur l'adaptation de l'hôte à la présence de ces microbes est le fait que les cellules sécrétrices d'IgA au niveau de cette muqueuse sont considérablement diminuées chez les animaux sans germes (ou dans les anses intestinales exclues d'une contamination microbienne), et sont pratiquement absentes chez le nouveau-né avant la colonisation de son intestin par la flore commensale (Benveniste et coll. 1971). Le système immunitaire des muqueuses est hautement spécialisé avec des fonctions largement indépendantes du système immunitaire systémique. Bien que toutes les parties de ce système possèdent des caractéristiques communes, les structures lymphoïdes qui le constituent varient d'un tissu à l'autre. Les plaques de Peyer, spécifiques des GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*), ont été décrites comme l'un des sites principaux de l'induction de la CSR $\alpha$  (Craig and Cebra 1971). Les cellules dendritiques intestinales des plaques de Peyer et des ganglions lymphatiques mésentériques sécrètent de manière constitutive de l'acide rétinoïque, qui agit en synergie avec l'IL-6 et IL-5 pour induire la production d'IgA dans les cellules B, tant chez l'homme que chez la souris (Mora et coll. 2006) (**Figure 20**). Ainsi, l'environnement cytokinique et le phénotype des cellules dendritiques dans les tissus lymphoïdes intestinaux semblent suffisant pour générer une réponse dominée par la production d'IgA.

Dans les souris « germ-free », l'absence de stimulus de la flore microbienne intestinale provoque une profonde carence de la production d'IgA dans la muqueuse intestinale, alors que les taux sériques d'IgA ne sont diminués que de moitié (Macpherson et coll. 2000). Ceci suggère que les IgA du sérum sont produites de façon partiellement indépendante des sites muqueux. Chez la souris, les cellules péritonéales de la lignée B1 et les cellules de la zone marginale de la rate peuvent contribuer à la production d'IgA sérique. Les déficiences APRIL et TGF $\beta$ RII résultent en un manque global d'IgA, suggérant que les mécanismes de signalisation les impliquant sont également nécessaires pour la production d'IgA sérique (Cazac and Roes 2000; Castigli et coll. 2004).

L'implantation des cellules B dans les tissus périphériques ou muqueux est médiée par la combinaison spécifique de l'expression de récepteurs aux chimiokines sur les cellules B et de molécules d'adhérence sur les tissus d'intérêts tels que les organes lymphoïde secondaires, la moelle osseuse, et les sites effecteurs muqueux. Dans les tissus lymphoïdes secondaires, la rencontre des cellules B avec l'antigène provoque leur activation et leur différenciation. En



**Figure 21 : Famille des récepteurs humains aux IgA.**

Les cercles orange schématisent des domaines Ig extracellulaires. pIgR, récepteur des Ig polymériques ; FcαRI, récepteur Fc myéloïde des IgA ; Fcα/μR, récepteur Fc IgA/IgM, ASGP-R ; récepteur asialoglycoprotéine ; TfR, récepteur de la transferrine (D'après Monteiro et coll. 2003)

général, la différenciation du B vers une cellule sécrétrice d'IgA s'accompagne d'une surexpression du récepteur CCR10 et de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  (**Figure 20**). Ces molécules vont induire l'attraction de la cellule B vers les tissus (colon, glandes mammaires et salivaires, nez et bronches) exprimant leurs récepteurs; les molécules CCL28 et VCAM-1 respectivement (Macpherson et coll. 2008). Ainsi, la forte expression de ces récepteurs sur des cellules B effectrices ou mémoires, induite lors de la commutation de classe vers l'IgA, contribue à la localisation préférentielle et la rétention de ces cellules dans les muqueuses.

### 3. Récepteurs aux IgA

Les récepteurs cellulaires des IgA comprennent plusieurs membres qui peuvent être classés en molécules déterminant la pharmacocinétique des IgA ou en récepteurs contribuant aux fonctions effectrices de l'anticorps. Le principal acteur de la pharmacocinétique de cet isotype est le récepteur des Ig polymériques (pIgR), qui lie l'anticorps et effectue sa transcytose vers la lumière des muqueuses (Mostov 1994). Plusieurs récepteurs effecteurs ont été décrits. Toutefois, la grande majorité des études porte sur le récepteur myéloïde Fc $\alpha$ RI (Monteiro and Van De Winkel 2003) (**Figure 21**).

#### 3.1 Le récepteur Fc $\alpha$ RI ou CD89

La molécule transmembranaire Fc $\alpha$ RI (CD89) a été identifiée en 1996 comme récepteur de la partie Fc des IgA humaine (Morton 1996). Le gène Fc $\alpha$ RI se trouve sur le chromosome 19 à proximité des gènes des récepteurs des cellules NK (KIR) et de ceux des récepteurs leucocytaires, avec lesquels il partage une plus forte homologie qu'avec les autres récepteurs Fc (Kremer et coll. 1992). Ce récepteur de type I est exprimé sur les cellules de la lignée myéloïde et plus particulièrement sur les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les éosinophiles, les cellules dendritiques interstitielles et les cellules hépatiques de Kupffer (Monteiro and Van De Winkel 2003). Dans le sang et les tissus, les neutrophiles constituent la majorité des cellules Fc $\alpha$ RI positives (Hamre et coll. 2003). Les patients qui présentent une déficience IgA expriment ce récepteur à niveau similaire aux individus sains, démontrant l'expression constitutive du CD89 indépendante de la présence d'IgA (Chevailler et coll. 1989). Néanmoins, plusieurs molécules peuvent induire une augmentation de son niveau

d'expression. Par exemple, la présence de FMLP (formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine), d'IL-8 ou de TNF $\alpha$  induit de manière rapide une surexpression de ce récepteur sur les neutrophiles (van Zandbergen et coll. 1999). Le même phénomène peut-être observé sur les monocytes et les macrophages en présence de GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*). Des récepteurs CD89 Fc $\alpha$ RI orthologues ont été identifiés chez les chimpanzés, les macaques, les bovins, les chevaux et le rat (Maruoka et coll. 2004; Morton et coll. 2005). Aucun homologue n'a encore été identifié chez la souris.

Le récepteur membranaire Fc $\alpha$ RI comprend deux domaines extracellulaires EC1 et EC2, qui comportent une dizaine de sites potentiels de N- et O-glycosylation. Ce récepteur présente, ainsi, un niveau de glycosylation variable selon le type cellulaire aboutissant à un poids moléculaire allant de 55 à 75 kDa sur les polynucléaires neutrophiles (PMN) et les monocytes, et de 70 à 100 kDa sur les éosinophiles (Monteiro et coll. 1992). La région extracellulaire est associée à un domaine transmembranaire suivi d'une queue cytoplasmique qui, comme la plupart des autres récepteurs Fc, ne contient pas de motifs de signalisation connu. La signalisation cellulaire via ce récepteur nécessite donc une association avec la chaîne FcR $\gamma$  qui porte un motif d'activation ITAM permettant la transduction du signal (van Egmond et coll. 1999). Lors de la liaison de Fc $\alpha$ RI avec son ligand, les tyrosines du motif ITAM de la chaîne  $\gamma$  sont phosphorylées caractérisant la première étape d'une cascade de signalisation qui aboutit à la relocalisation des récepteurs dans les «radeaux» ou «microdomaines» lipidiques spécialisés au sein de la membrane plasmique pour constituer des plates-formes d'activation initiant la transduction du signal (Elsasser et coll. 1999).

La fonction réelle du CD89 est longtemps restée mal comprise. En effet, les conclusions des nombreuses études réalisées sur ce récepteur décrivaient d'une part des capacités dans l'induction d'un programme pro-inflammatoire, ou à l'opposé un profil non-inflammatoire. Des études récentes ont permis de mieux appréhender le rôle de ce récepteur dans le déclenchement de la réponse immune. Pasquier et coll. ont notamment montré que l'absence d'agrégation lors de la liaison d'un ligand au Fc $\alpha$ RI inhibait la réponse cellulaire initiée par les récepteurs hétérologues Fc $\gamma$ R et Fc $\epsilon$ RI, tandis qu'un regroupement des Fc $\alpha$ RI conduisait à l'activation cellulaire (Pasquier et coll. 2005). De plus, à l'inverse des récepteurs Fc $\gamma$ RIII et Fc $\epsilon$ RI, le récepteur Fc $\alpha$ RI est parfois exprimé en absence de la chaîne  $\gamma$ , conditionnant le rôle inflammatoire de ce FcR (Honorio-Franca et coll. 2001). Enfin, Wu et coll. ont confirmé l'existence d'un polymorphisme dans le domaine cytoplasmique du CD89

aboutissant à l'expression de deux formes de FcαRI possédant des fonctions effectrices différentes. Notamment, dans le cas de l'expression du récepteur en absence de la chaîne γ, une seule des deux allèles semble conserver sa capacité d'activer la production de cytokines pro-inflammatoire sur des neutrophiles humains (Wu et coll. 2007). Ces différentes observations mettent en valeur le rôle crucial de ce récepteur dans la balance activation/inhibition dans la réponse inflammatoire induite lors de l'intervention d'une IgA.

Le site d'interaction entre FcαRI et l'IgA a été identifié dans le premier domaine extracellulaire du récepteur et dans la jonction entre Ca2 et Ca3 de l'IgA (Herr et coll. 2003). Le récepteur FcαRI semble se lier avec une affinité similaire ( $K_a \sim 10^6 M^{-1}$ ) à l'IgA1 et à l'IgA2. De nombreuses études de liaison avec les différentes formes moléculaires des IgA ont montré que l'IgA<sub>p</sub> s'associait de manière plus forte au CD89 que l'IgA<sub>m</sub> (Reterink et coll. 1997; van Zandbergen et coll. 1998; Oortwijn et coll. 2007). L'association de l'IgAs à ce récepteur est soumise à controverse, certains pensent cette interaction n'est possible qu'en présence de la protéine MAC-1 (Van Spriel et coll. 2002), d'autres suggèrent que cette molécule n'est pas indispensable (Oortwijn et coll. 2007).

La liaison de l'IgA sur le récepteur FcαRI suscite une large gamme de réponses biologiques en fonction du type cellulaire impliqué. Ces processus incluent la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC), la phagocytose, la libération de cytokines, la génération de superoxyde, la dégranulation et la présentation d'antigènes (pour revue (Monteiro and Van De Winkel 2003). Pour la plupart, ces réponses émanent d'une activation via la chaîne γ, mais l'intégrine Mac-1 (CR3; CD11b/CD18) peut également être impliquée comme co-récepteur dans certaines des fonctions du FcαRI (Van Spriel et coll. 2002).

### 3.2 Récepteur des immunoglobulines polymériques (pIgR)

Le récepteur des Ig polymériques (pIgR), présent au pôle basal des cellules épithéliales des muqueuses (**Figure 22**), s'associe aux IgAd et les transporte par l'intermédiaire du compartiment endosomal au pôle apical des cellules, où sa translocation aboutit à la libération des IgAs dans la lumière des muqueuses. Ce processus est appelé transcytose.

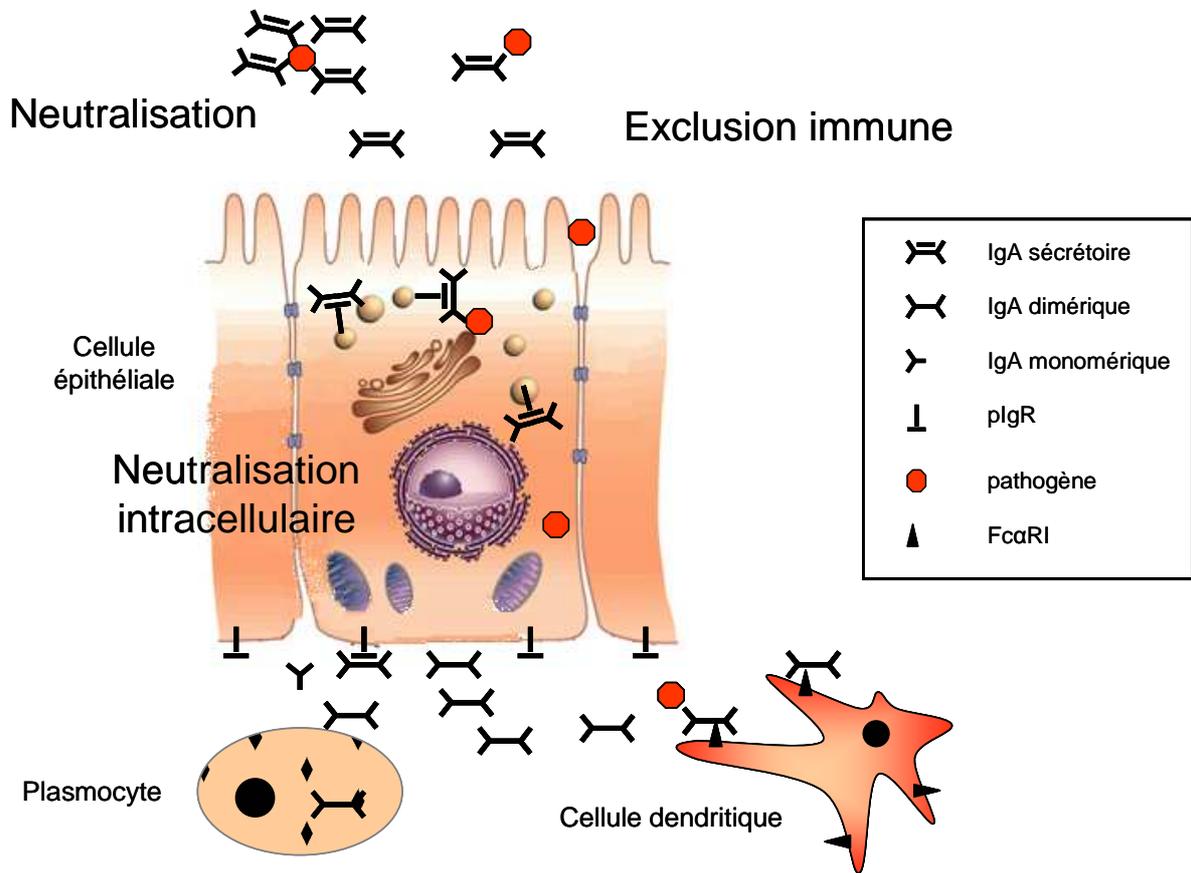


Figure 22 : Transport des IgA par le pIgR vers la lumière des muqueuses et fonctions effectrices associées.

Au cours des dernières années, de nombreuses observations ont permis d'affirmer que le récepteur pIgR est non seulement capable de transférer de larges quantités d'IgA polymériques vers la lumière des muqueuses, mais qu'il peut également transporter localement des IgA fixées à un pathogène rencontré au niveau de la lamina propria dans la région sous-épithéliale et ainsi contribuer à l'élimination de complexes immuns potentiellement inflammatoires (Robinson et coll. 2001) (**Figure 22**). De plus, le transport trans-épithélial permet aux IgA de lier et de neutraliser des pathogène de manière intracellulaire. Ainsi, de nombreuses expériences *in vitro* ont montré la capacité des IgA à neutraliser plusieurs virus intracellulaires tels que les virus de la grippe, de Sendai, de la rougeole et de l'immunodéficience humaine dans les cellules épithéliales, lors du transport par le pIgR, ou encore d'empêcher l'activation cellulaire par des lipopolysaccharides microbiens (Mazanec et coll. 1992; Bomsel et coll. 1998; Fujioka et coll. 1998; Fernandez et coll. 2003).

L'interaction des dimères d'IgA avec le pIgR implique des interactions covalentes avec l'extrémité C-terminale de la chaîne J et les domaines C $\alpha$ 2 du dimère d'IgA ainsi que des liaisons de faible affinité avec les domaines C $\alpha$ 3 (Kaetzel 2005). Le chevauchement apparent des sites de liaison du pIgR et du Fc $\alpha$ RI sur l'IgA pourrait expliquer l'incapacité des IgAs à promouvoir la phagocytose via le CD89. Cependant, l'IgAs reste capable d'activer une « bouffée » oxydative via le Fc $\alpha$ RI, mais ce phénomène nécessiterait une liaison combinée avec Mac-1 afin de surmonter la faible affinité de l'IgAs pour le Fc $\alpha$ RI (Van Spriël et coll. 2002).

### 3.3 Les autres récepteurs des IgA

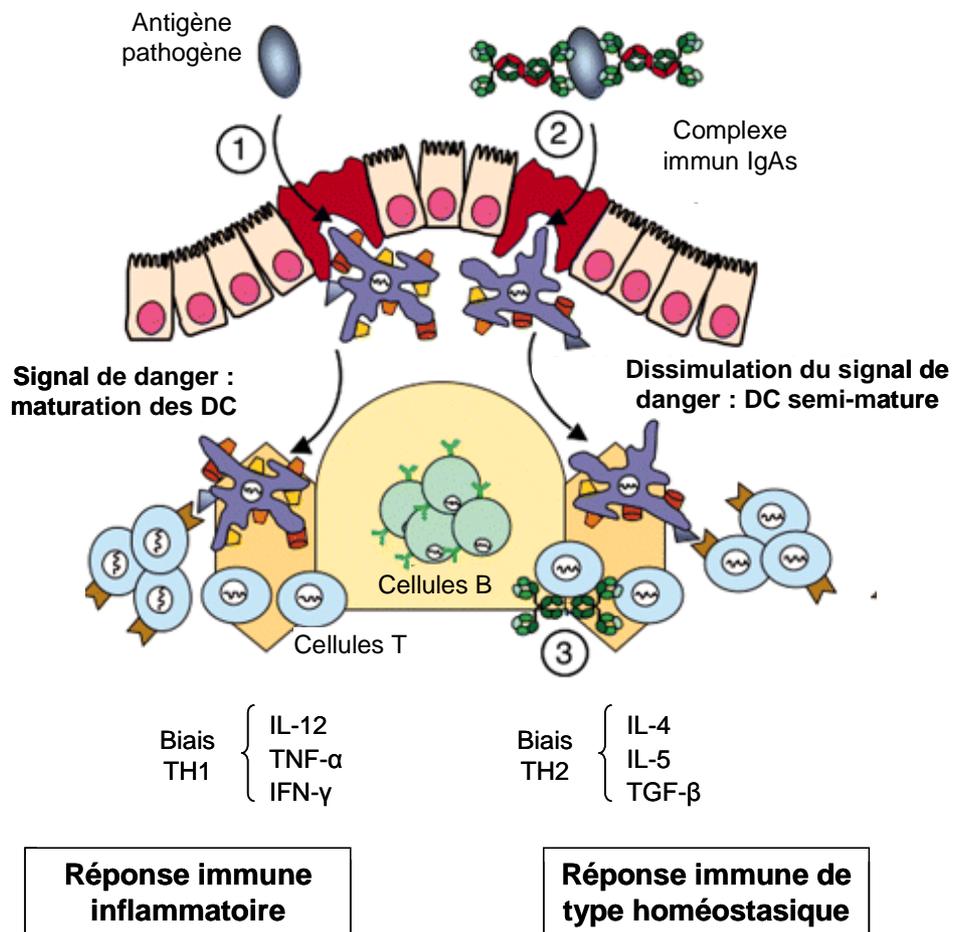
Le récepteur Fc $\alpha$ / $\mu$ R spécifique des IgA et des IgM a été décrit chez l'homme et chez la souris. Chez la souris, ce récepteur est constitutivement exprimé sur les cellules B et les macrophages mais également sur les ganglions lymphatiques, l'intestin, l'appendice, les reins, et les oligodendrocytes (Shibuya et coll. 2000; Sakamoto et coll. 2001). La partie distale de la région extracellulaire de ce récepteur de type I porte des caractéristiques structurales communes avec le domaine extracellulaire du pIgR. En particulier, la présence de résidus conservés à des positions clés indique qu'il pourrait partager un mode d'interaction avec les IgA similaire à celui observé avec le pIgR (Hamburger et coll. 2004). Le récepteur Fc $\alpha$ / $\mu$ R humain reste à ce jour peu étudié. Cependant, plusieurs études ont montré que le Fc $\alpha$ / $\mu$ R

murin était capable de médier l'endocytose B de cibles bactériennes opsonisées par des IgM (Shibuya et coll. 2000). Vraisemblablement ce récepteur pourrait également déclencher l'endocytose de cibles recouvertes d'IgA, contribuant ainsi à la défense immunitaire anti-microbienne précoce.

Initialement connu sous le nom de récepteur à la transferrine, CD71 (ou TfR) a plus récemment été décrit par l'équipe de R. Monteiro comme un récepteur des IgA, liant les IgA1 humaines (polymères plutôt que monomère), mais pas l'IgA2 (pour revue Monteiro et coll. 2002). Néanmoins, la liaison de l'IgA avec ce récepteur est beaucoup plus faible que celle réalisée avec la transferrine. CD71 est exprimé sur les cellules fœtales hématopoïétiques mononuclées et sur certaines cellules lymphoïdes et myéloïdes. L'expression de ce récepteur est difficilement détectable sur les cellules mononuclées et sur les polynucléaires de l'adulte. Il est cependant présent sur les cellules mésangiales, et sa surexpression observée chez les patients présentant une néphropathie à IgA suggère son implication dans les dépôts d'IgA au niveau des reins (Moura et coll. 2001). Le CD71 a également été mise en évidence sur des cellules dendritiques interstitielles pour lesquelles, il peut servir de médiateur d'endocytose de complexes IgA (Pasquier et coll. 2004).

La forte capacité des IgAs à déclencher la dégranulation et la production de superoxydes dans les éosinophiles est attribuable à l'expression combinée du Fc $\alpha$ RI et d'un récepteur spécifique pour le composant sécrétoire (Lamkhioed et coll. 1995). Le récepteur de ce dernier n'a pas encore été entièrement caractérisé même si une protéine de 15 kDa semble impliquée. La constatation qu'un anticorps anti-CD18 pourrait induire l'inhibition de la production de superoxydes médiée par les éosinophiles en présence d'IgAs donne des indications quant à l'implication potentielle des intégrines  $\beta$ 2 dans cette réponse (Motegi and Kita 1998).

Le récepteur ASGP (ASGP-R ; *asialoglycoprotein receptor*) est exprimé sur les cellules hépatiques et reconnaît les résidus galactoses terminaux des glycoprotéines sériques, dont les IgA, qu'il internalise et dégrade (Tomana et coll. 1988). Ce récepteur semble jouer un rôle important dans la clairance des IgA sériques, en particulier des IgA2. En effet, seul un petit pourcentage d'IgA1 serait éliminé par cette voie (Rifai et coll. 2000). Cette différence pourrait en partie expliquer la demi-vie plus élevée des IgA1 dans le sérum comparée à la demi-vie très courte des IgA2.



**Figure 23 : Proposition d'un modèle du mode d'action des complexes immuns IgAs-Ag.**

1) Les agents pathogènes pénétrant les cellules M sont phagocytés par les APC sous-jacentes qui vont alors mûrir, activer les cellules T voisines et la production de cytokines pro-inflammatoires.

2) L'IgAs (en vert) masque les « motifs moléculaires associés aux pathogènes » (PAMP) des antigènes qu'elle transporte à travers les cellules M. Ce mécanisme inhiberait l'activation de voies pro-inflammatoires et résulterait en une réponse cellulaire dirigée vers la production de cytokines médiant la production d'IgA et vers l'induction de tolérance.

3) L'interaction des IgAs avec les cellules T CD4 pourrait, elle aussi, réguler l'activation immunitaire. La conjonction de ces événements contribue au maintien de l'homéostasie.

(D'après Corthésy 2007)

Enfin, l'équipe de B. Corthesy a récemment mis en évidence un récepteur murin présent sur les cellules M des plaques de Peyer (Mantis et coll. 2002). Ces cellules épithéliales sont situées exclusivement en regard des follicules des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses et ont une fonction spécifique de transport des antigènes alimentaires depuis la lumière digestive jusqu'aux formations lymphoïdes sous-jacentes. Bien que la structure moléculaire de ce récepteur ne soit pas encore caractérisée, on peut au moins noter que ce récepteur murin s'associe aux IgA2 (donc la structure est la plus proche des IgA murines), mais pas aux IgA1 humaines. De plus, la liaison de ce récepteur sur l'IgA diffère de celle du FcαRI et dépend des domaines Ca1 et Ca2 de l'IgA. Ce récepteur permet donc un rétro-transport épithélial des IgAs de la lumière des muqueuses vers les tissus lymphoïdes sous-jacents où les IgAs, éventuellement associées à un antigène, pourraient être liées et internalisées par les cellules dendritiques des plaques de Peyer. Ceci participerait donc au transport des antigènes vers les cellules dendritiques, qui est connu pour, éventuellement, déclencher la maturation de ces cellules et leur migration vers les sites d'activation des cellules T naïves (Franklin et coll. 2004) (**Figure 23**). Ainsi, lors de l'utilisation de complexes IgAs/Ag dans des expériences d'immunisation orale, ce rétro-transport épithélial induit une réponse immunitaire décelable au sein des muqueuses intestinales mais également au niveau du sérum. Cette réponse a également été obtenue après transport d'antigènes de grande taille (shigelles) mais semble néanmoins se dérouler dans un contexte d'inflammation limitée respectant l'homéostasie locale du tractus gastro-intestinal. Cette réponse bien contrôlée pourrait permettre, en fonction d'une modulation des réponses par les cellules dendritiques, soit d'induire une tolérance (vis-à-vis d'antigènes alimentaires ou de germes non pathogènes), soit d'induire une réponse limitée contre des pathogènes, en empêchant ainsi leur dissémination et en prévenant une réponse inflammatoire exagérée (Kadaoui and Corthesy 2007).

#### **4. Fonctions effectrices de l'IgA... un anticorps bien tempéré !**

Pendant longtemps considérée comme essentiellement anti-inflammatoire, l'IgA avait été décrite comme inefficace dans l'activation des mécanismes de défense immunitaire. Au cours des dernières années, l'amélioration de la compréhension de l'interaction de l'IgA avec le récepteur cellulaire FcαR a largement contribué à modifier ce point de vue, même si

beaucoup de réponses balancent entre induction de tolérance, exclusion immune, ou induction d'une réponse protectrice.

#### 4.1. Mécanismes effecteurs directs médiée par l'IgA

Chez l'homme, la surface des muqueuses de l'intestin, des voies respiratoires et du tractus urogénital est bordée d'une couche épithéliale qui forme une barrière physique entre l'environnement extérieur et les compartiments internes. La vaste superficie (environ 400m<sup>2</sup>) de ces épithéliums, en contact permanent avec de multiples souches bactériennes et autres microorganismes, représente la principale voie d'entrée de pathogènes et de matériels exogènes dans l'organisme. La production continue et le transport actif des IgA à travers les muqueuses constitue une première ligne de défense contre l'intrusion de ces microorganismes. Dans la lumière, l'IgAs se lie directement aux agents pathogènes par l'intermédiaire de ses fragments F(ab'), les neutralise et bloque leur entrée dans l'organisme, un mécanisme appelé exclusion immune. Si cette première ligne de défense est brisée, le transport trans-épithélial permet aux IgA de lier les agents pathogènes de manière intra-cellulaire, qui sont alors éliminés par transport vers la lumière des muqueuses.

La polymérisation de l'IgA améliore grandement l'efficacité de cet anticorps, en augmentant sa valence et sa stabilité. Ainsi, les IgA dimériques et sécrétoires ont clairement prouvé leur supériorité sur l'IgA monomérique pour la neutralisation de virus (Renegar et coll. 1998), ou la cytotoxicité bactérienne (Janoff et coll. 1999). L'importance de la valence des anticorps a été confirmée pour d'autres isotypes. L'addition d'une queue C-terminale « IgM-like » aux molécules d'IgG induit leur polymérisation spontanée, et accroît leur capacité d'activation du complément (Smith et coll. 1995). En outre, la polymérisation chimique d'IgG monomériques anti-CD19 augmente de manière significative leur capacité pro-apoptotique et anti-proliférative sur des lignées tumorales B (Ghetie et coll. 1997).

La très forte concentration d'IgA sécrétoires dans le colostrum et le lait maternel suggère que cet anticorps pourrait jouer un rôle important dans la protection immunitaire passive du nouveau-né (Hanson and Korotkova 2002). En effet, le lait maternel contiendrait des IgAs spécifiques d'une grande variété d'antigènes microbiens capables de neutraliser des toxines et des virus. Néanmoins, le faible taux de transport de molécules intactes à travers le

tube digestif du nouveau-né, laisse présager que les IgAs dérivées du lait joueraient principalement un rôle d'exclusion immune en prévenant l'adhérence et la toxicité de micro-organismes (Mestecky et coll. 2005).

#### 4.2. Mécanismes effecteurs indirects de l'IgA

L'activation de la cascade du complément est l'un des mécanismes principaux de la cytotoxicité indirecte médiée par la partie Fc des anticorps. Trois voies différentes de l'activation du complément ont, à ce jour, été décrites ; la voie classique, la voie alternative et la voie des lectines. L'IgA est considérée classiquement comme un faible activateur de la cytotoxicité cellulaire médiée par le complément (CDC). Pour la plupart des auteurs, cet isotype semble incapable de recruter la voie classique (Miletic and Frank 1995), bien que plusieurs études aient montré, dans certaines conditions, une possibilité de liaison de l'IgA avec la molécule C1q (Burritt et coll. 1977; Jarvis and Griffiss 1989). Plus généralement, la CDC médiée par l'IgA a été mise en évidence dans des expériences *in vitro* de lyse bactérienne (Janoff et coll. 1999) ou chez le rat *in vivo* (Stad et coll. 1992) par un recrutement de la molécule C3 aboutissant à l'activation de la voie alterne du complément. Plus récemment, Roos *et coll.* ont montré que l'IgA pouvait lier la protéine MBL (mamman-binding lectin) et activer le complément par la voie des lectines (Roos et coll. 2001). Cependant, la participation de cette voie à une éventuelle lyse de cellules cibles n'a pas encore été démontrée. En réalité, *in vivo*, l'importance de l'activation du complément par les IgA reste incertaine. En effet, malgré de nombreuses études sur les capacités de CDC de l'IgA, il apparaît que lors de l'utilisation combinée de plusieurs isotypes, l'IgA pourrait effectivement inhiber l'activation du complément d'anticorps d'isotypes IgG ou IgM en bloquant leur liaison avec les sites antigéniques (Huls et coll. 1999).

La cytotoxicité cellulaire médiée par les IgA nécessite le recrutement du Fc $\alpha$ RI, principalement exprimé sur les cellules myéloïdes. Lors de cette interaction, le récepteur CD89 participe à différents aspects de la défense immunitaire. Il induit la phagocytose des complexes Ag/IgA (Gorter et coll. 1987), initie la réponse cellulaire cytotoxique dépendante de l'anticorps (Fanger et coll. 1980) et participe à la clairance des IgA sériques (Morton et coll. 1995). Fait important, le Fc $\alpha$ RI humain exprimé à la surface des macrophages

péritonéaux de souris transgéniques s'est également révélé efficace dans la phagocytose et la lyse des cellules tumorales humaines (van Egmond et coll. 1999).

A la fin des années 80, l'équipe de Neuberger a comparé les capacités effectrices d'un panel de différents isotypes d'Ac humains dirigés contre un même haptène (Bruggemann et coll. 1987). Sans surprise, les isotypes IgG1 et IgG3 se sont avérés de meilleurs candidats dans la médiation du complément et le recrutement des cellules NK pour la lyse de cellules cibles tumorales portant l'haptène antigénique. Cependant, dans plusieurs expériences similaires, l'IgA semble significativement plus efficace que l'IgG dans le recrutement de neutrophiles pour la lyse de cellules tumorales (Valerius et coll. 1997; Huls et coll. 1999). Les neutrophiles constituent la population cytotoxique la plus représentée chez l'homme. Une amélioration du recrutement de ces acteurs cellulaires pourrait se traduire par une augmentation de la lyse tumorale en sang total, surtout lorsque les cellules tumorales sont résistantes au complément et que le nombre et l'activité fonctionnelle des PMN sont accrus par des traitements additionnels au G-CSF ou au GM-CSF (Stockmeyer et coll. 2000). Ainsi, en 2007, Dechant et coll. démontrent qu'une IgA recombinante constituée d'une chaîne lourde humaine  $\alpha$  associée aux régions variables anti EGF-R du Cetuximab est capable de recruter les neutrophiles pour l'ADCC de manière plus efficace que son homologue IgG1 aboutissant à une meilleure élimination des cellules cancéreuses EGF-R<sup>+</sup> dans des tests en sang total (Dechant et coll. 2007).

Comme pour les récepteurs Fc $\gamma$ R et les récepteurs T CD3, Fc $\alpha$ RI peut également être activé par les anticorps anti-récepteurs Fc en ADCC inverse. Plusieurs anticorps bi-spécifiques anti-CD89 ont déjà montré de fortes capacités thérapeutiques *in vitro* (Deo et coll. 1998; Stockmeyer et coll. 2000) et certains d'entre eux ont été sélectionnés pour une évaluation en étude pré-clinique (Elsasser et coll. 1999).

## **5. Rôle des glycanes dans les fonctions effectrices des IgA et implication dans la maladie de Berger.**

La région charnière de l'IgA1, absente sur l'IgA2, comprend une dizaine de sites de O-glycosylation potentiels. L'IgA1 porte, également, 2 sites de N-glycosylation sur les domaines Ca2 et Ca3, alors que l'IgA2 contient 4 sites N-glyqués répartis sur les 3 domaines

constant C $\alpha$  (**Figure 18**). En dehors de leur implication dans la clairance des IgA par l'intermédiaire du récepteur ASGP (Rifai et coll. 2000) et leur importance dans le mécanisme d'exclusion immune des IgA sécrétoires (Mestecky et coll. 2005), les rôles physiologiques des glycanes présents sur les IgA restent encore mal connus. Néanmoins, il semble que ces glycanes pourraient intervenir dans les liaisons de l'IgA avec les molécules initiateuses de la cascade du complément. En effet, plusieurs études ont montré que des IgA1 mutantes pour l'un ou l'autre des sites de N-glycosylation présentaient des capacités réduites dans le recrutement du composant C3 et l'activation de la voie alterne (Zhang and Lachmann 1994; Boackle et coll. 2006)

De plus, des anomalies de glycosylation des IgA ont été impliquées dans plusieurs maladies telles que le syndrome de Sjögren (Basset et coll. 2000), la purpura Hénoch-Schönlein (Moldoveanu et coll. 2007), et la néphropathie à IgA (IgAN) (Tomana et coll. 1999). La maladie de Berger, ou néphropathie à IgA est la plus fréquente des maladies glomérulaires à travers le monde. La maladie est définie par le dépôt tissulaire d'Ig principalement de classe IgA1, dans le mésangium des glomérules rénaux, très souvent associés à des dépôts de C3, alors que les protéines de la voie classique du complément (C1 et C4) sont absentes. L'origine de cette maladie reste inconnue malgré certaines pistes développées au cours des vingt dernières années. Ainsi, les patients atteints d'une néphropathie à IgA, présentent pour certains un défaut de sialylation et de galactosylation de la région charnière des molécules d'IgA1 circulantes (Allen et coll. 1995). Cela pourrait résulter soit d'un clivage par une bêta-glycosidase bactérienne, soit d'un déficit d'activité des sialyltransférases et de la  $\beta$ 1,3-galactosyltransférase. Le C1 inhibiteur sérique (qui a aussi des résidus sucres O-glycosylés) est normalement glycosylé chez ces patients. Ainsi, l'anomalie de galactosylation, portant sur les sucres O-glycosylés, n'est pas généralisée. Les lymphocytes B de ces patients (mais pas les lymphocytes T ni les monocytes) ont une activité  $\beta$ 1,3-galactosyltransférase diminuée (Allen et coll. 1997). Il est possible que, dans la néphropathie à IgA, des facteurs génétiquement déterminés modulent la disponibilité ou la fonction de cette enzyme.

Plusieurs études ont montré que dans cette maladie, les N-glycanes des IgA pouvaient également être affectés (Amore et coll. 2001). Ces altérations sur les domaines CH2 et CH3 de la chaîne lourde pourraient modifier l'interaction de l'IgA avec ses récepteurs. En effet, des IgA provenant de patients atteints d'une néphropathie ont été décrits comme plus efficace

(Grossetete et coll. 1998) ou au contraire comme moins efficace (van Zandbergen et coll. 1998) dans leur capacité de liaison au Fc $\alpha$ RI. La modification de l'affinité des IgA pour ses récepteurs pourrait aboutir à des implications importantes lors de la formation de complexes immuns et conduire à des dépôts mésangiaux provoquant l'apparition d'une néphropathie à IgA. Par exemple, la présence de Fc $\alpha$ RI soluble complexé à des IgA a été impliquée dans la pathogénie d'un modèle murin d'IgAN (Launay et coll. 2000), et le récepteur de la transferrine a été identifié comme un récepteur des cellules mésangiales capable de lier les IgA1 des patients atteints d'IgAN (Moura et coll. 2001).

# RESULTATS

## **ARTICLE 1: “IgA-class anti-CD20 chimeric antibodies outperform IgG for direct effect on target cells but less efficiently recruit cytotoxic effectors”.**

(manuscrit en préparation)

Un peu plus de trente ans après leur découverte par Milstein et Köhler, les anticorps monoclonaux (AcM) ont désormais atteint leur maturité en tant qu'agents thérapeutiques. Dans le domaine de l'oncologie, les anticorps IgG1, caractérisés par une longue demie-vie plasmatique (Ghetie and Ward 2000) et des fonctions cytotoxiques très efficaces (Bruggemann et coll. 1987), représentent l'isotype thérapeutique dominant et constituent une nouvelle option de traitements pour certains cancers. Les nombreux essais cliniques et l'intensive recherche réalisée sur cet outil thérapeutique désormais majeur laissent, néanmoins, entrevoir certaines limites : mauvaise accessibilité à certains tissus (Beckman et coll. 2007), recrutement inefficace de cellules effectrices chez 20% de la population (Cartron et coll. 2002) ou encore apparition de résistances totales ou partielles. Au cours des dernières années, beaucoup d'efforts ont été accomplis dans le développement d'autres formes d'AcM dans le but de développer des caractéristiques fonctionnelles différentes et complémentaires de celles des IgG classiques (Dechant et coll. 2007; Karagiannis et coll. 2007).

Largement représentée au niveau sérique, essentiellement sous forme de monomère (IgAm), et prédominante dans les muqueuses, l'IgA joue un rôle clé dans la protection immunitaire. La majorité des IgA des muqueuses sont produites sous forme de dimères (IgAd) qui sont rapidement exportés vers la lumière des muqueuses où ils sont sécrétés sous forme d'IgA sécrétoires (IgAs). Les IgAs constituent une première ligne de défense contre l'intrusion des microorganismes qui tapissent la lumière des muqueuses et leur rôle dans l'immunité humorale est maintenant bien établi (Macpherson et coll. 2008). Les fonctions des IgA sériques restent, quand à elle, partiellement incomprises. Un exemple réside dans la controverse concernant les capacités des IgA au recrutement de la cascade cytotoxique du complément. Ainsi, malgré plusieurs études démontrant leurs capacités à ce recrutement via la voie alterne (Hiemstra et coll. 1987) ou la voie des lectines (Roos et coll. 2001), aucun rapport n'a pu établir, à ce jour, une quelconque activité CDC de l'IgA contre une cible tumorale. Un autre aspect fonctionnel des IgA concerne leur liaison au récepteur Fc $\alpha$ RI exprimé sur les polynucléaires neutrophiles (PMN). En effet, le recrutement de cette population leucocytaire

via les IgA a déjà démontré son fort potentiel cytotoxique dans quelques modèles oncologiques (Dechant et coll. 2002).

Dans cette étude, nous avons cherché à évoluer l'activité anti-tumorale d'IgA anti-CD20 et à comparer leur potentiel thérapeutique avec celui du rituxan, IgG1 anti-CD20 chimérique, qui est aujourd'hui, le médicament standard dans le traitement des lymphomes non-hodgkiniens. L'activité thérapeutique du rituxan s'effectue par de nombreux mécanismes regroupant des capacités d'inhibition de croissance ou d'induction de l'apoptose ainsi qu'un fort potentiel de recrutement de facteurs cytotoxiques aboutissant à la CDC ou à l'ADCC (Glennie et coll. 2007). Nous avons donc créé des anticorps chimériques d'isotype IgA1 ou IgA2 possédant la même spécificité de reconnaissance que le rituxan, produits aussi bien sous forme monomérique que dimérique. L'activité thérapeutique de chacune de ces formes a été évaluée sur l'ensemble des différents modes d'action propres aux AcM anti-CD20.

### **Résultats et Discussion de l'article 1 :**

Dans cette étude nous avons montré que des anticorps anti-CD20 d'isotype IgA présentaient un fort potentiel anti-tumoral contre plusieurs lignées de lymphomes B humains. De manière étonnante, sur cette cible, les mécanismes cytotoxiques de cette classe d'Ig se sont révélés tout à fait similaires à ceux utilisés par le rituxan. Dans un premier temps, nous avons constaté que les IgAd anti-CD20 présentaient un potentiel anti-prolifératif significativement plus efficace que l'IgG1. Par analogie avec l'observation d'une augmentation des effets directs des IgG après leur agrégation (Shan et coll. 2000), la dimérisation de l'IgA pourrait être à l'origine d'une signalisation plus forte lors du « cross-linking » du CD20 membranaire, aboutissant à une exaspération de la réponse cellulaire.

Le recrutement de la cascade cytotoxique du complément est considéré comme l'un des modes d'action prédominant dans l'action anti-tumorale des AcM anti-CD20. Contrairement aux nombreux exemples faisant état d'une absence d'activité CDC des IgA sur plusieurs cibles cancéreuses, les IgA anti-CD20 sont capables de déclencher efficacement la cascade du complément conduisant à la mort de plusieurs lignées de lymphomes B humains. Ce mécanisme est particulièrement efficace sur la lignée humaine DHL-4 pour laquelle les trois isoformes IgA1m, IgA2m et IgA2d présentent un potentiel CDC quasiment similaire à celui du rituxan. Ce recrutement cytotoxique du complément via l'IgA semble, néanmoins, faiblement généralisable à d'autres cibles cellulaire CD20. En effet, nos expériences montrent

que sur la lignée Raji, également connue pour sa sensibilité au rituxan dans un contexte CDC, seul l'isotype IgA2m est capable d'induire une forte lyse des cellules.

Un autre aspect important de la cytotoxicité des AcM anti-CD20 repose sur la capacité de recrutement d'effecteurs cellulaires sur le site tumoral. Dans ce domaine, nous avons démontré que les deux isoformes d'IgA monomérique présentaient des capacités importantes, en particulier en ce qui concerne le recrutement de PMN, qui s'avéraient cependant légèrement diminué lors de la dimérisation de l'anticorps. Malgré ce fort recrutement de neutrophiles à la surface des cellules tumorales, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une activité ADCC de ces effecteurs cellulaires dans nos tests *in vitro*. A l'inverse nous avons montré *in vivo* que les capacités cytotoxiques de l'IgA2m s'avéraient plus importantes dans une lignée murine transgénique exprimant un récepteur Fc $\alpha$ RI humain que dans une lignée murine sauvage, démontrant les capacités des IgA à déclencher l'ADCC sur une cible CD20. Cependant, le bénéfice thérapeutique de l'activité ADCC des IgA dans ces souris transgéniques semblent assez faible comparé au potentiel des autres mécanismes cytotoxiques et en particulier à celui de la CDC, qui semble représenter le mode d'action le plus efficace et le plus reproductible pour la lyse de cellules CD20 via un anticorps d'isotype IgA.

Cette étude s'est achevée sur une évaluation plus globale du potentiel thérapeutique des IgA anti-CD20 par rapport à un anticorps d'isotype IgG, avec deux études comparatives de leur activité anti-tumorale *in vivo*. Dans un premier temps, nous avons montré que l'IgA2m pouvait agir de manière relativement rapide sur une masse tumorale d'un lymphome B humain implanté dans le péritoine et induire sa destruction de manière spécifique. Cependant, l'efficacité de ce traitement diminue rapidement avec les quantités d'IgA inoculées alors que l'administration d'IgG anti-CD20 reste extrêmement efficace même avec de faibles concentrations. Une étude, à plus long terme, a été réalisée sur une cohorte de souris greffées d'un lymphome T murin CD20+ (Di Gaetano et coll. 2003). Afin d'obtenir une administration prolongée des molécules thérapeutiques, les souris n'ont pas reçu d'anticorps proprement dit mais ont subi une injection « hydrodynamique » d'ADN plasmidique codant pour les différents isotypes d'anticorps anti-CD20. Cette technique est connue pour entraîner, après quelques heures, une rapide et importante production hépatique de la protéine codée par le plasmide injecté. Dans cette expérience, nous avons pu constater que l'injection de plasmide codant l'IgA2m anti-CD20 aboutissait à une concentration sérique d'Ig humaine beaucoup plus faible que celle observée dans les souris ayant reçu un plasmide codant pour l'IgG1. Cette faible concentration d'IgA2m s'est, cependant, avérée suffisante pour protéger 80% des souris contre le développement du lymphome CD20+. L'injection d'un vecteur codant l'IgA1

anti-CD20 a également abouti à une meilleure survie de la cohorte murine. Le fort potentiel anti-tumoral des deux isotypes d'IgA démontré dans cette étude, reste cependant réduit face à la protection conférée par l'administration d'un plasmide codant pour l'IgG1 anti-CD20 qui protège 100% des souris traitées.

Dans une certaine mesure, ces résultats pourraient être liés aux propriétés pharmacocinétiques de l'IgA, fondamentalement différentes de celles de l'IgG. En effet, contrairement aux IgG, l'IgA ne forme pas de liaison avec le récepteur néonatal FcRn. Au contraire, l'une des caractéristiques de cet isotype réside dans sa liaison aux récepteur ASGR et pIgR qui captent et excrètent ces anticorps dans la bile et les sécrétions mucoales contribuant, ainsi, à leur très faible demie-vie sérique (Rifai et coll. 2000). En conséquence, malgré une forte activité cytotoxique des IgA CD20 *in vitro*, leur potentiel thérapeutique *in vivo* reste inférieur à celui du rituxan probablement du fait de la localisation de la cible dans le compartiment sanguin. En dehors d'applications sériques, l'utilisation d'IgA thérapeutiques porte encore de nombreux espoirs pour le traitement de maladies associées aux muqueuses. Il reste donc à démontrer que le tropisme préférentiel de cet isotype pour les muqueuses lui permettrait d'associer activité biologique et ciblage efficace d'un compartiment peu accessible pour l'IgG.

**IgA-class anti-CD20 chimeric antibodies outperform IgG for direct effect on target cells but less efficiently recruit cytotoxic effectors.**

**Virginie Pascal<sup>1</sup>, Arnaud Debin<sup>2</sup>, Armelle Cuvillier<sup>3</sup>, Marjolein Van Egmond<sup>4</sup>, Laurent Imbertie<sup>2</sup>, Gérard Tiraby<sup>2</sup> and Michel Cogné<sup>1\*</sup>**

Running title: mIgA-mediated effects on lymphoma cells

<sup>1</sup> Université de Limoges, France ; CNRS, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, F-87025 Limoges, France,

<sup>2</sup> CAYLA-Invivogen, 5 rue Jean Rodier, Toulouse, France

<sup>3</sup> B cell Design, 2, rue du Dr Marcland, Limoges, France

<sup>4</sup> Departments of Molecular Cellular Biology and Immunology/ Surgical Oncology, VU University Medical Center, Van der Boechorststraat, 71081BT Amsterdam, The Netherlands

This work was supported by grants from Pôle de compétitivité Cancer Bio Santé and Conseil Régional du Limousin. VP was successively supported by fellowships from the French Ministry for research , CAYLA- Invivogen, and Association pour la Recherche sur le Cancer.

\* To whom correspondence and reprint requests should be addressed:

Pr M. Cogné, CNRS UMR 6101, Laboratoire d'Immunologie, 2, rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges Cedex, France, Phone # 33 555 435 848, Fax 33 555 435 897, [cogne@unilim.fr](mailto:cogne@unilim.fr).

## Résultats complémentaires

L'isotype IgA présente un tropisme préférentiel pour les muqueuses qui en fait un candidat thérapeutique particulièrement intéressant pour cibler les nombreuses tumeurs associées au compartiment des muqueuses, difficilement accessible par les anticorps d'isotype IgG. Dans ce domaine, les cancers digestifs apparaissent comme des cibles majeures, tout comme les cancers des voies respiratoires supérieures, de l'appareil génito-urinaire (prostate, col de l'utérus) ou encore du sein. Cependant l'utilisation thérapeutique des IgA reste à ce jour dans l'attente de données expérimentales concrètes rapportant leur activité aux anticorps de référence, les IgG. Pour cette raison, il était important de tester pour le rituximab, l'un des anticorps thérapeutiques les plus standards et les mieux validés, en quoi sa transformation d'IgG en IgA pouvait modifier ses capacités fonctionnelles. Même les lymphomes du MALT pourraient éventuellement bénéficier d'un traitement à ciblage muqueux, ils ne représentent qu'une faible partie de l'ensemble des lymphomes. Nous nous sommes donc d'abord intéressés dans cette première étude à l'analyse de situations qui miment le cas le plus général des lymphomes, où les cellules lymphomateuses ont une localisation aisément accessible à la circulation sanguine, voire sont elles-mêmes circulantes. L'un des aspects de notre travail sur les IgA anti-CD20, encore trop préliminaire pour être intégré au manuscrit en préparation, a ensuite concerné l'évaluation du bénéfice thérapeutique intrinsèque à un anticorps d'isotype IgA dans une application thérapeutique, *in vivo*, touchant le compartiment intestinal.

Dans un premier temps, nous avons voulu nous assurer de la capacité des IgA dimérique exogènes à un transport vers les compartiments des muqueuses et plus particulièrement à travers l'épithélium intestinal.

Nous avons donc administré, par voie intraveineuse (IV) ou intra-péritonéale (IP), 150µg d'IgG1, d'IgA2m ou d'IgA2d à une cohorte de souris C57black/6. La moitié des animaux ont été sacrifiés 2h après l'injection, l'autre moitié après 5h et leurs fluides intestinaux ont été récupérés. Le sérum de chaque souris a également été prélevé juste avant le sacrifice. Le contenu en Ig humain des sérums et des fluides intestinaux a été apprécié par ELISA.

Les résultats de ces dosages sont présentés sur la figure 1 (histogramme A et B). Les concentrations d'Ig humaines sériques mesurées sur ces souris sont en accord avec les

données connues quant à la demi-vie sérique des IgA et leur très rapide élimination de la circulation sanguine (figure 1A). On peut ainsi noter que l'IgA dimérique semble être éliminée encore plus rapidement. De manière réciproque, les concentrations d'Ig humaine mesurées dans les fluides intestinaux montrent un relativement bon passage des IgA dimériques à travers les muqueuses intestinales que ce soit après une injection par intraveineuse ou par voie intra-péritonéale (figure 1B). Il est à noter qu'une certaine quantité de l'échantillon IgG semble également capable de traverser cette barrière intestinale.

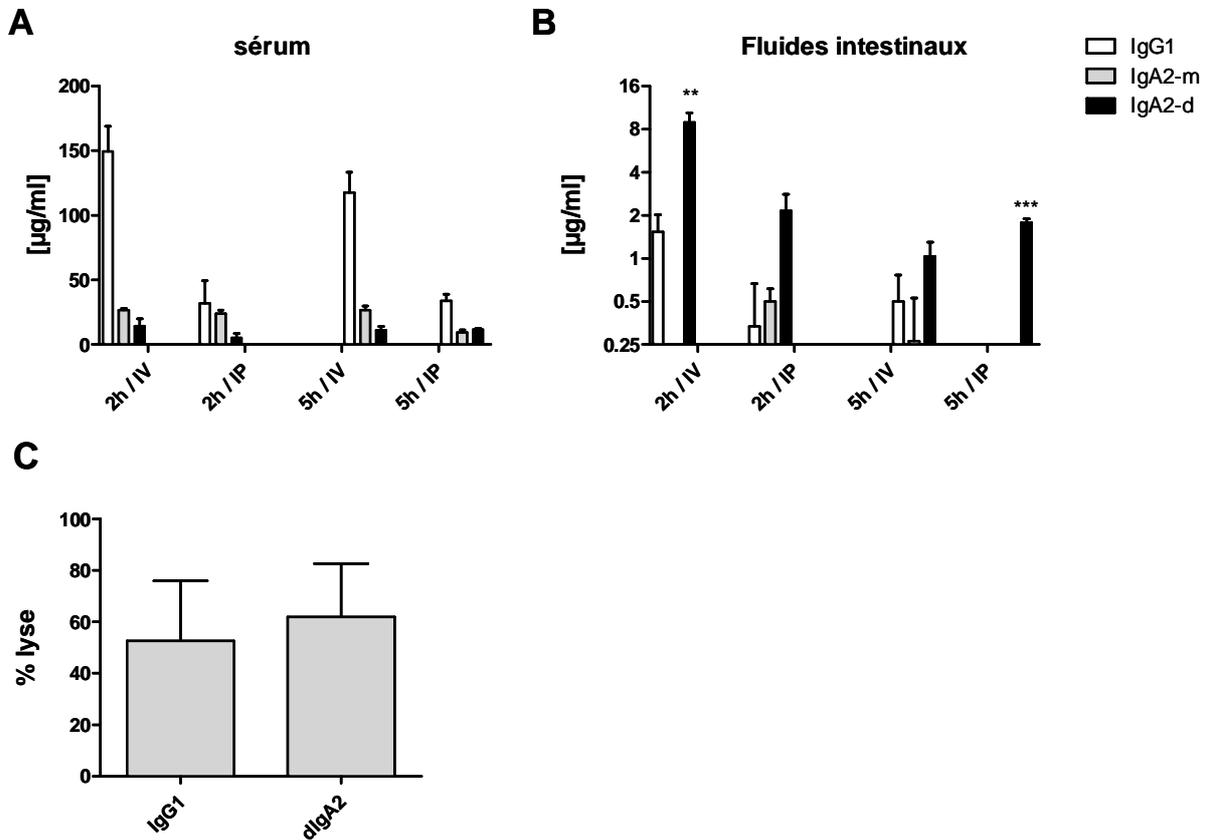
Ces données ont montré que des IgA dimérique injectées par voie intraveineuse pouvaient atteindre le compartiment intestinal et traverser l'épithélium pour atteindre la lumière. Ce passage traduit d'une part un passage rapide des anticorps injectés dans la circulation sanguine vers l'ensemble du compartiment extracellulaire par diffusion à travers les parois vasculaires. Secondairement, les anticorps liés par le pIgR bénéficient d'un transport actif trans-épithélial. La concentration d'IgA dimérique dans les fluides intestinaux se révèle maximale deux heures après l'injection i.v., mais elle reste néanmoins assez faible et décroît rapidement au cours du temps.

Afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de ce passage trans-épithélial d'anticorps vers une cible cancéreuse située au niveau des muqueuses intestinales, nous avons tenté d'adapter le modèle IVAK décrit dans le manuscrit précédent en implantant les cellules cibles CD20+ non plus dans le péritoine mais dans une anse intestinale de l'animal.

Concrètement, des souris RAG2 $\gamma$ C<sup>-/-</sup> ont reçu une dose de 150 $\mu$ g d'IgG ou d'IgAd anti CD20 par voie intraveineuse. Deux heures après cette injection, les souris ont été endormies et une petite laparotomie a permis de dégager une portion du grêle. Deux ligatures ont alors été réalisées sur cette portion afin de délimiter une zone intestinale dans laquelle un mélange de 10<sup>6</sup> cellules cibles et contrôle (préalablement marquées, voir « matériels et méthodes » du manuscrit) a été injecté. L'anse intestinale a alors été réintégrée dans la cavité péritonéale et l'incision abdominale a été suturée. 5 heures après cette opération, l'animal a été sacrifié et les cellules implantées ont été récupérées dans la portion d'intestin délimitée par les deux ligatures avant d'être analysées en cytométrie.

Les deux premières expériences réalisées avec cette technique laissent entrevoir un certain avantage des IgAd anti-CD20 comparées à l'IgG1 dans la lyse de cellules de lymphome B humain lorsque ces cellules sont implantées dans un compartiment intestinal. Evidemment, cette conclusion reste dépendante de la répétition de cette expérience afin d'évaluer la significativité de ce résultat. Néanmoins, cette expérience pourrait démontrer

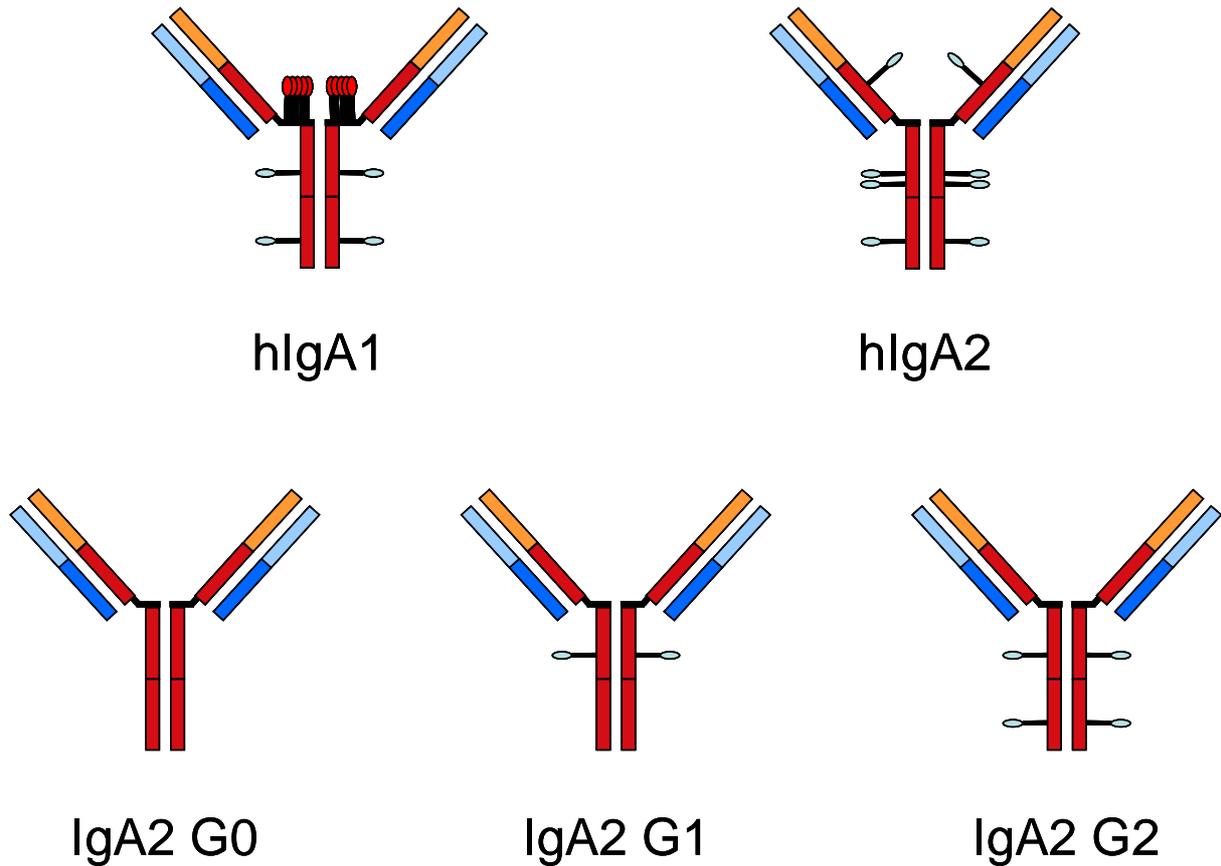
pour la première fois un réel potentiel des IgA dans le traitement de tumeurs associées aux muqueuses.



**Figure 1. Potentiel anti-tumoral des IgA2 dimériques dans un contexte muqueux.**

**A, B.** Titres sérique et intestinaux d'Ig humaines après une immunisation passive avec les anticorps anti-CD20. Une cohorte de souris C57black/6 a reçu en IV ou en IP, 150 µg de rituxan, d'IgA2 monomérique ou d'IgA2 dimérique. Le sang et les fluides intestinaux de ces souris ont été prélevés à 2h ou à 5h (3 souris par point) et titrés par ELISA. Les étoiles indiquent les différences statistiquement significatives selon un test *t* non-apparié entre les valeurs obtenues pour l'IgG1 et l'IgA2 dimérique (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). **C.** Evaluation du potentiel cytotoxique des Ig anti-CD20 contre une lignée B humaine implantée au sein d'une anse intestinale. Les cellules humaines (DHL-4/cible et Jurkatt/contrôle) ont été implantées dans l'anse intestinale de souris RAG2 $\gamma$ c-/- ayant été préalablement immunisé par voie IV avec 150µg de rituxan ou d'IgA2 dimérique. Cinq heures après l'implantation, la lyse CD20 spécifique est calculée à partir du ratio DHL-4/Jurkatt.





**Figure 24 : Représentation schématique des IgA anti-CD20 sauvages et mutantes.**

Les rectangles rouges représentent les chaînes lourdes et les rectangles bleus correspondent aux chaînes légères (foncées pour les parties constantes et claires pour les parties variables). Les bâtonnets surplombés d'un rond rouge correspondent aux résidus O-glycosylés, ceux surplombés d'un rond bleu, aux résidus N-glycosylés.

## **ARTICLE 2: “Feasibility of using glycosylation-deficient variants of human IgA as therapeutic antibodies”.**

(Manuscrit en préparation)

Bien qu'elle possède plusieurs propriétés uniques, l'IgA présente une architecture moléculaire similaire à celles des autres isotypes d'Ig. Les quatre formes monomériques d'IgA humaines (IgA1, IgA2(1), IgA2(2) et IgA(n)) sont composées de deux chaînes légères (ch.L) et de deux chaînes lourdes (ch.H) deux à deux identiques. Les ch.L comportent chacune un domaine variable et un domaine constant. Les ch.H contiennent, quant à elles, un domaine variable, trois domaines constants (VH, CH1, CH2 et CH3), une région charnière entre CH1 et CH2 ainsi qu'une région additionnelle, située au niveau de l'extrémité C-terminale, appelée pièce basale (Boehm et coll. 1999). La dimérisation de l'anticorps s'établit lors de la formation de ponts disulfures entre deux monomères d'IgA et un petit polypeptide, la chaîne J. Des complexes oligosaccharides sont disposés à deux endroits sur la chaîne lourde de l'IgA1 en position N263 sur le domaine CH2 et N459 sur la pièce basale. L'IgA2 contient, deux sites additionnels de glycosylation en position N166 et N337 sur les domaines CH1 et CH2, respectivement (figure 24). Les variants IgA2 (2) et IgA2 (n) contiennent un cinquième site sur le domaine CH1. En dehors de quelques variations du contenu en acides aminés, les domaines constant de l'IgA1 et des IgA2 diffèrent de façon significative dans la région charnière, qui présente, pour l'IgA1, trois à six O-glycanes liés à des résidus Ser ou Thr (Mattu et coll. 1998; Tarelli et coll. 2004).

Dans de nombreuses applications, et en particulier dans le cas de tumeurs solides, les anticorps thérapeutiques doivent posséder la capacité de pénétrer les tissus et la matrice extracellulaire pour atteindre leur cible cellulaire. Alors que les interactions avec le FcRn (Roopenian and Akilesh 2007) ou avec d'autres récepteurs exprimés à la surface de leucocytes effecteurs peuvent être avantageuses en termes de pharmacocinétique et de fonctionnalité pour les IgG sériques, l'interaction avec le récepteur pIgR présent, entre autres, sur les épithéliums des muqueuses, fait de l'IgA dimérique un candidat anticorps idéal pour cibler les pathologies associées aux muqueuses. Toutefois, à ce jour, aucun anticorps monoclonal de classe IgA n'est en développement pour une application clinique. Ce contraste avec la situation des IgG, résulte certainement de divers verrous technologiques concernant les IgA aussi bien dans leur isolement, caractérisation, propriétés que dans leur production

(Woof and Mestecky 2005; Yoo and Morrison 2005). Plus particulièrement, l'un des obstacles entravant l'utilisation thérapeutique des IgA réside dans leurs nombreux sites de glycosylation. En effet, l'unique glycanes présent sur la chaîne lourde de l'IgG exige déjà, la réalisation, tout au long du processus de production, de nombreux tests analytiques qui permettent de caractériser et de valider la glycosylation de l'anticorps (Beck et coll. 2008). Dans le cas des IgA, la présence des multiples N-et O-glycanes de la ch.H  $\alpha$  pourrait entraîner une variabilité accrue de la glycosylation, difficilement contrôlable et potentiellement allergène chez les patients. Dans ce domaine, l'utilisation de l'IgA2 paraît plus simple que celle de l'IgA1 car elle ne contient pas de sites O-glycane sur sa région charnière. Un « danger » potentiel de l'IgA1 et de sa région charnière glycosylée pourrait aussi être craint, puisque des anomalies de cette glycosylation ont été décrites comme impliquées dans certaines maladies de dépôts à IgA (Gomes et coll. 2008). La forme d'IgA2 la moins glycosylée ; l'IgA2(1) conserve toutefois, quatre sites N-glycane sur les domaines constant de sa ch. H.

Peu de données sont disponibles concernant le rôle physiologique des différents sites de glycosylation de l'IgA2. En revanche, de nombreuses études ont porté sur le rôle des N-glycanes CH2 et CH3 dans les fonctions effectrices des IgA1. Pour cet isotype, la plupart des études s'accordent sur le fait que ces résidus oligosaccharidiques n'interviendraient pas dans la liaison avec le récepteur aux IgA, Fc $\alpha$ RI (Gomes et coll. 2008), mais pourraient, à l'inverse, jouer un rôle important dans le recrutement des facteurs de la cascade cytotoxique du complément (Nikolova et coll. 1994). Pour évaluer le rôle des glycanes de l'IgA2, nous avons créé, par mutagenèse dirigée, différentes formes d'IgA2 mutantes portant un contenu variable en résidus glycosylés. Ainsi, la forme IgA2 G2 ne porte plus que deux sites N-glycanes (N263 et N459), l'IgA2 G1, un seul N-glycane (N263) et l'IgA2 G0, aucun glycanes (figure 24). Ces différentes chaînes lourdes mutantes ont été associées avec des régions variables spécifique du CD20 humain, produite sous monomérique ou dimérique (soit en association avec la chaîne J), et analysées dans des tests permettant de comparer leur activité thérapeutique avec leur homologue WT.

## **Résultats et Discussion de l'article 2 :**

Comme décrit dans l'étude précédente, l'activité thérapeutique des anticorps anti-CD20 s'effectue par de nombreux mécanismes regroupant l'inhibition de croissance cellulaire,

l'induction de l'apoptose et le recrutement de facteurs cytotoxiques aboutissant à la CDC ou à l'ADCC (Glennie et coll. 2007). Dans un premier temps, nous avons pu constater que les activités cytotoxiques médiées par les fragments Fab n'étaient pas altérées chez nos IgA mutantes. En effet, des tests d'évaluation de la cytotoxicité directe, réalisés sur les formes mutantes dimériques, ont montré que l'élimination des sites de glycosylation de la ch.H  $\alpha$  ne modifiait pas les capacités pro-apoptotiques et anti-prolifératives de l'anticorps.

Par la suite, nous nous sommes intéressés au potentiel des mutants IgA dans des tests de cytotoxicité indirecte nécessitant le recrutement de partenaires effecteurs. L'une des caractéristiques des glycanes des ch.H de l'IgA réside dans leur orientation vers l'extérieur de la molécule à l'inverse de ce qui est observé pour les IgG et les IgE pour lesquels les résidus glycosylés sont piégés entre les deux ch.H. La nature exposée des glycanes de la ch.H  $\alpha$  suggère qu'ils pourraient jouer un rôle dans l'interaction de l'IgA avec d'autres molécules (Gomes and Herr 2006). Le récepteur Fc $\alpha$ RI se lie à l'IgA2 au niveau de l'interface des domaines CH2 et CH3 (Furtado et coll. 2004) à proximité des deux sites N-glycanes 166 et 263. En accord avec les résultats obtenus sur des IgA1 déficientes pour leur glycosylation, ces résidus glycanes ne semble pas intervenir dans la liaison de l'IgA2 avec ce récepteur. En réalité aucun des sucres de la ch.H  $\alpha$ 2 ne semble important pour cette liaison puisque le mutant G0 présente une capacité de recrutement cellulaire similaire à celle de la forme WT. A l'inverse, nous avons montré que les glycanes de la ch.H de l'IgA2 jouent un rôle important dans le recrutement des facteurs du complément. Plus particulièrement, l'élimination du site de glycosylation de la région charnière diminue considérablement le potentiel CDC de l'IgA2.

Un des principaux avantages des anticorps IgA concerne leur tropisme préférentiel pour les compartiments muqueux. Chez la souris, la clairance rapide d'IgA dimérique injectée par voie intraveineuse découle, en partie, d'un fort recrutement de ces dimères au niveau des muqueuses via le récepteur pIgR, qui les transporte vers les lumières intestinales et broncho-alvéolaires (Steinmetz et coll. 1994). Dans cette étude, nous avons montré que les IgA2 dimériques déficientes pour la glycosylation conservaient une demi-vie sérique comparable à celles de la forme WT et que leur transport trans-épithélial intestinal n'était pas altéré, suggérant un rôle faible voir inexistant des N-glycanes de la ch.H  $\alpha$  dans la liaison avec le pIgR.

Nous l'avons évoqué plus haut, les anticorps d'isotype IgA sont également connus pour leur implication relativement fréquente dans les maladies rénales, et en particulier dans la maladie de Berger caractérisée par des dépôts d'IgA (mais essentiellement de classe IgA1) dans le mésangium des glomérules rénaux. Un certain nombre de publications font référence à

l'implication d'un défaut de O-glycosylation des IgA1 dans le déclenchement de cette maladie (Novak et coll. 2008). L'utilisation thérapeutique d'IgA WT et plus particulièrement l'utilisation d'IgA déficientes dans leur glycosylation exige, donc, une évaluation de leur prédisposition à ce type de dépôt tissulaire. Pour ce faire, nous avons analysé les reins de souris ayant reçu des doses élevées de notre panel d'anticorps WT et mutants sous leur forme monomérique et dimérique. Les résultats de cette expérience montrent que l'administration des mutants IgA2 G1 et G0 sous leur forme monomérique aboutit à l'apparition de dépôts alors que l'administration des formes WT et G2 laisse les reins exempts de tout dépôt. Ceci suggère que l'élimination du site de glycosylation N459 pourrait fortement diminuer la stabilité *in vivo* et / ou la solubilité des IgA déficientes pour ce glycan. En revanche, parmi les formes dimériques, seule l'administration de la forme G0 semble présenter un danger potentiel de dépôt. Cette différence provient probablement de l'intensif transport trans-épithélial des IgAd via le pIgR, entraînant une diminution rapide des IgA sériques exogènes et limitant, ainsi, le risque d'accession aux reins. Alternativement, la dimérisation pourrait stabiliser cette IgA déficient en N-glycosylation. Ces expériences montrent que l'utilisation d'AcM d'isotype IgA mutantes pour la glycosylation en thérapeutique humaine devrait privilégier les formes au moins partiellement glycosylées, et sans doute également les formes dimériques, au moins lorsqu'un transport muqueux est souhaité.

Les résultats obtenus dans cette étude nous permettent d'affirmer que l'élimination des sites de glycosylation de la ch.H  $\alpha$  de l'IgA2 ne réduit que faiblement ses propriétés effectrices. Le seul glucide dont l'absence entraîne un déficit fonctionnel, est le glycan 459 de la pièce basale, qui semble important pour la CDC. De manière plus pertinente, l'élimination de ce résidu glucidique semble favoriser le risque de dépôts rénaux des IgA administrées chez le patient. Il apparaît, néanmoins, que le mutant IgA2 G2, qui ne possède que 2 sites de glycosylation, ne semble pas prédisposé à se déposer au niveau rénal et pourrait ainsi devenir un candidat thérapeutique permettant une production et une caractérisation plus aisée que pour son homologue WT.

**Feasibility of using glycosylation-deficient variants of human IgA as therapeutic antibodies.**

**Virginie Pascal<sup>1</sup>, Arnaud Debin<sup>2</sup>, Daniel Drocourt<sup>2</sup>, Christelle Oblet<sup>1</sup>, Gérard Tiraby<sup>2</sup>  
and Michel Cogné<sup>1\*</sup>**

Running title:

<sup>1</sup> Université de Limoges, France ; CNRS, Laboratoire d'Immunologie, Faculté de Médecine, F-87025 Limoges, France,

<sup>2</sup> CAYLA-Invivogen, 5 rue Jean Rodier, Toulouse, France

This work was supported by grants from Pôle de compétitivité Cancer Bio Santé and Conseil Régional du Limousin. VP was successively supported by fellowships from the French Ministry for research , CAYLA- Invivogen, and Association pour la Recherche sur le Cancer.

\* To whom correspondence and reprint requests should be addressed:

Pr M. Cogné, CNRS UMR 6101, Laboratoire d'Immunologie, 2, rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges Cedex, France, Phone # 33 555 435 848, Fax 33 555 435 897, [cogne@unilim.fr](mailto:cogne@unilim.fr).

### **Article 3: “Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation”**

(Manuscrit en révision à Proceedings of National Academy of sciences)

Nous avons caractérisé un modèle de *knock-in* permettant chez la souris l'expression quasi exclusive de chaînes lourdes d'immunoglobulines de classe IgA. Nous avons ainsi obtenu des informations sur la fonction du BCR commuté à IgA, et vérifié si une chaîne  $\alpha$  peut se substituer à la chaîne  $\mu$  et promouvoir le développement B ainsi que les réponses B-spécifiques à l'antigène. On sait en effet qu'une chaîne lourde  $\delta$  peut fonctionner de façon quasi-identique à  $\mu$  (Lutz et al., 1998) alors qu'une chaîne  $\gamma$  se comporte au contraire de façon spécifique, moins efficace que  $\mu$  pour la différenciation B précoce mais hyperstimulatrice dans les cellules B matures en cas de pontage du BCR IgG (même si les modalités moléculaires précises de cette hyper-réactivité restent l'objet de controverses (Pogue et Goodnow, Tsubata, Horikawa, Waisman et al., 2007)).

Cette étude nous permet de dire que la chaîne lourde  $\alpha$  est capable de jouer un rôle similaire à celui d'une chaîne lourde  $\mu$  pendant les étapes précoces de la différenciation, à savoir son expression à la membrane et son association avec les modules de signalisation  $Ig\alpha/Ig\beta$  au sein d'un pre-BCR puis d'un BCR, afin de permettre le développement B. Comme pour la chaîne  $\gamma$  le pré-BCR  $\alpha$  se révèle moins efficace qu'un pré-BCR  $\mu$  car on observe un blocage partiel à la transition pro/préB et entre « large pre-BII » et « small pre-BII ». Malgré ce blocage partiel, une population B à IgA de membrane est retrouvée dans tous les compartiments B périphériques. Ces B peuvent être activés après rencontre avec un antigène et être à l'origine d'une réponse spécifique. On remarque également la présence d'anticorps murins d'isotypes différents dans le sérum de ces animaux, indiquant que comme des B à IgM dans le cas de la délétion isolée de  $S\mu$ , les cellules à IgA de membrane forcée peuvent subir un bas niveau restant de commutation de classe, en l'absence de  $S\mu$ .

Le trait phénotypique le plus marqué reste l'hyper-plasmocytose. Ces lymphocytes B à IgA de membrane semblent constitutivement activés à l'état basal et ont une grande facilité à se transformer en plasmocytes après stimulation avec un mitogène, d'où l'abondance de plasmocytes observés dans différents compartiments lymphoïdes périphériques de ces souris.

Ce trait constitue un point commun avec le BCR IgG lui aussi hyperactivable. L'IgA rejoindrait donc selon notre étude l'IgG parmi les BCR surtout effecteurs (c'est-à-dire très efficaces dans les cellules matures stimulées), tandis que la chaîne  $\mu$  comme la chaîne  $\delta$  semblent les plus efficaces composants des pre-BCR et BCR affecteurs qui sous-tendent la maturation B précoce et permettent à chaque clone B de valider son paratope et de rejoindre en fonction du niveau de stimulation que lui confère ce paratope, l'un ou l'autre des compartiments B.

Un dernier point important de notre équipe concerne l'absence d'effet positif de l'expression d'une IgA membranaire sur le homing muqueux des lymphocytes B alors que les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses sont pourtant le lieu préférentiel de résidence des cellules B normales à IgA, validant donc l'hypothèse que le homing muqueux des cellules B normales est initialement réalisé par des cellules à IgM membranaires, qui commutent ensuite sur place vers la classe IgA.

*Ma part de cette étude, a consisté à la réalisation de dosages d'IgA spécifiques au niveau du sérum et des sécrétions, en l'analyse in vitro de la réponse des B purifiés en présence de plusieurs signaux et en la réalisation d'hybridomes antigène-spécifiques.*

# Premature replacement of $\mu$ with $\alpha$ immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation

**Sophie Duchez<sup>1</sup>, Rada Amin<sup>1</sup>, Nadine Cogné<sup>1</sup>, Laurent Delpy<sup>1</sup>, Christophe Sirac<sup>1</sup>, Virginie Pascal<sup>1</sup>, Blaise Corthésy<sup>2</sup> and Michel Cogné<sup>1\*</sup>**

Running title: IgA-driven B cell differentiation and maturation.

<sup>1</sup> Laboratoire d'Immunologie, CNRS UMR6101, Equipe labellisée « La Ligue », Faculté de Médecine, F-87025 LIMOGES, FRANCE,

<sup>2</sup> R&D Laboratory of the Division of Immunology and Allergy, State University Hospital (Centre Hospitalier Universitaire Vaudois), Rue du Bugnon, BH 19-650, 1011 Lausanne, Switzerland.

This work was supported by grants from Réseau SWITCH, Ligue Nationale contre le Cancer and Conseil Régional du Limousin. SD was supported by a fellowship from Région Limousin and by Fondation pour la Recherche Médicale.

\* To whom correspondence and reprint requests should be addressed:

Pr M. Cogné, CNRS UMR 6101, Laboratoire d'Immunologie, 2, rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges Cedex, France, Phone # 33 555 435 848, Fax 33 555 435 897, [cogne@unilim.fr](mailto:cogne@unilim.fr).

DISCUSSION  
&  
PERSPECTIVES

## **1. Amélioration des outils biotechnologiques pour la production et l'évaluation des Immunoglobulines IgA.**

Alors que les premières études concernant les IgA utilisaient principalement des protéines de myélome purifiées, les progrès en ingénierie moléculaire des protéines permettent maintenant la génération de formes recombinantes d'IgA. Comme pour les autres classes d'Ig, ces techniques permettent la production d'IgA possédant une spécificité bien définie, en quantité suffisante pour des essais précliniques et potentiellement pour des tests cliniques. Il a été montré de plus qu'un assemblage correct des quatre composants de l'IgA sécrétoire (chaîne lourde  $\alpha$ , chaîne légère, chaîne J et composant sécrétoire) pouvait être réalisé *in vitro*. Ainsi, au cours des dix dernières années, un grand nombre d'anticorps chimérique de classe IgA ont été produits contre diverses cibles potentielles tumorales ou virales (Terskikh et coll. 1994; Huls et coll. 1999; Dechant et coll. 2007). L'expression d'IgA recombinante a été obtenue dans plusieurs systèmes d'expression, notamment dans des cellules de mammifères, (Johansen et coll. 1999), d'insectes (Carayannopoulos et coll. 1994) et de végétaux (Bomsel et coll. 1998) mais aussi dans le lait d'animaux transgéniques (Bioprotein Technologies).

Néanmoins, ces méthodes moléculaires ne permettent d'obtenir que des IgA recombinante associées de manière artificielle aux régions variables d'autres anticorps, la plupart du temps d'IgG, déjà bien définis et développés pour une application précise. L'obtention d'anticorps monoclonaux innovants utilise principalement, encore aujourd'hui, la méthode traditionnelle de productions d'hybridomes après immunisation d'un animal, le plus souvent la souris, avec un antigène d'intérêt. Sur une souris de type sauvage cette méthode aboutit à l'obtention d'AcM presque exclusivement de classe IgG. Pour pallier à cette limite, notre équipe a créé des animaux transgéniques pour lesquels la séquence de commutation de classe  $S\mu$  des chaînes lourdes d'immunoglobulines a été remplacée par un transgène codant pour la région constante  $C\alpha 1$  des Ig. Les souris de cette lignée dénommée  $\alpha 1KI$  produisent essentiellement des Ig de classe IgA dont le domaine constant de la chaîne lourde est humanisé et dont les domaines variables sont d'origine murine (Cogné et coll. 2005). Dans ces souris, la multiplicité des gènes V et la possibilité de mutation et de recombinaison somatique de ces gènes, permet l'obtention d'une très large diversité d'IgA spécifiques en réponse à une stimulation antigénique. La technologie classique d'isolement d'hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux par fusion d'un myélome avec des plasmocytes de la

rate s'applique parfaitement à ces animaux. De nombreux hybridomes sécréteurs d'IgA1 spécifiques de divers antigènes viraux ou tumoraux ont déjà été isolés et plusieurs sont en cours de caractérisation par l'équipe de l'entreprise B-Cell Design qui exploite ce brevet.

Ces souris constituent non seulement un outil très efficace pour la génération d'anticorps monoclonaux contre des cibles thérapeutiques, mais également un modèle animal utilisable pour évaluer *in vivo* un effet thérapeutique potentiel de ces mêmes anticorps. En effet, l'administration d'IgA humaine dans une souris sauvage aboutit assez rapidement (de quelques jours à quelques semaines) à l'apparition dans le sérum des animaux d'IgG anti-IgA humaine qui entraînent l'élimination rapide des IgA exogènes. A l'inverse, les souris  $\alpha 1$ KI ne semblent pas élaborer de réaction immune lors de l'administration d'IgA humaine, permettant ainsi des immunisations passives successives sans besoin d'immunosuppression ou d'utilisation d'animaux immunodéficients. Un autre aspect limitant dans l'évaluation du potentiel thérapeutique des IgA chez la souris concerne l'absence d'un homologue du récepteur Fc $\alpha$ RI chez ces animaux. Cette limitation a été surmontée par la création d'une lignée murine transgénique exprimant le Fc $\alpha$ RI humain, chez laquelle l'expression cellulaire de ce récepteur ainsi que sa régulation par des cytokines est similaire à celle observée chez l'homme (van Egmond et coll. 1999). En effet chez ces animaux, l'expression et la fonction du Fc $\alpha$ RI humain est tributaire d'une co-expression avec la chaîne de signalisation FcR $\gamma$  (van Egmond et coll. 1999) ; ainsi, l'administration de G-CSF entraîne une augmentation des capacités de phagocytose des cellules hépatiques de ces souris (Stockmeyer et coll. 2000). Le croisement de ces animaux avec la lignée transgénique  $\alpha 1$ KI nous a permis de mettre au point un nouveau modèle d'étude *in vivo* cherchant à mimer la situation de l'organisme humain. Cette double lignée transgénique présente un intérêt considérable pour l'évaluation de l'activité thérapeutique des IgA *in vivo*, en particulier dans des expériences d'immunisation passive d'animaux greffés d'une masse tumorale. La mise en place de ces expériences nécessite néanmoins l'obtention d'animaux de fond génétique pur qui a été initiée il y a plusieurs mois au laboratoire.

Une autre avancée technologique qui a permis d'améliorer les méthodes de production des IgA concerne la mise au point de nouveaux procédés de purification de ces anticorps. Une purification maximale est demandée pour toutes protéines injectées chez un animal. Cette exigence a pu être remplie pour les IgG thérapeutiques en grande partie grâce à l'existence de protéines d'origine bactérienne spécifiquement affines pour cette classe d'immunoglobulines.

De nombreux fournisseurs proposent deux de ces protéines (protéine A de Staphylocoque et protéine G de Streptocoque) fixées sur divers supports solides pour des purifications par chromatographie d'affinité. La purification des IgA est beaucoup plus laborieuse en particulier pour l'IgA2 pour laquelle aucun système de purification par affinité n'était commercialisé. Des protéines bactériennes pouvant se fixer spécifiquement à des IgA ont bien été décrites mais à l'exception d'une protéine M de Streptocoque et plus spécifiquement un fragment désigné SAP (pour streptococcal IgA-binding peptide) de cette protéine, elles n'ont pas été exploitées pour cette propriété. Le peptide SAP fixé sur support solide peut-être utilisé pour une purification par affinité en une seule étape de toutes les IgA sous leur forme monomérique ou dimérique (Sandin et coll. 2002). La lectine jacaline est une autre protéine de fixation des IgA d'origine végétale dont l'utilisation est limitée à la purification des seules IgA1, le support de reconnaissance se trouvant sur la chaîne O-glycosylée (Monteiro et coll. 1985). Cette propriété de la jacaline est intéressante pour fractionner les IgA1 d'un mélange d'IgA séparées par affinité sur colonne SAP. Un autre support solide greffé avec la toxine SSL7 de *Staphylococcus aureus* est maintenant également disponible pour la purification des deux formes d'IgA (Langley et coll. 2005).

## **2. Glycosylation et risque de pathogénicité des IgA**

Malgré ces nombreuses améliorations techniques, de gros efforts restent à fournir sur le plan technologique avant de pouvoir imaginer l'avènement thérapeutique des anticorps de classe IgA. En effet, leur utilisation en comparaison des IgG, présente de sérieux obstacles qui résident aussi bien dans leur production, leur purification, leur caractérisation, leurs propriétés physico-chimiques, et les incertitudes quant à la possibilité de les administrer à un organisme vivant dans un but d'immunothérapie passive.. L'un de ces limitations concerne sans aucun doute leur fort niveau de glycosylation. En effet, la caractérisation complète des nombreux sites de glycosylation de la chaîne lourde de l'IgA (allant jusqu'à 7 glycanes) paraît bien complexe à mettre en place dans l'hypothèse d'une production d'anticorps à l'échelle industrielle. Elle représente pourtant un pré-requis indispensable lors d'évaluation de l'anticorps en essais clinique et paraît d'autant plus importante lors de l'utilisation d'IgA. En effet, la nature des motifs des chaînes latérales glycosylées peut jouer un rôle important dans la fonction biologique des IgA, en particulier lors de leur interaction avec des récepteurs cellulaires (Rifai et coll. 2000). Les néphropathies par accumulation des IgA1 au niveau des

cellules mésangiales pourraient, ainsi, avoir pour origine une absorption anormale sur un récepteur du fait d'une glycosylation incomplète des chaînes O-glycosylées (Launay et coll. 2000; Moura et coll. 2001). D'autre part, il est maintenant bien décrit que la souris ajoute un groupement galactosyl supplémentaire en fin de chaîne à certains motifs glucidiques contrairement aux hominidés qui ont perdu la capacité de faire cette transformation par mutation au cours de l'évolution. Cette  $\alpha$ -galactosylation, ajoutée au fait que les rongeurs peuvent utiliser pour leur sialylation un variant de l'acide sialique, l'acide N-glycosylneuraminique (NGNA), compromet l'utilisation de systèmes de production des glyco-protéines par des systèmes cellulaires issus de rongeurs ; en effet, ces systèmes pourraient créer des épitopes sucrés anormaux, potentiellement cibles ultérieures d'une réponse immunitaire en cas d'administration à l'homme des glycoprotéines concernées. Le sang humain contient ainsi des anticorps naturels dirigés contre les motifs «  $\alpha$ -gal ». Notons que ce point ne semble pas constituer un problème pour les IgG thérapeutiques, sans doute du fait de leur faible glycosylation (l'unique chaîne glycosylée étant relativement « enfouie » au sein de la structure tertiaire chaîne lourde  $\gamma$ , rendant sans doute ce motif galactosylé éventuel peu accessible à des anticorps). Hybridomes et myélomes murins possèdent, semble-t-il à des degrés divers, l'activité  $\alpha$ -galactosyl-transférase responsable de cette modification.

Afin d'essayer de limiter les problèmes potentiels liés à la forte glycosylation des IgA, il nous est apparu important d'évaluer la possibilité d'utilisation de mutants possédant une glycosylation réduite, voir inexistante dans une application thérapeutique. Nous avons ainsi pu observer que l'élimination des glycanes de la chaîne lourde de l'IgA n'altère que peu ses fonctions biologiques *in vitro*. Cependant nous avons aussi observé qu'une déglycosylation complète de l'IgA semblait réduire fortement sa stabilité et/ou sa solubilité sérique, aboutissant à l'apparition rapide de dépôts d'IgA sur les glomérules rénaux lors de son administration chez la souris, surtout avec la forme monomérique de l'IgA. Il apparaît donc que l'utilisation d'IgA déficientes dans leur glycosylation semble possible mais en maintenant dans tout les cas le glycane de la région charnière, situé sur l'asparagine 459, qui semble indispensable pour la stabilité sérique de la molécule. Une molécule hybride IgA2/IgA1, limitée pour ses N-glycosylations à celle présentes sur l'IgA1, mais dépourvue du hinge des IgA1 (et donc de ses O-glycosylations) nous semble ainsi comme méritant de poursuivre des explorations en vue d'applications thérapeutiques, dans la mesure où toutes ses propriétés biologiques semblent respectées sans que ne soient induites de propriétés toxiques ou d'instabilité de la protéine. Avant de pouvoir valider le développement de ces formes

mutantes d'anticorps pour d'autres cibles, il nous reste cependant un aspect important à étudier. En effet, les observations réalisées sur les IgA hypoglycosylées dans le compartiment sanguin, nous amènent à penser que les glycanes de la chaîne lourde auraient préférentiellement un rôle dans la stabilité de l'anticorps *in vivo* plutôt que dans sa fonctionnalité. Il apparaît alors primordial de mesurer la stabilité de nos IgA mutantes *in vivo*, dans les divers compartiments humoraux, après administration à un animal receveur. Outre la demi-vie sériques, il conviendra aussi de tester les sécrétions digestives, et de s'assurer que la demi-vie de l'anticorps muqueux et/ou sa résistance aux protéases n'est pas altérée lors de l'élimination de l'un ou l'autre de ses glycanes. Il serait aussi intéressant de pouvoir vérifier dans la lumière muqueuse si ces IgA variantes reproduisent la tendance naturelle des IgA à se concentrer au contact de l'épithélium au niveau du mucus (une propriété que l'on considère habituellement comme plus médiée par le composant sécrétoire associé que par l'IgA elle-même)

### **3. IgA et immunothérapie anticancéreuse : l'approche anti-CD20**

Depuis ces dernières années, le rituximab (IgG1 chimérique anti-CD20) a considérablement fait évoluer la stratégie thérapeutique contre les lymphopathies, particulièrement contre les lymphomes « non-Hodgkiniens » (NHL). Depuis peu, d'autres anticorps monoclonaux anti-CD20 reconnaissant d'autres épitopes du CD20 ou plus fortement inducteurs d'ADCC grâce à des interactions plus fortes avec Fc $\gamma$ RIIIa viennent aussi compléter l'arsenal thérapeutique (veltuzumab, ofratumumab...). Le rituximab, seul ou en combinaison avec les chimiothérapies, s'est montré efficace dans le traitement des NHL à différents stades d'évolution. Cependant, 30 à 50% des patients restent totalement résistants à tout traitement. Les causes exactes de ces résistances ne sont pas encore parfaitement identifiées : plusieurs hypothèses sont soulevées, notamment le taux faible d'expression de CD20 à la surface de certains lymphomes, la masse tumorale trop importante pour une pénétration efficace de l'Ig, la surexpression par la tumeur d'inhibiteurs membranaires du complément et/ou la présence d'un polymorphisme du récepteur Fc $\gamma$ RIII réduisant considérablement le potentiel ADCC de l'anticorps. Dans ce contexte, nous avons évalué une solution alternative aux immunothérapies par les IgG en produisant des IgA monoclonales humanisées possédant la même spécificité de reconnaissance que le rituximab mais qui, du fait de la différence de classe, offrent la possibilité d'induire des mécanismes biologiques

alternatifs. Il resterait bien sûr à démontrer que ces mécanismes alternatifs pourraient être actifs dans certains cas de résistance aux traitements par IgG, où bien se révéleraient capables de synergie avec l'IgG. L'un des arguments phare du choix de la classe IgA résidait notamment dans la récente mise en évidence du potentiel anti-tumoral des neutrophiles par un déclenchement de l'ADCC via le récepteur Fc $\alpha$ RI, aboutissant à la lyse de diverses cibles tumorales, documentée par diverses équipes (Huls et coll. 1999; Dechant et coll. 2002; Otten et coll. 2005).

Malgré de nombreux essais, nous n'avons pas réussi à reproduire cette induction d'ADCC, *in vitro*, sur notre modèle CD20 en présence de neutrophiles humains purifiés. L'utilisation des souris transgénique CD89+ nous a permis de constater que cette activité pouvait, néanmoins, s'opérer *in vivo* mais dans une faible mesure. En réalité, il semble que le mécanisme préférentiel utilisé par les IgA pour la lyse des lignées CD20 repose sur le recrutement de la cascade cytotoxique du complément. Les nombreuses études ayant évalué le potentiel anti-cancéreux des IgA avait pourtant décrit cet isotype comme incapable de recruter efficacement la CDC. Même si elle est clairement présente, il faut reconnaître que cette capacité de CDC s'est avérée cependant moins efficace que celle médiée par l'IgG1. En fait, les IgA anti-CD20 ne surpassent le rituxan que dans des tests mesurant les effets directs de l'anticorps, en particulier pour l'inhibition de la croissance cellulaire. De la même façon, l'évaluation du potentiel thérapeutique des IgA, *in vivo*, s'est avérée ambivalente. Certes, nous avons montré pour la première fois qu'une IgA anti-lymphome pouvait présenter un fort potentiel thérapeutique dans le compartiment sanguin, mais nous avons aussi constaté qu'elle était moins efficace que son homologue IgG1. Ce modèle d'étude *in vivo* souffre cependant de l'absence d'un récepteur effecteur aux IgA chez les animaux utilisés, sous-estimant ainsi potentiellement ce que pourrait apporter une IgA spécifique en thérapeutique humaine, et la validation de ces conclusions nécessitera certainement l'adaptation de ce modèle dans les souris transgénique CD89.

En parallèle, nous avons également tenté d'évaluer dans des expériences supplémentaires *in vitro* en sang total, le potentiel d'une bi-thérapie, utilisant un cocktail d'IgG1 et d'IgA anti-CD20 contre une lignée de lymphomes B. Les résultats de ces expériences ont montré que la présence de l'IgA n'améliorait pas l'effet cytotoxique global observé avec l'IgG1 seule et qu'au contraire elle contribuait à inhiber le potentiel cytotoxique de ce dernier, lors d'utilisation à des concentrations sub-optimales.

Il est bien entendu impossible de généraliser les résultats que nous avons obtenus sur le modèle CD20 à l'ensemble des cibles tumorales qui pourraient être visées par les IgA. En effet, le faible recrutement ADCC et à l'inverse le réel potentiel CDC vont à l'encontre de la plupart des études publiées jusqu'ici sur le potentiel thérapeutique des IgA. Il apparaît donc que, comme souvent décrit pour les IgG, ce potentiel dépend en grande partie de la cible oncologique visée et de la lignée cellulaire utilisée, d'une façon probablement notamment modulée par le spectre des inhibiteurs membranaires du complément que peut exprimer chaque lignée. Néanmoins, au regard de la faible demi-vie sérique de l'IgA, il apparaît raisonnable d'affirmer que cet isotype ne pourra réellement concurrencer l'IgG sur une cible tumorale que s'il est capable d'associer ses effets directs à un recrutement efficace des neutrophiles et à un certain degré d'activation de la cascade cytotoxique du complément.

#### **4. Dualité des fonctions de l'IgA via le récepteur Fc $\alpha$ RI**

Au cours des dix dernières années, les travaux publiés par les équipes de Thomas Valerius et Jan G. J. van de Winkel ont largement contribué à modifier le point de vue jusqu'à là établi quant au caractère « anti-inflammatoire » des IgA sériques. En effet, leurs publications relatent plutôt un rôle activateur des IgA sur les polynucléaires neutrophiles, mesuré dans la majeure partie des cas par ADCC *in vitro* sur une cible cellulaire tumorale (Dechant et coll. 2002; Otten et coll. 2005). Ces études ont également contribué à élever les neutrophiles au rang de population cellulaire effectrice attractive dans le cadre d'immunothérapie par anticorps. De nombreuses preuves de l'activité cytolytique de ces cellules ont été obtenues, *in vitro*, sur une large variété de cellules tumorales et plusieurs études, *in vivo*, ont démontré un rôle important de cette population dans les traitements anti-cancéreux (Midorikawa et coll. 1990). Les neutrophiles activés sécrètent, de plus, une pléthore de médiateurs inflammatoires et de cytokines qui contribuent à l'attraction d'autres cellules immunitaires tels que des monocytes, des cellules dendritiques et des cellules T, favorisant ainsi la généralisation de la réponse immune anti-tumorale (Scapini et coll. 2000). L'expression constitutive du récepteur Fc $\alpha$ RI à la surface de cette population myéloïde, ainsi que sur d'autres populations effectrices regroupant les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les éosinophiles, a fait de ce récepteur une cible de choix pour l'immunothérapie anti-tumorale.

Dans le même temps, cependant, d'autres études ont réaffirmé l'activité anti-inflammatoire des IgA en décrivant notamment un rôle important du Fc $\alpha$ RI dans l'inhibition des fonctions effectrices des cellules qui l'expriment. Il apparaît ainsi, qu'une liaison de l'IgA ou d'un anti-Fc $\alpha$ RI sur ce récepteur peut également contribuer à l'inactivation des effets cytotoxiques médiés par les immuno-récepteurs hétérologues Fc $\epsilon$ RI et Fc $\gamma$ R (Pasquier et coll. 2005), aboutir au déclenchement d'un programme apoptotique des cellules exprimant le récepteur (Kanamaru et coll. 2007), ou encore réduire le développement de maladies inflammatoires (Kanamaru et coll. 2008). De manière générale, ces études s'accordent sur le fait qu'une préalable liaison de l'IgA avec son antigène est déterminante dans l'orientation de la réponse cellulaire vers signalisation pro- ou au contraire anti-inflammatoire lors du cross-link du récepteur Fc $\alpha$ RI.

Les difficultés que nous avons rencontrées dans l'évaluation de l'activité ADCC de nos IgA anti-CD20 pourraient s'expliquer, en partie, par les fonctionnalités ambivalentes du récepteur Fc $\alpha$ RI. En effet, nous avons montré que ces IgA étaient capables de recruter un nombre important de polynucléaires neutrophiles sur une cible cellulaire. Cependant, *in vitro*, nous ne mesurons aucune lyse spécifique des cellules opsonisées, relative à ce recrutement. Nous avons pu néanmoins observer, que l'incubation de sang humain avec un complexe IgA anti-CD20/Ag fixé sur un support, aboutissait à une réponse cellulaire des neutrophiles, mesurée par une surexpression membranaire du marqueur d'activation CD11b. A l'opposé, une incubation similaire en présence de complexes IgA/Ag solubles n'entraîne pas de surexpression de ce marqueur. Ces observations illustrent peut-être l'importance du degré d'aggrégation des IgA s'associant au récepteur Fc $\alpha$ RI dans le déclenchement de l'activation cytotoxique des neutrophiles, et pourraient traduire une vocation des IgA à reconnaître plutôt des antigènes particuliers tels que des corps bactériens ou des virus. Dans ce cadre, il est également important de noter que nous n'avons pas réussi à répéter ces expériences d'activation sur une population de neutrophiles humains purifiés. Pour cette population, les méthodes d'isolement les plus populaires utilisent des gradients de densité réalisés avec des polymères de glucose (Ficoll) ou avec des particules de gel de silice (Percoll). Bien que couramment utilisées pour la purification de la plupart des populations leucocytaires, l'adaptation de ces méthodes à l'isolement de neutrophiles ne semble pas sans conséquence sur le niveau d'activation et/ou la fonctionnalité de ces derniers (Venaille et coll. 1994). En réalité, il est probable que la purification des neutrophiles s'accompagne dans la majeure partie des cas, d'une modification, même minime, de leur état physiologique qui aboutit à leur

mort rapide quelques heures seulement après leur isolement. Il apparaît alors qu'une observation réalisée, *in vitro*, sur une population de neutrophiles purifiés pourrait s'avérer biaisée par une modification de la réactivité cellulaire des cellules induite lors de leur purification. Cette constatation s'ajoute à la difficulté d'appréhension du rôle ambivalent de l'IgA sur cette population leucocytaire.

La compréhension de ces mécanismes semble pourtant indispensable dans l'éventualité d'une l'utilisation d'IgA thérapeutique chez l'homme. En effet, il apparaît que l'administration d'une IgA anti-tumorale pourrait aboutir à une action ambivalente, combinant dans le même temps, en fonction d'une préalable liaison à l'antigène, des effets cytotoxiques intéressants dans les traitements anti-cancéreux ou à l'inverse une inhibition du système immunitaire qui pourrait s'avérer dangereuse dans l'évolution de la maladie. Dans d'autres applications thérapeutiques, c'est d'ailleurs peut-être plutôt ce versant anti-inflammatoire qui pourrait être recherché. Dans tous les cas, la bi-fonctionnalité nécessite donc un discernement précis, *in vivo*, des mécanismes contrôlant l'une ou l'autre de ces deux réponses antagonistes et une évaluation systématique de la prédisposition pro et/ou anti-inflammatoire de toute IgA développée avec un objectif d'application thérapeutique.

## **5. Potentiel thérapeutique des immunoglobulines d'isotype IgA**

### 5.1. Fonctions bloquantes ou agonistes

L'une des applications thérapeutique des AcM réside dans leur capacité d'altération ou d'activation de certaines réponses biologiques. Dans ce cadre, les exemples les plus nombreux concernent le potentiel bloquant de certains anticorps spécifiques de récepteurs impliqués dans la croissance ou la survie des cellules tumorales (Ghosh et coll. 2003; Sandborn et coll. 2007). Il apparaît que lorsque la neutralisation d'une cytokine ou d'un récepteur est l'objectif central, une activité effectrice excessive peut être préjudiciable, en particulier si la cible est aussi exprimée à la surface des cellules saines. Ainsi, plusieurs approches alternatives à l'administration d'IgG1 ont été développées avec l'utilisation d'anticorps bloquants de classe IgG4 (natalizumab, anti chaîne d'intégrine  $\alpha 4$ ) et IgG2 (panitumumab, anti-EGF-R), une classe connue pour sa faible capacité activatrice (Stebbing et coll. 2007 ; Jefferis, 2009). Plus récemment, un fragment Fab anti-TNF $\alpha$  a également été validé pour le traitement de la maladie de Crohn (Melmed et coll. 2008).

Dans l'article 1, nous avons montré que l'IgA pouvait également présenter des fonctions effectrices directes intéressantes et éventuellement supérieures à l'IgG dans certaines conditions. En effet, l'IgA anti-CD20, sous sa forme dimérique, est plus efficace que son homologue IgG1 pour l'inhibition de la prolifération cellulaire de plusieurs lignées de lymphome B. Bien que cet isotype soit aussi capable d'induire une réponse immunitaire inflammatoire, ses capacités dans ce domaine sont inférieures à celles de l'IgG1, lui conférant un potentiel intéressant en tant que candidat/médicament dans les applications pour lesquelles l'AcM doit jouer un rôle d'agoniste ou d'agent neutralisant.

La première utilisation d'IgA thérapeutique chez l'homme concernait justement l'exploitation du caractère neutralisant de l'IgA. En 1995, l'équipe du Pr. Hetch rendait publics les résultats d'une étude clinique de phase I, dans laquelle 27 patients atteints de cancer réfractaire évolué avaient été traités avec des doses croissantes d'IgA murine anti-récepteur de la transferrine (Brooks et coll. 1995). La transferrine est impliquée dans l'absorption cellulaire de fer sérique et joue un rôle important, en outre, dans l'activité proliférative des cellules tumorales. Les résultats de cette étude clinique ont montré que l'IgA thérapeutique avait bien été tolérée malgré une large expression de ce récepteur par les tissus normaux. Suite à cette administration, les patients présentaient une augmentation de la concentration de la ferritine dans le sérum et une diminution dose-dépendante du taux sérique du récepteur à la transferrine. L'un des avantages importants de l'utilisation d'IgA murine dans ce type de thérapie réside dans son incapacité à recruter le récepteur Fc $\alpha$ RI humain réduisant de manière importante le risque de réaction inflammatoire. Cependant, comme lors de l'administration d'IgG murine, 1/6 des patients impliqués dans cette étude, ont présenté une réponse HAMA réduisant les possibilités de ré administration ultérieure de l'IgA thérapeutique.

Aujourd'hui encore, un certain nombre d'industriel s'intéressent de près aux fonctions neutralisantes des IgA. Ainsi, une application pourrait voir le jour dans une utilisation combinée avec une chimiothérapie. En effet, l'efficacité des molécules utilisées en chimiothérapie est parfois limitée par l'apparition de réaction inflammatoire de la muqueuse intestinale, de la cavité buccale et/ou de l'œsophage nécessitant parfois une médication supplémentaire et qui s'accompagnent dans la majorité des cas d'une rapide alopecie. La société Planet Biotechnology a développé une IgA sécrétoire humaine anti-doxorubicine (*DoxoRX*®), qui permettrait de neutraliser, par voie topique ou orale, la toxicité de la

doxorubicine sans compromettre son activité anti-tumorale. L'efficacité de tels anticorps sur l'alopécie a été mise en évidence chez le rat (Balsari et coll. 1994) et plus récemment lors d'une étude préclinique chez l'homme. Il n'existe pas à ce jour, à notre connaissance, d'IgA développée pour une action agoniste. Il apparaît pourtant que l'isotype IgA semble présenter des prédispositions tout à fait intéressantes dans ce domaine.

## 5.2. Prédominance des muqueuses dans les applications thérapeutiques

L'un des espoirs les plus importants dans le développement d'IgA thérapeutique réside sans aucun doute dans la possibilité de pouvoir cibler directement les compartiments muqueux. En effet, quelque soit son potentiel thérapeutique, la très courte demi-vie sérique de l'IgA représente toujours un obstacle dans une application systémique. Au contraire, le transport trans-épithélial de cet anticorps vers la lumière des muqueuses et la récente découverte de son retro-transport vers la lamina propria lui confèrent des caractéristiques uniques qui constituent déjà le fondement de nombreuses pistes thérapeutiques utilisant cet isotype.

Plusieurs études ont déjà démontré que des IgA injectées par voie intraveineuse pouvaient atteindre les sécrétions nasales, les fluides broncho-alvéolaires (Steinmetz et coll. 1994) ainsi que le compartiment intestinal (Mazanec et coll. 1989). D'autre part, des indications importantes sur les mécanismes de transport des IgA ont été obtenues à partir des souris déficientes pour la chaîne J (Hendrickson et coll. 1996). Ces animaux présentent des taux sériques d'IgA élevés, et une absence complète d'IgA sécrétoire. Les niveaux d'IgA des sécrétions biliaires et fécales de ces souris sont également diminués, alors que les concentrations d'IgA dans leur lait maternel et leurs sécrétions nasales ne sont pas significativement différentes. De manière plus étonnante, les niveaux d'IgA des souris  $J^{-/-}$  dans les liquides broncho-alvéolaire sont plus élevées que chez les souris contrôle. Ces données suggèrent qu'il existe des mécanismes de passage des IgA vers les muqueuses, indépendants du pIgR qui peuvent varier en fonction du site muqueux observé. Globalement, ces données montrent également que les mécanismes de transport des IgA vers les différents compartiments muqueux de l'organisme sont encore mal connus, et c'est encore plus le cas pour ce qui concerne le transport des IgA exogènes. Une meilleure connaissance de ce dernier aspect constitue ainsi une priorité pour le développement d'anticorps de classe IgA. Plus

précisément, la connaissance du devenir d'une IgA après une injection par voie intraveineuse ou lors d'une administration orale, permettrait d'orienter de manière plus efficace l'évaluation du potentiel thérapeutique de cet anticorps.

Dans ce cadre, la finalisation de notre étude des IgA anti-CD20 nécessite une évaluation de leur activité cytotoxique dans un compartiment muqueux. Pour l'instant, nous avons pu montrer que des IgA dimériques administrées par voie sanguine ou péritonéale pouvaient atteindre, en quelques heures, la lumière intestinale. Nous n'avons pas pu nous procurer d'anticorps anti-pièce sécrétoire murine qui nous auraient permis de valider la présence de ce récepteur tronqué sur les IgA humaines récupérées dans les fluides intestinaux des souris. Néanmoins, nous avons montré que ce passage était dramatiquement réduit lors de l'administration d'IgA monomérique suggérant un rôle du récepteur pIgR dans le transport des dimères. De manière étonnante, nous avons également observé un passage des IgG vers ce compartiment intestinal lors de leur injection par voie intraveineuse, entraînant cependant une concentration dans les fluides intestinaux beaucoup plus faible que celle mesurée lors de l'administration d'IgA dimérique. L'étape suivante consistera donc à comparer l'activité biologique de ces deux formes dans la lumière intestinale. Les expériences préliminaires réalisées dans ce domaine tendent pour l'instant, à montrer que les dimères d'IgA pourraient présenter une supériorité thérapeutique dans ce compartiment. Les enjeux et les résultats de cette étude sont importants car ils pourraient concerner de nombreux cancers affectant les muqueuses et leurs annexes glandulaires, notamment à des stades peu invasifs et peu vascularisés. Dans ce cadre, les cancers digestifs apparaissent comme des cibles majeures, tout comme les cancers des voies respiratoires supérieures, de l'appareil génito-urinaire (prostate, col de l'utérus) ou encore du sein.

En dehors de leur potentiel cytotoxique, les IgA sont avant tout connues pour leur rôle protecteur dans la lumière des muqueuses qui s'exerce par la neutralisation de pathogènes ou de toxines empêchant leur entrée dans l'organisme. Cette fonction est à l'origine du développement de divers anticorps thérapeutiques de classe IgA qui comprennent essentiellement des IgA antivirales. Le grand avantage de ces anticorps réside dans leur mode d'administration : ils sont directement adressés vers les muqueuses lors d'immunisation passive orale ou nasale selon le compartiment ciblé et ils sont supposés être ensuite résistants à la protéolyse au sein de ces sécrétions. Dans ce cadre, de nombreux exemples d'immunisation passive, réalisées chez la souris, ont démontré le potentiel d'IgA administré

par voie nasale dans la réduction du titre viral notamment lors d'infection par le virus de l'influenza, le virus Sendai ou le virus syncytial (pour revue, Weltzin and Monath 1999). Plusieurs études ont également été réalisées chez l'homme. La plupart d'entre elles ont consisté en l'administration par pulvérisation nasale d'un pool d'IgA antivirales aboutissant dans la plupart des cas à une réduction significative du taux d'infection des voies respiratoires pendant quelques semaines (Weltzin and Monath 1999). Un des exemples d'administration d'IgA par voie orale concerne l'utilisation de sIgA monoclonale murine, dirigée contre une protéine d'adhésion de *streptococcus mutans*, qui a été administrée localement dans la cavité buccale de volontaires en bonne santé. Dans cette étude, les sIgA ont montré un effet prolongé par rapport aux l'IgG dans l'inhibition de la recolonisation buccale des streptocoques oraux, démontrant un potentiel préventif dans le contrôle de l'apparition de caries (Ma et coll. 1998). Dans ce domaine, l'un des aspects qui nous intéresse particulièrement concerne le rétro-transport des IgA décrit dans le compartiment intestinal via les cellules M des plaques de Peyer (Weltzin and Monath 1999). En effet, il a été montré que ce rétro-transport de complexes IgA/Ag pouvait, dans certain cas, jouer un rôle d'inhibition des voies pro-inflammatoires et induire une tolérance de l'antigène endocyté. A l'inverse, en présence d'adjuvant, ce même transport peut aboutir à l'induction d'une réponse immune inflammatoire contre l'antigène opsonisé. Ce mécanisme reflète encore une fois la dualité fonctionnelle de l'IgA dont le rôle principal au niveau des muqueuses et de maintenir l'homéostasie tissulaire mais qui doit aussi être capable de donner le premier signal d'alarme de l'invasion d'un pathogène. L'utilisation thérapeutique de ce rétro-transport doit donc être utilisée de manière prudente. Néanmoins, le potentiel tolérogène d'une IgA via ce transport nous semble particulièrement intéressant à développer en particulier pour le traitement d'allergie alimentaire.

Ainsi, les potentielles applications d'IgA en thérapie humaine sont multiples et variées. Elles présentent tout à la fois, des activités antivirales, anticancéreuse mais aussi un fort potentiel neutralisant et peut-être des capacités dans l'induction de tolérance. Bien que les outils technologiques permettant de les étudier se soient accumulés au cours de ces dernières années nos connaissances de cet isotype, et en particulier la compréhension de ses différentes fonctions parfois antagonistes, restent malgré tout relativement limitées. Néanmoins, les données s'amassent, rendant de plus en plus concrète une possible entrée des IgA dans la famille des anticorps monoclonaux à visée thérapeutique...

# ANNEXES

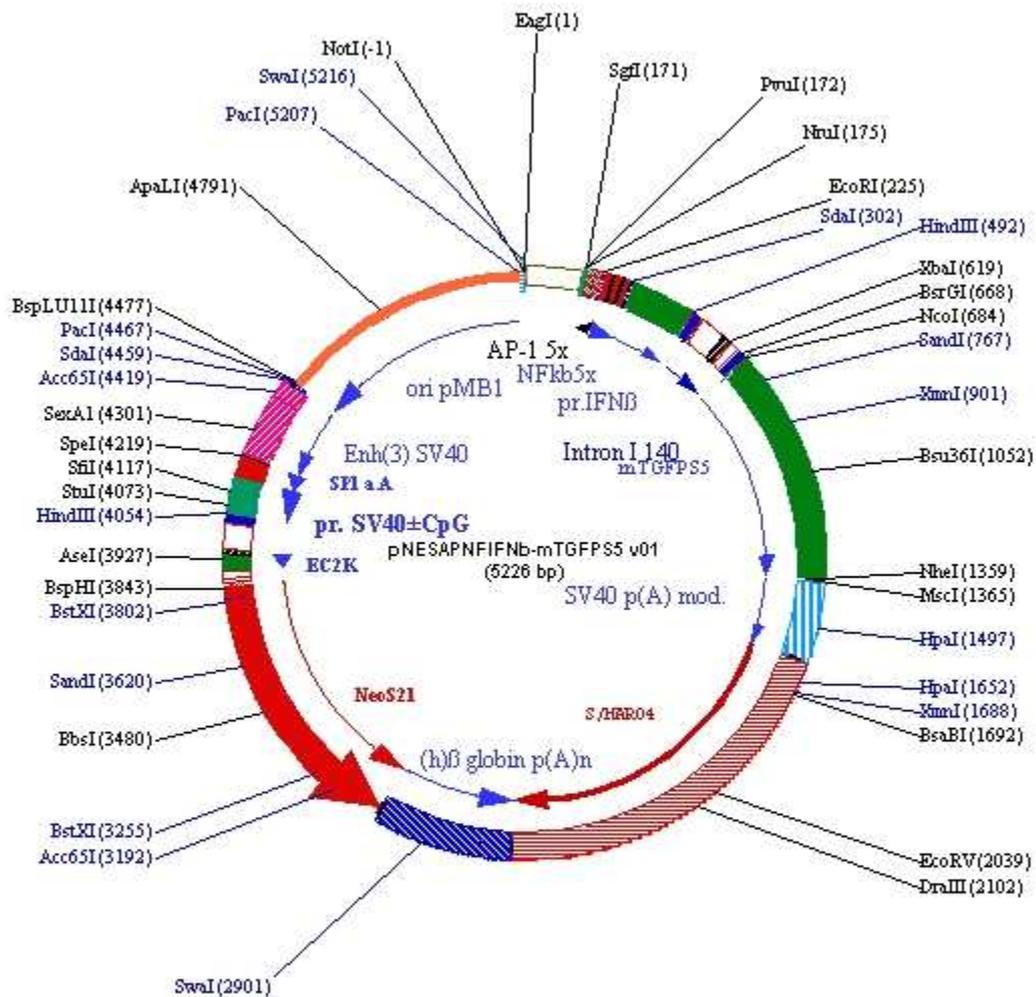
# *Création de modèles murins rapporteurs de l'activité NFκB*

## **1. Etude des TLR et systèmes rapporteurs NFκB**

De manière indépendante de l'étude des IgA thérapeutiques, mon programme de thèse comprenait également un projet d'intérêt appliqué, pertinent à l'activité R&D de l'entreprise Cayla-Invivogen sur les récepteurs Toll et au savoir-faire du laboratoire concernant la création de souris transgéniques.

La famille des Toll-Like récepteurs (TLR) joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée lors de l'invasion d'agents pathogènes dont ils sont capables de reconnaître les structures. Ces récepteurs hautement conservés au cours de l'évolution (homologues du gène Toll de la drosophile) sont spécifiques d'un panel très variés de PAMP (*pathogen-associated microbial patterns*), correspondant à des motifs structuraux spécifiques et communs à de nombreux pathogènes microbiens (Medzhitov et coll. 1997). La dénomination de PAMPs regroupe des molécules de structures très variées, qui peuvent être aussi bien des composants de parois bactériennes (lipopolysaccharide, peptidoglycane, lipopeptides, flagelline...) que des fragments d'ADN bactérien ou d'ARN viraux. La stimulation des récepteurs TLR initiés par les PAMPs induit, en fonction du TLR activé, plusieurs cascades de signalisation qui font intervenir un certain nombre de protéines, telles que MyD88, TRIF et IRAK (pour revue West et coll. 2006). Ces cascades de signalisation conduisent à l'activation de facteurs de transcription, tels que AP-1, NFκB et IRF qui cible et active des gènes principalement impliqués dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires aboutissant à l'activation et à l'orientation de la réponse immunitaire adaptative (Schoenemeyer et coll. 2005; Costa-Mattioli and Sonenberg 2008).

L'importance de ces récepteurs dans la réponse immunitaire est cruciale pour bien des aspects. Le nombre de publications dédiés aux TLR n'a fait que croître au cours des dix dernières années d'une part, parce que la dérégulation de leur signalisation semble impliquée dans de nombreuses pathologies (Redecke et coll. 2004; Ku et coll. 2005; Means and Luster



**Figure 25 : Représentation schématique du vecteur contenant le système rapporteur NFκB-GFP**

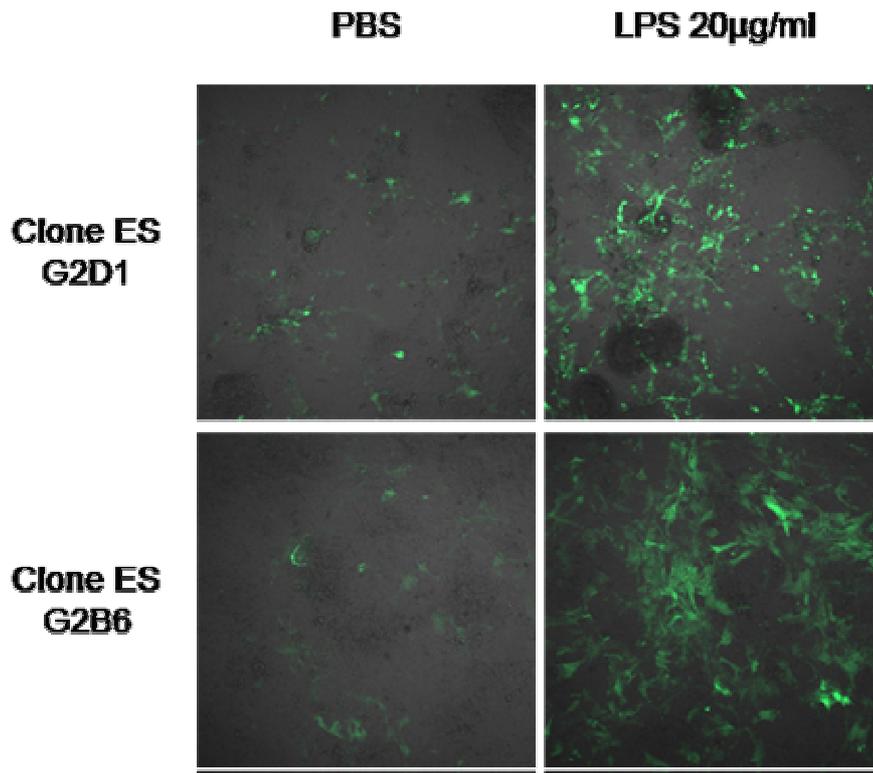
Le gène codant pour la GFP est sous le contrôle d'un promoteur IFNβ. En amont, la cassette AP-1 contient 5 sites de liaison NFκB supplémentaires. Ce vecteur contient une cassette d'expression d'un gène de résistance à la néomycine.

2005), d'autre part, parce depuis le XIX siècle et l'administration de toxines bactériennes par William Coley pour le traitement de sarcomes, leur ciblage en thérapeutique humaine s'avère extrêmement efficace mais encore peu exploité (Chaperot et coll. 2006; Grauer et coll. 2008). Au cours des dernières années, l'entreprise Cayla-Invivogen, est devenu leader mondial pour la fourniture de réactifs nécessaires à l'expérimentation des voies de signalisation des récepteurs de type Toll. Dans ce cadre, une partie de leur gamme de produit concerne plusieurs lignées cellulaires qui ont été génétiquement modifiées de telle sorte qu'elles possèdent un gène rapporteur de l'activité NFκB. L'activation de ce facteur étant le point commun des différentes voies de signalisation de l'ensemble des récepteurs TLR, ce système rapporteur permet donc de suivre et de quantifier, *in vitro*, l'activation cellulaire déclenchée par la liaison d'un récepteur Toll.

Dans ce cadre, la création de modèles murins transgéniques possédant dans l'ensemble de leurs cellules ces systèmes rapporteurs de l'activité NFκB présentait plusieurs avantages ; la mesure de l'activation TLR directement sur des cellules primaires (MEF, lymphocytes B ou T...), la création par immortalisation de nouvelles lignées cellulaires qui possèdent déjà le système rapporteur et bien sûr l'étude de l'activité TLR *in vivo*. A ce stade, il est important de préciser que de tels modèles murins possédant un gène rapporteur de l'activité NFκB ont déjà été créés par le passé. Les modèles murins NFκB-EGFP de christian Jobin et NFκB-Luciférase de Sankar Ghosh ont, par exemple, donné lieu à plusieurs publications décrivant, entre autres, le rôle du facteur de transcription dans le déclenchement de mécanismes pro-inflammatoires (Karrasch et coll. 2007) ou dans le développement lymphocytaire T (Voll et coll. 2000), respectivement.

## **2. Création des lignées murines transgéniques**

En réalité, la nécessité de création de nouvelles lignées transgénique découlait de la volonté de commercialisation des lignées cellulaires provenant de ces souris, voir de la vente des souris elles-mêmes. De plus, l'utilisation des vecteurs construits par Cayla, déjà validés dans de nombreuses lignées, pouvait apporter un certain nombre de caractéristiques innovantes dans ces nouvelles lignées transgéniques. En effet, ces vecteurs possèdent des séquences codantes modifiées pour les débarrasser des sites de méthylation qui pourraient diminuer leur niveau d'expression. Cet aspect était particulièrement important pour l'un des



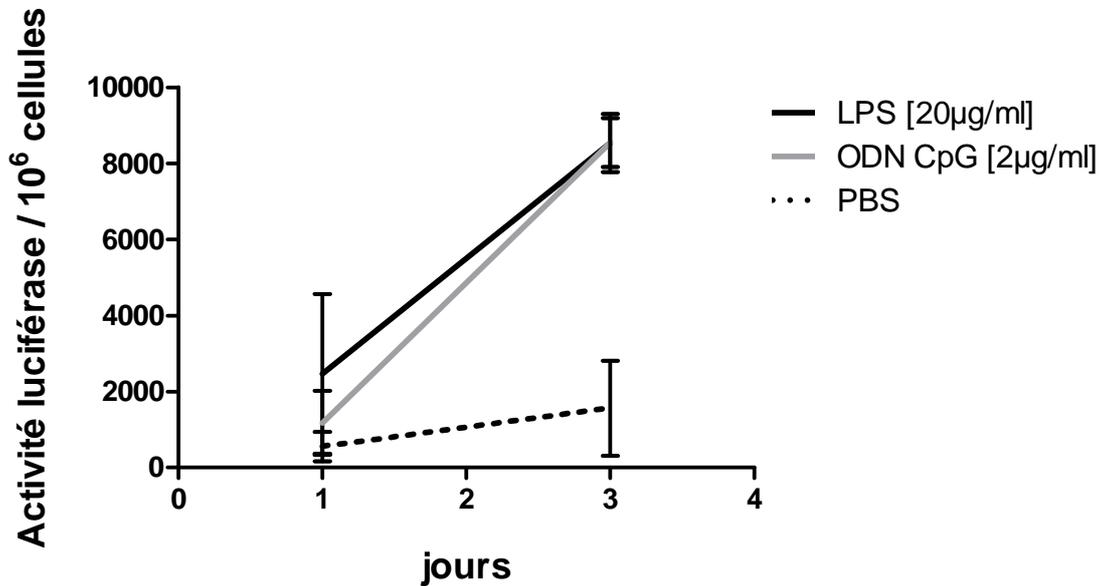
**Figure 26 : Vérification de la fonctionnalité du système rapporteur sur les clones ES<sup>+</sup> différenciés**

La différenciation des clones ES<sup>+</sup> a été obtenue en éliminant l'inhibiteur de différenciation (LIF pour Leukemia inhibitory factor) du milieu de culture et en diminuant la concentration en CO<sub>2</sub>. Après quelques jours de culture et le changement de morphologie des cellules, la population a été séparée en deux et l'une des deux parties a été cultivée en présence de 20µg/ml de LPS K12 (Cayla). Les photos ont été réalisées sur un microscope à épifluorescence avec un grossissement 10X sur des cultures provenant de deux clones ES différents.

systèmes rapporteurs que nous avons utilisé et qui comprend la « *green fluorescent protein* » (GFP). Une étude réalisée il y a plusieurs années au laboratoire avec l'expression d'une GFP de séquence « sauvage » dans les lymphocytes B avaient montré que l'expression de cette protéine semblait fortement réprimée dans le compartiment B (Guglielmi et coll. 2003). Ainsi nous espérons que l'élimination des sites de méthylation pourrait palier à ce problème dans cette lignée lymphocytaire. L'autre système rapporteur que nous avons utilisé pour la création de ces souris comprend un gène d'expression de la luciférase différent des systèmes rapporteur luciférase déjà existant puisqu'il possède la caractéristique de produire une luciférase sous forme sécrétée. L'utilisation d'un tel système dans des animaux permettait ainsi d'imaginer pouvoir suivre l'activité NFκB dans le sérum, dans l'urine ou dans les sécrétions des animaux.

La carte de l'un des vecteurs, contenant les deux systèmes rapporteurs, utilisé pour la création des lignées transgéniques est présentée dans la **figure 25**. Dans ces constructions, le gène rapporteur se trouve sous le contrôle d'un promoteur IFNβ qui possède plusieurs sites de liaison au facteur NFκB auquel ont été rajoutés en amont une cassette AP-1 contenant 5 sites de liaison NFκB supplémentaires qui permettent une forte amplification du signal. Ces lignées murines ont été établies par la méthodologie de transfection préalable de cellules ES. L'utilisation de cette technique, par rapport à la transgénèse classique, nous a permis de tester la fonctionnalité de nos transgènes dans les clones ES ayant incorporé au moins une copie du vecteur et de sélectionner les clones pour lesquels l'activation du transgène était inductible en présence d'un ligand TLR. Cette sélection a nécessité des expériences de différenciation de nos clones ES qui ont été réalisées par l'induction de la formation de corps embryonnaire et leur différenciation en fibroblastes après quelques jours de culture. Ces derniers ont ensuite été cultivés en présence ou non de différents ligands TLR (LPS ; CpG ODN) afin de vérifier l'inductibilité de la réponse NFκB. Les photos de la **figure 26** montrent des populations de fibroblastes obtenues à partir de deux clones ES pour lesquels la présence de LPS induit l'expression de la GFP. Ce sont ces deux clones qui ont été sélectionnés pour l'injection en blastocystes et la dérivation d'animaux transgéniques.

Nous avons ainsi établi deux nouvelles lignées transgéniques murines portant chacune un système rapporteur de l'activité NFκB analysable en fluorescence avec les souris GFP ou en luminescence avec les souris luciférase. Ces deux lignées murines font aujourd'hui l'objet



**Figure 27 : Stimulation TLR de splénocytes B purifiés provenant de souris transgéniques NFκB-luciférase**

Les cellules B ont été purifiées par déplétion lors d'un tri magnétique CD43<sup>+</sup>. Les cellules B ont ensuite été mises en culture en présence de différents ligands TLR (LPS, 20µg/ml et ODN CpG, 2µg/ml) ou en absence de stimulation (PBS). 50µl de surnageant cellulaire ont été prélevés et la concentration cellulaire a été estimée aux jours 1 et 3. L'activité luciférase a été mesurée après l'addition de son substrat (Sigma) et ramenée à une activité relative pour 10<sup>6</sup> de cellules vivantes.

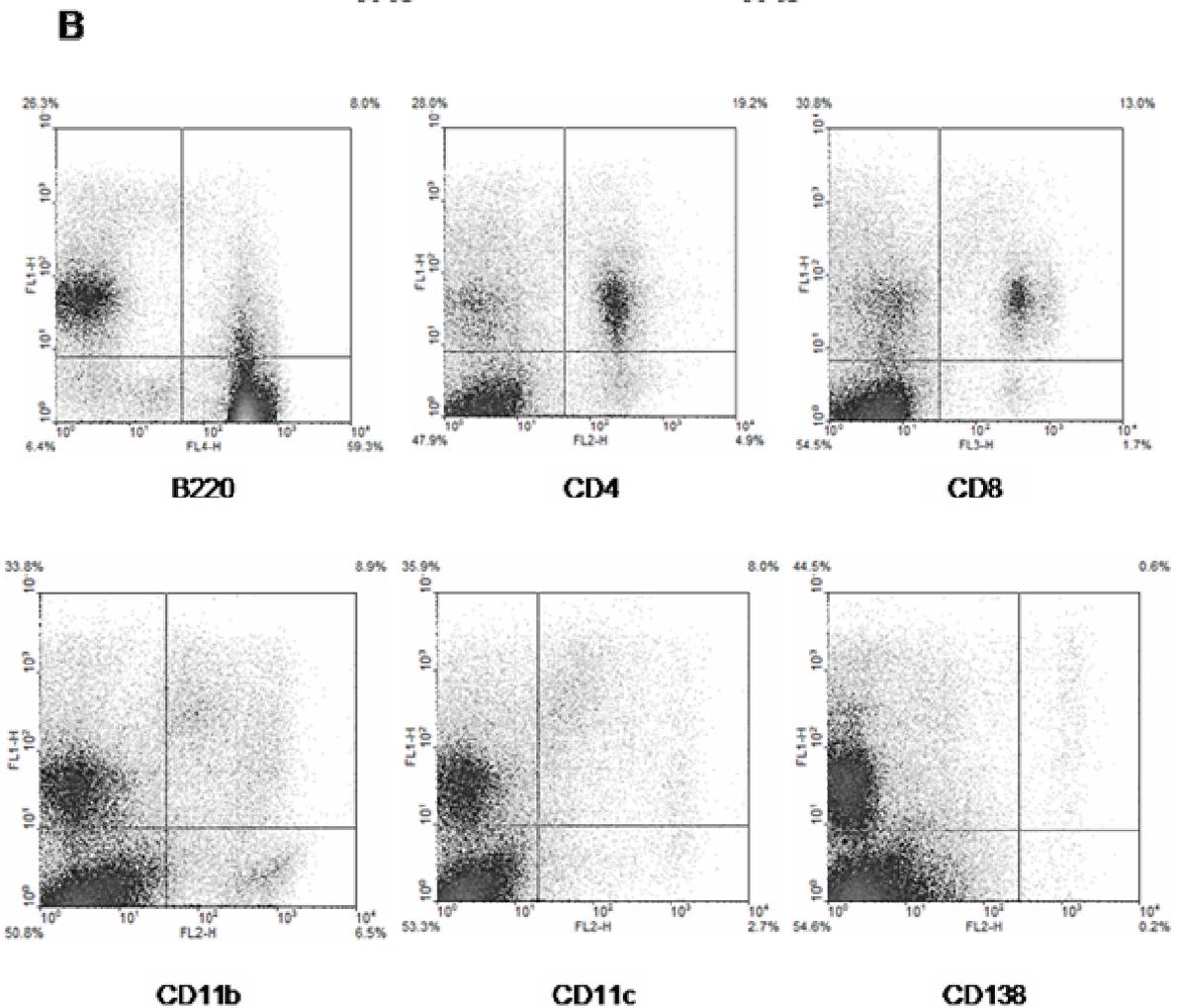
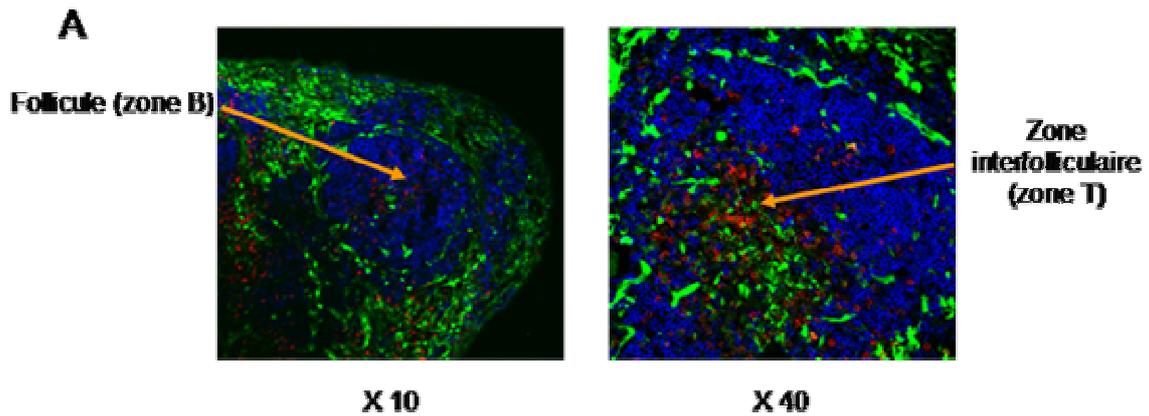
d'une utilisation par l'entreprise Cayla en particulier pour la dérivation de lignées cellulaires immortalisées variées, provenant de différents tissus, et qui constitueront de nouveaux outils pour l'étude, entre autres, des récepteurs Toll. Elles font également l'objet d'une caractérisation au laboratoire qui s'avère pour l'instant préliminaire mais qui nous aidera à définir les applications pour lesquels l'utilisation de ces souris pourrait s'avérer intéressante.

### **3. Caractérisation fonctionnelle des souris transgéniques : données préliminaires**

Concernant la caractérisation de ces souris, nous nous sommes contentés, pour l'instant, de valider la fonctionnalité des vecteurs dans certaines populations cellulaires.

#### 3.1. Souris luciférase

La particularité du vecteur utilisé pour ces souris réside dans le fait qu'il produit une luciférase sécrétée. Les applications de l'utilisation de ces souris sont de deux types : mesure de l'activité luciférase dans le surnageant de cellules en culture ou mesure de cette activité sur des prélèvements effectués directement sur les souris, en particulier sur le sérum, les urines ou les sécrétions (salive, prélèvement vaginal). Dans ce cadre, nous avons réalisé des cultures de B purifiés à partir de splénocytes en présence de différents ligands TLR ; LPS (TLR4) et l'ADN CpG (TLR9) (**Figure 27**). Nous avons ainsi pu confirmer, d'une part, qu'il y avait bien sécrétion de la luciférase dans le milieu de culture et d'autre part que l'expression de cette protéine était inductible par une stimulation de type TLR. Pour l'instant, nous ne disposons pas de résultats concernant l'induction de l'expression de cette protéine sur des prélèvements sériques ou urinaires. Il apparaît cependant que le niveau d'expression basale de cette protéine est déjà important dans le sérum de souris en environnement EOPS. Une étude vient d'être lancée sur la potentialité de suivre l'apparition d'une inflammation rénale en mesurant l'activité luciférase dans l'urine des souris après une injection toxique d'adriamycine (connue pour déclencher chez la souris la survenue d'une glomérulonéphrite toxique en quelques semaines).



**Figure 28 : Evaluation de l'expression basale de la GFP dans les différentes populations cellulaires de la rate**

**A.** Photos de coupes de rate d'une souris NFκB-GFP (fixation PFA + congélation) marquées avec un anti-CD5 PE (rouge) et un anti-B220 APC (bleu). La GFP apparaît en vert.

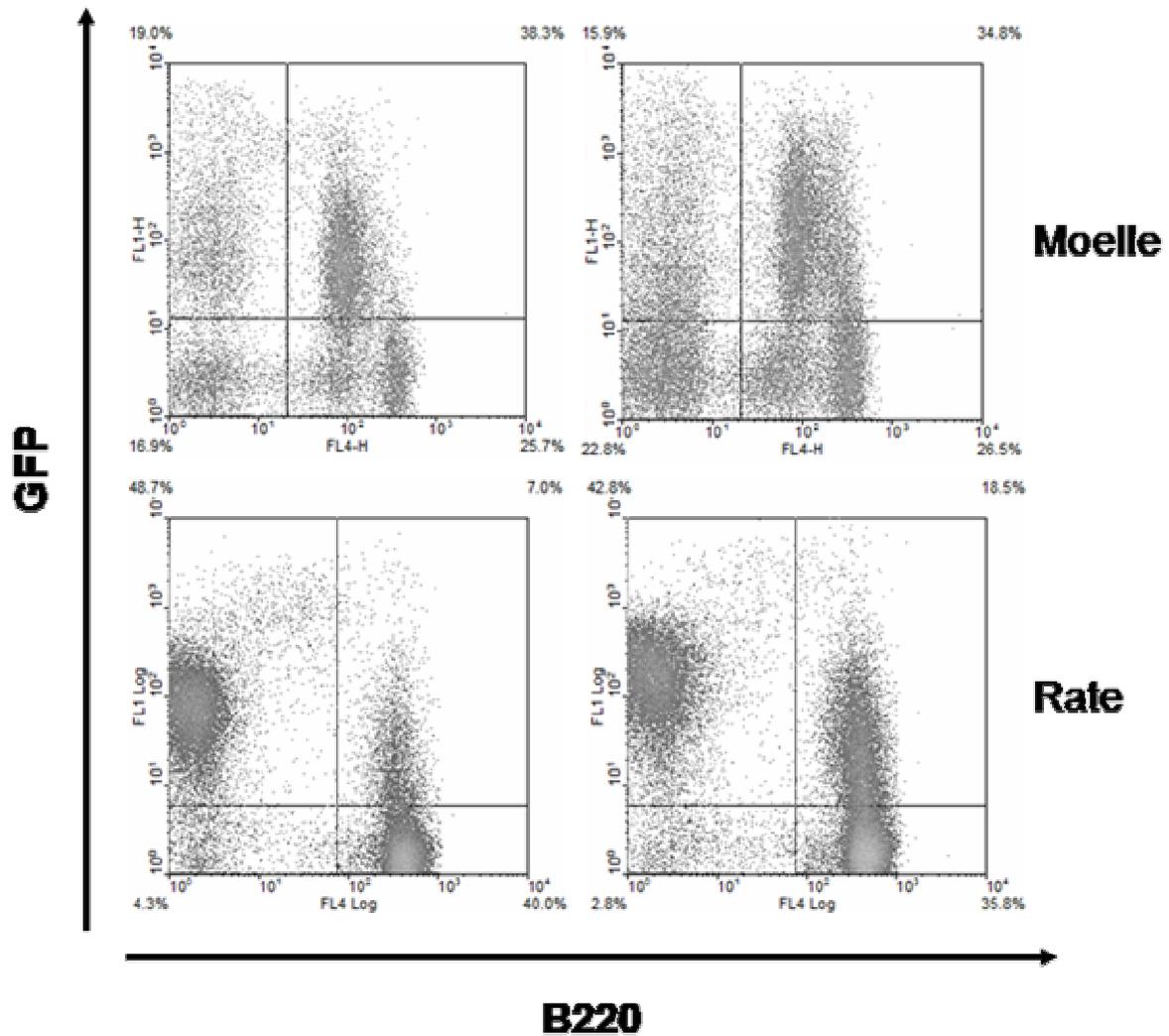
**B.** Dot plot de cytométrie sur une population de splénocytes d'une souris NFκB-GFP (en ordonnées) après un marquage membranaire réalisé à l'aide de plusieurs anticorps couplés PE (en abscisses) spécifiques des différentes populations cellulaires de la rate (anti-B220, lymphocyte B ; CD4, lymphocyte T CD4 ; CD8, lymphocyte T CD8 ; CD11b, macrophage ; CD11c, cellule dendritique ; CD138, plasmocyte).

Ces résultats sont représentatifs des observations réalisées sur trois souris différentes

### 3.2. Souris GFP

Au contraire des souris « NFκB-luciférase », l'expression de la GFP est intracellulaire. Les souris « NFκB-GFP » devraient donc nous permettre d'étudier l'induction de l'activité NFκB de manière géographique, au sein d'un organe par exemple. Pour comparer avec la forte expression basale observée dans le sérum des souris « NFκB-luciférase », nous avons dans un premier temps testé l'expression basale de la GFP dans différentes populations cellulaires d'intérêt. Ainsi, nous pu observer sur des coupes de rate réalisées à partir des souris NFκB-GFP que certaines cellules de cet organe exprimaient fortement la GFP sans besoin préalable d'une activation du système immunitaire dans des animaux hébergés en condition de relatif « repos immunitaire » (en cellule d'animalerie EOPS, exempte d'organismes pathogènes spécifiques) (**Figure 28.A**). Les marquages immunologiques que nous avons réalisés sur ces coupes (anti-B220 APC et anti CD5 PE) ne nous permettent pas de conclure sur la nature des cellules GFP+ même si leur morphologie et leur localisation laisse à penser qu'il pourrait s'agir de macrophages. Nous pouvons néanmoins observer que la GFP est totalement absente de la zone folliculaire et faiblement présente dans la zone inter-folliculaire T.

Afin d'affiner ces observations, nous avons analysé en cytométrie des splénocytes de souris NFκB-GFP après leur marquage avec différents anticorps permettant d'analyser une à une les différentes populations de la rate (**Figure 28B**). Comme dans l'observation des coupes de rate, cette analyse montre que l'expression basale de la GFP dans la population B est très faible. A l'inverse, l'ensemble des populations T CD4 et CD8 exprime fortement le transgène. Les marquages anti-CD11b montrent qu'une partie seulement des macrophages exprime la GFP en absence de stimulation et que le niveau d'expression dans la population GFP<sup>+</sup> est très important. En ce qui concerne les populations de cellules dendritiques et de plasmocytes, ils semblent également qu'ils expriment un niveau basal très élevé de GFP. Ces observations sont cruciales pour l'orientation des applications potentielles de ces souris. En effet, il paraît plus probable de pouvoir suivre une induction de l'expression du transgène dans une lignée cellulaire pour laquelle le niveau d'expression basale n'est pas trop élevé. Ces observations nous ont donc poussés à évaluer l'inductibilité de l'expression de la GFP en réponse à une stimulation immunitaire dans la population B qui paraît être, parmi les splénocytes, la population la moins « active » en condition non stimulée.



**Figure 29 : Evaluation de l'induction de l'expression de la GFP après une immunisation dans les cellules B de la moelle et de la rate**

Dot plot de cytométrie réalisés sur des populations cellulaires de moelle osseuse ou de rate de souris NFκB-GFP (en ordonnées) ayant reçu (à droite) une injection d'adjuvant de Freund complet ou n'ayant rien reçu (à gauche). Les cellules des deux organes ont été marquées avec un anti-B220 PE (en abscisses) afin de distinguer les populations B du reste des cellules.

L'observation de population B extraites de la moelle osseuse ou de la rate de souris ayant reçu une injection péritonéale de Freund complet montre effectivement une augmentation de l'expression de la GFP par rapport à celle observée sur des cellules B provenant de souris non immunisée (**Figure 29**). Un marquage anti-B220 sur des cellules de moelle osseuse permet de différencier les cellules B précurseurs (B220<sup>int</sup>) des cellules B matures re-circulantes (B220<sup>hi</sup>). Il apparaît sur cette dernière figure que les cellules précurseurs expriment déjà fortement la GFP en dehors d'une activation immunitaire. L'expression de la GFP dans cette population semble néanmoins légèrement augmentée dans les souris immunisées. Cette induction est, au contraire, particulièrement importante pour la population re-circulante. De la même façon, dans la rate, le niveau d'expression sans immunisation est beaucoup plus bas que celui observé après une injection de Freund. Cette expérience reflète parfaitement ce qui est déjà connu sur l'induction de l'activation du facteur de transcription NFκB par le pré-BCR (pour revue Siebenlist et coll. 2005). A l'inverse, l'expression de ce facteur semble n'intervenir, dans les cellules matures, qu'au cours de la réponse immunitaire. Ces observations montrent, d'une part que notre système rapporteur NFκB-GFP est fonctionnel et inductible dans le compartiment B à l'inverse des modèles déjà existants pour lesquels la GFP reste éteinte dans les cellules B. D'autre part, cette expérience nous désigne les populations B matures comme cible de choix pour la recherche d'applications intéressantes de ces souris.

Dans ce domaine, l'activation TLR est loin d'être le seul mécanisme de recrutement du facteur NFκB. En effet, ce facteur de transcription est impliqué non seulement dans la réponse immune innée mais également dans la réponse adaptative, notamment pour les cellules B dans les cascades de signalisation en aval de CD40 et du récepteur BR3 pour BAFF-R, mais aussi avec une implication de la signalisation du BCR. De manière plus générale, NFκB semble fortement impliqué dans la réponse au stress cellulaire. Les applications potentielles sont donc légion, il n'y a plus qu'à choisir...

## **Article 4: “Glycotranscriptome study reveals a genetic switch modulating glycosaminoglycan synthesis along B cell development and activation”**

(Manuscrit en prochaine re-soumission)

Parallèlement à la signalisation via le BCR, les cellules B sont continuellement soumises à des signaux provenant de différents médiateurs solubles ou résultant de l'interaction avec d'autres populations cellulaires. Ces signaux interviennent, entre autres, dans l'induction de la migration ou au contraire de la rétention des cellules B dans un compartiment donné. Dans de nombreux types cellulaires, la modulation des réponses à des stimuli externes découle en grande partie de la nature des glycanes exprimés à la surface de la cellule intrinsèquement liée à l'expression simultanée de plusieurs enzymes impliqués dans la glycosylation des protéines. L'étude de la transcription des gènes de ces enzymes dans plusieurs populations B à différents stades de développement, a montré que les deux enzymes CSGalNAcT-1 et EXTL1, subissaient de fortes variations d'expression en fonction du stade de différenciation. CsGalNAcT1 semble absent aux stades B au repos mais exprimé aux stades immatures et B activés. A l'inverse, Extl1 n'est pas exprimé aux stades B immatures mais au stade B au repos avec une expression qui diminue aux stades B activés. Ces deux enzymes sont impliquées dans la biosynthèse de formes alternatives de glycosaminoglycanes: chondroïtine sulfate et héparane sulfate, respectivement. Le niveau d'expression inversé de ces deux gènes tout au long du développement B suggère que l'expression séquentielle des résidus chondroïtine sulfate et héparane sulfate pourrait avoir un rôle important lors de certaines étapes du développement B.

Afin d'évaluer le rôle fonctionnel de ces enzymes dans la lymphopoïèse B, *in vivo*, nous avons réalisé des lignées de souris transgéniques sur-exprimant de façon B-spécifique ces deux protéines. Les deux lignées transgéniques obtenues présentent un blocage partiel des cellules B entre les stades pro-B et pre-B qui s'avère plus prononcé sur la lignée sur-exprimant l'enzyme CSGalNAcT-1. En périphérie, ce défaut semble être entièrement compensé puisque les deux lignées présentent des compartiments B normaux et des taux sériques d'anticorps tout à fait conformes à la normale. *In vitro*, l'activation polyclonale des splénocytes B en réponse à la présence de LPS est cependant profondément altérée. On

observe alors une forte augmentation de la prolifération pour les cellules de la lignée CSGalNAcT-1 par rapport à des splénocytes «de type sauvage» et au contraire une prolifération très réduite des cellules provenant de la lignée EXTL1. Il apparaît ainsi que la nature des résidus glycosylés présents à la surface de la cellule B pourrait jouer un rôle majeur dans leur différenciation, en particulier au cours des stades précoces du développement ou lors l'activation TLR.

*Ma contribution personnelle à ce travail à consisté dans l'étude de l'activation polyclonale in vitro des splénocytes B et dans le suivi et le typage des lignées transgéniques après le départ en post-doc de Sophie Duchez, afin que puisse être réalisées des expérimentations complémentaires.*

## **Glycotranscriptome study reveals a genetic switch modulating glycosaminoglycan synthesis along B cell development and activation**

**Running title: B cell specific modulation of GAG synthesis genes.**

**Sophie Duchez\*, Virginie Pascal\*, Nadine Cogné\*, Chantal Jayat-Vignoles\*, Raymond Julien<sup>2</sup>, Michel Cogné\***

\* Laboratoire d'Immunologie, CNRS UMR6101, Equipe labellisée « La Ligue », Faculté de Médecine, F-87025 LIMOGES, FRANCE,

<sup>2</sup> Unité de Génétique Moléculaire Animale, INRA UMR1061, Faculté des Sciences et Techniques, LIMOGES, FRANCE.

This work was supported by grants from Ligue Nationale contre le Cancer and Conseil Régional du Limousin. SD was supported by a fellowship from Région Limousin and by Fondation pour la Recherche Médicale.

Address correspondence and reprint requests to: Pr M. Cogné, CNRS UMR 6101, Laboratoire d'Immunologie, 2, rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges Cedex, France, Phone # 33 555 435 848, Fax 33 555 435 897, [cogne@unilim.fr](mailto:cogne@unilim.fr)

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, G. P. and L. M. Weiner (2005). "Monoclonal antibody therapy of cancer." Nat Biotechnol **23**(9): 1147-57.
- Adderson, E. E., P. G. Shackelford, R. A. Insel, A. Quinn, P. M. Wilson and W. L. Carroll (1992). "Immunoglobulin light chain variable region gene sequences for human antibodies to Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide are dominated by a limited number of V kappa and V lambda segments and VJ combinations." J Clin Invest **89**(3): 729-38.
- Allen, A. C., S. J. Harper and J. Feehally (1995). "Galactosylation of N- and O-linked carbohydrate moieties of IgA1 and IgG in IgA nephropathy." Clin Exp Immunol **100**(3): 470-4.
- Allen, A. C., P. S. Topham, S. J. Harper and J. Feehally (1997). "Leucocyte beta 1,3 galactosyltransferase activity in IgA nephropathy." Nephrol Dial Transplant **12**(4): 701-6.
- Alt, F. W., G. D. Yancopoulos, T. K. Blackwell, C. Wood, E. Thomas, M. Boss, et al. (1984). "Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments." Embo J **3**(6): 1209-19.
- Amore, A., P. Cirina, G. Conti, P. Brusa, L. Peruzzi and R. Coppo (2001). "Glycosylation of circulating IgA in patients with IgA nephropathy modulates proliferation and apoptosis of mesangial cells." J Am Soc Nephrol **12**(9): 1862-71.
- Aujame, L., R. Sodoyer and J. L. Teillaud (1997). "Phage display and antibody engineering: a French overview." Trends Biotechnol **15**(5): 155-7.
- Balsari, A. L., D. Morelli, S. Menard, U. Veronesi and M. I. Colnaghi (1994). "Protection against doxorubicin-induced alopecia in rats by liposome-entrapped monoclonal antibodies." Faseb J **8**(2): 226-30.
- Basset, C., V. Durand, C. Jamin, J. Clement, Y. Pennec, P. Youinou, et al. (2000). "Increased N-linked glycosylation leading to oversialylation of monomeric immunoglobulin A1 from patients with Sjogren's syndrome." Scand J Immunol **51**(3): 300-6.
- Beck, A., E. Wagner-Rousset, M. C. Bussat, M. Lokteff, C. Klinguer-Hamour, J. F. Haeuw, et al. (2008). "Trends in glycosylation, glycoanalysis and glycoengineering of therapeutic antibodies and Fc-fusion proteins." Curr Pharm Biotechnol **9**(6): 482-501.
- Beckman, R. A., L. M. Weiner and H. M. Davis (2007). "Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors." Cancer **109**(2): 170-9.
- Beliard, R., T. Waegemans, D. Notelet, L. Massad, F. Dhainaut, C. Romeuf, et al. (2008). "A human anti-D monoclonal antibody selected for enhanced FcγRIII engagement clears RhD+ autologous red cells in human volunteers as efficiently as polyclonal anti-D antibodies." Br J Haematol **141**(1): 109-19.
- Bellet, D. and V. Dangles-Marie (2005). "[Humanized antibodies as therapeutics]." Med Sci (Paris) **21**(12): 1054-62.
- Beltran, P. J., P. Mitchell, Y. A. Chung, E. Cajulis, J. Lu, B. Belmontes, et al. (2009). "AMG 479, a fully human anti-insulin-like growth factor receptor type I monoclonal antibody, inhibits the growth and survival of pancreatic carcinoma cells." Mol Cancer Ther.
- Benveniste, J., G. Lespinats, C. Adam and J. C. Salomon (1971). "Immunoglobulins in intact, immunized, and contaminated axenic mice: study of serum IgA." J Immunol **107**(6): 1647-55.
- Berek, C. and C. Milstein (1988). "The dynamic nature of the antibody repertoire." Immunol Rev **105**: 5-26.
- Bergqvist, P., E. Gardby, A. Stensson, M. Bemark and N. Y. Lycke (2006). "Gut IgA class switch recombination in the absence of CD40 does not occur in the lamina propria and is independent of germinal centers." J Immunol **177**(11): 7772-83.

- Bird, R. E., K. D. Hardman, J. W. Jacobson, S. Johnson, B. M. Kaufman, S. M. Lee, et al. (1988). "Single-chain antigen-binding proteins." *Science* **242**(4877): 423-6.
- Blick, S. K. and M. P. Curran (2007). "Certolizumab pegol: in Crohn's disease." *BioDrugs* **21**(3): 195-201; discussion 202-3.
- Boackle, R. J., Q. L. Nguyen, R. S. Leite, X. Yang and J. Vesely (2006). "Complement-coated antibody-transfer (CCAT); serum IgA1 antibodies intercept and transport C4 and C3 fragments and preserve IgG1 deployment (PGD)." *Mol Immunol* **43**(3): 236-45.
- Boehm, M. K., J. M. Woof, M. A. Kerr and S. J. Perkins (1999). "The Fab and Fc fragments of IgA1 exhibit a different arrangement from that in IgG: a study by X-ray and neutron solution scattering and homology modelling." *J Mol Biol* **286**(5): 1421-47.
- Boldicke, T. (2007). "Blocking translocation of cell surface molecules from the ER to the cell surface by intracellular antibodies targeted to the ER." *J Cell Mol Med* **11**(1): 54-70.
- Bomsel, M., M. Heyman, H. Hocini, S. Lagaye, L. Belec, C. Dupont, et al. (1998). "Intracellular neutralization of HIV transcytosis across tight epithelial barriers by anti-HIV envelope protein dIgA or IgM." *Immunity* **9**(2): 277-87.
- Braly, P., C. F. Nicodemus, C. Chu, Y. Collins, R. Edwards, A. Gordon, et al. (2009). "The Immune adjuvant properties of front-line carboplatin-paclitaxel: a randomized phase 2 study of alternative schedules of intravenous oregovomab chemoimmunotherapy in advanced ovarian cancer." *J Immunother* **32**(1): 54-65.
- Brauninger, A., T. Goossens, K. Rajewsky and R. Kuppers (2001). "Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human." *Eur J Immunol* **31**(12): 3631-7.
- Brooks, D., C. Taylor, B. Dos Santos, H. Linden, A. Houghton, T. T. Hecht, et al. (1995). "Phase Ia trial of murine immunoglobulin A antitransferrin receptor antibody 42/6." *Clin Cancer Res* **1**(11): 1259-65.
- Bruggemann, M., H. M. Caskey, C. Teale, H. Waldmann, G. T. Williams, M. A. Surani, et al. (1989). "A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(17): 6709-13.
- Bruggemann, M., G. T. Williams, C. I. Bindon, M. R. Clark, M. R. Walker, R. Jefferis, et al. (1987). "Comparison of the effector functions of human immunoglobulins using a matched set of chimeric antibodies." *J Exp Med* **166**(5): 1351-61.
- Burritt, M. F., N. J. Calvanico, S. Mehta and T. B. Tomasi, Jr. (1977). "Activation of the classical complement pathway by Fc fragment of human IgA." *J Immunol* **118**(2): 723-5.
- Carayannopoulos, L., E. E. Max and J. D. Capra (1994). "Recombinant human IgA expressed in insect cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18): 8348-52.
- Cartron, G., L. Dacheux, G. Salles, P. Solal-Celigny, P. Bardos, P. Colombat, et al. (2002). "Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene." *Blood* **99**(3): 754-8.
- Casali, P., G. Inghirami, M. Nakamura, T. F. Davies and A. L. Notkins (1986). "Human monoclonals from antigen-specific selection of B lymphocytes and transformation by EBV." *Science* **234**(4775): 476-9.
- Castigli, E., S. Scott, F. Dedeoglu, P. Bryce, H. Jabara, A. K. Bhan, et al. (2004). "Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(11): 3903-8.
- Castigli, E., S. A. Wilson, S. Scott, F. Dedeoglu, S. Xu, K. P. Lam, et al. (2005). "TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells." *J Exp Med* **201**(1): 35-9.
- Cazac, B. B. and J. Roes (2000). "TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo." *Immunity* **13**(4): 443-51.

- Chames, P., M. Van Regenmortel, E. Weiss and D. Baty (2009). "Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future." *Br J Pharmacol* **157**(2): 220-33.
- Chang, Q., Z. Zhong, A. Lees, M. Pekna and L. Pirofski (2002). "Structure-function relationships for human antibodies to pneumococcal capsular polysaccharide from transgenic mice with human immunoglobulin Loci." *Infect Immun* **70**(9): 4977-86.
- Chaperot, L., A. Blum, O. Manches, G. Lui, J. Angel, J. P. Molens, et al. (2006). "Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmacytoid dendritic cells." *J Immunol* **176**(1): 248-55.
- Chen, W. and D. S. Dimitrov (2009). "Human monoclonal antibodies and engineered antibody domains as HIV-1 entry inhibitors." *Curr Opin HIV AIDS* **4**(2): 112-7.
- Chevallier, A., R. C. Monteiro, H. Kubagawa and M. D. Cooper (1989). "Immunofluorescence analysis of IgA binding by human mononuclear cells in blood and lymphoid tissue." *J Immunol* **142**(7): 2244-9.
- Chintalacheruvu, K. R., M. Raines and S. L. Morrison (1994). "Divergence of human alpha-chain constant region gene sequences. A novel recombinant alpha 2 gene." *J Immunol* **152**(11): 5299-304.
- Clackson, T., H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths and G. Winter (1991). "Making antibody fragments using phage display libraries." *Nature* **352**(6336): 624-8.
- Cogné, M., C. Sirac, M. Bardel, C. Decourt and C. Laroche (2005). Non-human transgenic mammal for the constant region of the class A human immunoglobulin heavy chain and applications thereof. France. **WO 2005/047333**.
- Costa-Mattioli, M. and N. Sonenberg (2008). "RAPping production of type I interferon in pDCs through mTOR." *Nat Immunol* **9**(10): 1097-9.
- Coutinho, A., M. D. Kazatchkine and S. Avrameas (1995). "Natural autoantibodies." *Curr Opin Immunol* **7**(6): 812-8.
- Craig, S. W. and J. J. Cebra (1971). "Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit." *J Exp Med* **134**(1): 188-200.
- Crottet, P. and B. Corthesy (1998). "Secretory component delays the conversion of secretory IgA into antigen-binding competent F(ab')<sub>2</sub>: a possible implication for mucosal defense." *J Immunol* **161**(10): 5445-53.
- Dall'Acqua, W. F., K. E. Cook, M. M. Damschroder, R. M. Woods and H. Wu (2006). "Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region." *J Immunol* **177**(2): 1129-38.
- de Kruif, J., L. Terstappen, E. Boel and T. Logtenberg (1995). "Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(9): 3938-42.
- De Lorenzo, C., A. Arciello, R. Cozzolino, D. B. Palmer, P. Laccetti, R. Piccoli, et al. (2004). "A fully human antitumor immunoreceptor selective for ErbB-2-positive carcinomas." *Cancer Res* **64**(14): 4870-4.
- Dechant, M., T. Beyer, T. Schneider-Merck, W. Weisner, M. Peipp, J. G. van de Winkel, et al. (2007). "Effector mechanisms of recombinant IgA antibodies against epidermal growth factor receptor." *J Immunol* **179**(5): 2936-43.
- Dechant, M., G. Vidarsson, B. Stockmeyer, R. Repp, M. J. Glennie, M. Gramatzki, et al. (2002). "Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing." *Blood* **100**(13): 4574-80.
- Delagrave, S., J. Catalan, C. Sweet, G. Drabik, A. Henry, A. Rees, et al. (1999). "Effects of humanization by variable domain resurfacing on the antiviral activity of a single-chain antibody against respiratory syncytial virus." *Protein Eng* **12**(4): 357-62.
- Delbaldo, C., E. Raymond, K. Vera, L. Hammershaimb, K. Kaucic, S. Lozahic, et al. (2008). "Phase I and pharmacokinetic study of etaracizumab (Abegrin), a humanized

- monoclonal antibody against alphavbeta3 integrin receptor, in patients with advanced solid tumors." Invest New Drugs **26**(1): 35-43.
- Deo, Y. M., K. Sundarapandiyam, T. Keler, P. K. Wallace and R. F. Graziano (1998). "Bispecific molecules directed to the Fc receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89) and tumor antigens efficiently promote cell-mediated cytotoxicity of tumor targets in whole blood." J Immunol **160**(4): 1677-86.
- Desjarlais, J. R., G. A. Lazar, E. A. Zhukovsky and S. Y. Chu (2007). "Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective." Drug Discov Today **12**(21-22): 898-910.
- Di Gaetano, N., E. Cittera, R. Nota, A. Vecchi, V. Grieco, E. Scanziani, et al. (2003). "Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo." J Immunol **171**(3): 1581-7.
- Dimitrov, D. S. and J. D. Marks (2009). "Therapeutic antibodies: current state and future trends--is a paradigm change coming soon?" Methods Mol Biol **525**: 1-27, xiii.
- Dreher, M. L., E. Gherardi, A. Skerra and C. Milstein (1991). "Colony assays for antibody fragments expressed in bacteria." J Immunol Methods **139**(2): 197-205.
- Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, et al. (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." Science **298**(5594): 850-4.
- Ebbinghaus, C., R. Ronca, M. Kaspar, D. Grabulovski, A. Berndt, H. Kosmehl, et al. (2005). "Engineered vascular-targeting antibody-interferon-gamma fusion protein for cancer therapy." Int J Cancer **116**(2): 304-13.
- Elsasser, D., H. Stadick, S. Stark, J. G. Van de Winkel, M. Gramatzki, K. M. Schrott, et al. (1999). "Preclinical studies combining bispecific antibodies with cytokine-stimulated effector cells for immunotherapy of renal cell carcinoma." Anticancer Res **19**(2C): 1525-8.
- Eshhar, Z. (2008). "The T-body approach: redirecting T cells with antibody specificity." Handb Exp Pharmacol(181): 329-42.
- Fanger, M. W., L. Shen, J. Pugh and G. M. Bernier (1980). "Subpopulations of human peripheral granulocytes and monocytes express receptors for IgA." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(6): 3640-4.
- Fernandez, M. I., T. Pedron, R. Tournebize, J. C. Olivo-Marin, P. J. Sansonetti and A. Phalipon (2003). "Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin A by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells." Immunity **18**(6): 739-49.
- Fischer, N. and O. Leger (2007). "Bispecific antibodies: molecules that enable novel therapeutic strategies." Pathobiology **74**(1): 3-14.
- Franklin, M. C., K. D. Carey, F. F. Vajdos, D. J. Leahy, A. M. de Vos and M. X. Sliwkowski (2004). "Insights into ErbB signaling from the structure of the ErbB2-pertuzumab complex." Cancer Cell **5**(4): 317-28.
- Fujioka, H., S. N. Emancipator, M. Aikawa, D. S. Huang, F. Blatnik, T. Karban, et al. (1998). "Immunocytochemical colocalization of specific immunoglobulin A with sendai virus protein in infected polarized epithelium." J Exp Med **188**(7): 1223-9.
- Furtado, P. B., P. W. Whitty, A. Robertson, J. T. Eaton, A. Almogren, M. A. Kerr, et al. (2004). "Solution structure determination of monomeric human IgA2 by X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained modelling: a comparison with monomeric human IgA1." J Mol Biol **338**(5): 921-41.
- Gennari, R., S. Menard, F. Fagnoni, L. Ponchio, M. Scelsi, E. Tagliabue, et al. (2004). "Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2." Clin Cancer Res **10**(17): 5650-5.

- Ghetie, M. A., E. M. Podar, A. Ilgen, B. E. Gordon, J. W. Uhr and E. S. Vitetta (1997). "Homodimerization of tumor-reactive monoclonal antibodies markedly increases their ability to induce growth arrest or apoptosis of tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(14): 7509-14.
- Ghetie, V. and E. S. Ward (2000). "Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn." Annu Rev Immunol **18**: 739-66.
- Ghosh, S., E. Goldin, F. H. Gordon, H. A. Malchow, J. Rask-Madsen, P. Rutgeerts, et al. (2003). "Natalizumab for active Crohn's disease." N Engl J Med **348**(1): 24-32.
- Gillies, S. D., Y. Lan, S. Williams, F. Carr, S. Forman, A. Raubitschek, et al. (2005). "An anti-CD20-IL-2 immunocytokine is highly efficacious in a SCID mouse model of established human B lymphoma." Blood **105**(10): 3972-8.
- Glennie, M. J., R. R. French, M. S. Cragg and R. P. Taylor (2007). "Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies." Mol Immunol **44**(16): 3823-37.
- Golay, J., L. Zaffaroni, T. Vaccari, M. Lazzari, G. M. Borleri, S. Bernasconi, et al. (2000). "Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis." Blood **95**(12): 3900-8.
- Gomes, M. M. and A. B. Herr (2006). "IgA and IgA-specific receptors in human disease: structural and functional insights into pathogenesis and therapeutic potential." Springer Semin Immunopathol **28**(4): 383-95.
- Gomes, M. M., S. B. Wall, K. Takahashi, J. Novak, M. B. Renfrow and A. B. Herr (2008). "Analysis of IgA1 N-glycosylation and its contribution to Fc $\alpha$ RI binding." Biochemistry **47**(43): 11285-99.
- Gorter, A., P. S. Hiemstra, N. Klar-Mohamad, L. A. van Es and M. R. Daha (1987). "Binding and degradation of soluble aggregates of IgA by rat peritoneal macrophages." Adv Exp Med Biol **216B**: 1333-8.
- Grauer, O. M., J. W. Molling, E. Bennink, L. W. Toonen, R. P. Suttmuller, S. Nierkens, et al. (2008). "TLR ligands in the local treatment of established intracerebral murine gliomas." J Immunol **181**(10): 6720-9.
- Green, L. L., M. C. Hardy, C. E. Maynard-Currie, H. Tsuda, D. M. Louie, M. J. Mendez, et al. (1994). "Antigen-specific human monoclonal antibodies from mice engineered with human Ig heavy and light chain YACs." Nat Genet **7**(1): 13-21.
- Green, L. L. and A. Jakobovits (1998). "Regulation of B cell development by variable gene complexity in mice reconstituted with human immunoglobulin yeast artificial chromosomes." J Exp Med **188**(3): 483-95.
- Gregoire, M., C. Ligeza-Poisson, N. Juge-Morineau and R. Spisek (2003). "Anti-cancer therapy using dendritic cells and apoptotic tumour cells: pre-clinical data in human mesothelioma and acute myeloid leukaemia." Vaccine **21**(7-8): 791-4.
- Grossetete, B., P. Launay, A. Lehen, P. Jungers, J. F. Bach and R. C. Monteiro (1998). "Down-regulation of Fc $\alpha$  receptors on blood cells of IgA nephropathy patients: evidence for a negative regulatory role of serum IgA." Kidney Int **53**(5): 1321-35.
- Gugler, E., G. Bokelmann, A. Datwyler and G. Von Muralt (1958). "[Immuno-electrophoretic studies on human milk proteins.]." Schweiz Med Wochenschr **88**(50): 1264-7.
- Guglielmi, L., V. Truffinet, M. Cogne and Y. Denizot (2003). "The beta-globin HS4 insulator confers copy-number dependent expression of IgH regulatory elements in stable B cell transfectants." Immunol Lett **89**(2-3): 119-23.
- Hamburger, A. E., A. P. West, Jr. and P. J. Bjorkman (2004). "Crystal structure of a polymeric immunoglobulin binding fragment of the human polymeric immunoglobulin receptor." Structure **12**(11): 1925-35.

- Hamre, R., I. N. Farstad, P. Brandtzaeg and H. C. Morton (2003). "Expression and modulation of the human immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and the FcR gamma chain on myeloid cells in blood and tissue." Scand J Immunol **57**(6): 506-16.
- Hanes, J., C. Schaffitzel, A. Knappik and A. Pluckthun (2000). "Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display." Nat Biotechnol **18**(12): 1287-92.
- Hanson, L. A. and M. Korotkova (2002). "The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection." Semin Neonatol **7**(4): 275-81.
- Harding, F. A. and N. Lonberg (1995). "Class switching in human immunoglobulin transgenic mice." Ann N Y Acad Sci **764**: 536-46.
- Hendrickson, B. A., L. Rindisbacher, B. Corthesy, D. Kendall, D. A. Waltz, M. R. Neutra, et al. (1996). "Lack of association of secretory component with IgA in J chain-deficient mice." J Immunol **157**(2): 750-4.
- Heremans, J. F., M. T. Heremans and H. E. Schultze (1959). "Isolation and description of a few properties of the beta 2A-globulin of human serum." Clin Chim Acta **4**(1): 96-102.
- Herr, A. B., E. R. Ballister and P. J. Bjorkman (2003). "Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human Fc alphaRI and its complex with IgA1-Fc." Nature **423**(6940): 614-20.
- Hiemstra, P. S., A. Gorter, M. E. Stuurman, L. A. Van Es and M. R. Daha (1987). "Activation of the alternative pathway of complement by human serum IgA." Eur J Immunol **17**(3): 321-6.
- Holliger, P. and P. J. Hudson (2005). "Engineered antibody fragments and the rise of single domains." Nat Biotechnol **23**(9): 1126-36.
- Honorio-Franca, A. C., P. Launay, M. M. Carneiro-Sampaio and R. C. Monteiro (2001). "Colostrum neutrophils express Fc alpha receptors (CD89) lacking gamma chain association and mediate noninflammatory properties of secretory IgA." J Leukoc Biol **69**(2): 289-96.
- Hulett, M. D. and P. M. Hogarth (1994). "Molecular basis of Fc receptor function." Adv Immunol **57**: 1-127.
- Huls, G., I. A. Heijnen, E. Cuomo, J. van der Linden, E. Boel, J. G. van de Winkel, et al. (1999). "Antitumor immune effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG1 and IgA1 monoclonal antibodies." Cancer Res **59**(22): 5778-84.
- Huse, W. D., L. Sastry, S. A. Iverson, A. S. Kang, M. Alting-Mees, D. R. Burton, et al. (1989). "Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda." Science **246**(4935): 1275-81.
- Hwang, W. Y. and J. Foote (2005). "Immunogenicity of engineered antibodies." Methods **36**(1): 3-10.
- Imakiire, T., M. Kuroki, H. Shibaguchi, H. Abe, Y. Yamauchi, A. Ueno, et al. (2004). "Generation, immunologic characterization and antitumor effects of human monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen." Int J Cancer **108**(4): 564-70.
- Janoff, E. N., C. Fasching, J. M. Orenstein, J. B. Rubins, N. L. Opstad and A. P. Dalmasso (1999). "Killing of *Streptococcus pneumoniae* by capsular polysaccharide-specific polymeric IgA, complement, and phagocytes." J Clin Invest **104**(8): 1139-47.
- Jarvis, G. A. and J. M. Griffiss (1989). "Human IgA1 initiates complement-mediated killing of *Neisseria meningitidis*." J Immunol **143**(5): 1703-9.
- Johansen, F. E., R. Braathen and P. Brandtzaeg (2001). "The J chain is essential for polymeric Ig receptor-mediated epithelial transport of IgA." J Immunol **167**(9): 5185-92.
- Johansen, F. E., I. Natvig Norderhaug, M. Roe, I. Sandlie and P. Brandtzaeg (1999). "Recombinant expression of polymeric IgA: incorporation of J chain and secretory component of human origin." Eur J Immunol **29**(5): 1701-8.

- Jones, P. T., P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger and G. Winter (1986). "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." Nature **321**(6069): 522-5.
- Kadaoui, K. A. and B. Corthesy (2007). "Secretory IgA mediates bacterial translocation to dendritic cells in mouse Peyer's patches with restriction to mucosal compartment." J Immunol **179**(11): 7751-7.
- Kaetzel, C. S. (2005). "The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces." Immunol Rev **206**: 83-99.
- Kanamaru, Y., S. Pfirsch, M. Aloulou, F. Vrtovsniak, M. Essig, C. Loirat, et al. (2008). "Inhibitory ITAM signaling by Fc alpha RI-FcR gamma chain controls multiple activating responses and prevents renal inflammation." J Immunol **180**(4): 2669-78.
- Kanamaru, Y., H. Tamouza, S. Pfirsch, D. El-Mehdi, C. Guerin-Marchand, M. Pretolani, et al. (2007). "IgA Fc receptor I signals apoptosis through the FcRgamma ITAM and affects tumor growth." Blood **109**(1): 203-11.
- Kang, A. S., C. F. Barbas, K. D. Janda, S. J. Benkovic and R. A. Lerner (1991). "Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4363-6.
- Karagiannis, S. N., M. G. Bracher, J. Hunt, N. McCloskey, R. L. Bevil, A. J. Bevil, et al. (2007). "IgE-antibody-dependent immunotherapy of solid tumors: cytotoxic and phagocytic mechanisms of eradication of ovarian cancer cells." J Immunol **179**(5): 2832-43.
- Karrasch, T., J. S. Kim, M. Muhlbauer, S. T. Magness and C. Jobin (2007). "Gnotobiotic IL-10-/-;NF-kappa B(EGFP) mice reveal the critical role of TLR/NF-kappa B signaling in commensal bacteria-induced colitis." J Immunol **178**(10): 6522-32.
- Kaspar, M., E. Trachsel and D. Neri (2007). "The antibody-mediated targeted delivery of interleukin-15 and GM-CSF to the tumor neovasculature inhibits tumor growth and metastasis." Cancer Res **67**(10): 4940-8.
- Kennedy, A. D., P. V. Beum, M. D. Solga, D. J. DiLillo, M. A. Lindorfer, C. E. Hess, et al. (2004). "Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia." J Immunol **172**(5): 3280-8.
- Khamlichi, A. A., F. Glaudet, Z. Oruc, V. Denis, M. Le Bert and M. Cogne (2004). "Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat." Blood **103**(10): 3828-36.
- Kilian, M., J. Reinholdt, H. Lomholt, K. Poulsen and E. V. Frandsen (1996). "Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence." Apmis **104**(5): 321-38.
- Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn and K. Rajewsky (1991). "A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene." Nature **350**(6317): 423-6.
- Koene, H. R., M. Kleijer, J. Algra, D. Roos, A. E. von dem Borne and M. de Haas (1997). "Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype." Blood **90**(3): 1109-14.
- Kohler, G. and C. Milstein (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-7.
- Kozbor, D., A. E. Lagarde and J. C. Roder (1982). "Human hybridomas constructed with antigen-specific Epstein-Barr virus-transformed cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(21): 6651-5.

- Kremer, E. J., V. Kalatzis, E. Baker, D. F. Callen, G. R. Sutherland and C. R. Maliszewski (1992). "The gene for the human IgA Fc receptor maps to 19q13.4." Hum Genet **89**(1): 107-8.
- Krupitskaya, Y. and H. A. Wakelee (2009). "Ramucirumab, a fully human mAb to the transmembrane signaling tyrosine kinase VEGFR-2 for the potential treatment of cancer." Curr Opin Investig Drugs **10**(6): 597-605.
- Ku, C. L., K. Yang, J. Bustamante, A. Puel, H. von Bernuth, O. F. Santos, et al. (2005). "Inherited disorders of human Toll-like receptor signaling: immunological implications." Immunol Rev **203**: 10-20.
- Kuroiwa, Y., K. Tomizuka, T. Shinohara, Y. Kazuki, H. Yoshida, A. Ohguma, et al. (2000). "Manipulation of human minichromosomes to carry greater than megabase-sized chromosome inserts." Nat Biotechnol **18**(10): 1086-90.
- Lamkhioed, B., A. S. Gounni, V. Gruart, A. Pierce, A. Capron and M. Capron (1995). "Human eosinophils express a receptor for secretory component. Role in secretory IgA-dependent activation." Eur J Immunol **25**(1): 117-25.
- Langley, R., B. Wines, N. Willoughby, I. Basu, T. Proft and J. D. Fraser (2005). "The staphylococcal superantigen-like protein 7 binds IgA and complement C5 and inhibits IgA-Fc alpha RI binding and serum killing of bacteria." J Immunol **174**(5): 2926-33.
- Launay, P., B. Grossetete, M. Arcos-Fajardo, E. Gaudin, S. P. Torres, L. Beaudoin, et al. (2000). "Fcalpha receptor (CD89) mediates the development of immunoglobulin A (IgA) nephropathy (Berger's disease). Evidence for pathogenic soluble receptor-Iga complexes in patients and CD89 transgenic mice." J Exp Med **191**(11): 1999-2009.
- Lazar, G. A., W. Dang, S. Karki, O. Vafa, J. S. Peng, L. Hyun, et al. (2006). "Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4005-10.
- Lefranc, M. P., N. Pallares and J. P. Fricpiat (1999). "Allelic polymorphisms and RFLP in the human immunoglobulin lambda light chain locus." Hum Genet **104**(5): 361-9.
- Lindhofer, H., R. Mocikat, B. Steipe and S. Thierfelder (1995). "Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies." J Immunol **155**(1): 219-25.
- Litinskiy, M. B., B. Nardelli, D. M. Hilbert, B. He, A. Schaffer, P. Casali, et al. (2002). "DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL." Nat Immunol **3**(9): 822-9.
- Loder, F., B. Mutschler, R. J. Ray, C. J. Paige, P. Sideras, R. Torres, et al. (1999). "B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals." J Exp Med **190**(1): 75-89.
- Lonberg, N., L. D. Taylor, F. A. Harding, M. Trounstein, K. M. Higgins, S. R. Schramm, et al. (1994). "Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications." Nature **368**(6474): 856-9.
- Louis, E., Z. El Ghoul, S. Vermeire, S. Dall'Ozzo, P. Rutgeerts, G. Paintaud, et al. (2004). "Association between polymorphism in IgG Fc receptor IIIa coding gene and biological response to infliximab in Crohn's disease." Aliment Pharmacol Ther **19**(5): 511-9.
- Luginbuhl, B., Z. Kanyo, R. M. Jones, R. J. Fletterick, S. B. Prusiner, F. E. Cohen, et al. (2006). "Directed evolution of an anti-prion protein scFv fragment to an affinity of 1 pM and its structural interpretation." J Mol Biol **363**(1): 75-97.
- Ma, J. K., B. Y. Hikmat, K. Wycoff, N. D. Vine, D. Chargelegue, L. Yu, et al. (1998). "Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans." Nat Med **4**(5): 601-6.

- Mackay, F., P. Schneider, P. Rennert and J. Browning (2003). "BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival." Annu Rev Immunol **21**: 231-64.
- MacLennan, I. C. (1994). "Germinal centers." Annu Rev Immunol **12**: 117-39.
- Macpherson, A. J., D. Gatto, E. Sainsbury, G. R. Harriman, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (2000). "A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria." Science **288**(5474): 2222-6.
- Macpherson, A. J., L. Hunziker, K. McCoy and A. Lamarre (2001). "IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms." Microbes Infect **3**(12): 1021-35.
- Macpherson, A. J., K. D. McCoy, F. E. Johansen and P. Brandtzaeg (2008). "The immune geography of IgA induction and function." Mucosal Immunol **1**(1): 11-22.
- Mantis, N. J., M. C. Cheung, K. R. Chintalacharuvu, J. Rey, B. Corthesy and M. R. Neutra (2002). "Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor." J Immunol **169**(4): 1844-51.
- Maruoka, T., T. Nagata and M. Kasahara (2004). "Identification of the rat IgA Fc receptor encoded in the leukocyte receptor complex." Immunogenetics **55**(10): 712-6.
- Mattu, T. S., R. J. Pleass, A. C. Willis, M. Kilian, M. R. Wormald, A. C. Lellouch, et al. (1998). "The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc alpha receptor interactions." J Biol Chem **273**(4): 2260-72.
- Max, E. E., O. W. McBride, C. C. Morton and M. A. Robinson (1986). "Human J chain gene: chromosomal localization and associated restriction fragment length polymorphisms." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(15): 5592-6.
- Mazanec, M. B., C. S. Kaetzel, M. E. Lamm, D. Fletcher and J. G. Nedrud (1992). "Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 6901-5.
- Mazanec, M. B., J. G. Nedrud, X. P. Liang and M. E. Lamm (1989). "Transport of serum IgA into murine respiratory secretions and its implications for immunization strategies." J Immunol **142**(12): 4275-81.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, G. Winter and D. J. Chiswell (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." Nature **348**(6301): 552-4.
- Means, T. K. and A. D. Luster (2005). "Toll-like receptor activation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus." Ann N Y Acad Sci **1062**: 242-51.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-7.
- Melchers, F., A. Rolink, U. Grawunder, T. H. Winkler, H. Karasuyama, P. Ghia, et al. (1995). "Positive and negative selection events during B lymphopoiesis." Curr Opin Immunol **7**(2): 214-27.
- Mendez, M. J., L. L. Green, J. R. Corvalan, X. C. Jia, C. E. Maynard-Currie, X. D. Yang, et al. (1997). "Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice." Nat Genet **15**(2): 146-56.
- Mestecky, J., b. J., M. E. Lamm, M. L., M. JR. and S. W. (2005). Mucosal immunology. Amsterdam, Elsevier/Academic Press.
- Midorikawa, Y., T. Yamashita and F. Sendo (1990). "Modulation of the immune response to transplanted tumors in rats by selective depletion of neutrophils in vivo using a monoclonal antibody: abrogation of specific transplantation resistance to chemical carcinogen-induced syngeneic tumors by selective depletion of neutrophils in vivo." Cancer Res **50**(19): 6243-7.

- Miletic, V. D. and M. M. Frank (1995). "Complement-immunoglobulin interactions." Curr Opin Immunol **7**(1): 41-7.
- Moldoveanu, Z., R. J. Wyatt, J. Y. Lee, M. Tomana, B. A. Julian, J. Mestecky, et al. (2007). "Patients with IgA nephropathy have increased serum galactose-deficient IgA1 levels." Kidney Int **71**(11): 1148-54.
- Monteiro, R. C., M. D. Cooper and H. Kubagawa (1992). "Molecular heterogeneity of Fc alpha receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies." J Immunol **148**(6): 1764-70.
- Monteiro, R. C., L. Halbwachs-Mecarelli, M. C. Roque-Barreira, L. H. Noel, J. Berger and P. Lesavre (1985). "Charge and size of mesangial IgA in IgA nephropathy." Kidney Int **28**(4): 666-71.
- Monteiro, R. C., I. C. Moura, P. Launay, T. Tsuge, E. Haddad, M. Benhamou, et al. (2002). "Pathogenic significance of IgA receptor interactions in IgA nephropathy." Trends Mol Med **8**(10): 464-8.
- Monteiro, R. C. and J. G. Van De Winkel (2003). "IgA Fc receptors." Annu Rev Immunol **21**: 177-204.
- Mora, J. R., M. Iwata, B. Eksteen, S. Y. Song, T. Junt, B. Senman, et al. (2006). "Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells." Science **314**(5802): 1157-60.
- Morrison, S. L., M. J. Johnson, L. A. Herzenberg and V. T. Oi (1984). "Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(21): 6851-5.
- Morton, H. C., R. J. Pleass, A. K. Storset, P. Brandtzaeg and J. M. Woof (2005). "Cloning and characterization of equine CD89 and identification of the CD89 gene in chimpanzees and rhesus macaques." Immunology **115**(1): 74-84.
- Morton, H. C., I. E. van den Herik-Oudijk, P. Vosseveld, A. Snijders, A. J. Verhoeven, P. J. Capel, et al. (1995). "Functional association between the human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain. Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association." J Biol Chem **270**(50): 29781-7.
- Mostov, K. E. (1994). "Transepithelial transport of immunoglobulins." Annu Rev Immunol **12**: 63-84.
- Mostov, K. E., M. Friedlander and G. Blobel (1984). "The receptor for transepithelial transport of IgA and IgM contains multiple immunoglobulin-like domains." Nature **308**(5954): 37-43.
- Motegi, Y. and H. Kita (1998). "Interaction with secretory component stimulates effector functions of human eosinophils but not of neutrophils." J Immunol **161**(8): 4340-6.
- Moura, I. C., M. N. Centelles, M. Arcos-Fajardo, D. M. Malheiros, J. F. Collawn, M. D. Cooper, et al. (2001). "Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy." J Exp Med **194**(4): 417-25.
- Muller, D. and R. E. Kontermann (2007). "Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy." Curr Opin Mol Ther **9**(4): 319-26.
- Muul, L. M., P. J. Spiess, E. P. Director and S. A. Rosenberg (1987). "Identification of specific cytolytic immune responses against autologous tumor in humans bearing malignant melanoma." J Immunol **138**(3): 989-95.
- Muyldermans, S. (2001). "Single domain camel antibodies: current status." J Biotechnol **74**(4): 277-302.
- Natsume, A., M. In, H. Takamura, T. Nakagawa, Y. Shimizu, K. Kitajima, et al. (2008). "Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities." Cancer Res **68**(10): 3863-72.

- Nelson, A. L. and J. M. Reichert (2009). "Development trends for therapeutic antibody fragments." Nat Biotechnol **27**(4): 331-7.
- Nikolova, E. B., M. Tomana and M. W. Russell (1994). "The role of the carbohydrate chains in complement (C3) fixation by solid-phase-bound human IgA." Immunology **82**(2): 321-7.
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2007). "Antibodies, Fc receptors and cancer." Curr Opin Immunol **19**(2): 239-45.
- Nimmerjahn, F. and J. V. Ravetch (2008). "Fcγ receptors as regulators of immune responses." Nat Rev Immunol **8**(1): 34-47.
- Novak, J., B. A. Julian, M. Tomana and J. Mestecky (2008). "IgA glycosylation and IgA immune complexes in the pathogenesis of IgA nephropathy." Semin Nephrol **28**(1): 78-87.
- Olsson, L. and H. S. Kaplan (1980). "Human-human hybridomas producing monoclonal antibodies of predefined antigenic specificity." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(9): 5429-31.
- Oortwijn, B. D., A. Roos, P. J. van der Boog, N. Klar-Mohamad, A. van Remoortere, A. M. Deelder, et al. (2007). "Monomeric and polymeric IgA show a similar association with the myeloid FcαRI/CD89." Mol Immunol **44**(5): 966-73.
- Otten, M. A., E. Rudolph, M. Dechant, C. W. Tuk, R. M. Reijmers, R. H. Beelen, et al. (2005). "Immature neutrophils mediate tumor cell killing via IgA but not IgG Fc receptors." J Immunol **174**(9): 5472-80.
- Padlan, E. A. (1991). "A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties." Mol Immunol **28**(4-5): 489-98.
- Pardoll, D. (2003). "Does the immune system see tumors as foreign or self?" Annu Rev Immunol **21**: 807-39.
- Pasquier, B., P. Launay, Y. Kanamaru, I. C. Moura, S. Pfirsch, C. Ruffie, et al. (2005). "Identification of FcαRI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of FcRγ ITAM." Immunity **22**(1): 31-42.
- Pasquier, B., Y. Lepelletier, C. Baude, O. Hermine and R. C. Monteiro (2004). "Differential expression and function of IgA receptors (CD89 and CD71) during maturation of dendritic cells." J Leukoc Biol **76**(6): 1134-41.
- Petro, J. B., R. M. Gerstein, J. Lowe, R. S. Carter, N. Shinnars and W. N. Khan (2002). "Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling." J Biol Chem **277**(50): 48009-19.
- Petrus, A. K., T. J. Fairchild and R. P. Doyle (2009). "Traveling the vitamin B12 pathway: oral delivery of protein and peptide drugs." Angew Chem Int Ed Engl **48**(6): 1022-8.
- Popov, A. V., X. Zou, J. Xian, I. C. Nicholson and M. Bruggemann (1999). "A human immunoglobulin lambda locus is similarly well expressed in mice and humans." J Exp Med **189**(10): 1611-20.
- Redecke, V., H. Hacker, S. K. Datta, A. Fermin, P. M. Pitha, D. H. Broide, et al. (2004). "Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma." J Immunol **172**(5): 2739-43.
- Reiter, Y. and I. Pastan (1998). "Recombinant Fv immunotoxins and Fv fragments as novel agents for cancer therapy and diagnosis." Trends Biotechnol **16**(12): 513-20.
- Renegar, K. B., G. D. Jackson and J. Mestecky (1998). "In vitro comparison of the biologic activities of monoclonal monomeric IgA, polymeric IgA, and secretory IgA." J Immunol **160**(3): 1219-23.

- Restifo, N. P. (2000). "Building better vaccines: how apoptotic cell death can induce inflammation and activate innate and adaptive immunity." Curr Opin Immunol **12**(5): 597-603.
- Reterink, T. J., G. van Zandbergen, M. van Egmond, N. Klar-Mohamad, C. H. Morton, J. G. van de Winkel, et al. (1997). "Size-dependent effect of IgA on the IgA Fc receptor (CD89)." Eur J Immunol **27**(9): 2219-24.
- Rifai, A., K. Fadden, S. L. Morrison and K. R. Chintalacharuvu (2000). "The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes." J Exp Med **191**(12): 2171-82.
- Riley, S. (2006). The future of monoclonal antibodies therapeutics. B. I. Ltd.
- Robinson, J. K., T. G. Blanchard, A. D. Levine, S. N. Emancipator and M. E. Lamm (2001). "A mucosal IgA-mediated excretory immune system in vivo." J Immunol **166**(6): 3688-92.
- Roguska, M. A., J. T. Pedersen, C. A. Keddy, A. H. Henry, S. J. Searle, J. M. Lambert, et al. (1994). "Humanization of murine monoclonal antibodies through variable domain resurfacing." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(3): 969-73.
- Roopenian, D. C. and S. Akilesh (2007). "FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age." Nat Rev Immunol **7**(9): 715-25.
- Roos, A., L. H. Bouwman, D. J. van Gijlswijk-Janssen, M. C. Faber-Krol, G. L. Stahl and M. R. Daha (2001). "Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway." J Immunol **167**(5): 2861-8.
- Ruf, P. and H. Lindhofer (2001). "Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody." Blood **98**(8): 2526-34.
- Sakamoto, N., K. Shibuya, Y. Shimizu, K. Yotsumoto, T. Miyabayashi, S. Sakano, et al. (2001). "A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues." Eur J Immunol **31**(5): 1310-6.
- Salem Chouaib, F. E. H., Housseem Benlalam et Fathia Mami-Chouaib (2006). "Immunothérapie du cancer : espoirs et réalités." médecine sciences **22**(8-9): 755-759.
- Sandborn, W. J., B. G. Feagan, S. Stoinov, P. J. Honiball, P. Rutgeerts, D. Mason, et al. (2007). "Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease." N Engl J Med **357**(3): 228-38.
- Sandin, C., S. Linse, T. Areschoug, J. M. Woof, J. Reinholdt and G. Lindahl (2002). "Isolation and detection of human IgA using a streptococcal IgA-binding peptide." J Immunol **169**(3): 1357-64.
- Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni and M. A. Cassatella (2000). "The neutrophil as a cellular source of chemokines." Immunol Rev **177**: 195-203.
- Schmidt, M., M. E. Scheulen, C. Dittrich, P. Obrist, N. Marschner, L. Dirix, et al. (2009). "An open-label, randomized phase II study of adecatumumab, a fully human anti-EpCAM antibody, as monotherapy in patients with metastatic breast cancer." Ann Oncol.
- Schoenemeyer, A., B. J. Barnes, M. E. Mancl, E. Latz, N. Goutagny, P. M. Pitha, et al. (2005). "The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling." J Biol Chem **280**(17): 17005-12.
- Shan, D., J. A. Ledbetter and O. W. Press (2000). "Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells." Cancer Immunol Immunother **48**(12): 673-83.
- Shen, J. and Z. Zhu (2008). "Catumaxomab, a rat/murine hybrid trifunctional bispecific monoclonal antibody for the treatment of cancer." Curr Opin Mol Ther **10**(3): 273-84.

- Shibuya, A., N. Sakamoto, Y. Shimizu, K. Shibuya, M. Osawa, T. Hiroyama, et al. (2000). "Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes." Nat Immunol **1**(5): 441-6.
- Shields, R. L., A. K. Namenuk, K. Hong, Y. G. Meng, J. Rae, J. Briggs, et al. (2001). "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R." J Biol Chem **276**(9): 6591-604.
- Shinkawa, T., K. Nakamura, N. Yamane, E. Shoji-Hosaka, Y. Kanda, M. Sakurada, et al. (2003). "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity." J Biol Chem **278**(5): 3466-73.
- Siberil, S., C. A. Dutertre, C. Boix, E. Bonnin, R. Menez, E. Stura, et al. (2006). "Molecular aspects of human Fc gamma R interactions with IgG: functional and therapeutic consequences." Immunol Lett **106**(2): 111-8.
- Siberil, S., C. A. Dutertre, C. Boix and J. L. Teillaud (2005). "[Therapeutic monoclonal antibodies: a little history, a lot of engineering, and... some clinical successes]." Transfus Clin Biol **12**(2): 114-22.
- Siebenlist, U., K. Brown and E. Claudio (2005). "Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB." Nat Rev Immunol **5**(6): 435-45.
- Simister, N. E. and K. E. Mostov (1989). "An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens." Nature **337**(6203): 184-7.
- Smith, R. I., M. J. Coloma and S. L. Morrison (1995). "Addition of a mu-tailpiece to IgG results in polymeric antibodies with enhanced effector functions including complement-mediated cytolysis by IgG4." J Immunol **154**(5): 2226-36.
- Stad, R. K., W. M. Bogers, M. E. Thoomes-van der Sluys, L. A. Van Es and M. R. Daha (1992). "In vivo activation of complement by IgA in a rat model." Clin Exp Immunol **87**(1): 138-43.
- Stavnezer, J. (2000). "Immunology. A touch of antibody class." Science **288**(5468): 984-5.
- Steinmetz, I., F. Albrecht, S. Haussler and B. Brenneke (1994). "Monoclonal IgA class-switch variants against bacterial surface antigens: molecular forms and transport into murine respiratory secretions." Eur J Immunol **24**(11): 2855-62.
- Stockmeyer, B., M. Dechant, M. van Egmond, A. L. Tutt, K. Sundarapandiyam, R. F. Graziano, et al. (2000). "Triggering Fc alpha-receptor I (CD89) recruits neutrophils as effector cells for CD20-directed antibody therapy." J Immunol **165**(10): 5954-61.
- Strebhardt, K. and A. Ullrich (2008). "Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress." Nat Rev Cancer **8**(6): 473-80.
- Sunada, H., B. E. Magun, J. Mendelsohn and C. L. MacLeod (1986). "Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(11): 3825-9.
- Takahashi, T., T. Iwase, N. Takenouchi, M. Saito, K. Kobayashi, Z. Moldoveanu, et al. (1996). "The joining (J) chain is present in invertebrates that do not express immunoglobulins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(5): 1886-91.
- Takeda, S., T. Naito, K. Hama, T. Noma and T. Honjo (1985). "Construction of chimaeric processed immunoglobulin genes containing mouse variable and human constant region sequences." Nature **314**(6010): 452-4.
- Tamura, M., D. E. Milenic, M. Iwahashi, E. Padlan, J. Schlom and S. V. Kashmiri (2000). "Structural correlates of an anticarcinoma antibody: identification of specificity-determining residues (SDRs) and development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only." J Immunol **164**(3): 1432-41.

- Tarelli, E., A. C. Smith, B. M. Hendry, S. J. Challacombe and S. Pouria (2004). "Human serum IgA1 is substituted with up to six O-glycans as shown by matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry." *Carbohydr Res* **339**(13): 2329-35.
- Taylor, R. J., S. L. Chan, A. Wood, C. J. Voskens, J. S. Wolf, W. Lin, et al. (2009). "FcγRIIIa polymorphisms and cetuximab induced cytotoxicity in squamous cell carcinoma of the head and neck." *Cancer Immunol Immunother* **58**(7): 997-1006.
- Teeling, J. L., R. R. French, M. S. Cragg, J. van den Brakel, M. Pluyter, H. Huang, et al. (2004). "Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas." *Blood* **104**(6): 1793-800.
- Terskikh, A., S. Couty, A. Pelegrin, N. Hardman, W. Hunziker and J. P. Mach (1994). "Dimeric recombinant IgA directed against carcino-embryonic antigen, a novel tool for carcinoma localization." *Mol Immunol* **31**(17): 1313-9.
- Tomana, M., R. Kulhavy and J. Mestecky (1988). "Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin A by human liver." *Gastroenterology* **94**(3): 762-70.
- Tomana, M., W. Niedermeier, J. Mestecky and F. Skvaril (1976). "The differences in carbohydrate composition between the subclasses of IgA immunoglobulins." *Immunochemistry* **13**(4): 325-8.
- Tomana, M., J. Novak, B. A. Julian, K. Matousovic, K. Konecny and J. Mestecky (1999). "Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies." *J Clin Invest* **104**(1): 73-81.
- Tonegawa, S. (1983). "Somatic generation of antibody diversity." *Nature* **302**(5909): 575-81.
- Traggiai, E., S. Becker, K. Subbarao, L. Kolesnikova, Y. Uematsu, M. R. Gismondo, et al. (2004). "An efficient method to make human monoclonal antibodies from memory B cells: potent neutralization of SARS coronavirus." *Nat Med* **10**(8): 871-5.
- Valerius, T., B. Stockmeyer, A. B. van Spriël, R. F. Graziano, I. E. van den Herik-Oudijk, R. Repp, et al. (1997). "FcαRI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy." *Blood* **90**(11): 4485-92.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, et al. (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *Science* **254**(5038): 1643-7.
- van Egmond, M., A. J. Hanneke van Vuuren and J. G. van de Winkel (1999). "The human Fc receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89) on transgenic peritoneal macrophages triggers phagocytosis and tumor cell lysis." *Immunol Lett* **68**(1): 83-7.
- van Egmond, M., A. J. van Vuuren, H. C. Morton, A. B. van Spriël, L. Shen, F. M. Hofhuis, et al. (1999). "Human immunoglobulin A receptor (FcαRI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR gamma chain and CR3 (CD11b/CD18)." *Blood* **93**(12): 4387-94.
- Van Pel, A. and T. Boon (1982). "Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(15): 4718-22.
- Van Spriël, A. B., J. H. Leusen, H. Vile and J. G. Van De Winkel (2002). "Mac-1 (CD11b/CD18) as accessory molecule for Fc alpha R (CD89) binding of IgA." *J Immunol* **169**(7): 3831-6.
- van Zandbergen, G., C. van Kooten, N. K. Mohamad, T. J. Reterink, J. W. de Fijter, J. G. van de Winkel, et al. (1998). "Reduced binding of immunoglobulin A (IgA) from patients with primary IgA nephropathy to the myeloid IgA Fc-receptor, CD89." *Nephrol Dial Transplant* **13**(12): 3058-64.
- van Zandbergen, G., R. Westerhuis, N. K. Mohamad, J. G. van De Winkel, M. R. Daha and C. van Kooten (1999). "Crosslinking of the human Fc receptor for IgA (FcαRI/CD89)

- triggers FcR gamma-chain-dependent shedding of soluble CD89." *J Immunol* **163**(11): 5806-12.
- Vaughan, T. J., A. J. Williams, K. Pritchard, J. K. Osbourn, A. R. Pope, J. C. Earnshaw, et al. (1996). "Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library." *Nat Biotechnol* **14**(3): 309-14.
- Venaille, T. J., N. L. Misso, M. J. Phillips, B. W. Robinson and P. J. Thompson (1994). "Effects of different density gradient separation techniques on neutrophil function." *Scand J Clin Lab Invest* **54**(5): 385-91.
- Voll, R. E., E. Jimi, R. J. Phillips, D. F. Barber, M. Rincon, A. C. Hayday, et al. (2000). "NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development." *Immunity* **13**(5): 677-89.
- Ward, E. S., D. Gussow, A. D. Griffiths, P. T. Jones and G. Winter (1989). "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*." *Nature* **341**(6242): 544-6.
- Weltzin, R. and T. P. Monath (1999). "Intranasal antibody prophylaxis for protection against viral disease." *Clin Microbiol Rev* **12**(3): 383-93.
- West, A. P., A. A. Koblansky and S. Ghosh (2006). "Recognition and signaling by toll-like receptors." *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 409-37.
- Whitman, W. B., D. C. Coleman and W. J. Wiebe (1998). "Prokaryotes: the unseen majority." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(12): 6578-83.
- Willemsen, R. A., R. Debets, P. Chames and R. L. Bolhuis (2003). "Genetic engineering of T cell specificity for immunotherapy of cancer." *Hum Immunol* **64**(1): 56-68.
- Winter, G., A. D. Griffiths, R. E. Hawkins and H. R. Hoogenboom (1994). "Making antibodies by phage display technology." *Annu Rev Immunol* **12**: 433-55.
- Woof, J. M. and M. A. Kerr (2006). "The function of immunoglobulin A in immunity." *J Pathol* **208**(2): 270-82.
- Woof, J. M. and J. Mestecky (2005). "Mucosal immunoglobulins." *Immunol Rev* **206**: 64-82.
- Wright, A. and S. L. Morrison (1993). "Antibody variable region glycosylation: biochemical and clinical effects." *Springer Semin Immunopathol* **15**(2-3): 259-73.
- Wu, J., C. Ji, F. Xie, C. D. Langefeld, K. Qian, A. W. Gibson, et al. (2007). "FcalphaRI (CD89) alleles determine the proinflammatory potential of serum IgA." *J Immunol* **178**(6): 3973-82.
- Yagi, M., P. D'Eustachio, F. H. Ruddle and M. E. Koshland (1982). "J chain is encoded by a single gene unlinked to other immunoglobulin structural genes." *J Exp Med* **155**(3): 647-54.
- Yamane-Ohnuki, N., S. Kinoshita, M. Inoue-Urakubo, M. Kusunoki, S. Iida, R. Nakano, et al. (2004). "Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity." *Biotechnol Bioeng* **87**(5): 614-22.
- Yang, X. D., J. R. Corvalan, P. Wang, C. M. Roy and C. G. Davis (1999). "Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies: potential therapeutics for the treatment of inflammatory disease states." *J Leukoc Biol* **66**(3): 401-10.
- Yoo, E. M. and S. L. Morrison (2005). "IgA: an immune glycoprotein." *Clin Immunol* **116**(1): 3-10.
- Yoshino, T., E. Kondo, L. Cao, K. Takahashi, K. Hayashi, S. Nomura, et al. (1994). "Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes." *Blood* **83**(7): 1856-61.
- Zeidler, R., G. Reisbach, B. Wollenberg, S. Lang, S. Chaubal, B. Schmitt, et al. (1999). "Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing." *J Immunol* **163**(3): 1246-52.

- Zhang, M., G. Srivastava and L. Lu (2004). "The pre-B cell receptor and its function during B cell development." Cell Mol Immunol **1**(2): 89-94.
- Zhang, W., J. Feng, Y. Li, N. Guo and B. Shen (2005). "Humanization of an anti-human TNF-alpha antibody by variable region resurfacing with the aid of molecular modeling." Mol Immunol **42**(12): 1445-51.
- Zhang, W. and P. J. Lachmann (1994). "Glycosylation of IgA is required for optimal activation of the alternative complement pathway by immune complexes." Immunology **81**(1): 137-41.
- Zou, Y. R., W. Muller, H. Gu and K. Rajewsky (1994). "Cre-loxP-mediated gene replacement: a mouse strain producing humanized antibodies." Curr Biol **4**(12): 1099-103.