

# UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Bio-Santé (n° 524)

Faculté des Sciences et Techniques

**UMR CNRS 7276**

**"Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations" (CRIBL)**

Thèse n° XXX

## **THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

**Spécialité : Immunologie**

Présentée et soutenue publiquement par

**Brice LAFFLEUR**

Le 20 décembre 2013

# **Avatars des recombinaisons de switch des immunoglobulines et leur influence sur le destin du lymphocyte B, en particulier de classe IgE**

**Thèse dirigée par le Pr Michel COGNE**

## **JURY**

### **Président :**

M. Jean-Claude ALDIGIER, Professeur-Praticien Hospitalier, CHU, Limoges.

### **Rapporteurs :**

Mme Karin TARTE, Professeur des Universités, INSERM-U917, Rennes.

M. Bernardo REINA SAN MARTIN, Directeur de Recherche, IGBMC, Strasbourg.

### **Examineurs :**

M. Ahmed Amine KHAMLICHI, Directeur de Recherche, IPBS, Toulouse.

M. Nicolas FAZILLEAU, Chargé de Recherche, CPTB, Toulouse.

## Résumé

Les lymphocytes B expriment une immunoglobuline (Ig) membranaire, qui s'associe à l'hétérodimère  $Ig\alpha/Ig\beta$  pour former le récepteur à l'antigène des cellules B (BCR). Ce récepteur peut ensuite être sécrété sous la forme d'une Ig soluble pour assurer la réponse humorale adaptative. L'enzyme AID, spécifiquement exprimée dans les lymphocytes B, permet de moduler le répertoire B, en modifiant le site de reconnaissance des antigènes par hypermutation somatique des domaines variables, et en changeant le domaine constant des Ig par le phénomène de recombinaison de classe (CSR) du locus de chaîne lourde d'Ig (IgH). Nous avons ainsi suivi le destin cellulaire B après différents événements de recombinaison médiés par AID, en particulier après le CSR vers l'IgE. Les IgE sont impliquées dans les défenses antiparasitaire et anti-tumorale mais sont également responsables de réactions allergiques, pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique, potentiellement mortel. De cette dangerosité potentielle des IgE résulte sans doute qu'aient été sélectionnés des mécanismes puissants et multiples pour réguler finement et maintenir à des taux très faible la production des IgE, notamment sans doute pour prévenir leurs effets délétères. Alors que différents niveaux de contrôle de la production d'IgE sont déjà bien établis, nous mettons en évidence un phénomène d'autorégulation négative des cellules B  $IgE^+$  assuré par le BCR  $IgE$  lui-même, permettant de limiter fortement la mémoire cellulaire  $IgE$ . Nous avons également étudié des événements de recombinaison non-classiques AID-dépendants. Il s'avère que le changement de classe, qui se fait classiquement entre deux régions *switch* d'un même chromosome IgH, peut également se faire de manière inter-chromosomique (*trans*-CSR), et nous montrons son existence chez l'homme ainsi que sa fréquence élevée. Nous pensons que cette fréquence élevée doit être prise en compte dans les modèles qui tentent de comprendre comment la cellule B privilégie les jonctions d'ADN légitimes tout en étant à l'évidence impliquée fréquemment dans des recombinaisons inter-chromosomiques. Nous démontrons également la présence et le ciblage par AID de régions répétitives autres que les régions « *switch* », les régions « LS », situées à la fin du locus IgH et intégrées à sa région régulatrice 3', qui peuvent être recombinées avec la région  $S\mu$ . Un tel événement de recombinaison entraîne la délétion des gènes constants, la perte du BCR et la mort de la cellule B, et donc le « Locus Suicide Recombination ».

### **Immunoglobulin switch recombination avatars and their influence on B cell fate, in particular for IgE class**

#### **Abstract:**

B lymphocytes express a membrane immunoglobulin (Ig), which is associated with the heterodimer  $Ig\alpha/Ig\beta$  to form the B cell antigen receptor (BCR). This receptor can be secreted later as soluble Ig to ensure humoral immune responses. AID enzyme, specifically expressed in B lymphocytes, modulates the B repertoire, by modifying antigen binding sites *via* somatic hypermutation of variable domains, and by changing constant domains of Ig by class switch recombination (CSR) of the Ig heavy chain locus (IgH). We followed B cell fate after different recombination events mediated by AID, in particular after  $IgE$  CSR.  $IgE$  is implicated in antiparasitic and antitumoral defenses but also in allergic responses, including anaphylactic shock, which is potentially lethal. Resulting from this potential danger, multiple and strong mechanisms have probably been selected to tightly regulate and maintain very low levels of  $IgE$  production, especially to avoid these deleterious effects. Different  $IgE$  production control levels are well established, but we now show an auto-regulatory negative control of  $IgE$  class-switched B cell fate, mediated by  $IgE$  BCR itself, which strongly limits  $IgE$  cell memory. We also studied unconventional AID-dependent recombination events. CSR, which occurs classically between two switch regions on the same IgH chromosome, could occur through an inter-chromosomal pathway (*trans*-CSR), and we demonstrated this very frequent phenomenon in humans. We think this high frequency should be considered in models that try to understand how B cells privilege legitimate DNA junctions while undergoing frequent inter-chromosomal recombinations. We also demonstrated the presence and AID targeting of repetitive regions other than “switch” regions, “LS” regions, located at the end of the IgH locus and integrated into its 3' regulatory region, which can be recombined with  $S\mu$  regions. This recombination event induces deletion of all constant genes, BCR loss and B cell death, and is called “Locus Suicide Recombination”.

## Liste des abréviations

**[-/-]** : homozygote négatif

**[-/+]** : hétérozygote

**[+/+]** : homozygote positif

### A

**Ac** : anticorps

**ADCC** : *antibody dependent cellular cytotoxicity*

**ADCP** : *antibody dependent cellular phagocytosis*

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**A-EJ** : *alternative end-joining*

**Ag** : antigène

**AID** : *activation induced cytidine deaminase*

**AP1** : *activator protein 1*

**APE** : *apurinic/aprimidic endonuclease*

**ARN** : acide ribonucléique

**ARN pol II** : ARN polymérase II

**ARNm** : ARN messager

**ATM** : *ataxia telangiectasia mutated*

### B

**Bad** : *Bcl-xL/Bcl2 associated death promoter protein*

**BAFF** : *B cell activating factor*

**Bak** : *Bcl2-homologous antagonist-killer*

**Bax** : *Bcl2-associated X protein*

**Bcl2** : *B cell lymphoma 2*

**Bcl6** : *B cell lymphoma 6*

**Bcl-xL** : *B cell leukemia xL*

**BCR** : *B cell antigen receptor*

**BER** : *base excision repair*

**BIK** : *Bcl2-interacting killer*

**Bim** : *Bcl2 interacting mediator of cell death*

**BrdU** : 5-bromo-2'-deoxyuridine

**BSA** : *bovin serum albumin*

### C

**CD** : *cluster of differentiation*

**CD40L** : CD40 ligand

**C/EBP** : *CAAT / enhancer-binding protein*

**CH** : région constante des chaînes lourdes d'Ig

**CIS** : *cytokine-inducible SH2 (Src homology 2) protein*

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**CMV** : cytomégalovirus

**C-NHEJ** : *classical non-homologous end-joining*

**CSR** : *class switch recombination*

**Cx** : région constante d'une Ig de classe x

**CXCR5** : *chemokine (C-X-C motif) receptor 5*

### D

**D** : région de diversité

**DNA-PKcs** : *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*

**DSB** : *double-strand break*

### E

**E1/E2/E2A** : *early region 1/2/2a*

**EMPD** : *extracellular membrane-proximal domain*

### F

**Fc** : fragment cristallisable

**FcR** : *Fc (fragment crystallizable) receptor*

**FoxP3** : *forkhead box P3*

### G

**GC** : *germinal center*

**GFP** : *green fluorescent protein*

**GLT** : *germline transcript*

**Grb2** : *growth factor receptor binding protein-2*

### H

**H2AX** : *histone 2A family member X*

**HA** : *hemagglutinin*

**HAX1** : *HS1-associated protein X1*

**HPK1** : *haematopoietic kinase progenitor 1*

### I

**Id2** : *inhibitor of DNA-binding 2*

**IFN** : interférons

**Ig** : immunoglobuline

**IgH** : chaîne lourde (*heavy*) des Ig

**IgH 3'RR** : région régulatrice 3' du locus IgH

**IgL** : chaîne légère (*light*) des Ig

**IL** : interleukine

**IRES** : *internal ribosome entry site*

**ISRE** : *interferon-stimulated response element*

**Ix** : promoteur du gène constant de classe x d'Ig

### J

**J** : région de jonction

### K

**Kb** : kilobases

**KI** : *knock-in*

**KO** : *knock-out*

**L**

**LAT** : linker for activation of T cells

**LPS** : lipopolysaccharide

**LS** : like-switch

**LSR** : locus suicide recombination

**M**

**MAb** : monoclonal antibody

**MafK** : v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K

**MDC1** : mediator of DNA-damage checkpoint 1

**mIlg** : membrane Ig

**mLIgE** : membrane long IgE

**MSH** : DNA mismatch repair protein

**msIlgE** : membrane short IgE

**N**

**NBS1** : Nijmegen breakage syndrome 1

**NFIL3/E4BP4** : nuclear factor I13-regulated

**NF-κB** : nuclear factor κB

**NHEJ** : non-homologous end-joining

**NIP** : (4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenyl)acetyl

**NKT** : natural killer T

**O**

**ORF** : open reading frame

**OVA** : ovalbumin

**OVA-PEP** : ovalbumin peptide

**P**

**PAMP** : pathogen associated molecular patterns

**Pax5** : paired box 5

**Pb**: paire de bases

**PBMC** : peripheral blood mononuclear cells

**PCR** : polymerase chain reaction

**PI3K** : phosphatidylinositol 3 kinase

**PKA-Cα** : cAMP-dependent protein kinase, catalytic subunit alpha

**PLCγ2** : phospholipase Cγ2

**PRR** : patterns recognition receptors

**Q**

**qPCR** : quantitative PCR

**R**

**RAG** : recombination activating gene

**RPA** : replication protein A

**S**

**SCID** : severe combined immunodeficiency

**SHM** : somatic hypermutation

**SNP** : single nucleotide polymorphism

**SSB** : single-strand break

**STAT** : signal transducer activator of transcription

**SWAP-70** : switch-associated protein 70

**Sx** : région switch d'une Ig de classe x

**T**

**TCR** : T cell receptor

**TFH** : follicular helper T cells

**TGF-β** : tumor growth factor β

**TH 1/2/9/17** : lymphocytes T "helper" 1/2/9/17

**TLR** : toll like receptor

**TNP** : trinitrophenyl

**TREG** : lymphocytes T régulateurs

**U**

**UNG** : uracil-DNA glycosylase

**V**

**V** : région variable

**VLR** : variable lymphocyte receptors

**W**

**wt** : wild-type

**X**

**XBP1** : X-box binding protein 1

**XRCC4** : X-ray repair cross-complementing protein 4

**Y**

**YFP** : yellow fluorescent protein

**YY1** : Yin Yang 1 protein

**Z**



Ces travaux de thèse ont été financés par le CNRS, la Région Limousin, et l'Association pour la Recherche sur le Cancer.

# SOMMAIRE

<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>8</b>
1. Introduction générale .....	9
2. Contexte scientifique .....	13
3. Revue d'introduction : "AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate" .....	22
<b>II. RESULTATS</b> .....	<b>23</b>
1. Le switch IgE et le bref destin des cellules à BCR IgE .....	24
2. Les recombinaisons initiées par l'enzyme AID au-delà du dogme .....	25
2.1 Recombinaisons inter-chromosomiques du locus IgH .....	25
2.2 Recombinaison suicide du locus IgH .....	26
<b>III. DISCUSSION GENERALE</b> .....	<b>28</b>
1. Phylogénie des IgE .....	29
2. Fonction des IgE dans le contexte des réponses immunes, en immunopathologie et régulation de ces réponses	29
3. Régulation de la production des IgE .....	33
3.1 Régulation du mécanisme de la commutation de classe vers S $\epsilon$ au niveau du locus IgH .....	33
3.2 Les transcrits IgE .....	38
3.3 La différenciation plasmocytaire IgE .....	41
3.4 Les lymphocytes B IgE+ .....	42
3.5 Modèles d'étude <i>in vivo</i> .....	47
3.6 Le réseau des IgE et de leurs récepteurs .....	51
4. Une mémoire IgE ? .....	53
5. Vers un usage thérapeutique des IgE .....	56
6. Recombinaisons non classiques médiées par l'enzyme AID .....	57
6.1 Recombinaisons inter-chromosomiques du locus IgH .....	58
6.2 Recombinaison suicide du locus IgH .....	63
6.3 Remaniements AID-dépendants du locus de chaîne lourde d'immunoglobuline et lymphomogénèse ..	64
7. Conclusion générale .....	66
<b>IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>67</b>
<b>V. ANNEXES</b> .....	<b>78</b>

1. Annexe 1 : “Transgenic non-human mammal for producing chimeric human immunoglobulin E” .....	79
2. Annexe 2 : “Production of Human or Humanized Antibodies in Mice” .....	80
3. Annexe 3 : “Class-Specific Effector Functions of Therapeutic Antibodies” .....	81
4. Annexe 4 : “Anti-CD20 can protect mice against lymphoma development: evaluation of the direct impact of IgA and cytotoxic effector recruitment on CD20 target cells” .....	82
5. Annexe 5 : “Specific impairment of proximal tubular cell proliferation by a monoclonal $\kappa$ light chain for Fanconi syndrome” .....	83
6. Annexe 6 : “A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene” .....	84

# **I. INTRODUCTION**

# 1. Introduction générale

L'immunologie est la science qui étudie le système immunitaire, système cellulaire et moléculaire assurant l'intégrité d'un organisme contre les agressions microbiennes et les proliférations malignes. De manière empirique, dès le VI<sup>ème</sup> millénaire avant JC, les chinois pratiquaient la « variolisation » qui protégeait les sujets sains, après inoculation de pus prélevé sur un malade, de la variole. En 1796, Edward Jenner utilise du pus provenant d'une personne atteinte par le virus de la vaccine pour immuniser un jeune garçon contre la variole, cette pratique donnera son nom à la vaccination et permettra l'éradication du virus deux siècles plus tard. En 1885, Louis Pasteur livre un vaccin à la fois préventif et curatif contre la rage. Cinq ans plus tard, Emil Adolf Von Behring et Shibasaburo Kitasato mettent en évidence une antitoxine antidiphtérique qui sera utilisée plus tard pour le traitement de la diphtérie, ouvrant la porte de l'immunologie humorale et de la sérothérapie. Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, Ilya Ilich Metchnikov découvre la phagocytose et propose ainsi le concept d'immunité cellulaire. Paul Ehrlich quant à lui, prévoit de manière remarquable la structure des récepteurs aux antigènes avec sa théorie des chaînes latérales. L'immunologie moderne débutera au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle et connaîtra une progression spectaculaire et de nombreuses applications thérapeutiques et vaccnologiques, contribuant avec d'autres avancées médicales à un allongement considérable de la durée de vie. Tous ces travaux précurseurs étaient aussi les premiers pas vers la compréhension et le traitement de pathologies fréquentes où des déséquilibres immunologiques sont au cœur de la pathogénie, l'auto-immunité et les allergies occupant une place centrale au cœur du vaste domaine de l'immunopathologie.

L'immunité est souvent schématiquement représentée comme scindée entre deux grandes entités : immunité innée et immunité adaptative. L'immunité innée, dont nous héritons génétiquement et sans apprentissage, résulte de la coévolution de motifs antigéniques (PAMP : *pathogen associated molecular patterns*) des micro-organismes et de leurs récepteurs réciproques (PRR : *patterns recognition receptors*) codés par les gènes des organismes pluricellulaires. Elle est présente chez les animaux et les végétaux et permet une réaction rapide contre un déterminant antigénique prédéfini. Chez les vertébrés, l'évolution a complété cette première ligne de défense

par une immunité adaptative extrêmement sophistiquée et efficace, basée sur la possibilité de faire évoluer le répertoire de récepteurs dirigés contre les antigènes et de mémoriser cette fonction. De façon très primitive déjà chez les agnathes comme la lamproie, des récepteurs VLR (*variable lymphocyte receptors*) préfigurent la possibilité de modeler le génome pour diversifier le répertoire de récepteurs antigéniques (par conversion génique sous l'action d'un enzyme orthologue d'AID). La sophistication de ce système chez les poissons à mâchoires et au-delà a été permise par l'apparition des recombinaisons de l'ADN RAG-dépendantes (RAG : *recombination activating gene*) entre différents segments géniques permettent aux récepteurs T (TCR : *T cell receptor*) et B (BCR : *B cell receptor*) de générer un répertoire et une diversité de reconnaissance des Ag considérable à partir d'une quantité très restreinte de gènes.

Des niveaux supérieurs de raffinement sont atteints lorsque l'évolution sélectionne l'apparition de mécanismes multiples de remaniements de l'ADN, spécifiques aux lymphocytes B, assurés par l'enzyme AID (*activation-induced cytidine deaminase*). Surtout, l'utilisation d'AID par les cellules B matures leur permet de générer au-delà de la diversification par RAG, un deuxième cycle de diversification en modifiant, la partie variable de leur récepteur par le phénomène d'hypermutation somatique (SHM : *somatic hypermutation*) ou de conversion génique (GCV : *gene conversion*), et ainsi d'affiner leur liaison à l'antigène. Les lymphocytes B peuvent également changer la partie constante de leur récepteur par le phénomène de recombinaison de classe (CSR : *class switch recombination*), recombinaison entre deux régions *switch* (S) après création de cassures doubles brins de l'ADN et réparation. Ces récepteurs, pouvant également être sécrétés sous forme d'anticorps, permettent la neutralisation directe de l'antigène (Ag) ou bien le recrutement de fonctions effectrices adaptées et ainsi une réaction adaptative de très grande qualité. L'enzyme AID a été découverte en 1999 par l'équipe de Tasuku Honjo et caractérisée comme initiatrice de la commutation de classe, de l'hypermutation somatique comme de la conversion génique des régions variables (ces différents mécanismes étant chacun utilisés selon des ratios variables d'une espèce à l'autre).

Les travaux présentés dans ce manuscrit se focalisent sur le destin cellulaire après l'expression de l'enzyme AID. Une partie étant consacrée à l'étude des lymphocytes B commutés

vers l'IgE, précurseurs des plasmocytes producteurs d'IgE, anticorps nécessaires à la défense antiparasitaire mais malheureusement aussi impliqués dans les réactions allergiques (et le choc anaphylactique potentiellement mortel). Ce caractère à double-tranchant de l'IgE implique des mécanismes de régulation très stringents à tous les niveaux de sa production. Ainsi la population de cellules IgE+ est elle-même étroitement régulée et freinée dans son expansion, si bien que ces cellules sont pratiquement indétectables *in vivo* dans des conditions physiologiques. Nous avons donc développé différentes approches et modèles *in vitro* et *in vivo* afin d'étudier ces cellules et de comprendre ce qui leur confère ce caractère fugace. En fait, la régulation rapide de ces cellules par l'expression du BCR IgE évite leur accumulation et limite très fortement la mémoire cellulaire IgE.

Notre élaboration d'animaux transgéniques dédiés à l'étude de ces cellules a également fait l'objet d'un dépôt de brevet pour la production d'anticorps humanisés de classe IgE.

Une seconde partie de nos travaux est consacrée à l'étude de recombinaisons initiées par AID. En effet, le mécanisme d'action d'AID est étudié intensivement depuis sa découverte, mais il est toujours d'actualité de comprendre comment cet enzyme réussit à cibler précisément ses séquences cibles au sein d'un génome de plusieurs milliards de paires de bases. Nous nous sommes intéressés à deux types de recombinaisons atypiques induites par AID, différentes du modèle classique de CSR ciblant deux régions S sur un même chromosome lors du CSR (dogme d'un modèle de « *looping-out* et délétion »). En fait, AID peut également cibler les régions S du chromosome homologue aboutissant à une recombinaison *trans*-chromosomique. Alors que ce phénomène était déjà connu chez le lapin et la souris, nous mettons en évidence sa présence et sa fréquence élevée chez l'homme. La fréquence importante de ce « *pathway* » par rapport au modèle classique, remet en cause par elle-même l'importance fonctionnelle que peuvent avoir les boucles intra-chromosomiques formées lors de la recombinaison de classe. Celles-ci sont-elles une règle absolue et un moteur de rapprochement des régions *switch* ? Ou ne sont-elles pas plutôt de simples structures passives entre des régions *switch* que d'autres forces attirent et rassemblent indépendamment du lien physique que constitue la fibre chromatinienne ? D'autres structures tridimensionnelles ne pourraient-elles alors également se former avec des partenaires multiples

selon une régulation qui appellerait d'autres contrôles qu'un simple effet de « *linking* » ou de « *looping* » ?

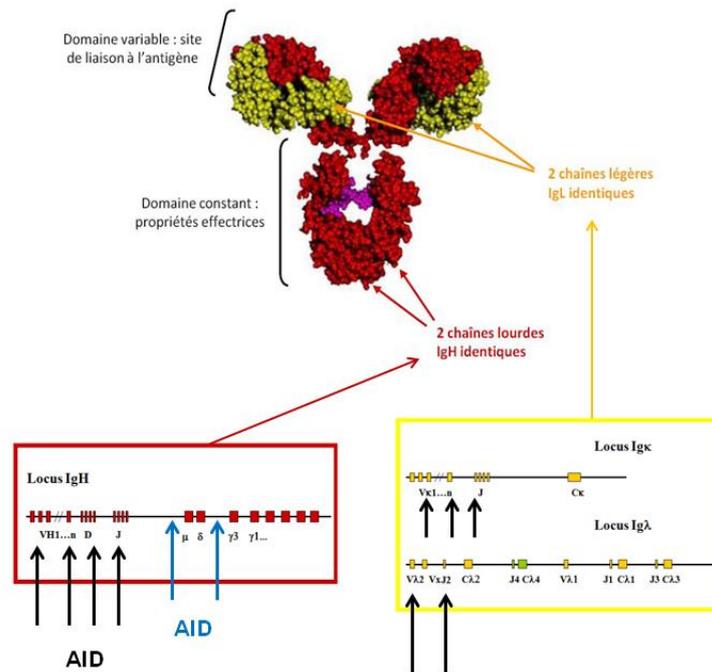
Finalement une cible inattendue d'AID et bouleversant à tout jamais le destin de la cellule B a été mise en évidence dans la région terminale du locus de chaîne lourde d'immunoglobuline (IgH), après les gènes constants, de part et d'autre et au sein de la région régulatrice 3' (3'RR). La position même de cette cible implique que sa recombinaison avec la région S $\mu$  entraîne la délétion complète du locus IgH, et donc la perte du BCR et de ses signaux de survie associés. La cellule impliquée se déleste donc de ses armes et meurt... nous avons nommé ce phénomène « Locus Suicide Recombination » (LSR), pour recombinaison suicide du locus IgH.

Nous allons donc voir en cours de ces travaux comment l'expression dans les lymphocytes B de l'enzyme AID va remodeler le locus IgH et moduler le destin de la cellule B associée, selon le contexte physiologique.

## 2. Contexte scientifique

Les différentes notions abordées au cours de ces travaux ont fait l'objet de l'écriture d'une revue (acceptée à Oncotarget) que nous avons choisi de substituer à l'introduction bibliographique. Les points importants seront également développés et discutés dans la partie discussion. Les notions générales et le cheminement des idées seront présentés brièvement dans ce paragraphe de contexte.

La production d'immunoglobulines (Ig) permet de lutter efficacement contre la plupart des pathogènes, selon différents mécanismes. Les Ig sont d'abord exprimées à la membrane des lymphocytes B, formant le BCR en association avec  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$ , puis sécrétées par les plasmocytes. Le domaine variable (V) des Ig, créé par les recombinaisons (VDJ des chaînes lourdes et VJ des chaînes légères) RAG-dépendantes, est le site de liaison à l'Ag (pour revue (Nishana and Raghavan, 2012)). L'association des domaines variables des chaînes lourde et légère forme le paratope de l'Ac permettant l'interaction avec un motif antigénique, constituant l'épitope. Cette reconnaissance des Ag suffit parfois à leur neutralisation mais la présence des domaines constants d'Ig permet également de recruter d'autres fonctions du système immunitaire (recrutement du système du complément, activation de la cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC) ou de la phagocytose cellulaire dépendante des Ac (ADCP) ou dégranulation). La genèse de ces Ig a lieu dans la moelle osseuse, indépendamment des Ag, et permet aux lymphocytes B qui expriment un BCR fonctionnel IgM de migrer en périphérie. Lors de la rencontre avec un Ag les lymphocytes B activés vont pouvoir exprimer l'enzyme AID et modifier à la fois les domaines variable et constant, permettant d'augmenter l'affinité des Ac (SHM) et de changer de classe (CSR). L'hypermutation somatique se fait par introduction de mutations ponctuelles dans les segments V(D)J des chaînes lourde et légère, le changement de classe nécessite le ciblage, les cassures doubles brins et la réparation des régions S, ces processus étant dépendants de AID. Ainsi AID joue un rôle central dans la production d'Ig en exerçant son action sur ces différentes cibles (figure 1).



**Figure 1 : Structure générale des immunoglobulines et ciblage de AID**

Les immunoglobulines sont formées de deux chaînes lourdes (en rouge) et de deux chaînes légères (en jaune) reliées entre elles par des ponts disulfures. Les parties variables des chaînes lourde et légère forment le site de liaison à l'antigène. Le domaine constant confère à chaque classe d'immunoglobuline ses propriétés effectrices en permettant le recrutement de différents acteurs du système immunitaire.

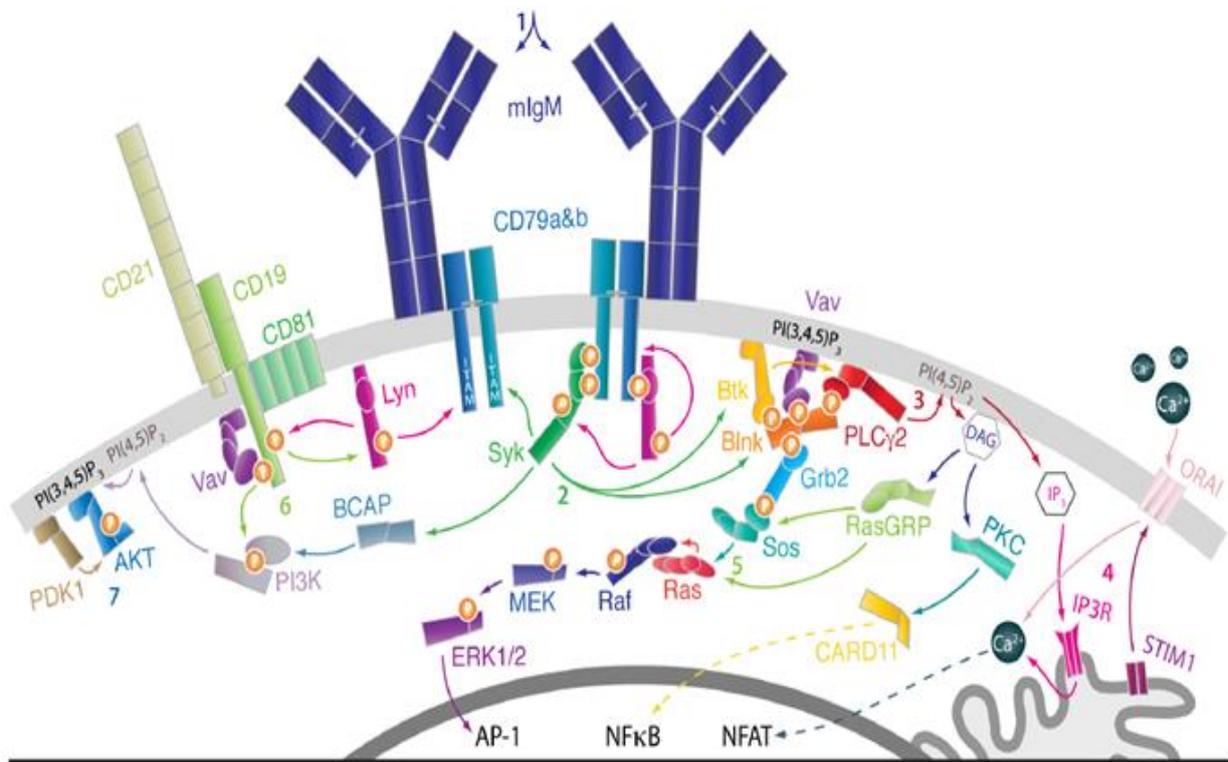
Le locus de chaîne lourde (IgH) contient les segments V(D)J qui formeront le domaine variable, après recombinaisons, ainsi que les gènes des domaines constants des différentes classes.

Les chaînes légères sont codées par deux loci indépendants (Igk et Igλ), organisés de manière similaire, avec des segments VJ qui formeront la partie variable, après recombinaison, et une partie constante permettant l'association avec la chaîne lourde.

Des cibles potentielles de AID sont indiquées par des flèches : en noir pour l'hypermutation somatique, sur les segments V(D)J (après recombinaison) et en bleu pour la recombinaison de classe, au niveau des régions *switch*.

Les fonctions et le mécanisme d'action d'AID sont développés dans le chapitre 1 de la revue incluse ci-après « AID functions and sites of action ».

La commutation de classe permet de modifier le BCR exprimé par une cellule B. Or ce BCR, en association avec les co-recepteurs (CD19, CD22, FcγRIIB, etc) et en interaction avec son environnement, module fortement le destin du lymphocyte B, permettant sa prolifération et sa survie ou induisant son apoptose *via* ses voies de signalisation (figure 2).



**Figure 2 : Signalisations induites par le BCR après activation antigénique.**

Le BCR est composé d'une immunoglobuline membranaire (mIg) associée à l'hétérodimère CD79a/CD79b (Iga/Igβ).

- 1) La reconnaissance de l'antigène entraîne la phosphorylation des ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) de l'hétérodimère CD79a/CD79b par les kinases de la famille SFK (*Src-family kinase*), Lyn en particulier, et Syk.
- 2) La phosphorylation des ITAM permet la liaison des protéines SFKs à domaines SH2 et augmente leur activité kinase. La double phosphorylation des ITAM permet la liaison et l'activation de Syk. Syk activée permet la propagation du signal BCR via la phosphorylation d'un groupe de protéines associées à l'adaptateur Blnk (*B cell linker, SLP-65*), dont Btk (*Bruton's tyrosine kinase*), Vav et PLCγ2 (*phospholipase C-gamma 2*). Ces protéines ont des domaines PH (*pleckstrin-homology*) qui lient les phosphoinositides de la membrane plasmique interne et c'est la PI3K (*PI3 kinase*) qui permet la phosphorylation de Pi(4,5)P2 en Pi(3,4,5)P3, qui a un rôle de second messager important. La Btk permet la phosphorylation et l'activation de la PLCγ2.
- 3) La PLCγ2 clive le Pi(4,5)P2 en IP3 (inositol triphosphate) et DAG (diacylglycérol).
- 4) L'IP3 se lie à son récepteur (IP3R) au niveau du réticulum endoplasmique, permettant une libération de calcium intracellulaire et l'activation de NFAT. Le DAG se lie et active les membres de la famille PKC (dont PKCβ) et le facteur d'échange nucléotidique RasGRP .
- 5) En aval, la signalisation par le BCR active de multiples cascades de kinases (dont Erk et les MAP kinases) et les facteurs d'échanges nucléotidiques Ras/Raf, aboutissant à la translocation nucléaire de facteurs de transcription tels que AP-1, NF-κB et NFAT.
- 6) Cette signalisation est amplifiée par le récepteur CD19 qui active Lyn et la PI3K.
- 7) L'accumulation de Pi(3,4,5)P3 permet l'activation d'Akt (qui joue également un rôle important dans le signal tonique du BCR *via* la voie TC21).

Ces événements permettent l'activation B, la présentation de l'antigène, la production de cytokines, la prolifération cellulaire et la différenciation.

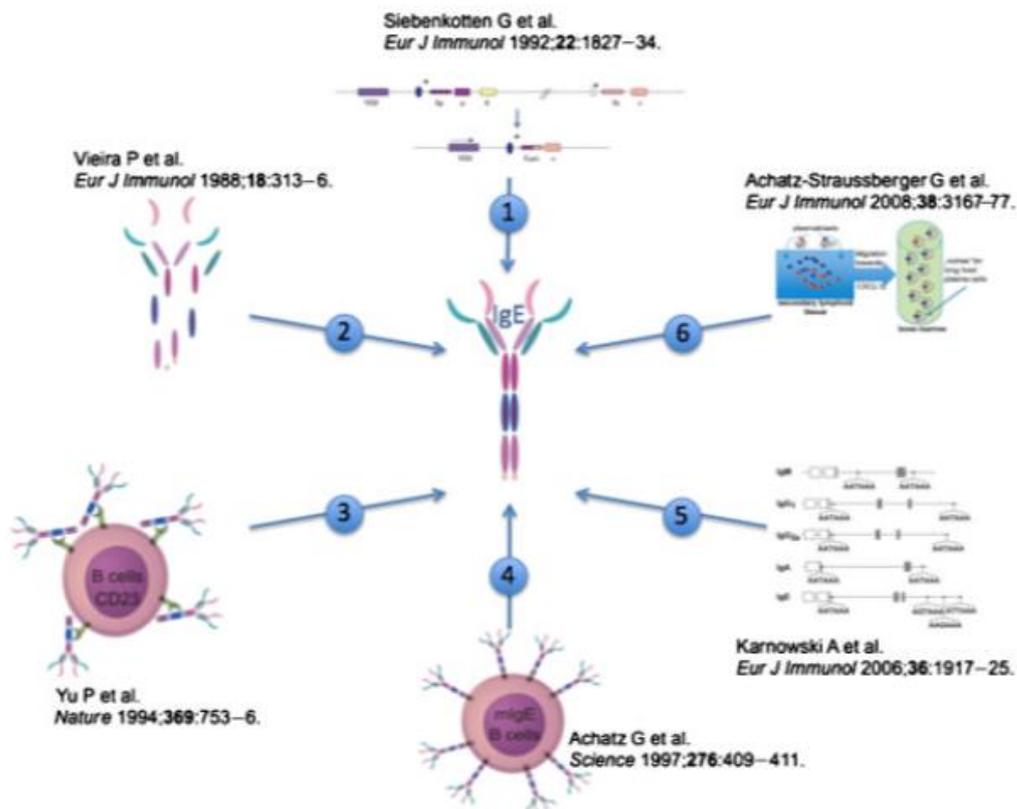
Des différences qualitatives et quantitatives entre les classes de BCR existent et modulent le destin des lymphocytes B, en favorisant la différenciation plasmocytaire des cellules commutées par exemple.

Schéma adapté de (Packard and Cambier, 2013).

Les caractéristiques des différentes classes de BCR sont décrites dans le chapitre 2 de la revue : « CSR and the BCR class-specific control of B cell fate ».

L'étude des BCR commutés, initiée au laboratoire, a permis une observation importante : alors que les BCR IgA et IgG peuvent se substituer à l'IgM pour le développement B ((Duchez et al., 2010) et observations non publiées) le BCR IgE ne permet pas d'assurer un tel développement. De plus, alors qu'il est possible de générer *in vitro* des lymphocytes B à IgE de membrane, ces cellules sont quasiment indétectables *in vivo*. Nous avons donc posé et étudié l'hypothèse d'une apoptose induite par le signal tonique du BCR IgE. Cette partie, qui constitue le coeur de ces travaux de thèse, fait l'objet d'un article en préparation et présenté dans la partie résultat (article 1 : "An auto-regulatory negative control of IgE class-switched B cell fate").

Ces données complètent les nombreuses études menées par d'autres équipes pour comprendre la réponse et la régulation des IgE, qui ont finalement beaucoup focalisées sur les différents paramètres de la production d'IgE mais très peu sur le BCR IgE lui-même (figure 3).



### Figure 3 : Régulation de la production d'immunoglobuline E

Différents niveaux de régulation permettent un maintien du taux d'IgE extrêmement faible.

- 1) Un niveau de régulation important se fait avant même la production de cet isotype, par un contrôle stringent du *switch* IgE
  - 2) La demi-vie très courte de l'IgE sécrétée contribue au maintien de sa faible concentration
  - 3) Le récepteur de faible affinité CD23, exprimé par les cellules B activées, participe au rétrocontrôle de la production d'IgE
  - 4) Le BCR IgE est nécessaire à la réponse IgE
  - 5) Contrairement aux autres isotypes, les transcrits d'IgE membranaires contiennent des sites de polyadénylation criptiques, inefficaces
  - 6) Les plasmablastes IgE ont intrinsèquement une moindre chance de migrer vers les niches plasmocytaires à longue durée de vie
- Adapté de Achatz-Straussberger et al., 2009.

### Les IgE et leurs récepteurs

La production d'IgE est finement contrôlée et permet de maintenir un taux d'IgE sérique extrêmement faible. Cependant une part importante (environ la moitié) des IgE produites n'est pas présente sous forme soluble mais fixée à la surface des récepteurs aux IgE dits « de forte affinité » (FcεRI), exprimés par des cellules effectrices et permettant leur activation lors du pontage par l'antigène. Le récepteur aux IgE dit « de faible affinité » (CD23 ou FcεRII) joue également un rôle important dans la régulation et la réponse IgE, et ce récepteur peut aussi avoir des propriétés cytokiniques sous une forme soluble. Enfin, un nouveau récepteur aux IgG (FcγRIV) cumulant une capacité de liaison aux IgE, a été mis en évidence chez la souris, et permet de lier les complexes IgE-Ag, participant d'une façon pour l'instant mal connue à la réponse IgE. Étant donné que les propriétés effectrices des IgE se font principalement via leurs interactions avec ces récepteurs, la physiologie des réponses IgE ne peut être appréhendée sans une vision globale de ce réseau.

#### FcεRI : récepteur de haute affinité aux IgE

La liaison de l'IgE à ce récepteur se fait avec la plus grande affinité connue entre une immunoglobuline et son récepteur, avec une constante d'affinité  $K_a \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}$ . Cette association peut se faire même en absence d'Ag, et stabilise les IgE, augmentant considérablement leur durée de vie, et participe in vitro à la survie des mastocytes (après déprivation de facteurs de croissance) (Kawakami and Galli, 2002). La structure cristallographique du complexe FcεRI/IgE démontre que cette interaction implique le domaine CH3 de l'IgE, liée à la sous-unité  $\alpha$  du FcεRI (Garman et al., 2000). Le FcεRI appartient à la superfamille des immunoglobulines et est très homologue aux récepteurs Fcγ. Chez la souris ce récepteur est présent sous-forme tétramérique uniquement,

incluant la sous-unité  $\alpha$  responsable de la liaison de l'IgE, une sous-unité  $\beta$  et deux sous-unités  $\gamma$  (structure  $\alpha\beta\gamma_2$ ), alors que chez l'homme on retrouve en plus de cette structure une variante trimérique, dépourvue de la sous-unité  $\beta$  (structure  $\alpha\gamma_2$ ). Ce sont les sous-unités  $\beta$  et/ou  $\gamma$  qui permettent la signalisation de ce récepteur grâce à leur domaine intra-cytoplasmique ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), le Fc $\epsilon$ RI étant un récepteur activateur. L'éventuelle liaison secondaire par les IgE fixées au Fc $\epsilon$ RI, d'un Ag reconnu avec une forte affinité (même s'il est présent à des concentrations extrêmement faibles) induit l'activation du Fc $\epsilon$ RI. Les motifs ITAM sont alors phosphorylés par la kinase Lyn et permettent le recrutement de la kinase Syk via son domaine SH2. Syk change alors de conformation, ce qui libère son domaine kinase, entraînant son activation et les cascades de signalisation associées, responsables de l'activation cellulaire (pour revue (Mócsai et al., 2010)).

Les mastocytes présents dans les tissus et les basophiles circulant dans le sang sont les principaux types cellulaires exprimant le Fc $\epsilon$ RI. Chez l'homme de faibles niveaux d'expression sont détectés sur d'autres cellules dont les éosinophiles, les neutrophiles et les plaquettes, ainsi que les monocytes, les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques (pour revue (Kinet, 1999)). L'activation de ce récepteur via le complexe IgE-Ag aboutit à la dégranulation des mastocytes et basophiles, c'est-à-dire à la libération de molécules préformées présentes dans les granules cellulaires, dont l'histamine, la sérotonine et des protéases. Ce phénomène participe à la destruction des pathogènes (tels que les parasites multicellulaires dont les helminthes) ainsi qu'à une vasodilatation à l'origine du recrutement d'autres cellules du système immunitaire, mais est aussi impliqué dans les réactions allergiques (pour revue (Kraft and Kinet, 2007)). Vis-à-vis des helminthes lorsque ceux-ci sont liés par des IgE spécifiques, ce récepteur Fc $\epsilon$ RI permet également des phénomènes de cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC), médiés par les éosinophiles.

Le Fc $\epsilon$ RI exprimé par les cellules présentatrices d'Ag (dont les cellules de Langerhans et les cellules dendritiques) participe à la présentation de l'Ag, en délivrant les Ag liés à l'IgE à la voie du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, et induit une réponse de type TH2 via la production de cytokines telle que l'IL4 (Zhang and Murphy, 2007).

### **FcεRII : récepteur de faible affinité**

Ce récepteur appartient à la superfamille des lectines de type-C (calcium-dépendant). Il contient un domaine lectine extra-cellulaire C-terminal, une « tige » faisant le lien avec la partie membranaire, un domaine transmembranaire et une partie intra-cytoplasmique N-terminale. Il peut s'auto-associer et former des trimères en s'enroulant au niveau des tiges (Sutton and Gould, 1993). Le domaine lectine permet la liaison avec un site de l'IgE au niveau du domaine CH3, distinct de celui permettant la liaison avec le FcεRI, mais ces deux interactions sont exclusives (Dhaliwal et al., 2012). La tige peut également être la cible de clivages protéolytiques (par des métalloprotéinases, notamment ADAM10), générant des fragments solubles, ayant alors des propriétés cytokiniques pro-inflammatoires et amplificatrices de la réponse IgE (Bonney et al., 1997; Platzer et al., 2011). L'affinité de ce récepteur pour l'IgE est faible sous forme monomérique ( $K_a \sim 10^6-10^7 \text{ M}^{-1}$ ) mais augmente avec la trimérisation ( $K_a \sim 10^8-10^9 \text{ M}^{-1}$ ), approchant la forte affinité du FcεRI.

Un épissage alternatif produit deux isoformes de CD23 : CD23a et CD23b, qui ne diffèrent que de quelques acides aminés dans la partie cytoplasmique N-terminale. Les deux isoformes sont présentes à la surface des cellules B, CD23a étant exprimé par les lymphocytes B activés par l'Ag (et B spécifique), alors que CD23b est induit (notamment par l'IL4) et peut être exprimé par les monocytes, les macrophages, les éosinophiles, les plaquettes, les cellules NK, les lymphocytes T, les cellules folliculaires dendritiques (FDC) et les cellules de Langerhans. L'isoforme CD23a est associée à l'endocytose IgE-dépendante de l'Ag et à sa présentation aux cellules T, alors que l'isoforme CD23b exprimée par les macrophages permet la phagocytose des complexes solubles IgE-Ag, mais globalement la fonction de ce récepteur reste encore mal connue. Le cross-linking de CD23 sur les cellules B est inhibiteur de la production d'IgE, constituant (à l'inverse du CD23 soluble), une boucle auto-inhibitrice de la production des IgE (Gould and Sutton, 2008).

### **FcγRIV : un nouveau récepteur aux IgE**

Ce récepteur a d'abord été identifié comme un récepteur aux IgG mais sa capacité de lier les IgE a ensuite été démontrée dans deux études indépendantes. Les complexes immuns IgE-Ag sont ainsi capables de se lier aux macrophages par le FcγRIV et de les activer, entraînant la phagocytose du complexe, la présentation de l'Ag aux cellules T, la production de cytokines pro-

inflammatoires et la phase retardée de réactions allergiques cutanées (Hirano et al., 2007). Le FcγRIV a été identifié chez la souris, le rat et le hamster mais pas chez l'homme, et le récepteur Fc humain qui s'en rapproche le plus au niveau extra-cellulaire est le FcγRIIIA, cependant ce dernier ne lie pas l'IgE. De plus le FcγRIV ressemble au FcεRI de macrophages humains de par sa structure quaternaire et sa distribution tissulaire. Il s'avère que ce récepteur est capable de causer l'inflammation du poumon induite par l'IgE (Mancardi et al., 2008). Les domaines d'interaction précis entre l'IgE et le FcγRIV ne sont pas encore connus et la fonction de ce récepteur reste à préciser.

Le FcγRIV est associé aux deux sous-unités FcRγ, permettant la transduction du signal et fonctionne comme un récepteur activateur. Il est exprimé par les monocytes, les macrophages et les neutrophiles.

### **Autres récepteurs et conclusion**

En plus de ces récepteurs, l'IgE murine peut se lier in vitro au FcγRIIIA et au FcγRIIB, qui est lui un récepteur inhibiteur car il contient dans sa partie intra-cellulaire un motif ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif), et pourrait donc participer à un rétro-contrôle de la production d'IgE. La galectine 9 sécrétée se lie à l'IgE avec une forte affinité (Niki et al., 2009), la galectine 3 soluble lie également l'IgE mais avec une faible affinité, et en plus des formes membranaires les FcεRI et FcεRII sont présents sous forme sécrétée, pouvant se lier à l'IgE soluble et potentiellement à l'IgE membranaire et ainsi participer à la régulation de la réponse IgE (pour revue (Platzer et al., 2011)).

L'IgE est donc en interaction avec différents récepteurs, le FcεRI présentant une affinité extrêmement élevée et assurant une fonction biologique importante, les autres récepteurs Fc ont également des fonctions spécifiques et les galectines participent à ce réseau IgE. Les différents récepteurs Fc permettent la captation des complexes IgE-Ag et participent donc à la présentation de l'Ag. L'IgE sécrétée par les plasmablastes et les plasmocytes est en grande partie captée par ces récepteurs (le FcεRI en particulier) sous forme libre ou complexée à l'Ag, régulant le taux d'IgE sérique. L'équilibre entre ces différentes composantes participe aux réponses IgE et doit contribuer à sa régulation.

La méthodologie de l'obtention de souris transgéniques humanisées, utilisées au cours notre étude sur les IgE, a également été publiée sous la forme d'un article de méthode, présenté en annexe (annexe 2 : "Production of Human or Humanized Antibodies in Mice").

Les animaux  $\mu$ κI générés, qui permettent une production d'anticorps monoclonaux humanisés, de classe IgM puis IgE, après immunisation et création d'hybridomes, ont été brevetés. Le brevet est présenté dans la partie annexe (annexe 1 : "Transgenic non-human mammal for producing chimeric human immunoglobulin E").

Une autre partie de cette thèse concerne le ciblage d'AID, au moment de la recombinaison de classe, au niveau des régions S, ainsi qu'au cours de l'activation B, entre la région S $\mu$  et les nouvelles cibles d'AID : les régions « LS » (pour « *like-switch* » car ayant des caractéristiques de régions S).

Au cours du CSR, une région S donneuse (S $\mu$  principalement) est ciblée par AID ainsi qu'une région S $x$  acceptrice (x étant l'isotype activé, en fonction de l'environnement cytokinique en particulier). Cela se fait classiquement sur le même chromosome, créant une boucle intra-chromosomique, le rapprochement des deux régions S, leur cassure puis leur réparation. Le fragment intermédiaire est éliminé sous la forme d'un épisode. Cependant chez le lapin et la souris, a été observé un mécanisme moins fréquent qui implique des recombinaisons inter-chromosomiques. Cela implique donc l'activation, sur les deux allèles de deux régions S donneuses et de deux régions S acceptrices, ainsi que la formation de structures, différentes des boucles intra-chromosomiques classiques. Les données générées par le séquençage massif du génome humain (projet ENCODE : <http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>) nous ont permis de sélectionner différents SNP (*single nucleotide polymorphisms*) et d'étudier ce phénomène chez l'homme. Un SNP fréquent dans le gène JH6 et un SNP plus rare dans le gène  $\alpha$ 1 ont été sélectionnés et un donneur sain double hétérozygote a été identifié. Nous avons pu mettre en évidence ce phénomène de recombinaison inter-chromosomique à une fréquence élevée chez l'homme et ces résultats font l'objet d'un deuxième article, en préparation, présenté dans la partie résultats (article 2 : « Evaluation of *cis- versus trans*-chromosomal class switch recombination in human B cells »).

Enfin les régions LS, d'abord identifiées comme répétitives *in silico*, ont été étudiées chez la souris. Il s'avère que ces régions sont transcrites, mutées par AID et qu'elles peuvent effectivement être ciblées au cours d'un nouveau processus de recombinaison, le LSR. Cette recombinaison ultime entre la région S $\mu$  et une des régions LS localisée à la fin du locus IgH entraîne la perte du BCR *in vitro* et *in vivo* ainsi que l'apoptose des cellules concernées. La découverte de ce phénomène a été publiée (article 3 : "AID-Driven Deletion Causes Immunoglobulin Heavy Chain Locus Suicide Recombination in B Cells" et article 4 : "Recombinaisons suicides du locus IgH. Quand le lymphocyte B dépose les armes !"). La partie 3 de la revue traite également de ce sujet : « LSR elimination of B cells ».

### **3. Revue d'introduction : "AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate"**

## **II. RESULTATS**

# 1. Le switch IgE et le bref destin des cellules à BCR IgE

Article 1 :

**« An auto-regulatory negative control of IgE class-switched B cell fate »**

Brice Laffleur, Sophie Duchez, Denis-Lagache Nicolas, Sophie Péron, Claire Carrion, Yves Denizot, Jean Sainte-Laudy and Michel Cogné

Manuscrit en préparation (version préliminaire).

Nous avons étudié la physiologie de la cellule B exprimant le BCR IgE par différentes approches in vitro et in vivo. Alors que ces cellules peuvent être facilement générées in vitro, elles sont quasiment indétectables in vivo, suggérant un mécanisme de régulation important de ce compartiment cellulaire. Il apparaît à l'occasion de ces travaux que cette régulation est liée au caractère intrinsèque de la cellule B IgE<sup>+</sup> et directement dépendante de l'expression du BCR IgE. Ce BCR se distingue de toutes les autres classes par des propriétés uniques, il ne permet pas de supporter le développement B précoce, in vitro les cellules IgE<sup>+</sup> primaires montrent une tendance apoptotique (notamment dans le test classique en culture, de « déprivation de sérum »), il n'y a pas d'accumulation de lymphocytes B IgE<sup>+</sup> in vivo même dans le modèle murin LATY136F hyper-TH2, qui a pourtant 10 000 fois plus d'IgE sérique, et le transfert de ces cellules IgE<sup>+</sup> in vivo montre leur très brève survie après transfert. L'expression forcée du BCR IgE modifie le phénotype de lignées cellulaires B matures, induit leur apoptose, et contre-sélectionne les cellules IgE<sup>+</sup> dans un modèle murin transgénique que nous avons généré.

Ma contribution à cette étude a consisté en la mise en place des protocoles, la génération et l'analyse de l'ensemble des données. J'ai construit les différents plasmides utilisés, dont celui de knock-in qui a permis la création du modèle murin  $\mu\epsilon$ KI que j'ai croisé avec différentes lignées transgéniques et dont j'ai assuré le génotypage et le suivi, tout comme celui des autres modèles utilisés. J'ai encadré différents étudiants qui ont participé à ces travaux et collaboré avec les différents co-auteurs au cours de ces travaux. J'ai également participé à la rédaction de l'article.

## 2. Les recombinaisons initiées par l'enzyme AID au-delà du dogme

### 2.1 Recombinaisons inter-chromosomiques du locus IgH

Article 2:

#### « Evaluation of *cis- versus trans*-chromosomal class switch recombination in human B cells »

Brice Laffleur, Sylvia M. Bardet, Armand Garot, Audrey Baylet and Michel Cogné

Manuscrit soumis à Gene and immunity.

Nous avons mis en évidence le phénomène de recombinaison inter-chromosomique, ou trans-switch, au cours de la recombinaison de classe du locus de chaîne lourde d'immunoglobuline (IgH) chez l'homme, alors que ce phénomène était déjà connu chez le lapin et la souris. Ce phénomène implique des cassures doubles brins de l'ADN sur les deux chromosomes IgH ainsi que la création d'une synapse inter-chromosomique, différente de la structure en boucle intra-chromosomique classiquement présentée pour décrire le switch.

Ma contribution a consisté en la mise en place des différents protocoles utilisés et à la génération d'une partie des séquences. J'ai travaillé avec Sylvia, étudiante en post-doctorat, qui a recherché par bioinformatique les SNP d'intérêt avec des fréquences suffisantes pour identifier un donneur sain double hétérozygote, et nous avons analysé l'ensemble des séquences. J'ai également encadré Audrey, étudiante en BTS 2ème année, qui a suivi les différents protocoles et généré de nombreuses séquences. J'ai également participé à la rédaction de l'article.

## 2.2 Recombinaison suicide du locus IgH

### Article 3:

### **“AID-Driven Deletion Causes Immunoglobulin Heavy Chain Locus Suicide Recombination in B Cells”**

Sophie Péron, Brice Laffleur, Nicolas Denis-Lagache, Jeanne Cook-Moreau, Aurélien Tinguely, Laurent Delpy, Yves Denizot, Eric Pinaud and Michel Cogné

Manuscrit accepté en Avril 2012 à Science.

Nous avons mis en évidence un nouveau phénomène de recombinaison du locus de chaîne lourde d'immunoglobuline médié par AID. Dans cette étude nous montrons que la présence de régions « like-switch » (LS) au niveau de la région régulatrice 3'RR murine et leur transcription entraînent leur ciblage par AID. Ces régions subissent donc des mutations et des événements de recombinaisons avec les régions switch ( $S\mu$  principalement) entraînant la délétion des gènes constants et donc la perte du BCR et la mort de la cellule B. Ce phénomène a donc été nommé « Locus Suicide Recombination » (LSR). C'est un phénomène inductible que nous détectons dans des lymphocytes B activés in vitro et in vivo.

Ma contribution à cette étude a consisté à cloner et séquencer des jonctions de recombinaisons de LSR, à stimuler les lymphocytes B in vitro dans les différentes conditions, à immuniser les souris et préparer les banques d'ADN de ces différents échantillons. J'ai également mis en place des protocoles d'analyse de cytométrie en flux pour tester ces cellules et j'ai participé à la rédaction de l'article.

Article 4:

**“Recombinaisons suicides du locus IgH  
Quand le lymphocyte B dépose les armes !”**

Sophie Péron, Brice Laffleur, Nicolas Denis-Lagache, Jeanne Cook-Moreau, Matthieu Filloux,  
Michel Cogné

Manuscrit accepté en Mai 2012 à Médecine/sciences.

Cet article présente le phénomène de recombinaisons suicides (LSR) du locus de chaîne lourde d'immunoglobuline, après la publication de l'article scientifique (Péron et al., 2012), dans la revue médecine/sciences.

J'ai participé à la rédaction de cet article.

### **III. DISCUSSION GENERALE**

## 1. Phylogénie des IgE

Les IgE, comme les IgG, sont spécifiquement présentes chez les mammifères. Ces deux classes d'immunoglobulines auraient pour ancêtre commun l'IgY présente chez les amphibiens, les reptiles et les oiseaux. La duplication de ce gène (il y a environ 300 millions d'années) aurait ainsi permis de séparer les fonctions effectrices des IgG et des IgE (Warr et al., 1995). Plusieurs millions d'années plus tard, les IgG représentent la classe quantitativement prépondérante dans le sérum des mammifères alors que les IgE sont les moins abondantes et ne sont présentes qu'à des doses extrêmement faibles (de l'ordre du ng/mL). Cependant les IgE ont été conservées chez les trois lignages de mammifères (placentaires, marsupiaux et monotrèmes), ce qui suppose qu'elles confèrent un avantage sélectif. La structure générale (*i.e.* les 4 domaines constants, les positions des sites putatifs de formation des ponts disulfures et le site de N-glycosylation présent dans le domaine CH3) est conservée, et une augmentation d'homologie est observée au niveau du site de fixation au récepteur de haute affinité FcεRI, suggérant l'importance fonctionnelle de cette interaction IgE/FcεRI (Vernersson et al., 2004). Donc, la conservation sur une aussi longue période sous-entend une fonction capitale de l'IgE dans l'immunité, alors que le maintien constant de son expression à des niveaux très bas suggère la nécessité d'un contrôle stringent de cette classe d'Ig dans les conditions physiologiques, probablement du fait de sa « dangerosité » immunopathologique potentielle.

## 2. Fonction des IgE dans le contexte des réponses immunes, en immunopathologie et régulation de ces réponses

Les IgE jouent un rôle dans la défense anti-parasitaire, en particulier contre les helminthes (parasites eucaryotes multicellulaires) qui infectent environ un quart de la population mondiale (Maizels et al., 2009). Les réponses immunes contre les helminthes, tels que *Schistosoma mansoni* et *S. haematobium*, sont caractérisées par un taux élevé d'IgE totales et spécifiques, une éosinophilie et un profil fortement TH2 (Capron and Capron, 1994). Les IgE spécifiques promeuvent

le recrutement de cellules inflammatoires (éosinophiles en particulier) et une ADCC permettant la destruction du parasite. De nombreuses études épidémiologiques confirment une association entre un taux élevé d'IgE totales et spécifiques et l'existence d'une infection parasitaire (Hagan et al., 1991), témoignant aussi d'une hyper-stimulation TH2 et dont la contribution à la protection de l'organisme reste cependant mal précisée.

Une autre fonction protectrice des IgE pourrait être leur effet « adjuvant » ou catalyseur de la réponse IgG. En effet, différents travaux du groupe de Heyman montrent que l'ajout d'IgE spécifiques (IgE anti-TNP) en tant qu'adjuvant lors d'une immunisation BSA-TNP peut augmenter d'un facteur 1000 la production d'IgG spécifiques anti-BSA et augmenter la production d'IgM et d'IgE spécifiques. Cet effet est T-dépendant et CD23-dépendant, et pourrait résulter de l'endocytose par les cellules B, *via* leur récepteur CD23, du complexe IgE/Ag puis de la présentation de peptides antigéniques aux lymphocytes T (pour revue (Heyman, 2002)). Des études du groupe de Siccardi démontrent également cet effet adjuvant, même avec des IgE non-spécifiques (Reali et al., 2001), mais selon un processus FcεRI-dépendant dans ce protocole (Nigro et al., 2009).

Malheureusement les IgE sont mieux connues pour leurs effets délétères dans les réactions d'allergie immédiate (asthme, urticaire, allergies alimentaires...), qui peuvent aller jusqu'à l'œdème de Quincke ou au choc anaphylactique, potentiellement mortel. La fréquence des allergies a très fortement augmenté et reste en augmentation constante dans les pays développés (Holgate and Polosa, 2008). Les traitements symptomatiques proposés vont agir, soit au niveau terminal (anti-histaminiques et corticostéroïdes) en supprimant la libération des médiateurs chimiques des mastocytes induite par la liaison de complexes IgE-allergènes sur leur FcεRI, soit en amont pour neutraliser les IgE sécrétées (immunothérapie passive anti-IgE) ou enfin de façon expérimentale et comme nous le verrons plus tard au niveau des lymphocytes B IgE+, afin d'éviter leur différenciation en plasmocytes sécréteurs (immunothérapie anti-mIgE (Luger et al., 2010)). Les traitements de fond reposent surtout sur la désensibilisation, qui consiste en quelque sorte à tenter d'inverser la polarité de la réponse immune vers une orientation TH1.

La physiopathologie de l'allergie immédiate renvoie essentiellement à la question de la régulation cellulaire des réponses immunes humorales. Les allergies ont longtemps été interprétées comme simplement liées à une polarisation TH2 anormale de la réponse T, avec une expansion de cellules auxiliaires TH2 spécifiques d'un antigène souvent environnemental (« allergène ») et en corollaire un *switch* accru des cellules B pour générer des IgE spécifiques de cet allergène. La très forte augmentation du nombre d'allergies est ainsi souvent attribuée à la nature de notre « environnement antigénique » et a incité Strachan à proposer il y a vingt ans la « théorie de l'hygiène » (qui n'a cependant pas reçu de confirmation scientifique très robuste et ne doit certainement pas être prise à la lettre). Un environnement très aseptisé pourrait biaiser certaines réponses immunes vers un profil TH2. Des contacts répétés avec des germes stimulant l'immunité cellulaire pourraient à l'inverse contrebalancer un profil hyper-TH2. A l'appui de cette théorie, la confrontation du système immunitaire avec certains antigènes, les helminthes en particulier, joue un rôle immunomodulateur. Quelques études ont montré que des infections fréquentes par des entérovirus dans la petite enfance pourraient diminuer la survenue d'atopies (Korhonen et al., 2013). Cependant, l'observation inverse a été publiée par d'autres auteurs avec des infections virales respiratoires (Lee et al., 2007). La désensibilisation par administration de faibles doses d'allergènes à long terme par une voie stimulant les réponses TH1 ou TREG peut également rétablir la balance et être efficace au cours du traitement des allergies, mais elle est loin de donner des résultats constants. Des travaux ont aussi montré le rôle immunomodulateur d'extraits antigéniques d'helminthes au cours de maladies inflammatoires de l'intestin chez l'homme, et pourraient donc avoir un intérêt en immunothérapie (Jouvin and Kinet, 2012).

Tous ces travaux et toutes les théories impliquant un rôle de l'environnement antigénique dans le développement de l'allergie, doivent s'interpréter aujourd'hui en prenant en compte la complexité des réponses T au-delà de la polarité TH1/TH2. *In vivo* la réponse IgE des cellules B est ainsi stimulée par des cytokines sécrétées par les lymphocytes T, de type TH2 : IL4, IL9, IL13 en particulier (pour revue (Geha et al., 2003a)), mais également par l'IL17A (Milovanovic et al., 2010). Les populations TH17 sont impliquées dans l'inflammation locale et contribuent fortement au développement des réactions asthmatiques; les cellules TH17 peuvent en outre produire non

seulement de l'IL17 mais aussi de l'IL4 et de l'IL22 (Kudo et al., 2013). La population TH9 récemment décrite (se différenciant en présence d'IL4 et TGF- $\beta$ , et productrice d'IL9, IL10 et IL21) joue aussi un rôle important dans le développement de certaines réactions atopiques chez la souris comme chez l'homme (Kaplan, 2013) (Yao et al., 2013). Cette population est négativement contrôlée par l'inhibiteur de signalisation CIS, qui inhibe la signalisation de STAT3, STAT5 et STAT6 et inhibe ainsi la transcription du gène de l'IL9 (Yang et al., 2013). Les TH9 pourraient agir en stimulant l'expansion des mastocytes ainsi que leur production d'une cytokine réputée « TH2 » et stimulatrice des réactions atopiques : l'IL13 (Kaplan, 2013). Les basophiles ont également un rôle au cours des infections par les helminthes (Ohnmacht et al., 2010).

En revanche, la réponse IgE est inhibée par différentes cellules et différentes molécules. Les cellules TREGS, autant FoxP3+CD25+ que celles productrices d'IL10, jouent un rôle inhibiteur des réponses IgE. Le rôle de ces populations régulatrices est maintenant démontré dans de nombreux modèles. Ainsi, les lymphocytes T régulateurs CD4+  $\alpha/\beta$  (CD25+ et CD25-) peuvent éviter une forte réponse IgE (de Lafaille et al., 2001), tout comme des lymphocytes T Foxp3+ peuvent prévenir une réaction d'asthme allergique (Kim et al., 2010a). Les cellules dendritiques suppriment la réponse IgE par contact cellulaire et sécrétion de TGF- $\beta$  et d'IFN- $\gamma$  *in vitro* (Obayashi et al., 2006).

Dans tous les cas, la fréquence et la sévérité potentielle des allergies démontrent pour l'organisme l'importance d'une régulation stringente de la production d'IgE, que cette régulation résulte de mécanismes T-dépendants ou intrinsèques à la lignée B, l'étude de ces derniers étant ceux sur lesquels s'est concentrée cette thèse. Une meilleure compréhension de la réponse IgE permettra également une meilleure prise en charge de la prévention, du traitement et éventuellement de l'immunothérapie des pathologies atopiques.

Différents travaux d'étude de la régulation de la production d'IgE ont été menés autour des lymphocytes B IgE+, sur le contrôle du *switch* ou la production d'IgE, mais très peu de données sont disponibles sur ces cellules elles-mêmes, en partie du fait que physiologiquement, pour certains auteurs elles n'existeraient pas, et qu'elles sont en tout cas quasiment indétectables par les méthodes usuelles d'exploration...

### **3. Régulation de la production des IgE**

Il existe des mécanismes très sophistiqués de régulation des interactions cellulaires au cours des réponses immunes, impliquant les multiples acteurs que sont les cellules dendritiques, les cellules TH1, TH2, TH9, TH17, TREGS, NKT, et nous laisserons la régulation de la polarité des réponses cellulaires en dehors du champ de notre discussion, même s'il est évident qu'elle est à l'origine du contexte cytokinique et cellulaire dans lequel se produisent les réponses IgE. Nous laisserons aussi hors de notre discussion le détail de la description de tous les acteurs de l'immunité innée (polynucléaires, mastocytes, plaquettes, agents des réactions inflammatoires...) qui sont directement mobilisés par les réponses IgE et qui jouent alors à la fois un rôle effecteur et un rôle éventuellement immunomodulateur.

Nous ne considérerons tous ces acteurs qu'en nous restreignant à leur action sur la cible, qui est l'objet d'étude de cette thèse : la cellule B exprimant l'IgE membranaire.

#### **3.1 Régulation du mécanisme de la commutation de classe vers S $\epsilon$ au niveau du locus IgH**

Les cellules B peuvent exprimer successivement le même domaine variable de reconnaissance d'un Ag avec différentes régions constantes de chaîne lourde. Ce processus B-spécifique implique une recombinaison initiée par l'enzyme AID entre des séquences répétitives (régions S) situées en 5' de chaque gène constant. Outre les régulations complexes de la machinerie de recombinaison, impliquant AID et ses nombreux partenaires, il existe une régulation fine de l'accessibilité du locus aux recombinaisons de commutation de classe. De façon schématique, on peut considérer que la région 3' RR est globalement sensible à l'activation B (et tout particulièrement aux signaux NF- $\kappa$ B) et capable ensuite de conférer à différents sites du locus une accessibilité aux recombinaisons, manifestée d'une part par leur transcription germinale (pré-requis nécessaire mais non suffisant aux recombinaisons), et leur recrutement de l'enzyme AID

pour y initier des cassures double brin (pour revue (Pinaud et al., 2011a)). Pour chaque gène constant « Cx » du locus IgH, les recombinaisons incluront ainsi transcription germinale (GLT) de la région Ix-Sx, son ciblage par AID, la création de cassures double brin de l'ADN, puis la formation de synapses entre la région S<sub>μ</sub> en amont et la région Sx ciblée en aval puis enfin la réparation du chromosome (pour revue (Xu et al., 2012)). L'accessibilité locale et le choix entre les différents sites cibles de recombinaisons disponibles au sein du locus sont ensuite finement régulés d'une façon Ag-dépendante, BCR-dépendante et largement « T-dépendante », puisque influencée à la fois par l'activation B et par des signaux externes cytokiniques.

Outre le rôle que jouent des récepteurs membranaires d'activation, comme les récepteurs TLR ou CD40 et OX40L au cours des interactions T-B, un contexte cytokinique donné favorise la commutation de classe vers une région S donnée, en agissant sur le promoteur germinale I qui se trouve en amont de cette région S et en stimulant sa transcription. Le *switch* vers un gène Cx constant donné est ainsi toujours précédé de la transcription germinale de ce gène. Les différents signaux inducteurs de *switch* activent toujours aussi la transcription germinale du gène correspondant. Ils agissent en induisant la synthèse de facteurs nucléaires à activité « DNA-binding ». On trouve ainsi au niveau des promoteurs I de transcription germinale situés en amont des régions S, des séquences cibles pour les facteurs nucléaires induits par des cytokines variées (notamment *Interferon-stimulable response element* (ISRE), sites de liaison de STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*), *TGF-β responsive element*...). Ainsi, le traitement des cellules B murines par le mitogène LPS, induit une transcription germinale des régions Iγ2b-Cγ2b et Iγ3-Cγ3 et donc un *switch* vers IgG2b et IgG3 en l'absence de toute cytokine; l'ajout d'IL4 inhibe le *switch* vers IgG2b et IgG3 mais stimule la transcription de Iγ1-Cγ1 et Iε-Cε et donc un *switch* vers IgG1 et IgE; l'interféron γ et le facteur de transcription T-bet stimulent plutôt un *switch* vers IgG2a et le TGF-β stimule le *switch* vers IgA

Un niveau de régulation important pour maintenir un faible taux d'IgE est le contrôle de ce *switch* vers la région S<sub>ε</sub>. Alors que les *switch* IgG1 et IgE peuvent être induits par les mêmes cytokines (notamment l'IL4) on observe (surtout *in vivo*, mais à un certain degré aussi *in vitro*) une

plus forte proportion de cellules induites vers l'IgG1 (Siebenkotten et al., 1992). Le promoteur I $\epsilon$  est composé de différents sites de liaison aux facteurs de transcription, dont : E1 et E2, deux sites de liaison au facteur de transcription E2A, un site de liaison à AP1 (*activator protein 1*), un pour C/EBP (CCAAT/*enhancer-binding protein*), un pour STAT6, deux sites pour NF- $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*), un site PU.1 et un site pour Pax5 (Geha et al., 2003b; Monticelli and Vercelli, 2001). Classiquement, le *switch* IgE nécessite des facteurs que procurent les lymphocytes T CD4 (TFH essentiellement de polarité TH2, mais aussi TH9 voire TH17) qui expriment le CD40L (CD40 ligand), activant le récepteur CD40 des cellules B, et sécrètent les cytokines de types TH2 (principalement IL4 et IL13), induisant ainsi la transcription germinale  $\epsilon$ . Des cellules de l'immunité innée comme les mastocytes peuvent aussi fournir de l'IL4 et IL13. Cette activation B se fait *via* STAT6 qui est alors phosphorylé et dimérisé et agit comme facteur de transcription en se fixant sur sa séquence cible, activant ainsi la transcription de I $\epsilon$ -S $\epsilon$  et l'initiation du *switch* IgE. Cette interaction est stabilisée par la protéine SWAP-70, de manière spécifique au cours du *switch* IgE (Audzevich et al., 2013). L'activation du récepteur CD40 induit l'activation de NF- $\kappa$ B qui agit en synergie avec STAT6 pour activer la transcription. Un autre régulateur positif, spécifique du *switch* IgE, a également été mis en évidence : NFIL3/E4BP4 (*nuclear factor, IL3-regulated*), il agit comme facteur de transcription et se lie au promoteur I $\epsilon$  en réponse à l'IL4 (Kashiwada et al., 2009).

Il est intéressant de noter que Bcl6, fortement exprimé dans les centres germinatifs (GC), partage le site de fixation de STAT6, et entre donc en compétition avec ce facteur et inhibe le *switch* IgE. Ce point influence potentiellement la localisation des cellules switchant vers l'IgE, qui fait débat, comme nous le verrons plus loin. Un autre facteur régulateur négatif du *switch* vers l'IgE a été mis en évidence : Id2 (*inhibitor of DNA binding 2*), qui agit par séquestration des facteurs de transcription E2A et Pax5 et inhibe la transcription germinale  $\epsilon$  et le *switch* IgE de manière intrinsèque à la cellule B (Sugai et al., 2002).

Enfin, il apparaît que la composition même de la région S $\epsilon$  participe à la régulation du *switch* IgE, cette région étant une des plus courtes et des moins répétitives des régions S chez la souris (environ 2kb au lieu d'une dizaine de kilobases pour la région S $\gamma$ 1) (Hackney et al., 2009). Le

remplacement de cette région par une région S $\mu$  augmente très fortement le *switch* IgE *in vitro* et *in vivo*, probablement en conférant un meilleur accès à AID et ses co-facteurs, et de manière très surprenante augmente (ou stabilise ?) les transcrits germinaux  $\epsilon$  alors que le promoteur I $\epsilon$  est inchangé (Misaghi et al., 2013).

Au-delà de la composition de cette séquence primaire S $\epsilon$ , l'état de la chromatine est important et des variations aux alentours de la région S $\epsilon$  ont été observées après stimulation *in vitro* de lymphocytes B humains en présence d'anti-CD40 et d'IL4 : accumulation de marques d'acétylation et de tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (Dayal et al., 2011). Dans ces conditions d'activation une déméthylation dépendante de l'IL4 de cette région a également été rapportée (Kuwabara et al., 1995). Enfin, les cellules B immatures (qui ont très probablement un *pattern* d'accessibilité de la chromatine spécifique de leur stade de maturation) switchent préférentiellement vers l'IgE plutôt que vers IgG1, à l'opposé des B matures (Wesemann et al., 2011a).

Le *switch* IgE peut se faire de manière directe (de S $\mu$  à S $\epsilon$ ) ou bien de manière séquentielle, avec une étape intermédiaire IgG (Yoshida et al., 1990). Ces deux voies semblent dédiées dans le premier cas à la production d'IgE de basse affinité (plutôt inhibitrices de l'atopie) et dans le second à la production d'IgE de haute affinité, correspondant notamment à celles qui déclenchent les phénomènes atopiques (Xiong et al., 2012).

Il existe donc un premier niveau de régulation fort de la génération des cellules IgE+, *via* le contrôle de l'accessibilité de la région S $\epsilon$  à la transcription et donc au ciblage par AID et au *switch* IgE. Ce contrôle mêle des propriétés intrinsèques des lymphocytes B (brièveté de la région S $\epsilon$ , particularités de sa séquence) et des éléments pour lesquels le programme transcriptionnel B est modulé par le microenvironnement. Il est cependant important de noter que des conditions cytokiniques très proches induisent le *switch* IgG1 et IgE, mais aboutissent pourtant à la production de deux types de cellules dont l'abondance est aux deux extrémités du spectre. D'autres éléments que le contrôle du *switch* doivent donc régler la survie différentielle des cellules switchées et favoriser dans un cas la survie des cellules mémoires IgG1+ tout en restreignant au contraire celle

des cellules IgE<sup>+</sup>, permettant dans des conditions physiologiques de maintenir un taux d'IgE faible. Il est d'ailleurs frappant de constater que des cellules IgE<sup>+</sup> sont très facilement obtenues de façon abondante lors de stimulations B effectuées *in vitro*, alors qu'au contraire elles sont virtuellement indétectables *in vivo*. Cette rareté compromet bien sûr l'étude de telles cellules primaires IgE<sup>+</sup>.

Afin de contourner ce problème nous avons développé différentes approches *in vitro* et *in vivo* pour générer des cellules IgE<sup>+</sup> et les étudier : stimulations *in vitro* de lymphocytes B murins et humains, transfections de lymphocytes B murins et humains, étude du modèle murin LAT<sub>Y136F</sub> dont les lymphocytes T produisent de l'IL4 en continu et hyper-induisent un *switch* IgG1 et IgE permanent (Aguado et al., 2002), transferts cellulaires dans des souris immunodéficientes et création de modèles transgéniques spécifiques (article 1). L'ensemble de ces approches confirme que le *switch* IgE (ou de façon plus générale, l'expression d'IgE membranaire) est très fortement contrôlé et « down-régulé » *in vivo*, alors qu'il peut être induit efficacement *in vitro* par de nombreux moyens, et notamment bien sûr par les protocoles d'activation polyclonale des B *via* des signaux activateurs mimant une interaction avec un lymphocyte T (anti-CD40 ou CD40 ligand), en présence d'IL4. On peut alors étudier ces cellules obtenues *in vitro* et démontrer qu'elles sont très dépendantes de leur microenvironnement, en particulier (pour les B activés) des signaux de survie et d'activation présents dans le milieu de culture (sérum de veau fœtal, anti-CD40, IL4...). Malgré l'absence de cellules mIgE<sup>+</sup> chez les souris *wild-type* (*wt*), quelques conditions exceptionnelles semblent cependant parvenir à induire *in vivo* une population de cellules mIgE, telle l'hyperproduction de cytokines TH2 (IL4, IL13...) qui caractérise les souris LAT<sub>Y136F</sub>. Cette hyperpolarisation TH2 produit un *switch* important vers l'IgE, principalement manifesté par une augmentation de sa concentration sérique, d'un facteur 10 000. Chez l'homme des mutations sont à l'origine de syndromes d'hyper-IgE, impliquant des défauts de signalisation cytokinique (en particulier TH17) et une forte production d'IgE (Minegishi, 2009), probablement par augmentation du *switch* vers l'IgE.

### 3.2 Les transcrits IgE

Après commutation de classe vers l'IgE les cellules vont pouvoir exprimer le gène  $C\epsilon$ , avec d'abord des transcrits membranaires dans les lymphocytes B, puis des transcrits sécrétés dans les plasmablastes et les plasmocytes. Le gène  $C\epsilon$  contient comme le gène  $C\mu$  4 exons codant la partie constante (CH1, CH2, CH3 et CH4) et 2 exons de membrane (M1 et M2). Alors que  $C\mu$  ne donne naissance qu'à 2 formes de transcrits matures (l'une incluant les exons CH1 à CH4 dans les cellules sécrétrices, et l'autre contenant en plus les 2 exons membranaires dans les lymphocytes), la situation est plus complexe pour les transcrits  $\epsilon$ , qui subissent un épissage alternatif plus diversifié, chez l'homme comme chez la souris. En effet, en 1992, deux équipes indépendantes ont mis en évidence la présence de formes différentes d'IgE membranaires chez l'homme, résultant d'un épissage alternatif de l'exon M1 sur un site accepteur situé plus en amont et incluant donc ou non une insertion 5' de 156 nucléotides (Peng et al., 1992; Zhang et al., 1992). La suite de ces études identifiera en fait 4 transcrits codant des formes sécrétées potentielles, incluant alors une nouvelle structure exonique, nommée CH5 et située entre le CH4 et le M1 (Zhang et al., 1994). L'équipe de Burrone identifie 7 transcrits différents chez l'homme (Batista et al., 1995), ainsi que 2 formes sécrétées au niveau protéique, la seconde contenant six acides aminés supplémentaires et étant plus glycosylée (Batista et al., 1996a) et valide également l'expression membranaire de deux isoformes de BCR IgE humains (Batista et al., 1996b) (forme courte mslgE proche de la forme majoritaire du BCR IgE de la souris, et forme longue mLlgE avec un peptide supplémentaire séparant de le domaine CH4 de la région d'ancrage membranaire). Enfin, ces auteurs identifient différents transcrits d'IgE chez la souris, résultant d'épissages alternatifs ainsi que de l'utilisation différentielle de 2 sites de polyadénylation des exons de membrane (Anand et al., 1997). Il est possible que la régulation de l'expression des IgE s'accompagne en outre d'une régulation qualitative qui ferait varier les rapports des différentes isoformes d'épissage, mais en vérité, rien de tel n'a été démontré à ce jour, et les éventuelles différences de fonction entre les isoformes protéiques de la chaîne  $\epsilon$  n'ont jamais été déterminées.

Ces travaux ont aussi permis d'identifier une caractéristique exclusive des IgE membranaires chez toutes les espèces étudiées : la présence en 3' des exons qui codent le domaine d'ancrage membranaire de sites de polyadénylation (polyA) non-conventionnels. En effet, alors que tous les gènes d'Ig contiennent un polyA canonique (AATAAA) après leur dernier exon constant (CH3 ou CH4) et après leur exon de membrane M2, permettant l'expression des formes sécrétée et membranaire, les sites de polyA membranaires sont des variants de type AGTAAA, AAGAAA ou encore ATTAAA qui pourraient avoir une efficacité moindre. Selon une étude, ceci se traduirait par un ratio des ARN messagers de type sécrété/membranaire de 100/1 pour les IgE murines, soit l'inverse des IgG1 lors de stimulations B *in vitro*. Un même ratio de 100/1 est retrouvé par cette étude dans des stimulations de PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) humains, avec un ratio contrôle à 1/2 pour les IgG4. Si cet effet est réel, il correspond alors quasiment à une impossibilité d'expression du BCR IgE! Ce défaut de maturation des transcrits primaires  $\epsilon$  en ARNm matures de type membranaire a donc été attribué par les auteurs à un défaut de polyadénylation dans la mesure où ils ont pu partiellement l'inverser en incluant un polyA classique en aval des exons de membrane dans des transfectants (Karnowski et al., 2006). Hormis ce dernier résultat (mais il est partiel) cette étude pourrait à notre avis (en fonction des résultats que nous documentons dans cette thèse) s'interpréter au moins pour partie d'une autre façon : 1) l'expression des IgE membranaires stimule très fortement la différenciation plasmocytaire et 2) les cellules mIgE+ ont une durée de vie très courte... pour ces deux raisons le travail sur une population de cellules B stimulées pourrait aboutir hors de tout problème d'épissage à une sur-représentation des ARNm  $\epsilon$  de type sécrété (= de type plasmocytaire) et à une sous-représentation des ARNm de type membranaire (= de type lymphocytaire). L'existence de ces polyA non conventionnels est retrouvée chez différentes espèces de primates (26) et non primates (12) (Wu et al., 2012). Dans cette étude, on découvre en outre que les exons de membrane sont carrément absents chez les tarsiers, que le segment génique codant l'isoforme membranaire  $\epsilon$  long est absent chez les primates strepsirrhiniens et les non-primates, que les singes du nouveau monde n'ont pas le site d'épissage nécessaire à la production de la forme courte et ne doivent donc exprimer que la forme longue, et

que les singes de l'ancien monde et les humains expriment majoritairement la forme longue de l'IgE membranaire.

Les lymphocytes B commutés vers l'IgE vont donc transcrire ce gène mais ces transcrits subiront différentes formes d'épissage. L'expression de la forme membranaire serait éventuellement désavantagée à cause des sites polyA non-conventionnels. Cependant, dans les conditions favorables (*in vitro* et *in vivo*) nous avons nous-mêmes observé que le *switch* à IgE se fait efficacement et nous détectons l'expression membranaire, en PCR quantitative et en cytométrie en flux sur des cellules B primaires, ce qui va mal avec l'idée que la quantité du transcrit membranaire  $\epsilon$  serait réduite d'un facteur 100 sur une « *per cell basis* », par rapport à celle d'un transcrit membranaire  $\mu$  ou  $\gamma$ . Afin que nos travaux respectent l'ensemble des particularités d'expression des IgE, le gène IgE humain introduit dans nos modèles transgéniques/*knock-in* est sous sa forme naturelle, avec tous ses introns et exons ainsi que 300 pb en aval du codon stop de l'exon M2 incluant le site polyA « non canonique ».

Dans certaines expériences de transfection transitoire, nous avons par contre utilisé les ADN complémentaires de l'IgE humaine dans des vecteurs d'expression eucaryote (pcDNA3.1) contenant un promoteur fort (promoteur CMV) ainsi qu'un polyA conventionnel. L'expression des IgE membranaires ainsi obtenue ne s'est pas révélée 100 fois plus intense que celle vue sur des B primaires stimulés par anti-CD40+IL4 (en terme de moyenne de fluorescence des cellules authentiquement mIgE+, mais bien sûr ce point est à nuancer en fonction de l'efficacité de transfection).

Même si le niveau (d'un facteur 100 !) de « sous-expression » des ARNm  $\epsilon$  membranaires reste donc pour nous à discuter et préciser, on peut cependant considérer qu'il existe un deuxième niveau potentiel de down-régulation de l'expression des IgE après le *switch* IgE, *via* la production de transcrits d'IgE membranaire qui auraient été sélectionnés au cours de l'évolution pour se polyadényler de façon peu efficace et donc s'exprimer à des taux faibles. Cette faible proportion de transcrits d'IgE de membrane entraînerait *ipso facto* une faible expression membranaire et probablement un faible signal tonique du BCR IgE. Ce signal faible pourrait ne pas permettre la

survie des lymphocytes B IgE+, mais aussi être à l'origine de la tendance de ces cellules à se différencier en plasmocytes puisqu'il existe une corrélation inverse (théorie du « *less is more* » de Christopher Goodnow à propos des mIgG) entre la force du signal tonique du BCR et la différenciation plasmocytaire (Horikawa et al., 2007) (Lechouane et al., 2013).

### 3.3 La différenciation plasmocytaire IgE

Un autre facteur limitant le nombre de lymphocytes B IgE+ est leur très rapide différenciation terminale en plasmablastes et plasmocytes. Une première étude, *in vivo* dans des souris standard *wt*, a démontré la forte prédisposition des cellules IgE+ à se différencier en cellules sécrétrices, ces cellules étant localisées en dehors des centres germinatifs et exprimant très précocement un programme de différenciation plasmocytaire au niveau transcriptionnel (Erazo et al., 2007a). Cette tendance est retrouvée dans un modèle de souris transgéniques (où les cellules IgE+ deviennent fluorescentes) qui démontre à la fois la propension des cellules IgE+ à sur exprimer Blimp1, gène de différenciation plasmocytaire, et à devenir des plasmablastes à courte durée de vie (Yang et al., 2012a). Cet effet est également observé dans des systèmes de culture *in vitro* (Nojima et al., 2011).

Il a néanmoins été proposé que les plasmablastes IgE+ auraient une moindre chance de migrer vers les niches plasmocytaires, limitant le pool de plasmocytes à longue durée de vie. Ces résultats étant basés sur un *knock-in* (KI) où les exons de membrane M1 et M2 de l'IgE ont été remplacés par ceux de l'IgG1, permettant de comparer des cellules *wt* et des cellules avec une « signalisation médiée par l'IgG1 » (Achatz-Straussberger et al., 2008). Ces observations ne sont cependant pas confirmées dans un autre KI avec une stratégie similaire de récepteur chimérique IgE/IgG1 et une insertion des gènes constants (CH1-CH4) IgE dans le locus IgG1 (Lübber et al., 2013a). Il a d'ailleurs été démontré que des plasmocytes IgE à longue durée de vie pouvaient être générés *in vivo*, dans la moelle osseuse et dans la rate, par un protocole d'induction d'asthme allergique à l'ovalbumine (Luger et al., 2009). Chez l'homme la transplantation de moelle osseuse d'un donneur atopique chez un sujet non-atopique entraîne fréquemment un transfert de production des IgE spécifiques d'un allergène, évoquant la possibilité d'un transfert de plasmocytes à longue durée de vie (Hallstrand et al., 2004) (mais ne permettant pas d'exclure qu'il s'agisse plutôt du

transfert de cellules B mémoires mIgM+ ou mIgG1+ capables secondairement de switcher vers IgE et de devenir des plasmocytes).

Sur le plan sérologique, il faut rappeler qu'une propriété spécifique des IgE sécrétées elles-mêmes est leur très courte demi-vie (quelques heures) lorsqu'elles sont libres dans le plasma, contribuant à un retour rapide à l'état basal après une réponse immunitaire. Même si cette demi-vie est considérablement allongée (quelques semaines à quelques mois) lorsque les IgE sont fixées sur leur récepteur de forte affinité (pour revue (Achatz-Straussberger et al., 2009)), il est clair que la persistance sur le long terme (éventuellement à vie) des allergies à des Ag spécifiques, implique une mémoire cellulaire très prolongée soit de plasmocytes producteurs de ces IgE spécifiques qui donneront les allergies immédiates, soit de cellules B mémoires (pas nécessairement IgE) se différenciant au long cours en plasmocytes IgE.

Dans le modèle LAT<sub>Y136F</sub> nous retrouvons la tendance à la différenciation plasmocytaire des cellules IgE décrite par d'autres auteurs. Dans ces animaux il y a environ 4 plasmablastes pour un lymphocyte B IgE+ alors que ce ratio n'est pas affecté pour les autres isotypes (IgM et IgG1, plutôt situé à des valeurs allant de 0,1 à 0,01). Par ailleurs, nos expériences de transfert à des souris immunodéficientes ont montré la courte durée de vie et l'absence d'accumulation des cellules productrices d'IgE *in vivo*.

Donc même si les cellules exprimant l'IgE se différencient rapidement en plasmocytes, il est probable que ces plasmocytes soient plutôt à courte durée de vie et qu'ils migrent peu vers les niches à longue durée de vie. Cette physiologie du système IgE aurait pu être sélectionnée dans la phylogénie afin d'éviter une mémoire IgE et une sécrétion à long terme d'IgE spécifiques, potentiellement dangereuse.

### **3.4 Les lymphocytes B IgE+**

Bien que l'existence des lymphocytes à IgE de membrane soit difficilement démontrable *in vivo* dans des conditions physiologiques, leur nécessité et leur existence transitoire est démontrée indirectement à travers diverses études. Tout d'abord, le KO des exons de membrane IgE chez la

souris entraîne une chute de 95% des IgE sériques totales et ces souris ne développent après immunisation qu'une réponse IgE spécifique négligeable. Le remplacement de la queue intracytoplasmique IgE par celle de l'IgM réduit de moitié le taux d'IgE sérique et les réponses spécifiques sont réduites de 40 à 80%, sans une réponse secondaire (Achatz et al., 1997). De plus, différents anticorps dirigés contre l'IgE membranaire permettent par immunothérapie une diminution du taux d'IgE *in vitro* et *in vivo*. Une première étude menée chez la souris, avec un Ac monoclonal (MAb) dirigé contre le domaine EMPD (domaine extra-membranaire proximal) de l'IgE membranaire, montre l'induction d'apoptose *in vitro* des cellules mIgE+, ainsi qu'une inhibition de la synthèse d'IgE spécifiques par immunisation passive avec cet Ac, en parallèle d'une induction de réaction allergique *in vivo* (Feichtner et al., 2008). Une autre étude chez la souris utilisant un Ac simple chaîne dirigé contre les IgE totales (membranaires et sécrétées) démontre à la fois la neutralisation de l'IgE circulante ainsi qu'une réduction du nombre de cellules IgE+ (Ota et al., 2009). Des travaux complémentaires ont été réalisés, ayant pour cible l'IgE humaine. Ainsi le domaine M1' (spécifique de l'IgE membranaire forme longue) a été ajouté entre le CH4 et le M1 de souris « humanisées ». L'utilisation d'un Ac monoclonal dirigé contre cet épitope s'avère efficace *in vivo* en diminuant la quantité d'IgE produite et le nombre de plasmocytes dans ce modèle, ainsi que dans un modèle de greffe de PBMC humains à des souris immunodéficientes SCID (HuSCID), après immunisation, induction d'asthme ou infection par des helminthes. Cet effet étant attribué à une induction d'apoptose observable *in vitro* (Brightbill et al., 2010a). Une approche similaire mais avec un Ac anti-IgE totales et une partie Fc capable de lier le FcγRIIb avec une forte affinité montre la diminution de production d'IgE et de plasmocytes dans des souris HuSCID. Cette diminution est 40 fois plus forte qu'avec un anti-IgE classique tel que l'omalizumab utilisé en contrôle dans cet article, et en traitement chez l'homme. Cette augmentation d'efficacité pourrait résulter du co-engagement de l'IgE membranaire et du FcγRIIb, qui a un rôle de récepteur inhibiteur, à la surface des lymphocytes B (Chu et al., 2012). Enfin, la jonction entre le domaine EMPD et la partie extra-membranaire courte a été ciblée lors d'une dernière étude *in vitro*. Les lymphocytes B humains étant capables d'exprimer les deux formes de BCR (longue et courte) il serait intéressant de cibler

cette partie courte commune aux deux BCR, bien que ces auteurs aient échoués lors de cette tentative (Chowdhury et al., 2012).

La nécessité d'exprimer une IgE membranaire au cours d'une réponse IgE semble donc évidente et bien établie. Cependant, ces cellules B exprimant l'IgE ne persistant pas *in vivo*, leur étude est difficile. Pour contourner cet obstacle, différentes stratégies ont été mise en œuvre, que ce soient des études biochimiques pour trouver des partenaires d'interaction, des études *in vitro* de transfectants ou de cellules primaires ou bien la création de modèles transgéniques *ad hoc*.

Ainsi à partir d'expériences de *phage display*, 2 protéines de liaison à la partie intracytosolique de l'IgE membranaire ont été identifiées. HPK1 (*haematopoietic progenitor kinase 1*) se lie ainsi à l'IgE et d'autres isotypes (Geisberger et al., 2002) et HAX1 (*HS1-associated protein X1*) semble spécifique des IgE (Oberndorfer et al., 2006). L'étude des KO respectifs ne montre pas d'impact sur le taux d'IgE à l'état basal (Königsberger et al., 2010; Peckl-Schmid et al., 2010; Shui et al., 2006). Cependant HAX1 ayant des propriétés anti-apoptotiques en jouant un rôle au niveau des mitochondries, il nous paraît intéressant d'étudier si l'expression d'un BCR IgE n'entraîne pas une délocalisation de HAX1 de la mitochondrie vers la queue IgE (rôle de « *docking site* » ?), et donc si l'absence mitochondriale d'HAX1 ne pourrait pas alors être la cause de la chute de potentiel de mitochondrie observée dans nos transfectants mIgE+.

Après avoir identifié les deux formes de transcrits membranaires IgE humains, l'équipe de Burrone a cloné ces deux BCR, sous forme de récepteurs chimériques, avec une partie variable murine (anti-NIP) et la partie constante humaine. Ces constructions ont été transfectées dans la lignée B immature WEHI murine, permettant la validation de leur expression et la mise en évidence de l'association des 2 BCR avec les complexes de signalisation Ig $\alpha$ /Ig $\beta$ . Des différences entre les 2 BCR ont été observées : la forme courte est transportée à la surface plus rapidement et s'associe avec une Ig $\alpha$  partiellement glycosylée (la forme longue s'associe avec Ig $\alpha$  totalement glycosylée), le pontage des BCR entraîne une cinétique de phosphorylation intracellulaire différente et inhibe la prolifération des cellules exprimant la forme courte. Ces travaux ont été poursuivis avec des transfectants A20, lignée B mature murine, plus relevant pour l'expression d'un BCR switché. Malheureusement les constructions utilisées sont incomplètes car elles n'incluent pas les exons

CH1-CH3. Cependant une induction d'apoptose est observée après pontage du BCR en absence du domaine EMPD, cet effet étant attribué au domaine CH4 uniquement. De manière intéressante l'incubation de cellules A20 non transfectées avec ce CH4 soluble puis pontage du CH4 induit également de l'apoptose, cette observation évoquant la possibilité d'un mécanisme faisant intervenir une interaction entre le BCR IgE et une protéine de surface indépendante de la signalisation du BCR (Poggianella et al., 2006). D'autres constructions chimériques tronquées ont permis de mettre en évidence, dans la lignée B mature humaine Ramos, un mécanisme spécifique aux BCR switchés  $\gamma$  et  $\epsilon$  : le recrutement de l'adaptateur Grb2 après phosphorylation d'une tyrosine conservée, participant à l'activation des protéines kinases et à la génération prolongée de seconds messagers, et augmentant la prolifération B (Engels et al., 2009). Enfin on peut voir dans l'article de Brightbill sur l'utilisation de MAb anti-IgE que dans leurs tests *in vitro* (figure 6 a et b), le simple fait de transfecter l'IgE membranaire induit au moins 15% d'apoptose, cet effet étant augmenté par la présence d'anticorps anti-IgE (et inversé par un inhibiteur de caspases dans ce cas) (Brightbill et al., 2010b). Cette expérience est réalisée dans la lignée B mature humaine Daudi, par transfection rétrovirale avec l'IgE forme longue, et analysée sur les cellules totales (donc sous-estimant peut-être cet effet, que l'on verrait peut être plus clairement si on se focalisait sur les cellules IgE+, avec un fenêtrage en cytométrie en flux par exemple).

L'étude de cellules primaires fournit des données sur les lymphocytes B mIgE+. Cependant ces données sont souvent à analyser avec précaution. En effet il existe un artéfact possible, amplifié dans des cultures *in vitro*, du à la fixation des IgE sécrétées sur leur récepteur de faible affinité CD23, exprimé par les cellules B. Cette fixation sur les récepteurs de surface entraîne donc des faux positifs. Différentes stratégies permettent de s'affranchir de cet effet, la plus simple étant de travailler avec des cellules CD23<sup>-/-</sup>, cependant l'absence de ce récepteur, important pour la régulation de la réponse IgE (Yu et al., 1994), peut influencer les résultats. Deux protocoles ont été développés : on peut marquer les cellules switchées vers l'IgE en intracellulaire après traitement des cellules à trypsine (Wesemann et al., 2011b) ou bien après avoir saturé les IgE de surface avec un Ac anti-IgE non fluorescent (Yang et al., 2012b). Cependant l'IgE de membrane n'est alors pas

marquée directement. La meilleure solution est donc de laver les cellules avant marquage avec un tampon acide pour décrocher les IgE solubles ((Erazo et al., 2007b), validé dans nos expériences).

Parmi les données fournies avec les cultures de cellules primaires *in vitro* on peut noter l'induction d'apoptose des cellules IgE+, mais pas IgG1+, en présence d'IL21 (Harada et al., 2006), ainsi qu'un effet de la densité cellulaire dans les cultures : à forte concentration les cellules IgE+ entrent en apoptose, cet effet pouvant être inversé par un inhibiteur de caspases (Rabah and Conrad, 2002).

Un système de culture *in vitro*, utilisant des fibroblastes exprimant le CD40L et sécrétant du BAFF ainsi que l'ajout d'IL4, permet une expansion rapide de cellules B naïves, ainsi qu'une possible commutation vers l'IgG et l'IgE (Nojima et al., 2011). Le transfert *in vivo* de ces cellules permet la génération de cellules « mémoires » IgM/IgD et IgG mais pas IgE. Cette détection étant effectuée par cytométrie en flux nous avons tenté une approche en PCR quantitative dans nos expériences homologues de transfert, avec un résultat allant dans le sens d'une disparition très rapide des cellules IgE+.

Ces données soulèvent donc la question de l'apoptose, en particulier après pontage du BCR ou en présence d'IL21. Cependant nos observations suggèrent une entrée en apoptose même en absence d'Ag ou de pontage, simplement induite par la présence du BCR IgE (forme courte ou longue). Ainsi l'expression d'une IgE membranaire induit l'apoptose de différents transfectants, murin (A20) ou humain (BL2), avec un effet plus marqué pour la forme longue. Cette mort cellulaire implique la mitochondrie qui voit son potentiel de membrane chuter (témoignant donc d'une ouverture du pore mitochondrial), ainsi que l'activation des caspases. Des inhibiteurs chimiques peuvent inverser partiellement ou totalement ces phénomènes selon les conditions (forme courte ou longue, A20 ou BL2). De tels transfectants voient leur programme transcriptionnel affecté, aboutissant à des modifications phénotypiques et à la mort cellulaire. Cet effet du BCR mIgE pourrait avoir pour fonction de limiter de façon « B-intrinsèque » le nombre de cellules mémoires IgE, voire le nombre de plasmablastes et de plasmocytes IgE, ces cellules sécrétrices pouvant exprimer l'IgE membranaire (Yang et al., 2012b).

### 3.5 Modèles d'étude *in vivo*

Afin d'étudier la réponse IgE *in vivo*, différents modèles murins ont été créés. L'insertion d'un simple transgène IgE permet une augmentation du taux d'IgE sérique, mais n'est pas suffisante pour l'étude des lymphocytes B IgE+ eux-mêmes ((Matsuoka et al., 1999), observations au laboratoire). Il a également été rapporté que le KI des exons constants IgE (CH1-CH4) dans le locus IgG1, conservant les exons de membranes IgG1, permet *in vitro* la génération de cellules IgE+ après stimulations LPS+IL4 mais ces cellules ne sont pas détectées *in vivo*, « suggérant qu'un mécanisme indéfini doit exister *in vivo*, qui limite l'expression des cellules B IgE+ » (Lübber et al., 2013b).

L'équipe de De Lafaille a développé un modèle de réponse hyper-IgE qui leur a permis d'étudier différents aspects de cette réponse. Ces souris possèdent un transgène codant un TCR anti-*chicken ovalbumin* (OVA) et un BCR *knock-in* anti-*influenza virus hemagglutinin* (HA) permettant après une seule immunisation, avec le peptide OVA-HA, une forte réponse IgE (20 à 300 µg/mL) (de Lafaille et al., 2001). Ce modèle a permis de mettre en évidence le rôle des lymphocytes T REGS dans la régulation de la réponse IgE. Dans un second temps, ce modèle ainsi que des souris *wt* infectées par l'helminthe *N.brasiliensis* ont permis de localiser les cellules IgE+ en dehors des centres germinatifs, bien que le *switch* soit initié dans le GC (dans les cellules IgG1+), et de montrer leur différenciation rapide en plasmocytes. En effet les cellules IgE+ sont grosses, elles expriment les marqueurs plasmocytaires (B220- CD138+ Fas<sup>high</sup>) en cytométrie ainsi qu'en PCR quantitative (Pax5- Bcl6- AID- mais très fortement Blimp1 et Xbp1) et n'expriment pas CXCR5 qui est impliquée dans la localisation dans le GC. Afin d'étudier l'affinité des IgE, ces auteurs ont immunisé les souris avec l'antigène OVA-PEP1, PEP1 étant un variant de faible affinité de l'HA (un acide aminé différent), permettant le suivi des cellules ayant hypermuté leur segment variable et capables de lier cet Ag avec une forte affinité. Des IgG1 spécifiques apparaissent ainsi après immunisation. Des IgE spécifiques sont également produites mais après des cycles d'immunisations plus nombreux. Cette différence de cinétique, ainsi que la détection des transcrits de *switch* ε dans les cellules IgG1+, amènent à penser à un *switch* séquentiel au cours duquel la

maturation d'affinité se fait dans les cellules IgG1+ qui re-switchent par la suite en cellules IgE+, promptes à se différencier en plasmocytes. Cette hypothèse est validée par un transfert de lymphocytes B IgG1+ (ainsi que des cellules T OVA naïves) capables de produire des IgE spécifiques après immunisations dans des souris réceptrices immunodéficientes, cette réponse n'étant pas observée avec des cellules B IgG1-. Un modèle en deux phases est proposé : une phase pré-IgE où se font l'hypermutation somatique et la maturation d'affinité et la phase post-*switch* IgE où les cellules IgE se différencient rapidement en plasmocytes (Erazo et al., 2007c). Ce modèle est étayé par une dernière étude avec l'utilisation de souris IgG1 déficientes (souris hMT) : ces animaux ne peuvent pas faire d'IgE spécifiques, même après des immunisations répétées, alors que le taux d'IgE totales est normal. Un nouveau modèle est proposé : les IgE de haute affinité sont générées par *switch* séquentiel alors que les IgE de faible affinité le sont par *switch* direct. Ils démontrent également qu'une faible concentration d'IgE spécifique peut causer un choc anaphylactique et est pathogénique. Les IgE de faible affinité sont en compétition pour se lier aux récepteurs FcεRI et elles évitent le choc anaphylactique, et sont donc bénéfiques (Xiong et al., 2012). De ce point de vue on peut noter qu'il existe une production d'IgE « naturelle », indépendante du CMHII (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II), par les cellules B2, qui pourrait jouer ce rôle de protection (McCoy et al., 2006), comme les IgE produites par les cellules immatures (Wesemann et al., 2011b). En tout cas ces travaux évoquent une mémoire IgG1 capable de supporter l'hypermutation somatique, et une absence de mémoire IgE.

Deux modèles rapporteurs utilisant des protéines fluorescentes pour le suivi des cellules IgE+ ont également été publiés récemment. Le premier est celui qui avait été utilisé par Brightbill pour tester les MAb anti-hIgE, il s'agit d'un KI au locus IgE dans lequel on ajoute l'exon humain M1' entre le CH4 et le M1 murin. En plus de ce « *tag* » qui leur permet d'identifier les cellules IgE+ en cytométrie en flux, un IRES (site d'entrée interne ribosomal) et une cassette GFP sont ajoutés après le gène IgE. Les auteurs valident leur modèle en stimulant *in vitro* des splénocytes de leurs souris IgE-GFP rapporteur : à J4 ils observent une petite population GFP<sup>high</sup> qui semble exprimer leur construction mais le décalage de fluorescence sur ces cellules est très faible (figure 1b), en revanche une population GFP<sup>intermédiaire</sup> apparaît rapidement et constitue la majorité des cellules à

J4, il s'avère que ces cellules sont en partie IgG1+, la spécificité de leur *tag* GFP ne semble donc pas absolue... cependant toutes leurs expériences sont faites avec ce modèle, sans contrepartie *wt*. Après infection par *N.brasiliensis*, ils détectent des cellules IgG1+ du GC et ils font les mêmes marquages sur les cellules GFP<sup>high</sup> qu'ils considèrent comme IgE+ (le marquage anti-IgE sur cette population est montré en figure supplémentaire 4b et montre un léger décalage d'une partie des cellules, le reste semblant IgE-). Ainsi, ces auteurs affirment détecter des cellules IgE+ du GC (B220+ IgD- GL7+ CD95+ GFP<sup>high</sup>) et une population de cellules B IgE+ mémoires (B220+ IgD- GL7- CD38+ GFP<sup>high</sup>). La forte différenciation plasmocytaire ne semble pas se confirmer dans leur modèle, bien qu'ils détectent des plasmocytes IgE+. Enfin, en regardant de plus près leur construction on s'aperçoit qu'un polyA classique a été placé environ 100 bp en aval de l'exon M2... il est très probable que ce polyA influence le ratio sécrété/membranaire, la physiologie de la réponse IgE, et donc ce modèle (Talay et al., 2012). Un modèle beaucoup plus convaincant a été construit selon la même stratégie de rendre les cellules mIgE+ fluorescentes, et pour ce faire l'exon de membrane IgE M2 est lié à Venus, une protéine dérivée de la YFP (encore plus brillante), par une séquence virale « peptide 2A » permettant l'expression de 2 protéines à partir d'un seul ORF (cadre ouvert de lecture). L'avantage de cette méthode est que la traduction de Venus dépend de la traduction complète de l'IgE membranaire et donc une expression finement corrélée des deux protéines, cependant elle ajoute 17 acide aminés à la queue mIgE, inhibant peut être certaines interactions entre celle-ci et des protéines intracellulaires. Néanmoins, la validation de ce modèle lors de stimulations B *in vitro* est claire : les cellules fluorescentes sont fortement positives pour l'IgE. Ce modèle montre cette fois une localisation de cellules IgE+ dans les centres germinatifs, confirmée avec des souris *wt*. Un point intéressant est la description des plasmocytes IgE qui semblent exprimer l'IgE membranaire plus fortement que les cellules du GC, contrairement aux IgG ou IgM (les auteurs notent une légère augmentation du ratio membranaire/sécrété dans leur modèle comparé aux cellules *wt*, avec 2 ou 3 fois plus de transcrits membranaire mais la différence n'influe pas sur cette observation qui est confirmée avec des souris *wt*). Un « *pre-commitment* » plasmocytaire reste manifeste dans ce modèle, de plus les IgE produites ont une affinité réduite comparée aux IgG1, tandis qu'une absence de plasmocytes IgE à longue durée de vie reste

observée dans la moelle osseuse. Le nombre de plasmocytes à courte durée de vie peut quant à lui être augmenté par croisement des souris dans un fond génétique sur-exprimant la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Yang et al., 2012c). Ces données sont plus en accord avec les données de la littérature et mettent clairement en évidence le rôle de l'apoptose dans le maintien de l'homéostasie du compartiment IgE. L'apoptose et la présence à la membrane du BCR IgE est en relation directe avec nos observations. Nous montrons en effet à l'occasion de cette thèse, que la simple expression du BCR IgE, en l'absence même de tout antigène liant ce BCR, serait donc le (ou l'un des) signal déclencheur d'apoptose, à la fois dans les lymphocytes et dans les plasmocytes à courte durée de vie. Il a récemment été démontré que les plasmocytes IgM et IgA exprimaient un BCR fonctionnel et qu'un pontage fort de celui-ci diminuait le nombre de cellules sécrétrices (Pinto et al., 2013). Etant donné que les plasmocytes IgE (à courte durée de vie) expriment fortement un BCR, que nous montrons que ce BCR est pro-apoptotique, et que ces cellules ont une moindre chance de migrer vers les niches plasmocytaires, le nombre de plasmocytes IgE à longue durée de vie pourrait donc être *ipso facto* très limité. Cependant, l'existence chez de nombreux sujets allergiques de sensibilisation IgE qui perdurent des années ou à vie implique qu'un certain contingent de plasmocytes IgE persiste sur le long terme, soit cellules à vie longue, soit cellules constamment régénérées même en l'absence de nouveau challenge antigénique spécifique. La présence de quelques picogrammes d'IgE spécifiques d'un antigène par litre de sérum étant suffisante pour déclencher une réaction de sensibilisation, on peut cependant s'attendre à ce que ce nombre de cellules sécrétantes d'IgE soit minime (et doit sans doute absolument rester minime pour éviter des réactions de sensibilisation d'intensité dramatique).

Des expériences sont en cours pour évaluer la durée de vie des plasmocytes IgE avec notre modèle  $\mu\text{Kl} \times \text{CreERT2}$ , où nous induisons l'activité de la *cre* recombinase avec du tamoxifène sur 3 jours (permettant une délétion du gène IgM et donc l'expression de l'IgE), créant un fort pic de production d'IgE environ 10 jours plus tard, ce taux diminuant à trois semaines. Le suivi à plus long terme de cette cinétique nous permettra de voir si ce taux chute à zéro ou se maintient ensuite à un taux basal, témoignant ainsi d'une survie ou d'une disparition totale de toutes les cellules sécrétrices d'IgE (provenant éventuellement pour partie dans notre modèle de plasmocytes IgM à

longue durée de vie IgM, déjà présents dans leurs niches avant induction « *cre* » et induits vers l'IgE par la délétion *cre*, mais alors sans passage par un stade de lymphocytes mIgE+). Cette induction au tamoxifène permet également de générer des cellules IgE+, avec un pic à J7 puis une chute rapide à J11, cette disparition étant très certainement liée à l'expression de l'IgE membranaire car une simple délétion du BCR IgM *in vivo* n'entraîne pas la même cinétique d'apoptose (Lam 1997). Montrant que la faible et transitoire expression de cellules mIgE+ ne relève pas simplement d'une mauvaise expression à la membrane, on ne détecte pas davantage de cellules IgE+ en intra-cellulaire (du type de ce qui est par contre facilement obtenu dans le modèle  $\mu\kappa$ KI par délétion *cre* d'hybridomes IgM vers l'IgE). Donc, même dans un modèle bi-phasique comme celui-ci, qui permet un passage massif de l'IgM vers l'IgE (l'efficacité de la délétion étant vérifiée par Southern blot et révélant la disparition totale de l'allèle en configuration germinale dans les cellules non-B), le nombre de cellules IgE+ reste faible, probablement car elles sont éliminées au fur et à mesure de leur production (la délétion *cre* ne se faisant pas instantanément après les traitements au tamoxifène mais plutôt en continu depuis le début de l'induction) et les cellules IgM+ sont alors sélectionnées par leur simple capacité à survivre. Enfin les rares cellules IgE+ détectées un mois après traitement ont toutes incorporé le BrdU injecté 10 jours avant la fin de cette cinétique, témoignant d'une absence de cellules IgE+ à « longue durée de vie ». Les cellules IgE générées dans ce modèle le sont de manière indépendante de l'Ag et de cytokines, il n'y a pas de biais de répertoire (répertoire endogène complet) et les effets observés peuvent être attribués à un caractère intrinsèque des cellules IgE+.

### **3.6 Le réseau des IgE et de leurs récepteurs**

La production d'IgE est en relation étroite avec divers récepteurs. En effet la présence d'IgE augmente l'expression du Fc $\epsilon$ RI à la surface des mastocytes d'un facteur 32 (Yamaguchi et al., 1997), alors que le KO du récepteur de faible affinité (Fc $\epsilon$ RII ou CD23) augmente la réponse IgE, supposant un rétrocontrôle par ce récepteur (Yu et al., 1994). De plus, ces récepteurs existent sous forme membranaire et sécrétée. La galectine 3 soluble lie également l'IgE avec une faible affinité

(pour revue (Platzer et al., 2011)). La galectine 9 sécrétée se lie à l'IgE avec une forte affinité (Niki et al., 2009). Enfin, un récepteur Fc $\gamma$  capable de lier les complexes immuns IgE-Ag et d'activer les macrophages a été décrit chez la souris : le Fc $\gamma$ RIV (Hirano et al., 2007). Au-delà de la fonction de ces récepteurs à la surface des effecteurs cellulaires, on peut se poser la question de leur rôle dans l'homéostasie des IgE et des lymphocytes B exprimant l'IgE. En effet il a été démontré que le Fc $\epsilon$ RI pouvait se lier à l'IgE membranaire (Vangelista et al., 2005), tout comme le CD23 soluble (Hibbert, 2005). Les galectines doivent elles-aussi être capables de se lier à l'IgE membranaire.

Bien que n'ayant pu réussir à le démontrer, nous nous sommes interrogés au cours de cette thèse quant à l'hypothèse d'interactions avec les Fc récepteurs qui lieraient non seulement les IgE solubles mais aussi des IgE ancrées à la membrane en tant que BCRs. On pourrait alors imaginer des interactions cellulaires paracrines/juxtacrines entre un lymphocyte B mIgE<sup>+</sup> et d'autres lymphocytes B environnants exprimant un récepteur (Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup> ou Fc $\gamma$ RIV<sup>+</sup>), voire même des interactions autocrines (voire intracrines au sein des vésicules de transport des protéines vers la membrane) entre mIgE et récepteurs Fc spécifiques exprimés sur la même cellule B. Le pontage du BCR IgE se révélant pro-apoptotique, les récepteurs Fc étant pour leur part connus pour signaler par une voie qui chevauche celle du BCR (voie Syk), le type de stimulation qui émanerait hypothétiquement d'une telle liaison « autocrine-like » pourrait fort bien contribuer à l'effet pro-apoptotique du BCR IgE. Il convient ici aussi de noter que notre travail nous a permis de montrer que la transfection d'une cellule B par un vecteur d'expression du BCR IgE, induit la capacité pour la cellule transfectée de lier les IgE solubles, augmente la transcription du Fc $\gamma$ RIV et son expression membranaire, et semble augmenter l'expression membranaire du Fc $\epsilon$ RI. Ces points mériteront à l'évidence d'être explorés plus en détail pour comprendre leur implication éventuelle dans le processus apoptotique que nous observons.

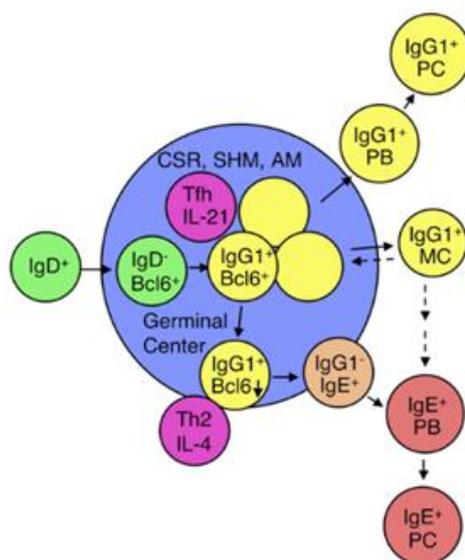
## 4. Une mémoire IgE ?

Après avoir façonné un paratope au cours des recombinaisons V(D)J et d'éventuelles hypermutations somatiques, il peut être utile, pour de futures réponses immunes, de garder ce récepteur dans le répertoire, c'est le principe de la mémoire adaptative. Un tel récepteur sera donc déjà disponible en cas de nouveau contact avec l'Ag et pourra même être remodelé par de nouvelles hypermutations si besoin. Il apparaît alors que ce domaine variable porteur du paratope peut être associé à une IgM, assurant un pool de cellules mémoires IgM, ou bien associé à une classe d'Ig switchée (IgG ou IgA), à l'origine de cellules mémoires commutées. Il a été démontré chez la souris que ces multiples strates étaient générées après immunisation (pour l'IgM et l'IgG1) et permettaient, lors d'un nouveau contact avec l'Ag une différenciation rapide des cellules mémoires IgG1 en plasmocytes sécréteurs, et aux cellules mémoires IgM d'assurer un nouveau cycle dans le centre germinatif (Dogan et al., 2009). De plus il existe deux niveaux de mémoires : celle portée par les lymphocytes B et une mémoire sérique, assurée par les plasmocytes à longue durée de vie.

Toutes ces populations de lymphocytes B mémoires et de plasmocytes à longue durée de vie peuvent être générées ou étudiées pour les différentes classes d'Ig, mais la question est spécialement complexe pour les IgE. Comme nous l'avons vu il existe des données contradictoires concernant les cellules IgE, menant à différents modèles sur la mémoire IgE... dont les trois suivants :

Le premier modèle (que nous dirons de « *switch* séquentiel ») découle des travaux d'Erazo et al. (Erazo et al., 2007b) et a été renforcé par de nouvelles données de cette équipe (Xiong et al., 2012). Il est proposé que les cellules switchent d'abord vers l'IgG1 dans le centre germinatif, puis switchent à nouveau vers l'IgE en dehors du GC, et se différencient rapidement en plasmocytes. A distance dans le temps, des cellules mémoires IgG1 pourraient également switcher vers l'IgE (en repassant ou non par le GC) et maintenir ainsi une pseudo-mémoire IgE émergeant à la demande ou en continu de la mémoire IgG1. Ce modèle suggère donc une absence de lymphocytes B IgE+

mémoires (Figure 4). L'étude de 2012 permet d'établir que ces cellules mémoires IgG1 sont à l'origine des IgE de forte affinité. La mémoire IgE serait donc portée par les lymphocytes B IgG1 et éventuellement des plasmocytes IgE à longue durée de vie (ou des plasmocytes IgE régulièrement renouvelés à partir du stock des cellules mémoires mIgG1+). Nos données sur l'apoptose des cellules IgE sont en accord avec un tel modèle puisque ces cellules nous apparaissent comme par essence dotées d'une courte durée de vie.

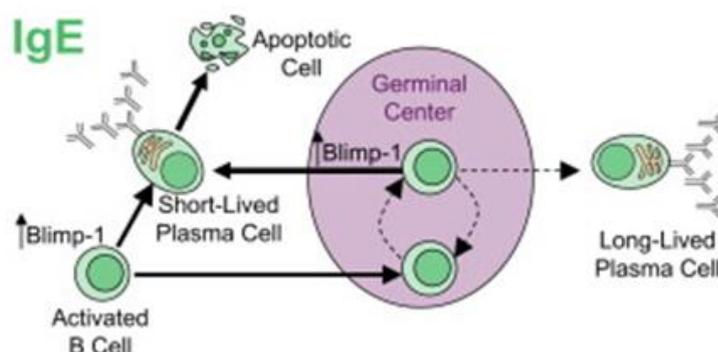


**Figure 4 : Modèle du « switch séquentiel »**

Le *switch* des cellules IgE+ se ferait en deux temps, avec une phase IgG1 permettant l'hypermutation somatique, puis un *switch* vers l'IgE suivi d'une différenciation rapide en plasmocytes. Adapté de Erazo *et al.*, 2007

Il convient également d'intégrer aux modèles de mémoire IgE les travaux de Yang *et al.* (Yang *et al.*, 2012), qui suggèrent que les cellules qui effectuent le *switch* IgE hors du GC, deviennent mIgE+ et sont alors prédisposées à un devenir plasmocytaire « à courte durée de vie ». Ces cellules mIgE+ peuvent également passer par le GC où elles se renouvelleront peu, généreront peu de plasmocytes à longue durée de vie, et se différencieront majoritairement en plasmocytes à courte durée de vie (Figure 5). La mémoire IgE serait donc supportée par ces quelques plasmocytes IgE à longue durée de vie, dont l'existence réelle reste cependant en attente d'une caractérisation effective. Nos observations sur le signal pro-apoptotique du BCR IgE pourraient être étendues dans ce modèle, des lymphocytes B mIgE+ aux plasmocytes mIgE+, les plasmocytes IgE

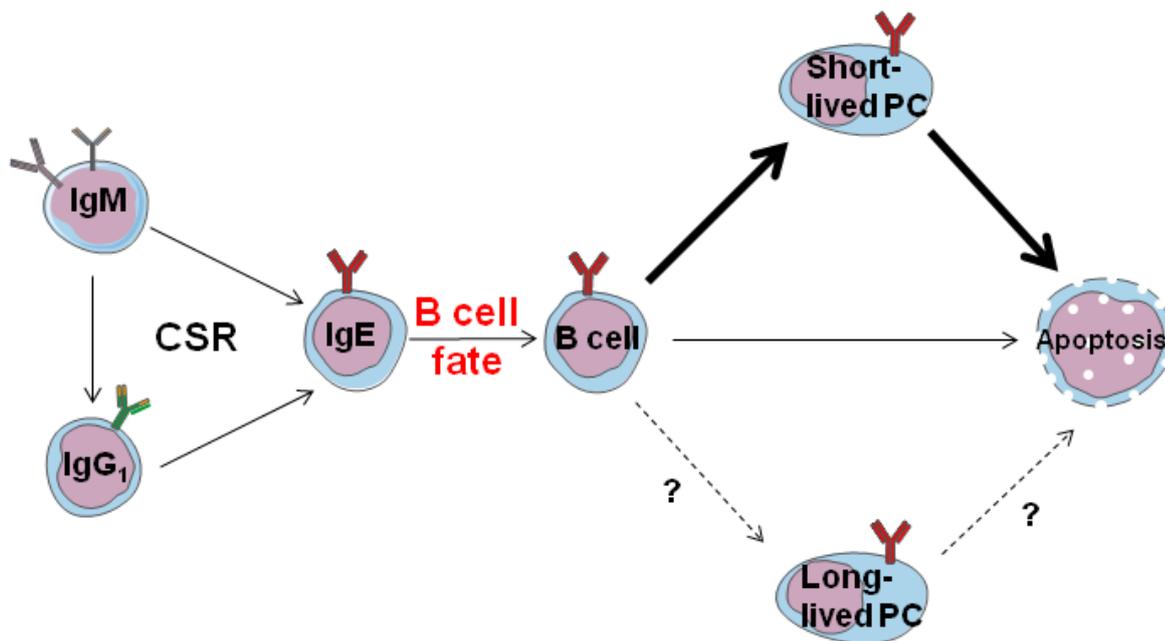
à courte durée de vie étant décrits dans cet article, comme maintenant une expression forte de l'IgE membranaire.



**Figure 5 : Modèle des « plasmocytes à courte durée de vie »**

La différenciation plasmocytaire rapide des cellules IgE<sup>+</sup> se ferait principalement vers des plasmocytes à courte durée de vie. Adapté de Yang *et al.*, 2012

Au final, nos observations apportent de nouveaux éclairages aux modèles de mémoire IgE, dans la mesure où elles expliquent comment cette mémoire est auto-limitée par la physiologie très particulière qui découle du caractère constitutivement pro-apoptotique du BCR mIgE et de son pouvoir modulateur du phénotype B. Nos observations peuvent donc s'intégrer à l'ensemble des données publiées en un modèle cohérent. Les cellules IgE pouvant provenir de cellules IgM ou IgG1, selon le contexte physiologique, mais ayant un destin cellulaire identique. Les cellules mIgE<sup>+</sup> ont une forte tendance à se différencier en plasmocytes à courte durée de vie, qui restent alors voués, comme au stade de lymphocytes B IgE<sup>+</sup> à être éliminés, du fait de l'expression d'une IgE membranaire pro-apoptotique (Figure 6). Les plasmocytes à longue durée de vie, s'ils existent, devraient nécessairement avoir stoppé l'expression du BCR IgE, ou bien avoir élaboré des mécanismes de résistance à l'apoptose mIgE-induite. On notera que même si elle brise de vieux dogmes, la notion de maintien d'un certain niveau d'expression du BCR par des plasmocytes est défendue par divers auteurs (Pinto *et al.*, 2013).



**Figure 6 : Modèle de « mémoire auto-limitée »**

Les cellules B IgE+ auraient une tendance à la différenciation plasmocytaire à courte durée de vie et seraient limitées dans leur expansion par un signal pro-apoptotique induit par le BCR IgE lui-même. Modèle proposé à partir de nos données et de la littérature

Le mécanisme d'induction d'apoptose reste à préciser, les données de variations transcriptomiques pouvant éventuellement nous orienter. L'implication de la mitochondrie nous renseigne également, et HAX1 qui est impliqué à la fois dans l'apoptose mitochondriale et dans la liaison de la queue IgE apparaît comme un candidat vraiment intéressant.

## 5. Vers un usage thérapeutique des IgE

Les anticorps monoclonaux (MAb) actuellement utilisés en thérapie anticancéreuse sont de classe IgG, car ils ont une longue durée de vie et des propriétés biologiques bien connues. Cependant des travaux testent de nouvelles classes d'anticorps. Il a été montré au sein du laboratoire que des MAb anti-CD20 de classe IgA avaient un effet *in vitro* et *in vivo*, ouvrant la possibilité de l'utilisation des IgA dans le domaine thérapeutique (Pascal et al., 2012).

Des études épidémiologiques ont montré une association inverse entre des maladies allergiques et le taux de certains cancers (Jensen-Jarolim et al., 2008; Turner, 2005). Donc si les IgE

sont, potentiellement, naturellement impliquées dans la surveillance et la lutte contre les cancers, il apparaîtrait d'intérêt que leur usage thérapeutique soit testé.

Ainsi un nouveau domaine s'est créé : « l'allergo-oncologie » (pour revue, (Jensen-Jarolim and Pawelec, 2012)). Il apparaît que les MAb IgE, spécifiques d'antigènes tumoraux, peuvent être supérieurs aux autres classes en terme d'ADCC et d'ADCP. Ces MAb ont la capacité de recruter les éosinophiles, les mastocytes et les macrophages, qui peuvent alors devenir des effecteurs anti-tumoraux puissants (pour revue (Nigro et al., 2013)).

Le modèle murin  $\mu\kappa$ KI que nous avons généré a fait l'objet d'un dépôt de brevet pour la production d'Ac humanisés de classe IgE (souris « InEps », annexe 1). Il a l'avantage de posséder un large répertoire, celui du locus IgH murin, et de répondre efficacement à différentes immunisations, produisant des Ac de forte affinité de classe IgM (humaine) dans un premier temps. Des hybridomes sécrétant des IgM spécifiques sont ainsi facilement obtenus avec des techniques conventionnelles. La présence de sites *LoxP* de part et d'autre de l'IgM permet une délétion, grâce à l'action d'une *cre* recombinase, de ce gène et la sécrétion d'Ac humanisés de classe IgE. Les MAbs produits peuvent être utilisés en diagnostic, pour servir de standards à la recherche d'Ac de l'allergie par exemple, mais pourraient également être utilisés pour explorer des stratégies d'immunothérapie IgE. Les souris InEps pourraient également être utilisées comme modèle d'étude *in vivo*, après croisement avec des lignées apportant une *cre* recombinase inductible et des souris humanisées pour le Fc $\epsilon$ RI (Dombrowicz et al., 1996), l'interaction IgE/Fc $\epsilon$ RI étant importante pour assurer les fonctions biologiques de l'IgE.

## 6. Recombinaisons non classiques médiées par l'enzyme AID

Au-delà des cibles bien connues d'AID sur les régions S $\mu$  et S $\alpha$  d'un même chromosome IgH lors du CSR, on sait qu'AID peut agir sur les régions S du chromosome homologue, au moins chez le lapin et la souris, durant le CSR. De plus AID peut agir sur des séquences présentes sur les autres chromosomes au cours d'évènements de translocation. Ainsi les boucles intra-chromosomiques entre deux régions S formées en majorité au cours du CSR ne sont pas une règle

absolue et des structures alternatives existent. Dans le cadre d'une meilleure compréhension de tels agencements nous nous sommes intéressés à différentes situations où AID pouvait agir de manière non conventionnelle, avec l'étude du phénomène de *trans-switch* chez l'homme, la mise en évidence du phénomène de LSR chez la souris et la recherche de mutations AID-dépendantes dans des lymphoproliférations humaines.

## 6.1 Recombinaisons inter-chromosomiques du locus IgH

L'enzyme AID, découverte en 1999 (Muramatsu et al., 1999), a d'abord été décrite comme un nouveau membre potentiel de la famille des désaminases impliquées dans l'édition des ARN. Son rôle capital dans la commutation de classe et l'hypermutation somatique fût démontré un an plus tard chez la souris (Muramatsu et al., 2000) ainsi que chez des patients atteints du syndrome d'hyper-IgM de type 2 (Revy et al., 2000). Enfin son implication dans le phénomène de conversion génique chez le poulet a été mise en évidence deux ans plus tard (Arakawa, 2002). De nombreux travaux ont été menés pour comprendre le mécanisme d'action de cette enzyme, et on sait désormais qu'AID agit par désamination des cytidines (C) de l'ADN en uraciles (U). Ces bases illégitimes dans l'ADN sont enlevées par l'uracile ADN glycosylase (UNG), élément crucial du mécanisme de réparation par excision de bases (BER), créant des sites abasiques. Les endonucléases apuriques/apyrimidiques (APEs) peuvent exciser ces sites abasiques et entraîner la formation de trous dans l'ADN. Une ADN polymérase fidèle peut éventuellement réparer cette lésion et rétablir la cytosine initiale (réparation sans erreur). Des intermédiaires de cassures double brin (DSB) de l'ADN peuvent se produire à différents niveaux de ce processus, par exemple lorsque deux trous dans l'ADN simple brin (SSB) sont créés sur chaque brin et se retrouvent à proximité. Ces cassures de l'ADN sont nécessaires pour la recombinaison de classe. L'apparition de cassures double brin dans l'ADN active des mécanismes de réparation, avec le recrutement de senseurs de dommage à l'ADN, d'adaptateurs et d'effecteurs. Brièvement, le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) localise les sites de cassure, où il recrute et active la protéine sérine kinase ATM. ATM phosphoryle NBS1 et des protéines de réponse de dommage à l'ADN, amplifiant la réponse. MRN

active également la voie  $\gamma$ H2AX-MDC1-53BP1, l'histone H2AX phosphorylée ( $\gamma$ H2AX) et la protéine 1 de liaison à p53 (53BP1) permettant de former la synapse entre les deux régions S (synapse S-S). Enfin deux processus de réparation de l'ADN peuvent avoir lieu : le principal utilise la voie de recombinaison classique du NHEJ (C-NHEJ pour classical non homologous end joining), le second la voie alternative A-EJ (alternative end joining). Lors du C-NHEJ, les cassures doubles brins sont liées par KU70 et KU86 qui forment un complexe avec la sous-unité catalytique de la protéine kinase ADN-dépendante (DNA-PKcs), recrutant d'autres facteurs essentiels, tels que le complexe XRCC4-ADN ligase IV, qui permettront la ligature de l'ADN et la formation des jonctions entre les régions S. Lors de l'A-EJ, les DSBs sont pris en charge par le complexe MRN et CTIP, générant ainsi des micro-homologies entre les extrémités libres d'ADN. La ligature des DSBs de l'ADN se fait par une ou plusieurs ligases (à identifier) et produit des jonctions S-S avec plus de micro-homologie que le C-NHEJ (pour revues (Robbiani and Nussenzweig, 2013; Xu et al., 2012)).

Quant au ciblage d'AID, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence certaines caractéristiques de ses substrats, dont la composition nucléotidique même de l'ADN, avec un motif cible, conservé au cours de l'évolution : la séquence AGCT (Zarrin et al., 2004), ou de manière plus générale le site WRCY, où W=A/T, R=purine et Y=pyrimidine (Rogozin and Kolchanov, 1992). La forte fréquence de répétitions AGCT au niveau des régions S permet également la liaison d'adaptateurs, dont les protéines 14-3-3, qui servent de ponts entre l'ADN, AID et ses co-facteurs. Ces protéines interagissent directement avec AID et PKA-C $\alpha$  permettant la phosphorylation d'AID (sur sa sérine 38) nécessaire à son activation. La transcription, nécessaire au CSR, génère des hybrides ARN:ADN stables ainsi que des structures secondaires, telles que les « *R loops* » ou les « *stem loops* », et une accumulation de telles structures (*R loops*) dans des levures transgéniques augmente le ciblage de AID et les translocations chromosomiques (Ruiz et al., 2011). Ces structures participent en partie au ralentissement de l'ARN polymérase II (ARN polIII) observé au niveau de ces régions, cette « pause » permettant une interaction entre AID et l'ARN polIII par l'intermédiaire du facteur d'élongation Spt5. Le complexe de liaison simple brin RPA participe à la stabilisation de l'ADN simple brin, alors que l'ARN exosome se lie au transcrit naissant et l'exclut de l'hybride ADN/ARN pour présenter AID aux deux brins de l'ADN (pour revue (Keim et al., 2013)). De

nombreux autres co-facteurs participent à ces interactions et permettent à AID d'agir principalement sur ses substrats légitimes.

Le phénomène de recombinaison de classe, en lui-même, est décrit depuis longtemps et il s'avère que cette recombinaison se fait majoritairement (75%), en parallèle sur les deux chromosomes (Borzillo et al., 1987). En effet il se trouve que la transcription germinale, induite lors de l'activation du CSR, se fait sur les deux allèles (Delpy et al., 2003). Ainsi il est possible qu'AID et ses co-facteurs ciblent à la fois les deux régions S ( $S_{\mu}$  et  $S_x$ ) de l'allèle réarrangé mais aussi les deux régions S de l'autre allèle. Dans cette configuration la recombinaison de classe peut se faire entre les deux régions S d'un même chromosome, de manière classique en *cis*, ou bien en *trans* entre les deux chromosomes homologues, créant une recombinaison de *trans*-CSR. Cette hypothèse a été validée chez le lapin qui possède de nombreux allotypes des gènes VH et C $\alpha$ , permettant un suivi des segments d'ADN, grâce aux variations nucléotidiques présentes dans ces différents allotypes. Ainsi le clonage et le séquençage de transcrits d'IgA révèlent des associations provenant de chromosomes parentaux différents (Knight et al., 1995). La preuve que ces associations sont le résultat de recombinaisons en *trans* a été apportée par le séquençage des jonctions  $S_{\mu}/S_{\alpha}$  hybrides (Kingzette et al., 1998). Dans ces premières études la fréquence de *trans*-CSR rapportée est d'environ 7% pour les IgA de lapin. Des travaux menés chez la souris confirment ce phénomène et cette fréquence pour la commutation vers l'IgA, et indiquent une fréquence encore plus élevée pour le *switch* vers l'IgG3, environ 18% (Reynaud et al., 2005).

Nos données obtenues chez un donneur sain confirment ce phénomène chez l'homme, avec une forte fréquence de 17% de *trans*-CSR vers IgA1. Alors qu'un épissage en *trans* semble exclu de ces observations (non démontré chez l'homme), un contrôle important était de vérifier les biais d'amplification par la PCR, car les nombreux cycles de dénaturations et d'hybridations peuvent créer des structures hybrides entre les différents amplifiats qui seront ensuite complétées par l'ADN polymérase et généreront de faux positifs lors des clonages. Un mélange équimolaire de deux plasmides contenant chacun un transcrit de *cis*-CSR avec une combinaison spécifique des allèles JH6 et C $\alpha$ 1 a donc été préparé et soumis aux mêmes conditions de PCR que les ADNc. Dans ces conditions artificielles, où ne sont présentes que ces deux matrices et à forte concentration, nous

n'avons cloné qu'un seul faux positif (avec réassociation interallélique d'un allèle JH avec le deuxième allèle C $\alpha$ ) sur les 100 clones analysés, cet artéfact de PCR par *ré-annealing* avec *mismatch* de fragments en cours d'élongation existe donc mais reste relativement rare et ne peut expliquer les fréquences élevées de *trans*-CSR que nous mesurons.

Les recombinaisons en *trans* sont donc communes à trois espèces mammifères étudiées, et il est assez probable que l'on puisse les détecter chez n'importe quelle espèce faisant de la recombinaison de classe. Leurs fréquences mesurées sont élevées, et donc, lorsqu'une cellule possède deux chromosomes IgH avec une cassure double brin, il est assez probable que ces chromosomes peuvent toujours recombinaisonner en *trans*. Lors d'un tel évènement, on peut imaginer différentes situations. La première est une cassure de la région S $\mu$  de l'allèle réarrangé et de la région Sx de l'autre allèle : après réparation il y a un chromosome switché classique et l'autre contiendrait une duplication des gènes constants (qui auraient dus être éliminés sous forme d'un épisode). Cette anomalie génétique serait sans conséquence puisque ces gènes ne seraient pas exprimés. L'hypothèse la plus probable est que les deux régions S $\mu$  et les deux régions Sx soient coupées en même temps (permettant la délétion des deux régions intermédiaires sous forme de deux épisodes) puis que les régions S $\mu$  et Sx soient mélangées, aboutissant au *trans-switch*. Il en résulterait deux chromosomes switchés. Enfin une situation intermédiaire serait envisageable, avec délétion d'un seul épisode (de l'un ou l'autre chromosome) générant un allèle switché et un allèle portant les gènes constants. L'étude de ces situations pourrait éventuellement nous informer sur la structure de l'ADN au cours d'un tel phénomène de formation de boucles inter-chromosomiques.

La 3'RR est nécessaire au CSR (Vincent-Fabert et al., 2010a), et participe à la formation de boucles intra-chromosomiques lors du *switch*, notamment en se rapprochant de l'activateur intronique E $\mu$  et de la régions Sx, permettant la formation de la synapse S-S (Wuerffel et al., 2007a). Il a été démontré dans des souris hétérozygotes, que la 3'RR d'un allèle IgH non fonctionnel (avec un VDJ non traduisible) pouvait activer le CSR sur l'autre allèle qui ne possédait pas de 3'RR (et portait donc un défaut de *switch* en *cis*), et donc apporter une « *trans-complémentation* » de l'activité de cet *enhancer* (Dougier et al., 2006). Dans ce cas, la structure de boucles intra-chromosomiques entre E $\mu$ , la 3'RR et Sx proposée par Wuerffel, n'existe pas et la

synapse entre les régions S est donc plus complexe. Il serait intéressant dans un tel modèle de voir si cette *trans*-complémentation est également capable de rétablir l'hypermutation somatique de l'allèle 3'RR déficient, cet activateur transcriptionnel étant nécessaire à la SHM *in vivo* ((Rouaud et al., 2013). De plus, on pourrait aussi croiser des souris 3'RR KO avec des souris E $\mu$  KO et étudier la descendance hétérozygote qui aurait donc un allèle avec E $\mu$  mais sans la 3'RR (allèle IgH<sup>a</sup> par exemple) et l'autre allèle sans E $\mu$  mais avec la 3'RR (allèle IgH<sup>b</sup> pour permettre le suivi des molécules d'ADN). Il faudrait comparer ce modèle à des souris E $\mu$  KO hétérozygotes mais qui possèderaient bien les deux 3'RR et qui switcheraient donc normalement sur les 2 allèles (E $\mu$  n'influençant pas le CSR lorsque la 3'RR est présente). On pourrait alors comparer les fréquences de *cis*-CSR et de *trans*-CSR dans ces deux modèles pour essayer de comprendre les interactions entre les différents acteurs E $\mu$ , 3'RR et S et les boucles formées au cours du switch.

Si une recombinaison en *trans* ne pose pas de problème entre deux chromosomes homologues au niveau des loci IgH au moment du CSR, il peut en revanche en aller autrement lorsque d'autres partenaires sont impliqués, lors une translocation. Ce type d'aberration chromosomique peut mener à la situation où un oncogène se retrouve sous le contrôle de la région régulatrice 3'RR du locus IgH et est surexprimé. Ces translocations au locus IgH existent et sont à l'origine de différentes lymphoproliférations (pour revue (Vincent-Fabert et al., 2010b)). Ces recombinaisons aberrantes ont fait l'objet de nombreuses études et il en résulte que, notamment, la proximité nucléaire au locus IgH pourrait être un facteur contribuant à de telles anomalies pour certains auteurs ((Rocha et al., 2012) et pour revue (Rocha and Skok, 2013)), mais pas pour d'autres (Gramlich et al., 2012). Pourtant une telle notion de proximité est assez intuitive et il apparaît plus probable, au sens propre, que deux chromosomes soient recombinaisonnés entre eux s'ils se trouvent au même endroit, au même moment, ce qui est le cas pour les loci IgH au cours du CSR. Enfin la probabilité pour un chromosome non IgH d'être la cible de AID doit être plus importante dans un « territoire chromosomique » de AID au moment du CSR puisque les différents facteurs du CSR sont également présents et en plus forte concentration à cet endroit-là.

## 6.2 Recombinaison suicide du locus IgH

Le séquençage de la région 3'RR murine a révélé sa structure palindromique (Chauveau and Cogné, 1996) ainsi que la présence de séquences répétitives, faisant penser à la structure des régions S. L'analyse *in silico* révèle la présence de ces régions « LS » au sein de la 3'RR de différentes espèces (homme, souris, chien, lapin). De plus la 3'RR contient de nombreux sites de fixations aux facteurs de transcription (pour revue (Pinaud et al., 2011b)) permettant sa transcription potentielle, et il a été démontré que certains activateurs transcriptionnels étaient eux-mêmes transcrits (Kim et al., 2010b). Ces caractéristiques des régions LS rappelant celles des régions S, l'hypothèse d'un ciblage par AID a été émise. La transcription de la 3'RR a été démontrée en qPCR (hs1,2 et hs4) ainsi que par immunoprécipitation de l'ARN polymérase II et de la chromatine. Le clonage de ces activateurs transcriptionnels met en évidence la présence de mutations, stigmates de l'activité d'AID sur la région 3'RR. Enfin l'étude par PCR suivie de Southern blot ainsi que le séquençage direct des jonctions ont démontré que les régions LS, qui étaient ciblées par AID, subissaient également des événements de recombinaisons avec les régions S (S $\mu$  principalement). De telles recombinaisons impliquent la perte du locus IgH et du BCR...aboutissant à la mort de la cellule B, ce processus a donc été baptisé « Locus Suicide Recombination » (Péron et al., 2012). La mise en évidence de ce LSR pose diverses questions, dont la fonction biologique de ces événements et il est tentant de penser que ce phénomène pourrait participer à la régulation de la réponse adaptative, en particulier en éliminant les lymphocytes B auto-réactifs. En effet l'absence de AID entraîne la formation de GC géants (Revy et al., 2000) qui pourraient alors être dus à une absence de LSR et d'élimination de populations B. De plus, différentes études argumentent en faveur d'un rôle de AID dans la tolérance centrale (Kuraoka et al., 2011; Meyers et al., 2011). Une meilleure compréhension de ce phénomène *in vitro* et *in vivo* devrait permettre de préciser ce point et différents travaux ont été initiés dans ce sens au laboratoire. Un modèle murin a été créé pour permettre le « sauvetage » des cellules B suicidaires, en insérant un gène C $\mu$  humain à la fin de la 3'RR. Ainsi les cellules qui accomplissent le LSR et éliminent leurs gènes constants se retrouvent avec un nouveau gène C $\mu$ , permettant son association avec le VDJ réarrangé et donc l'expression

d'un nouveau BCR IgM, évitant potentiellement leur apoptose. Des données préliminaires valident cette stratégie, en détectant des lymphocytes B hIgM+ ainsi que la sécrétion d'IgM humaine après stimulation *in vitro*. Ce modèle va également permettre l'analyse du répertoire des cellules B induites vers le LSR (après PCR entre les VH murins et le C $\mu$  humain, clonage et analyse des séquences) et donc préciser la physiologie de ce processus. D'un point de vue mécanistique, on pourrait se demander si AID est recruté par des marques spécifiques au niveau de la 3'RR, éventuellement en association avec des partenaires spécifiques...mais ces pures spéculations nécessitent évidemment une investigation beaucoup plus poussée.

L'origine phylogénique de ces recombinaisons éclairerait peut-être sur sa fonction, on pourrait même penser que le LSR est à l'origine du CSR, avec la mise en place d'un phénomène de recombinaison régulateur dans un premier temps, puis son évolution vers un système de diversification de la classe et de la reconnaissance des récepteurs B...

Enfin, la mise en évidence de ces recombinaisons chez l'homme présente un intérêt fondamental, et éventuellement à terme thérapeutique, et a donc été initiée au laboratoire, avec des résultats encourageants qui sont en cours d'étude.

### **6.3 Remaniements AID-dépendants du locus de chaîne lourde d'immunoglobuline et lymphomogénèse**

La mise en évidence de mutations au sein de la 3'RR chez la souris nous a également amené à penser que de telles mutations des séquences activatrices transcriptionnelles pourraient avoir un effet de majoration de la dérégulation d'oncogènes, dans tous les cas où un tel oncogène est transloqué à proximité de la 3'RR. Ces séquences activatrices portent en effet des sites de liaison pour des répresseurs transcriptionnels (tels que Pax5, YY1, MafK) dont la disruption pourrait augmenter l'activité transcriptionnelle de la 3'RR, et donc l'expression d'un oncogène associé. Des mutations dans des éléments *cis*-régulateurs étant déjà connues pour des maladies génétiques (transmises par les cellules germinales dans ces cas) (pour revue (Epstein, 2009)).

Nous avons donc recherché sur des échantillons de lymphomes humains de type post-centre germinatif (échantillons de lymphomes folliculaires, en partenariat avec le CHU de Limoges et de

Rennes) des mutations AID-dépendantes de la 3'RR susceptibles de participer au processus de lymphomogenèse. Nous avons séquencé en particulier les enhancers hs1,2 et hs4, sur des échantillons d'ADN de tumeur totale ainsi que sur des échantillons appariés de cellules B tumorales (triées CD19+) et de tissu sain, permettant une comparaison directe des séquences. Nous n'avons pas trouvé de mutations récurrentes potentiellement impliquées dans le processus de lymphomagenèse.

En revanche le grand nombre de séquences générées sur ces échantillons, ainsi que sur des échantillons contrôles de volontaires sains, nous a permis de mettre en évidence quelques nouveaux SNP au sein des enhancers hs4 et de hs1,2, ainsi qu'un nouvel allèle hs1,2 fréquent. En effet, il existe un polymorphisme allélique hs1,2, ces allèles ayant un nombre de sites de liaison à NF- $\kappa$ B différent et donc une taille différente (D'Addabbo et al., 2011). Ces variants alléliques peuvent être impliqués dans différentes pathologies impliquant la production d'Ig (Aupetit et al., 2000; Frezza et al., 2012). Nous avons donc réorienté notre hypothèse en nous demandant s'il existait une corrélation entre la présence de ces divers allèles et le développement d'un lymphome (folliculaire ou du manteau). Nous avons mis au point une PCR de génotypage ultra-sensible, avec une amorce fluorescente permettant, après migration dans un gel très résolutif et lecture de la fluorescence (analyse « Genescan »), de discriminer les différents allèles avec une précision de 3 paires de bases. Cette PCR est maintenant utilisée dans le cadre de l'étude PRIERR (« Etude de l'immunopathologie et du polymorphisme génétique hs1,2 du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines ») qui a pour but d'évaluer les fréquences alléliques hs1,2, au sein de la population contrôle de volontaires sains (environ 400 personnes) ainsi que chez des patients atteints de différentes pathologies : purpura rhumatoïde, allergies et lymphomes. L'analyse des volontaires sains a mis en évidence 2 nouveaux allèles (très rares car retrouvés une fois chacun, que nous avons cloné et séquencé) et a permis d'établir les fréquences attendues dans une population contrôle. Les premiers résultats des échantillons de lymphomes folliculaires pouvaient faire penser à un allèle protecteur, car sous-représenté chez ces patients, mais l'échantillonnage trop faible pour l'instant ne permet pas d'analyses statistiques. Enfin l'analyse des dossiers médicaux de ces patients permettrait d'étudier s'il existe une corrélation entre les allèles hs1,2 et

l'agressivité clinique de ces lymphomes folliculaires. Ces travaux, non présentés, sont en cours et les données générées seront soumises à publication. AID ne semble donc pas impliqué dans un processus mutagène de la 3'RR. En revanche la composition de cette région (hs1,2 en particulier, de part son polymorphisme et son nombre de sites de liaison à NF- $\kappa$ B) pourrait jouer un rôle au moment du déclenchement ou au cours de la progression de processus lymphoprolifératifs (impliquant une translocation au locus IgH), en modulant d'une part le niveau de recrutement d'AID au cours du CSR, et en augmentant la probabilité de dommages collatéraux sur un oncogène, ou d'autre part en influençant le niveau d'expression de l'oncogène transloqué.

## **7. Conclusion générale**

Les différentes questions abordées au cours de ces travaux ont donc contribué à éclairer quelques aspects fondamentaux de destins cellulaires et de mécanistique B, et à élaborer un modèle murin avec des applications biotechnologiques. Différentes perspectives restent à explorer, notamment la compréhension du phénomène de LSR, ainsi que l'utilisation des IgE en thérapeutique.

Enfin, à travers ces différentes actions, il apparaît clairement qu'AID module à la fois le répertoire ET le destin de la cellule B, pour le meilleur et pour le pire...

## **IV. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Achatz, G., Nitschke, L., and Lamers, M.C. (1997). Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response. *Science* 276, 409–411.
- Achatz-Straussberger, G., Zaborsky, N., Königsberger, S., Luger, E.O., Lamers, M., Cramer, R., and Achatz, G. (2008). Migration of antibody secreting cells towards CXCL12 depends on the isotype that forms the BCR. *Eur. J. Immunol.* 38, 3167–3177.
- Achatz-Straussberger, G., Zaborsky, N., Königsberger, S., Feichtner, S., Lenz, S., Peckl-Schmid, D., Lamers, M., and Achatz, G. (2009). Limited humoral immunoglobulin E memory influences serum immunoglobulin E levels in blood. *Clin. Exp. Allergy* 39, 1307–1313.
- Aguado, E., Richelme, S., Nuñez-Cruz, S., Miazek, A., Mura, A.-M., Richelme, M., Guo, X.-J., Sainy, D., He, H.-T., Malissen, B., et al. (2002). Induction of T Helper Type 2 Immunity by a Point Mutation in the LAT Adaptor. *Science* 296, 2036–2040.
- Anand, S., Batista, F.D., Tkach, T., Efremov, D.G., and Burrone, O.R. (1997). Multiple transcripts of the murine immunoglobulin  $\epsilon$  membrane locus are generated by alternative splicing and differential usage of two polyadenylation sites. *Mol. Immunol.* 34, 175–183.
- Arakawa, H. (2002). Requirement of the Activation-Induced Deaminase (AID) Gene for Immunoglobulin Gene Conversion. *Science* 295, 1301–1306.
- Audzevich, T., Pearce, G., Breucha, M., Gunal, G., and Jessberger, R. (2013). Control of the STAT6-BCL6 Antagonism by SWAP-70 Determines IgE Production. *J. Immunol.* 190, 4946–4955.
- Aupetit, C., Drouet, M., Pinaud, E., Denizot, Y., Aldigier, J.C., Bridoux, F., and Cogné, M. (2000). Alleles of the alpha1 immunoglobulin gene 3' enhancer control evolution of IgA nephropathy toward renal failure. *Kidney Int.* 58, 966–971.
- Batista, F.D., Efremov, D.G., and Burrone, O.R. (1995). Characterization and expression of alternatively spliced IgE heavy chain transcripts produced by peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 209–218.
- Batista, F.D., Efremov, D.G., and Burrone, O.R. (1996a). Characterization of a second secreted IgE isoform and identification of an asymmetric pathway of IgE assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 3399–3404.
- Batista, F.D., Anand, S., Presani, G., Efremov, D.G., and Burrone, O.R. (1996b). The two membrane isoforms of human IgE assemble into functionally distinct B cell antigen receptors. *J. Exp. Med.* 184, 2197–2206.
- Bonnefoy, J.Y., Lecoanet-Henchoz, S., Gauchat, J.F., Graber, P., Aubry, J.P., Jeannin, P., and Plater-Zyberk, C. (1997). Structure and functions of CD23. *Int. Rev. Immunol.* 16, 113–128.
- Borzillo, G.V., Cooper, M.D., Kubagawa, H., Landay, A., and Burrows, P.D. (1987). Isotype switching in human B lymphocyte malignancies occurs by DNA deletion: evidence for nonspecific switch recombination. *J. Immunol.* 139, 1326–1335.
- Brightbill, H.D., Jeet, S., Lin, Z., Yan, D., Zhou, M., Tan, M., Nguyen, A., Yeh, S., Delarosa, D., Leong, S.R., et al. (2010a). Antibodies specific for a segment of human membrane IgE deplete IgE-producing B cells in humanized mice. *J. Clin. Invest.* 120, 2218–2229.
- Brightbill, H.D., Jeet, S., Lin, Z., Yan, D., Zhou, M., Tan, M., Nguyen, A., Yeh, S., Delarosa, D., Leong, S.R., et al. (2010b). Antibodies specific for a segment of human membrane IgE deplete IgE-producing B cells in humanized mice. *J. Clin. Invest.* 120, 2218–2229.

- Capron, M., and Capron, A. (1994). Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science* 264, 1876–1877.
- Chauveau, C., and Cogné, M. (1996). Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat. Genet.* 14, 15–16.
- Chowdhury, P.S., Chen, Y., Yang, C., Cook, K.E., Nyborg, A.C., Ettinger, R., Herbst, R., Kiener, P.A., and Wu, H. (2012). Targeting the junction of C $\epsilon$ mX and  $\epsilon$ -migs for the specific depletion of mIgE-expressing B cells. *Mol. Immunol.* 52, 279–288.
- Chu, S.Y., Horton, H.M., Pong, E., Leung, I.W.L., Chen, H., Nguyen, D.-H., Bautista, C., Muchhal, U.S., Bennett, M.J., Moore, G.L., et al. (2012). Reduction of total IgE by targeted coengagement of IgE B-cell receptor and Fc $\gamma$ RIIb with Fc-engineered antibody. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1102–1115.
- D'Addabbo, P., Scascitelli, M., Giambra, V., Rocchi, M., and Frezza, D. (2011). Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1. 2 within the palindrome of IgH 3' Regulatory Region. *BMC Evol. Biol.* 11, 71.
- Dayal, S., Nedbal, J., Hobson, P., Cooper, A.M., Gould, H.J., Gellert, M., Felsenfeld, G., and Fear, D.J. (2011). High Resolution Analysis of the Chromatin Landscape of the IgE Switch Region in Human B Cells. *PLoS ONE* 6, e24571.
- Delpy, L., Le Bert, M., Cogné, M., and Khamlichi, A.A. (2003). Germ-line transcription occurs on both the functional and the non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes. *Eur. J. Immunol.* 33, 2108–2113.
- Dhaliwal, B., Yuan, D., Pang, M.O.Y., Henry, A.J., Cain, K., Oxbrow, A., Fabiane, S.M., Beavil, A.J., McDonnell, J.M., Gould, H.J., et al. (2012). Crystal structure of IgE bound to its B-cell receptor CD23 reveals a mechanism of reciprocal allosteric inhibition with high affinity receptor Fc RI. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12686–12691.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 10, 1292–1299.
- Dombrowicz, D., Brini, A.T., Flamand, V., Hicks, E., Snouwaert, J.N., Kinet, J.-P., and Koller, B.H. (1996). Anaphylaxis mediated through a humanized high affinity IgE receptor. *J. Immunol.* 157, 1645–1651.
- Dougier, H.-L., Reynaud, S., Pinaud, E., Carrion, C., Delpy, L., and Cogné, M. (2006). Interallelic class switch recombination can reverse allelic exclusion and allow trans-complementation of an IgH locus switching defect. *Eur. J. Immunol.* 36, 2181–2191.
- Duchez, S., Amin, R., Cogné, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., Corthésy, B., and Cogné, M. (2010). Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3064–3069.
- Engels, N., König, L.M., Heemann, C., Lutz, J., Tsubata, T., Griep, S., Schrader, V., and Wienands, J. (2009). Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nat. Immunol.* 10, 1018–1025.
- Epstein, D.J. (2009). Cis-regulatory mutations in human disease. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 8, 310–316.
- Erazo, A., Kutchukhidze, N., Leung, M., Christ, A.P.G., Urban, J.F., Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2007a). Unique Maturation Program of the IgE Response In Vivo. *Immunity* 26, 191–203.

- Erazo, A., Kutchukhidze, N., Leung, M., Christ, A.P.G., Urban, J.F., Jr, Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2007b). Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity* 26, 191–203.
- Erazo, A., Kutchukhidze, N., Leung, M., Christ, A.P.G., Urban, J.F., Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2007c). Unique Maturation Program of the IgE Response In Vivo. *Immunity* 26, 191–203.
- Feichtner, S., Inführ, D., Achatz-Straussberger, G., Schmid, D., Karnowski, A., Lamers, M., Rhyner, C., Cramer, R., and Achatz, G. (2008). Targeting the extracellular membrane-proximal domain of membrane-bound IgE by passive immunization blocks IgE synthesis in vivo. *J. Immunol.* 180, 5499–5505.
- Frezza, D., Tolusso, B., Giambra, V., Gremese, E., Marchini, M., Nowik, M., Serone, E., D'Addabbo, P., Mattioli, C., Canestri, S., et al. (2012). Polymorphisms of the IgH enhancer HS1.2 and risk of systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 71, 1309–1315.
- Garman, S.C., Wurzburg, B.A., Tarchevskaya, S.S., Kinet, J.P., and Jardetzky, T.S. (2000). Structure of the Fc fragment of human IgE bound to its high-affinity receptor Fc epsilonRI alpha. *Nature* 406, 259–266.
- Geha, R.S., Jabara, H.H., and Brodeur, S.R. (2003a). The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 721–732.
- Geha, R.S., Jabara, H.H., and Brodeur, S.R. (2003b). The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 721–732.
- Geisberger, R., Prlic, M., Achatz-Straussberger, G., Oberndorfer, I., Luger, E., Lamers, M., Cramer, R., Appenzeller, U., Wienands, J., Breitenbach, M., et al. (2002). Phage Display Based Cloning of Proteins Interacting with the Cytoplasmic Tail of Membrane Immunoglobulins. *Dev. Immunol.* 9, 127–134.
- Gould, H.J., and Sutton, B.J. (2008). IgE in allergy and asthma today. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 205–217.
- Gramlich, H.S., Reisbig, T., and Schatz, D.G. (2012). AID-Targeting and Hypermutation of Non-Immunoglobulin Genes Does Not Correlate with Proximity to Immunoglobulin Genes in Germinal Center B Cells. *PLoS ONE* 7, e39601.
- Hackney, J.A., Misaghi, S., Senger, K., Garris, C., Sun, Y., Lorenzo, M.N., and Zarrin, A.A. (2009). Chapter 5 DNA Targets of AID. In *Advances in Immunology*, (Elsevier), pp. 163–189.
- Hagan, P., Blumenthal, U.J., Dunn, D., Simpson, A.J., and Wilkins, H.A. (1991). Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* 349, 243–245.
- Hallstrand, T.S., Sprenger, J.D., Agosti, J.M., Longton, G.M., Witherspoon, R.P., and Henderson, W.R., Jr (2004). Long-term acquisition of allergen-specific IgE and asthma following allogeneic bone marrow transplantation from allergic donors. *Blood* 104, 3086–3090.
- Harada, M., Magara-Koyanagi, K., Watarai, H., Nagata, Y., Ishii, Y., Kojo, S., Horiguchi, S., Okamoto, Y., Nakayama, T., Suzuki, N., et al. (2006). IL-21-induced B cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J. Exp. Med.* 203, 2929–2937.
- Heyman, B. (2002). IgE-mediated enhancement of antibody responses: the beneficial function of IgE? *Allergy* 57, 577–585.
- Hibbert, R.G. (2005). The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21. *J. Exp. Med.* 202, 751–760.

- Hirano, M., Davis, R.S., Fine, W.D., Nakamura, S., Shimizu, K., Yagi, H., Kato, K., Stephan, R.P., and Cooper, M.D. (2007). IgE immune complexes activate macrophages through FcγRIV binding. *Nat. Immunol.* **8**, 762–771.
- Holgate, S.T., and Polosa, R. (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 218–230.
- Horikawa, K., Martin, S.W., Pogue, S.L., Silver, K., Peng, K., Takatsu, K., and Goodnow, C.C. (2007). Enhancement and suppression of signaling by the conserved tail of IgG memory-type B cell antigen receptors. *J. Exp. Med.* **204**, 759–769.
- Jensen-Jarolim, E., and Pawelec, G. (2012). The nascent field of AllergoOncology. *Cancer Immunol. Immunother.* **61**, 1355–1357.
- Jensen-Jarolim, E., Achatz, G., Turner, M.C., Karagiannis, S., Legrand, F., Capron, M., Penichet, M.L., Rodríguez, J.A., Siccardi, A.G., Vangelista, L., et al. (2008). AllergoOncology: the role of IgE-mediated allergy in cancer. *Allergy* **63**, 1255–1266.
- Jouvin, M.-H., and Kinet, J.-P. (2012). *Trichuris suis* ova: Testing a helminth-based therapy as an extension of the hygiene hypothesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **130**, 3–10.
- Kaplan, M.H. (2013). Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol. Rev.* **252**, 104–115.
- Karnowski, A., Achatz-Straussberger, G., Klockenbusch, C., Achatz, G., and Lamers, M.C. (2006). Inefficient processing of mRNA for the membrane form of IgE is a genetic mechanism to limit recruitment of IgE-secreting cells. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1917–1925.
- Kashiwada, M., Levy, D.M., McKeag, L., Murray, K., Schroder, A.J., Canfield, S.M., Traver, G., and Rothman, P.B. (2009). IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 821–826.
- Kawakami, T., and Galli, S.J. (2002). Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 773–786.
- Keim, C., Kazadi, D., Rothschild, G., and Basu, U. (2013). Regulation of AID, the B-cell genome mutator. *Genes Dev.* **27**, 1–17.
- Kim, B.-S., Kim, I.-K., Park, Y.-J., Kim, Y.-S., Kim, Y.-J., Chang, W.-S., Lee, Y.-S., Kweon, M.-N., Chung, Y., and Kang, C.-Y. (2010a). Conversion of Th2 memory cells into Foxp3+ regulatory T cells suppressing Th2-mediated allergic asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 8742–8747.
- Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J.M., Costa, A.M., Bear, D.M., Wu, J., Harmin, D.A., Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., et al. (2010b). Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**, 182–187.
- Kinet, J.-P. (1999). The high-affinity IgE receptor (FcεRI): from physiology to pathology. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 931–972.
- Kingzette, M., Spieker-Polet, H., Yam, P.C., Zhai, S.K., and Knight, K.L. (1998). Trans-chromosomal recombination within the Ig heavy chain switch region in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 11840–11845.

- Knight, K.L., Kingzette, M., Crane, M.A., and Zhai, S.-K. (1995). Transchromosomally derived Ig heavy chains. *J. Immunol.* *155*, 684–691.
- Königsberger, S., Peckl-Schmid, D., Zaborsky, N., Patzak, I., Kiefer, F., and Achatz, G. (2010). HPK1 Associates with SKAP-HOM to Negatively Regulate Rap1-Mediated B-Lymphocyte Adhesion. *PLoS ONE* *5*, e12468.
- Korhonen, L., Kondrashova, A., Tauriainen, S., Haapala, A.M., Huhtala, H., Ilonen, J., Simell, O., Knip, M., Lönnrot, M., and Hyöty, H. (2013). Enterovirus infections in early childhood and the risk of atopic disease—a nested case-control study. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *43*, 625–632.
- Kraft, S., and Kinet, J.-P. (2007). New developments in FcεRI regulation, function and inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 365–378.
- Kudo, M., Ishigatsubo, Y., and Aoki, I. (2013). Pathology of asthma. *Front. Microbiol.* *4*, 263.
- Kuraoka, M., Holl, T.M., Liao, D., Womble, M., Cain, D.W., Reynolds, A.E., and Kelsoe, G. (2011). Activation-induced cytidine deaminase mediates central tolerance in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11560–11565.
- Kuwabara, N., Kondo, N., Fukutomi, O., Fujii, H., and Orii, T. (1995). Methylation patterns of I epsilon region in B cells stimulated with interleukin 4 and Epstein-Barr virus in patients with a high level of serum IgE. *Eur. J. Immunogenetics Off. J. Br. Soc. Histocompat. Immunogenetics* *22*, 265–275.
- De Lafaille, M.A.C., Muriglan, S., Sunshine, M.-J., Lei, Y., Kutchukhidze, N., Furtado, G.C., Wensky, A.K., Olivares-Villagómez, D., and Lafaille, J.J. (2001). Hyper Immunoglobulin E Response in Mice with Monoclonal Populations of B and T Lymphocytes. *J. Exp. Med.* *194*, 1349–1360.
- Lechouane, F., Bonaud, A., Delpy, L., Casola, S., Oruc, Z., Chemin, G., Cogné, M., and Sirac, C. (2013). B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation: Cellular immune response. *Eur. J. Immunol.* *43*, 619–628.
- Lee, K.K., Hegele, R.G., Manfreda, J., Wooldrage, K., Becker, A.B., Ferguson, A.C., Dimich-Ward, H., Watson, W.T.A., and Chan-Yeung, M. (2007). Relationship of early childhood viral exposures to respiratory symptoms, onset of possible asthma and atopy in high risk children: the Canadian Asthma Primary Prevention Study. *Pediatr. Pulmonol.* *42*, 290–297.
- Lübber, W., Turqueti-Neves, A., Okhrimenko, A., Stöberl, C., Schmidt, V., Pfeffer, K., Dehnert, S., Wünsche, S., Storsberg, S., Paul, S., et al. (2013a). IgE knock-in mice suggest a role for high levels of IgE in basophil-mediated active systemic anaphylaxis: Cellular immune response. *Eur. J. Immunol.* *43*, 1231–1242.
- Lübber, W., Turqueti-Neves, A., Okhrimenko, A., Stöberl, C., Schmidt, V., Pfeffer, K., Dehnert, S., Wünsche, S., Storsberg, S., Paul, S., et al. (2013b). IgE knock-in mice suggest a role for high levels of IgE in basophil-mediated active systemic anaphylaxis. *Eur. J. Immunol.* *43*, 1231–1242.
- Luger, E.O., Fokuhl, V., Wegmann, M., Abram, M., Tillack, K., Achatz, G., Manz, R.A., Worm, M., Radbruch, A., and Renz, H. (2009). Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge. *J. Allergy Clin. Immunol.* *124*, 819–826.e4.
- Luger, E.O., Wegmann, M., Achatz, G., Worm, M., Renz, H., and Radbruch, A. (2010). Allergy for a lifetime. *Allergol Int* *59*, 1–8.
- Maizels, R.M., Pearce, E.J., Artis, D., Yazdanbakhsh, M., and Wynn, T.A. (2009). Regulation of pathogenesis and immunity in helminth infections. *J. Exp. Med.* *206*, 2059–2066.

- Mancardi, D.A., Iannascoli, B., Hoos, S., England, P., Daëron, M., and Bruhns, P. (2008). FcγRIV is a mouse IgE receptor that resembles macrophage FcεRI in humans and promotes IgE-induced lung inflammation. *J. Clin. Invest.* *118*, 3738–3750.
- Matsuoka, K., Taya, C., Kubo, S., Toyama-Sorimachi, N., Kitamura, F., Ra, C., Yonekawa, H., and Karasuyama, H. (1999). Establishment of antigen-specific IgE transgenic mice to study pathological and immunobiological roles of IgE in vivo. *Int. Immunol.* *11*, 987–994.
- McCoy, K.D., Harris, N.L., Diener, P., Hatak, S., Odermatt, B., Hangartner, L., Senn, B.M., Marsland, B.J., Geuking, M.B., Hengartner, H., et al. (2006). Natural IgE Production in the Absence of MHC Class II Cognate Help. *Immunity* *24*, 329–339.
- Meyers, G., Ng, Y.-S., Bannock, J.M., Lavoie, A., Walter, J.E., Notarangelo, L.D., Kilic, S.S., Aksu, G., Debré, M., Rieux-Laucat, F., et al. (2011). Activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for B-cell tolerance in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11554–11559.
- Milovanovic, M., Drozdenko, G., Weise, C., Babina, M., and Worm, M. (2010). Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 2621–2628.
- Minegishi, Y. (2009). Hyper-IgE syndrome. *Curr. Opin. Immunol.* *21*, 487–492.
- Misaghi, S., Senger, K., Sai, T., Qu, Y., Sun, Y., Hamidzadeh, K., Nguyen, A., Jin, Z., Zhou, M., Yan, D., et al. (2013). Polyclonal hyper-IgE mouse model reveals mechanistic insights into antibody class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 15770–15775.
- Mócsai, A., Ruland, J., and Tybulewicz, V.L.J. (2010). The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 387–402.
- Monticelli, S., and Vercelli, D. (2001). Molecular regulation of class switch recombination to IgE through  $\epsilon$  germline transcription. *Allergy* *56*, 270–278.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase (AID), a Novel Member of the RNA-editing Deaminase Family in Germinal Center B Cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 18470–18476.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell* *102*, 553–563.
- Nigro, E., Siccardi, A., and Vangelista, L. (2013). Role and Redirection of IgE against Cancer. *Antibodies* *2*, 371–391.
- Nigro, E.A., Brini, A.T., Soprana, E., Ambrosi, A., Dombrowicz, D., Siccardi, A.G., and Vangelista, L. (2009). Antitumor IgE Adjuvanticity: Key Role of Fc RI. *J. Immunol.* *183*, 4530–4536.
- Niki, T., Tsutsui, S., Hirose, S., Aradono, S., Sugimoto, Y., Takeshita, K., Nishi, N., and Hirashima, M. (2009). Galectin-9 Is a High Affinity IgE-binding Lectin with Anti-allergic Effect by Blocking IgE-Antigen Complex Formation. *J. Biol. Chem.* *284*, 32344–32352.
- Nishana, M., and Raghavan, S.C. (2012). Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunology* *137*, 271–281.

- Nojima, T., Haniuda, K., Moutai, T., Matsudaira, M., Mizokawa, S., Shiratori, I., Azuma, T., and Kitamura, D. (2011). In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nat. Commun.* *2*, 465.
- Obayashi, K., Doi, T., and Koyasu, S. (2006). Dendritic cells suppress IgE production in B cells. *Int. Immunol.* *19*, 217–226.
- Oberndorfer, I., Schmid, D., Geisberger, R., Achatz-Straussberger, G., Cramer, R., Lamers, M., and Achatz, G. (2006). HS1-Associated Protein X-1 Interacts with Membrane-Bound IgE: Impact on Receptor-Mediated Internalization. *J. Immunol.* *177*, 1139–1145.
- Ohnmacht, C., Schwartz, C., Panzer, M., Schiedewitz, I., Naumann, R., and Voehringer, D. (2010). Basophils Orchestrate Chronic Allergic Dermatitis and Protective Immunity against Helminths. *Immunity* *33*, 364–374.
- Ota, T., Aoki-Ota, M., Duong, B.H., and Nemazee, D. (2009). Suppression of IgE B Cells and IgE Binding to Fc RI by Gene Therapy with Single-Chain Anti-IgE. *J. Immunol.* *182*, 8110–8117.
- Packard, T.A., and Cambier, J.C. (2013). B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000prime Rep.* *5*.
- Pascal, V., Laffleur, B., and Cogné, M. (2012). Class-specific effector functions of therapeutic antibodies. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *901*, 295–317.
- Peckl-Schmid, D., Wolkerstorfer, S., Königsberger, S., Achatz-Straussberger, G., Feichtner, S., Schwaiger, E., Zaborsky, N., Huemer, M., Gratz, I.K., Schibli, R., et al. (2010). HAX1 deficiency: Impact on lymphopoiesis and B-cell development. *Eur. J. Immunol.* *40*, 3161–3172.
- Peng, C., Davis, F.M., Sun, L.K., Liou, R.S., Kim, Y.W., and Chang, T.W. (1992). A new isoform of human membrane-bound IgE. *J. Immunol.* *148*, 129–136.
- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., and Cogné, M. (2012). AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* *336*, 931–934.
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., and Cogné, M. (2011a). The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* *110*, 27–70.
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., and Cogné, M. (2011b). The IgH Locus 3' Regulatory Region. In *Advances in Immunology*, (Elsevier), pp. 27–70.
- Pinto, D., Montani, E., Bolli, M., Garavaglia, G., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Jarrossay, D. (2013). A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood* *121*, 4110–4114.
- Platzer, B., Rüter, F., van der Mee, J., and Fiebiger, E. (2011). Soluble IgE receptors—Elements of the IgE network. *Immunol. Lett.* *141*, 36–44.
- Poggianella, M., Bestagno, M., and Burrone, O.R. (2006). The extracellular membrane-proximal domain of human membrane IgE controls apoptotic signaling of the B cell receptor in the mature B cell line A20. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 3597–3605.
- Rabah, D., and Conrad, D.H. (2002). Effect of cell density on in vitro mouse immunoglobulin E production. *Immunology* *106*, 503–510.

- Reali, E., Greiner, J.W., Corti, A., Gould, H.J., Bottazzoli, F., Paganelli, G., Schlom, J., and Siccardi, A.G. (2001). IgEs Targeted on Tumor Cells Therapeutic Activity and Potential in the Design of Tumor Vaccines. *Cancer Res.* *61*, 5517–5522.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Lagelouse, R., and Gennery, A. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* *102*, 565–575.
- Reynaud, S., Delpy, L., Fleury, L., Dougier, H.-L., Sirac, C., and Cogné, M. (2005). Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol.* *174*, 6176–6183.
- Robbiani, D.F., and Nussenzweig, M.C. (2013). Chromosome Translocation, B Cell Lymphoma, and Activation-Induced Cytidine Deaminase. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *8*, 79–103.
- Rocha, P.P., and Skok, J.A. (2013). The origin of recurrent translocations in recombining lymphocytes: a balance between break frequency and nuclear proximity. *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 365–371.
- Rocha, P.P., Micsinai, M., Kim, J.R., Hewitt, S.L., Souza, P.P., Trimarchi, T., Strino, F., Parisi, F., Kluger, Y., and Skok, J.A. (2012). Close Proximity to Igh Is a Contributing Factor to AID-Mediated Translocations. *Mol. Cell* *47*, 873–885.
- Rogozin, I.B., and Kolchanov, N.A. (1992). Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1171*, 11–18.
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Saintamand, A., Fiancette, R., Marquet, M., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Pinaud, E., Cogné, M., and Denizot, Y. (2013). The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* *210*, 1501–1507.
- Ruiz, J.F., Gómez-González, B., and Aguilera, A. (2011). AID induces double-strand breaks at immunoglobulin switch regions and c-MYC causing chromosomal translocations in yeast THO mutants. *PLoS Genet.* *7*, e1002009.
- Shui, J.-W., Boomer, J.S., Han, J., Xu, J., Dement, G.A., Zhou, G., and Tan, T.-H. (2006). Hematopoietic progenitor kinase 1 negatively regulates T cell receptor signaling and T cell-mediated immune responses. *Nat. Immunol.* *8*, 84–91.
- Siebenkotten, G., Esser, C., Radbruch, A., and Wabl, M. (1992). The murine IgG1/IgE class switch program. *Eur. J. Immunol.* *22*, 1827–1834.
- Sugai, M., Gonda, H., Kusunoki, T., Katakai, T., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2002). Essential role of Id2 in negative regulation of IgE class switching. *Nat. Immunol.* *4*, 25–30.
- Talay, O., Yan, D., Brightbill, H.D., Straney, E.E.M., Zhou, M., Ladi, E., Lee, W.P., Egen, J.G., Austin, C.D., Xu, M., et al. (2012). IgE<sup>+</sup> memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nat. Immunol.* *13*, 396–404.
- Turner, M.C. (2005). Cancer Mortality among US Men and Women with Asthma and Hay Fever. *Am. J. Epidemiol.* *162*, 212–221.
- Vangelista, L., Soprana, E., Cesco-Gaspere, M., Mandiola, P., Di Lullo, G., Fucci, R.N., Codazzi, F., Palini, A., Paganelli, G., Burrone, O.R., et al. (2005). Membrane IgE binds and activates Fc epsilon RI in an antigen-independent manner. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 5602–5611.

- Vernersson, M., Aveskogh, M., and Hellman, L. (2004). Cloning of IgE from the echidna (*Tachyglossus aculeatus*) and a comparative analysis of epsilon chains from all three extant mammalian lineages. *Dev. Comp. Immunol.* *28*, 61–75.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2010a). Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* *116*, 1895–1898.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogné, M., Pinaud, E., and Denizot, Y. (2010b). The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur. J. Immunol.* *40*, 3306–3311.
- Warr, G.W., Magor, K.E., and Higgins, D.A. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* *16*, 392–398.
- Wesemann, D.R., Magee, J.M., Boboila, C., Calado, D.P., Gallagher, M.P., Portuguese, A.J., Manis, J.P., Zhou, X., Recher, M., Rajewsky, K., et al. (2011a). Immature B cells preferentially switch to IgE with increased direct S $\mu$  to S $\epsilon$  recombination. *J. Exp. Med.* *208*, 2733–2746.
- Wesemann, D.R., Magee, J.M., Boboila, C., Calado, D.P., Gallagher, M.P., Portuguese, A.J., Manis, J.P., Zhou, X., Recher, M., Rajewsky, K., et al. (2011b). Immature B cells preferentially switch to IgE with increased direct S to S recombination. *J. Exp. Med.* *208*, 2733–2746.
- Wu, P.C., Chen, J.-B., Kawamura, S., Roos, C., Merker, S., Shih, C.-C., Hsu, B.-D., Lim, C., and Chang, T.W. (2012). The IgE gene in primates exhibits extraordinary evolutionary diversity. *Immunogenetics* *64*, 279–287.
- Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F.W., Cogne, M., Pinaud, E., and Kenter, A.L. (2007a). S-S Synapsis during Class Switch Recombination Is Promoted by Distantly Located Transcriptional Elements and Activation-Induced Deaminase. *Immunity* *27*, 711–722.
- Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F.W., Cogne, M., Pinaud, E., and Kenter, A.L. (2007b). S-S Synapsis during Class Switch Recombination Is Promoted by Distantly Located Transcriptional Elements and Activation-Induced Deaminase. *Immunity* *27*, 711–722.
- Xiong, H., Dolpady, J., Wabl, M., Lafaille, M.A.C. de, and Lafaille, J.J. (2012). Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J. Exp. Med.* *209*, 353–364.
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 517–531.
- Yamaguchi, M., Lantz, C.S., Oettgen, H.C., Katona, I.M., Fleming, T., Miyajima, I., Kinet, J.-P., and Galli, S.J. (1997). IgE enhances mouse mast cell Fc $\epsilon$ RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J. Exp. Med.* *185*, 663–672.
- Yang, X.O., Zhang, H., Kim, B.-S., Niu, X., Peng, J., Chen, Y., Kerketta, R., Lee, Y.-H., Chang, S.H., Corry, D.B., et al. (2013). The signaling suppressor CIS controls proallergic T cell development and allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* *14*, 732–740.
- Yang, Z., Sullivan, B.M., and Allen, C.D.C. (2012a). Fluorescent In Vivo Detection Reveals that IgE+ B Cells Are Restrained by an Intrinsic Cell Fate Predisposition. *Immunity* *36*, 857–872.
- Yang, Z., Sullivan, B.M., and Allen, C.D.C. (2012b). Fluorescent In Vivo Detection Reveals that IgE+ B Cells Are Restrained by an Intrinsic Cell Fate Predisposition. *Immunity* *36*, 857–872.

- Yang, Z., Sullivan, B.M., and Allen, C.D.C. (2012c). Fluorescent In Vivo Detection Reveals that IgE+ B Cells Are Restrained by an Intrinsic Cell Fate Predisposition. *Immunity* 36, 857–872.
- Yao, W., Zhang, Y., Jabeen, R., Nguyen, E.T., Wilkes, D.S., Tepper, R.S., Kaplan, M.H., and Zhou, B. (2013). Interleukin-9 is required for allergic airway inflammation mediated by the cytokine TSLP. *Immunity* 38, 360–372.
- Yoshida, K., Matsuoka, M., Usuda, S., Mori, A., Ishizaka, K., and Sakano, H. (1990). Immunoglobulin switch circular DNA in the mouse infected with *Nippostrongylus brasiliensis*: evidence for successive class switching from mu to epsilon via gamma 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7829–7833.
- Yoshida, T., Mei, H., Dörner, T., Hiepe, F., Radbruch, A., Fillatreau, S., and Hoyer, B.F. (2010). Memory B and memory plasma cells. *Immunol. Rev.* 237, 117–139.
- Yu, P., Kosco-Vilbois, M., Richards, M., Köhler, G., and Lamers, M.C. (1994). Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* 369, 753–756.
- Zarrin, A.A., Alt, F.W., Chaudhuri, J., Stokes, N., Kaushal, D., Du Pasquier, L., and Tian, M. (2004). An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 5, 1275–1281.
- Zhang, M., and Murphy, R.F. (2007). Decoding IgE Fc receptors. *Immunol. Res.* 37, 1–16.
- Zhang, K., Saxon, A., and Max, E.E. (1992). Two unusual forms of human immunoglobulin E encoded by alternative RNA splicing of epsilon heavy chain membrane exons. *J. Exp. Med.* 176, 233–243.
- Zhang, K., Max, E.E., Cheah, H.-K., and Saxon, A. (1994). Complex alternative RNA splicing of epsilon-immunoglobulin transcripts produces mRNAs encoding four potential secreted protein isoforms. *J. Biol. Chem.* 269, 456–462.

## **V. ANNEXES**

# 1. Annexe 1 : “Transgenic non-human mammal for producing chimeric human immunoglobulin E”

Brice Laffleur, Armelle Cuvillier, Marie Bosselut and Michel Cogné

Brevet européen déposé en Septembre 2013

Ce brevet, développé en partenariat avec l'entreprise « B cell design », concerne l'invention d'un modèle murin permettant l'expression de transgènes humains IgM et IgE, insérés à la place de la région endogène switch  $\mu$ , et son utilisation dans la production d'anticorps chimériques humains IgM ou IgE spécifiques d'un antigène d'intérêt. Il s'agit d'un *knock-in* du gène C $\mu$  humain entouré de sites *LoxP*, suivi du gène C $\epsilon$  humain. La position de cette construction permet l'expression, dans un premier temps d'une IgM (à chaîne lourde chimérique humaine) qui s'associe avec la partie variable (VDJ) créée par le répertoire endogène murin, puis après délétion induite par la *cre* recombinase, d'une IgE (là aussi, à chaîne lourde chimérique humaine). Les souris peuvent ainsi être immunisées avec un antigène d'intérêt pour permettre l'obtention d'hybridomes sécréteurs d'IgM humaine. Ces hybridomes peuvent être induits vers la production d'IgE humaine, en éliminant le gène C $\mu$  par action de la *cre* recombinase.

Cette stratégie d'induction permet de s'affranchir des particularités des réponses IgE, qui, comme nous l'avons vu au cours de cette thèse, sont plutôt éphémères et ne permettent pas en pratique d'obtenir de lymphocytes B IgE<sup>+</sup> aptes à être fusionnés pour la création d'hybridomes. De plus des anticorps monoclonaux chimériques humains de classe IgM, de même spécificité que les IgE, sont obtenus dans un premier temps et peuvent être produits en parallèle des IgE.

Ma contribution au dépôt de ce brevet a été la construction du vecteur de *knock-in*, son séquençage et sa transfection dans des cellules souches embryonnaires (cellules ES). J'ai effectué le criblage des clones ES par Southern blot, leur sous-clonage et leur préparation pour injection dans les blastocystes, puis le criblage des animaux par ELISA et cytométrie en flux et leurs croisements jusqu'à l'obtention de souris homozygotes. J'ai également validé la stratégie de délétion *cre* sur des hybridomes et des cellules primaires et la production d'IgE humanisée *in vitro* et *in vivo*, et participé à la rédaction du brevet.

## 2. Annexe 2 : “Production of Human or Humanized Antibodies in Mice”

Brice Laffleur, Virginie Pascal, Christophe Sirac and Michel Cogné

Manuscrit accepté en 2012 à Methods in Molecular Biology

Cet article méthodologique concerne la description des stratégies déjà utilisées, ou utilisables, afin d'établir les différents modèles d'animaux transgéniques qui peuvent permettre soit la production d'anticorps humanisés (larges transgènes, BACS, méthodes de *knock-in*, méthodes d'expression transitoire par injection hydrodynamique...), soit la mise en place de tests fonctionnels d'efficacité de ces anticorps *in vivo*.

J'ai participé à la rédaction de cette revue.

### **3. Annexe 3 : “Class-Specific Effector Functions of Therapeutic Antibodies”**

Virginie Pascal, Brice Laffleur and Michel Cogné

Manuscrit accepté en 2012 à Methods in Molecular Biology

Cet article méthodologique concerne la production d'anticorps à des fins biotechnologiques ou thérapeutiques et décrit les différents tests initiaux qui peuvent s'appliquer aux différentes classes d'anticorps afin de tester des propriétés spécifiques de classe de chacun d'entre eux.

J'ai participé à la rédaction de cette revue.

## 4. Annexe 4 : “Anti-CD20 can protect mice against lymphoma development: evaluation of the direct impact of IgA and cytotoxic effector recruitment on CD20 target cells”

Virginie Pascal, Brice Laffleur, Arnaud Debin, Armelle Cuvillier, Marjolein van Egmond, Daniel Drocourt, Laurent Imbertie, Céline Pangault, Karin Tarte, Gérard Tiraby and Michel Cogné

Manuscrit accepté en Novembre 2012 à Haematologica.

Nous avons exploré dans cet article à l'aide de tests *in vitro* ou *in vivo* chez la souris et dans un modèle d'immunothérapie anti-CD20 basé sur la spécificité du rituximab, en quoi les anticorps de classe IgA diffèrent fonctionnellement des anticorps de classe IgG vis-à-vis de l'activation du complément, de l'induction d'apoptose, de l'ADCC, du recrutement de cellules effectrices...Globalement cette étude montre que les IgA ont des propriétés originales avec en particulier des effets directs plus marqués que ceux des IgG, une capacité à activer le complément par la voie alterne, et une capacité à recruter des neutrophiles humains exprimant le récepteur CD89/Fc $\alpha$ RI.

Ma contribution à cette étude a consisté en la réalisation des expériences complémentaires demandées au cours des révisions finales de l'article. J'ai validé la qualité de reconnaissance du CD20 des IgG et des IgA anti-CD20 produites par injection hydrodynamique des vecteurs d'expression au cours de l'étude, par un test fonctionnel cellulaire et analyse en cytométrie en flux. J'ai aussi testé le pouvoir agglutinant des différents isotypes. J'ai mis en place un test fonctionnel sur cellules primaires de lymphomes folliculaires humains et validé l'activation de cytotoxicité dépendante du complément induite par les IgA anti-CD20 sur ces cellules.

## **5. Annexe 5 : “Specific impairment of proximal tubular cell proliferation by a monoclonal $\kappa$ light chain for Fanconi syndrome”**

Chahrazed El Hamel, Jean-Claude Aldigier, Christelle Oblet, Brice Laffleur, Frank Bridoux and Michel Cogné

Manuscrit accepté en Décembre 2012 à Nephrology dialysis transplantation.

Nous avons tenté d’explorer dans cette étude les mécanismes des altérations fonctionnelles que provoquent certaines chaînes légères d’immunoglobulines qui se déposent sous forme cristalline au niveau du rein au cours d’une complication des dysglobulinémies appelée « syndrome de Toni Debré Fanconi » (en France) et « syndrome de Fanconi » (partout ailleurs). Nous avons ainsi travaillé sur une lignée de cellules tubulaires proximales (le syndrome de Fanconi étant une tubulopathie). L’étude montre que les chaînes légères néphrotoxiques n’induisent pas d’apoptose des cellules tubulaires mais compromettent leur prolifération et potentiellement donc in vivo leur renouvellement. Par ailleurs les cellules B qui sécrètent ce type de chaîne kappa ont aussi une croissance ralentie, ce qui pourrait expliquer que les syndromes de Fanconi sont souvent associés à des formes de myélome de type “smoldering myeloma”.

Ma contribution à cette étude a consisté en l’extraction des ARN, préparation des ADN complémentaires et la prise en charge de tests de PCR quantitative.

## **6. Annexe 6 : “A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene”**

Rémy Fiancette, Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Brice Laffleur, Virginie Magnone, Michel Cogné and Yves Denizot

Manuscrit accepté en Décembre 2011 à Journal of immunology.

Cette étude teste l'effet de la coexistence d'une haplo-insuffisance de p53 dans un fond génétique, qui est par ailleurs transgénique pour l'expression de c-myc sous le contrôle de la région régulatrice 3' du locus IgH (3'RR). Ce que nous observons c'est une forte diversification du spectre des tumeurs apparaissant dans ce contexte. Alors que les tumeurs des souris c-myc-3'RR simple transgéniques sont très homogènes et majoritairement de phénotype évoquant un lymphome de Burkitt, la présence d'une haplo-insuffisance p53 induit d'une part une pénétrance très augmentée du phénotype tumoral, et d'autre part l'apparition de tumeurs dont les phénotypes s'apparentent pour les unes à des lymphomes du manteau, pour les autres à des lymphomes de Burkitt, pour d'autres enfin à des proliférations plasmocytaires.

Ma contribution à cet article a été la mise en place de protocoles de cytométrie en flux et l'analyse de cellules tumorales développées dans ces modèles.

## Table des matières des publications scientifiques

### “AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate”

Brice Laffleur, Nicolas Denis-Lagache, Sophie Péron, Christophe Sirac, Jeanne Moreau and Michel Cogné, **Oncotarget**, 2013.....21

### “An auto-regulatory negative control of IgE class-switched B cell fate”

Brice Laffleur, Sophie Duchez, Denis-Lagache Nicolas, Sophie Péron, Claire Carrion, Yves Denizot, Jean Sainte-Laudy and Michel Cogné, en préparation.....23

### “Evaluation of *cis- versus trans*-chromosomal class switch recombination in human B cells”

Brice Laffleur, Sylvia M. Bardet, Armand Garot, Audrey Baylet and Michel Cogné, soumis à **Gene and immunity**.....24

### “AID-Driven Deletion Causes Immunoglobulin Heavy Chain Locus Suicide Recombination in B Cells”

Sophie Péron, Brice Laffleur, Nicolas Denis-Lagache, Jeanne Cook-Moreau, Aurélien Tinguely, Laurent Delpy, Yves Denizot, Eric Pinaud and Michel Cogné. **Science**, 2012.....25

### “Recombinaisons suicides du locus IgH Quand le lymphocyte B dépose les armes !”

Sophie Péron, Brice Laffleur, Nicolas Denis-Lagache, Jeanne Cook-Moreau, Matthieu Filloux, Michel Cogné. **Médecine/sciences**, 2012.....25

### “Transgenic non-human mammal for producing chimeric human immunoglobulin E”

Brice Laffleur, Armelle Cuvillier, Marie Bosselut and Michel Cogné, Brevet européen, 2012.....78

### “Production of Human or Humanized Antibodies in Mice”

Brice Laffleur, Virginie Pascal, Christophe Sirac and Michel Cogné, *Methods in Molecular Biology*, 2012.....79

**“Class-Specific Effector Functions of Therapeutic Antibodies”**

Virginie Pascal, Brice Laffleur and Michel Cogné, **Methods in Molecular Biology**, 2012.....80

**“Anti-CD20 IgA can protect mice against lymphoma development: evaluation of the direct impact of IgA and cytotoxic effector recruitment on CD20 target cells”**

Virginie Pascal, Brice Laffleur, Arnaud Debin, Armelle Cuvillier, Marjolein van Egmond, Daniel Drocourt, Laurent Imbertie, Céline Pangault, Karin Tarte, Gérard Tiraby and Michel Cogné, **Haematologica**, 2012.....81

**“Specific impairment of proximal tubular cell proliferation by a monoclonal  $\kappa$  light chain responsible for Fanconi syndrome”**

Chahrazed El Hamel, Jean-Claude Aldigier, Christelle Oblet, Brice Laffleur, Frank Bridoux and Michel Cogné, **Nephrology dialysis transplantation**, 2012.....82

**“A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene”**

Rémy Fiancette, Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Brice Laffleur, Virginie Magnone, Michel Cogné and Yves Denizot, **Journal of immunology**, 2011.....83