



HAL
open science

Edition génomique de la lignée B en vue de la sécrétion d'anticorps thérapeutiques

Marine Cahen

► **To cite this version:**

Marine Cahen. Edition génomique de la lignée B en vue de la sécrétion d'anticorps thérapeutiques. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0082 . tel-04416223

HAL Id: tel-04416223

<https://theses.hal.science/tel-04416223v1>

Submitted on 25 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges

ED 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)

CRIBL (Contrôle de la réponse Immune B et Lymphoproliférations)

**UMR U1236 (Microenvironnement and B-cell: Immunopathology cell
Differentiation and Cancer)**

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Immunologie, Oncologie, inflammation et infectiologie

Présentée et soutenue par
Marine Cahen

Le 8 décembre 2022

Édition génomique de la lignée B en vue de la sécrétion d'anticorps thérapeutiques

Thèse dirigée par le Pr. Michel Cogné et le Pr Christophe Sirac

JURY :

Président du jury

Mme. Pr Karin Tarte, PU-PH, INSERM U1236, MOBIDIC, Rennes

Rapporteurs

M. Dr Pierre Bruhns, DR1, INSERM U1222, Institut Pasteur, Paris

M. Pr Stéphane Paul, PU-PH, INSERM U1111, CIRI, Lyon





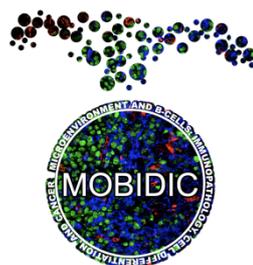
Université
de Limoges



Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Mes trois premières années de thèse ont été financées à l'aide d'une bourse délivrée par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), obtenue dans le cadre d'un consortium impliquant mon équipe d'accueil. Ma dernière année a, quant à elle, été financée par l'obtention d'une allocation de 4^{ème} année de thèse fournie par la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).



« Dans la vie, il y a ceux qui choisissent de voir qu'il fait nuit et ceux qui savent que plus il fait sombre, mieux on peut voir les étoiles. Tout ne marche pas du premier coup, il faut savoir persévérer »

Elia, passeuse d'âme de Marie Vareille

« Un cul de sac est toujours un nouveau départ ! »

À la croisée des mondes

« On peut trouver le bonheur même dans les moments les plus sombres... Il suffit de se souvenir d'allumer la lumière »

Albus Dumbledore, Harry Potter et le Prisonnier d'Azkaban

À toi qui ne m'as jamais vue obtenir un diplôme, je te dédis ce dernier

Remerciements

Il est enfin venu le temps pour moi de remercier toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réussite de cette thèse.

Avant toute chose, je remercie le Dr Pierre Bruhns et le Pr Stéphane Paul d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Pr Karin Tarte pour avoir accepté de présider ce jury mais également de m'avoir donné la chance de pouvoir intégrer son laboratoire pour mes deux dernières années de thèse.

Ensuite, je souhaiterais remercier mon directeur de thèse, le Pr. Michel Cogné pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ma thèse dans non pas un, mais bien deux laboratoires de recherches (CRIBL à Limoges et U1236 à Rennes). Vous avez répondu présent lorsque j'en ai eu besoin et pour cela je vous en suis très reconnaissante. Grâce à vous j'ai pu grandir scientifiquement et découvrir le monde de la biologie moléculaire, qui avant cette thèse m'effrayait énormément (à juste titre). Je m'excuse pour toutes mes fautes de français, qui je le sais vous ont fait lever les yeux au ciel plus d'une fois ! Je remercie également mon autre directeur de thèse le Pr Christophe Sirac pour son accueil au sein de son équipe dans le laboratoire CRIBL.

Un grand merci à tous mes collègues Limougeauds, chercheurs, ingénieurs, techniciens, personnel animalier, thésards. Mention spéciale à Mélissa ma co-thésarde de promo, qui à ce jour représente bien plus que cela. Merci d'avoir été là, mon aventure Limougeaude n'aurait clairement pas été la même sans toi. J'ai adoré nos pauses déjeuner à refaire le monde et durant lesquelles tu me dispensais des cours d'histoire de France et d'Algérie (j'ai beaucoup appris grâce à toi !). J'espère pouvoir te rendre visite très prochainement dans ton nouveau pays d'accueil.

Je voudrais aussi remercier mes collègues de bureau. Sébastien, ça a été un vrai plaisir de partager ton bureau, avec toi nous ne manquons jamais de vivres ! Cependant j'aimerais te rappeler ici qu'un téléphone portable est comme son nom l'indique « portable » et possède une option « mute ». Victoria, merci d'avoir pris le temps de m'initier aux rudiments de la biologie moléculaire, cela m'a été très précieux. Je retiendrai de toi, tes goûts plus que douteux en matière de gastronomie (qui, à part toi, préfère la nourriture anglaise à la nourriture française ?). Une petite pensée pour Jean-Marie mon co-responsable de « Salle de Culture », merci pour ta gentillesse et ta disponibilité et surtout pour tes précieux conseils. J'espère que tu te plais dans ta nouvelle équipe, tu le mérites largement.

Un immense merci à toute l'équipe de Rennes de m'avoir si bien accueillie, grâce à vous j'ai pu prendre mes marques rapidement. Merci à tous les techniciens, ingénieurs de recherches, personnel animalier pour votre aide au quotidien, vous faites partie intégrante de ce travail.

Merci à tous les post-doc avec qui j'ai eu l'occasion de discuter : Maud, Jocelyn, Alexis, Ilénia, Florent. Votre expérience plus ou moins récente de la thèse m'a permis de relativiser (enfin presque).

Merci également à l'ensemble des thésards (passés ou présents). Vous m'avez tous à votre façon marquée : JuG (toujours dispo quand j'avais besoin mais, alors tes goûts musicaux mon traumatisé), JuF (toujours un mot gentil, humainement tu es exceptionnelle, cependant tes connaissances ont-elles une limite ?), Baptiste (rappelle moi, de ne JAMAIS faire des manip importantes en même temps que toi ! Courage pour la fin de thèse tu vas très bien t'en sortir), Nicolas (Je n'ai toujours pas compris pourquoi tu t'infliges des marathons sportifs, les souffrances de la thèse ne te suffisent-elles pas ?), Steve (le nouveau pas si nouveau, tu vas amener une super ambiance au labo, je n'en doute pas une seconde), Claire (nous ne nous sommes pas connues longtemps mais ta personnalité haute en couleur m'aura marquée), Marvin (pareil, on ne se sera pas connu bien longtemps mais j'ai cru comprendre que nous avions en commun notre personnalité casanière et un régime alimentaire très restrictif même si toi tu t'imposes ça volontairement !), Mourad (ta niaque m'impressionne, surtout accroche toi à elle pour la fin de ta thèse). J'étais seulement venue chercher à Rennes une équipe mais finalement je vous ai également trouvés, ce qui est encore mieux. Vous êtes les meilleurs co-thésards qu'on puisse espérer.

Aux membres de l'équipe BIGRES : Brice merci pour tes conseils et nos longues discussions sur l'avenir de la recherche (pas toujours très rose). Malgré ton pessimisme, tu restes un chercheur passionné par tes recherches, qui redonne foi en la science. Greg merci pour ta joie de vivre et nos discussions scientifiques. J'espère que ma poisse légendaire va te laisser tranquille pour te permettre d'enfin avoir des résultats avec les manip souris. Je voudrais également te remercier Yannic pour ton aide tout au long de ma thèse. Lolo merci de m'avoir supportée et ce, même lorsque je râlais (à savoir presque tous les jours !). Tes prouesses linguistiques ne cesseront jamais de m'éblouir. Surtout cultive les, c'est un don rare que tu possèdes là. Plus sérieusement, grâce à ta gentillesse et ta bonne humeur, tu as fait de notre bureau un endroit convivial dans lequel j'aime me réfugier quand ça ne va pas. Évidemment, je ne vous ai pas oubliées les filles. Ma petite Ophélie, je te dois un grand merci pour m'avoir tellement soutenue durant ces deux dernières années, j'espère pouvoir un jour te rendre la pareille. Maintenant que la rédaction touche à sa fin, nous allons pouvoir reprendre nos séances de sport ! Parce que ma thèse est indissociable de la tienne je me devais de te remercier Natsuko. Nous avons formé tout du long un duo de choc, nous entraînant à surmonter les difficultés de notre projet, ô combien éprouvant ! Merci pour ton mantra, on ne peut plus réaliste « je ne sais pas si ça va bien se passer mais je sais que ça va se passer ». Emma, on ne se connaît pas encore mais je te souhaite plein de courage pour ta thèse.

Je remercie très chaleureusement mes anciens encadrant(e)s de stages pour m'avoir donné le goût de la recherche. Merci au Dr. Alain Chevailler de m'avoir initiée à l'immunologie et d'avoir répondu à chacune de mes sollicitations. Un immense merci aux Dr Mar Naranjo-Gomez et Dr Mireia Pelegrin pour m'avoir si bien formée et surtout pour votre gentillesse et votre disponibilité, je vous dois énormément.

Un grand merci à mes amies hors du laboratoire, Samantha, Laura, Manon, Charlène, Pauline. Il est parfois bon de prendre du recul sur notre travail et de pouvoir faire une parenthèse. Nos conversations communes ou isolées m'ont apporté bien plus que vous ne l'imaginez. Petite mention spéciale à Éva, courage pour ta fin de thèse, pour nous les galériennes c'est toujours difficile mais finalement on y arrive. Cette fois ci ne fera pas exception, j'en suis certaine ! Merci pour nos longues heures téléphoniques à discuter de tout et de rien, ces moments-là étaient pour moi l'occasion de relâcher la pression.

Mes derniers remerciements vont maintenant à ma famille. Maman merci d'avoir toujours bien plus cru en moi, que je ne le fais moi-même. Ta force et ton courage m'ont maintenu à flot durant tout mon parcours scolaire, alors on peut dire que cette thèse est la nôtre. A mon père qui est dans mes pensées continuellement (je t'aime d'amour toujours). À mes deux frères, qui ne comprennent pas toujours bien ce que je fais, mais qui je le sais, seront toujours présents en cas de besoin. J'espère vous avoir rendu fière de votre petite sœur.

Et pour finir, je voudrais adresser tout mon amour et ma gratitude à l'homme qui partage ma vie depuis maintenant 10 ans et que j'ai le plaisir (à présent) de pouvoir appeler « mon mari ». Tu n'as jamais refusé de me suivre pour mes études, même si cela signifiait partir à l'autre bout de la France et de quitter ton travail. Tu arrives toujours à voir les choses du bon côté ce qui contrebalance mon pessimisme naturel (enfin moi je dirais réaliste !). Pour ça et bien d'autres choses, tu es l'une des meilleures choses qui me soient arrivées, finalement j'ai peut-être un peu de chance dans la vie !

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

I.	INTRODUCTION	1
A.	RAPPELS CONCERNANT LA LIGNEE LYMPHOÏDE B ET SON HETEROGENEITE	2
1.	<i>Lymphopoïèse B</i>	4
2.	<i>Différenciation précoce des lymphocytes B indépendante des antigènes</i>	5
a)	Immunoglobulines, BCR et Anticorps	8
(1)	Structure	8
(2)	Fonctions associées aux classes d'Ig	11
(3)	Organisation des gènes d'Ig	19
b)	Mécanismes des recombinaisons V(D)J au cours de la différenciation B	20
c)	Mécanismes d'amélioration de l'affinité et de l'activité effectrice des anticorps	24
3.	<i>Maturation des lymphocytes B dépendante des antigènes</i>	27
a)	Cellules B transitionnelles	27
b)	Cellules B de la zone marginale	27
c)	Cellules B de la zone folliculaire	28
d)	Centres germinatifs	28
4.	<i>Stade ultime de différenciation</i>	30
a)	B mémoires	30
b)	Plasmocytes	31
B.	L'IMMUNOTHERAPIE : DU COMMENCEMENT A 2022	33
1.	<i>Immunothérapie passive ou pseudo-passive</i>	34
a)	Sérothérapie	34
b)	Anticorps monoclonaux et leurs dérivés	35
(1)	Formats	35
(2)	Application thérapeutique	37
2.	<i>Immunothérapie active</i>	40
a)	Cytokines : immunothérapie active non spécifique	40
b)	Vaccin : immunothérapie active spécifique	41
3.	<i>Immunothérapie adoptive</i>	43
a)	Greffes de moelle osseuse	43
b)	Lymphocytes infiltrant les tumeurs	44
c)	« Chimeric antigen receptor » (CAR)	45
C.	INGENIERIE DU GENOME	51
II.	OBJECTIFS	61
III.	RESULTATS	65
A.	STRATEGIE D'EDITION NON POURSUIVIE : EDITION DE LA CHAINE J	66
B.	ARTICLE 1: SINGLE-HIT GENOME EDITION FOR EXPRESSION OF SINGLE-CHAIN IMMUNOGLOBULINS BY EDITED B CELLS	74
C.	ARTICLE 2: USE OF THE IGHA2 GENE AS AN APPROPRIATE SITE FOR HUMAN B CELL EDITING	95

D.	MISE AU POINT D'UN MODELE MURIN POUR L'ETUDE DE FONCTIONNALITE <i>IN VIVO</i> DES DIFFERENTS FORMATS D'ANTICORPS PRODUITS PAR DES CELLULES B HUMAINES MODIFIEES GENETIQUEMENT.	114
1.	<i>Optimisation de xéno greffes de cellules B humaines au sein de souris immunodéficientes</i>	114
2.	<i>Mise au point de modèle tumoraux in vivo</i>	117
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	121
A.	REMISE EN CONTEXTE	121
B.	INGENIERIE DES CELLULES B.....	122
1.	<i>Pertinence de cette approche</i>	122
2.	<i>Difficultés associées à l'ingénierie des cellules B</i>	124
C.	EXPLOITATION DES PROPRIETES INTRINSEQUES AUX CELLULES B.....	127
1.	<i>Cassettes d'expression d'un mAb adéquat</i>	127
2.	<i>Multiplication des méthodes d'édition</i>	129
D.	IGA THERAPEUTIQUES, UNE IDEE QUI A DE L'AVENIR !.....	130
1.	<i>Rationnel</i>	130
2.	<i>Les cellules B peuvent-elle être la solution ?</i>	131
E.	MODELE MURIN ADAPTE A L'ETUDE DE LA FONCTIONNALITE DES MAb PRODUITS PAR DES CELLULES B HUMAINES <i>IN VIVO</i>	134
V.	REFERENCES	137
	ANNEXE	161

Table des illustrations

Figure 1 : Hétérogénéité fonctionnelle du lignage B humain	3
Figure 2 : Hématopoïèse	5
Figure 3 : Différenciation des LB humains.	7
Figure 4 : Structure d'une IgG	9
Figure 5 : Ensemble des récepteurs d'Ig et de leurs caractéristiques associées	11
Figure 6 : Cascade de signalisation induite par l'activation ou l'inhibition du motif ITAM du FcR γ-chain	14
Figure 7 : Organisation des gènes d'Ig humaines	19
Figure 8 : Recombinaison séquentielle V(D)J des gènes d'immunoglobulines.	21
Figure 9 : Exclusion allélique	22
Figure 10 : Mécanisme de commutation de classe isotypique	26
Figure 11 : Répartition des domaines d'application des anticorps monoclonaux.	37
Figure 12 : Ensemble des différentes stratégies de vaccination	43
Figure 13 : Design des 4 générations de CAR.	46
Figure 14 : Représentation schématique des deux stratégies d'édition de la chaîne J	67
Figure 15 : Principe du test "Surveyor nuclease assay"	68
Figure 16 : Validation de l'efficacité de clivage par CRISPR/Cas de la chaîne J	69
Figure 17 : Représentation schématique des cassettes d'expressions adaptées aux différents sites de clivage	70
Figure 18 : Intégration au sein du locus chaîne J d'un gène rapporteur en position 113Rev	71
Figure 19 : Intégration au sein du locus chaîne J d'un gène rapporteur avec promoteur VH en amont en position 113Rev	72
Figure 20 : Intégration au sein du locus chaîne J du gène codant le "minibody" en position 175For.	73
Figure 21 : Évaluation du timing et du nombre de cellules B humaines pour obtenir une meilleure implantation chez un modèle murin immunodéficient	115
Figure 22 : Comparaison de pré-conditionnement des souris avec xénogreffes de cellules B humaines.	116
Figure 23 : La co-injection de cellules B humaines et de cellules T humaines autologues favorise l'implantation des cellules B humaines in vivo	117

Figure 24 : Mise au point du développement tumoral des cellules EL4-hCD20 dans le modèle murin BRGS	118
Figure 25 : Modification de la lignée B16F10 dans le but d'induire l'expression de la protéine HER2	119
Figure 26 : Mise au point du développement tumoral des cellules B16F10 HER2⁺ dans le modèle murin BRGS	120

Liste des abréviations

bn	broadly neutralizing (neutralisation large)
Ac	Anticorps
ADCC	Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity (Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps)
ADCP	Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis (Phagocytose cellulaire dépendant des anticorps)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ag	Antigènes
AID	Activation Induced cytidine Deaminase (Activation induite de la cytidine déaminase)
ANR	Agence nationale de la recherche
ARN	Acide RiboNucléique
B2M	β2 microglobuline
BAFF	B-cell Activating Factor (Facteur d'activation des cellules B)
BCMA	B-cell Maturation Antigen (Antigène de maturation des cellules B)
BCR	B-cell receptor (Récepteur des cellules B)
BER	Basic Excision Repair (Réparation de l'excision de base)
BREG	B-régulatrices
BRGS	BALB/c Rag2 ^{-/-} IL-2Rγc ^{-/-} SIRPα.NOD
CAR	Chimeric Antigen Receptor (récepteur antigénique chimérique)
Cas	CRISPR-Associated
CDC	Cytotoxicité Dépendante du Complément
CDR	Complementarity Determining Regions (Régions déterminant la complémentarité)
CH	Heavy Chain (chaîne lourde)
CLP	Common Lymphoid Progenitor (Progéniteur lymphoïde commun)
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (Répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées et groupées)
CRS	Cytokine Release Syndrome (Syndrome de libération des cytokines)
CSM	Cellules Stromales Mésoenchymateuses
CSR	Class-Switch Recombination (commutation de classe isotypique)
CTL4	Cytotoxic T Lymphocyte-Associated antigen 4 (Antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques)
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-Integrin
dIgA	IgA dimériques
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fab	Fragment Antigen Binding (Fragment de liaison antigénique)
Fc	Fragment Cristallisable
FcγR	Récepteurs Fcγ
FcRn	Neonatal Fc Receptor
FDA	Food and Drug Administration
FDC	Follicular Dendritic Cells (cellules dendritiques folliculaires)

FLT3	FMS-Like Tyrosine kinase 3
FO	Zone Folliculaire
FR	Framework Regions
Gal1	Galectine-1
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissues (Tissus lymphoïdes associés à l'intestin)
GC	Germinal Center (centre germinatif)
GvHD	Graft-versus-Host Disease (réaction du greffon contre l'hôte)
GVL	Graft Versus Leukemia (greffon contre la leucémie)
H	Heavy (Lourd)
HACA	Human Anti-Chimeric Antibodies (Anticorps anti-chimères humains)
HAMA	Human Anti-Mouse Antibodies (Anticorps humains anti-souris)
HDR	Homology-Directed Repair (Réparation dirigée par l'homologie)
HLA	Human Leucocyte Antigen (Antigène leucocytaire humain)
HLH	LymphoHistiocytose Hémaphagocytaire
Hu-SCID	Human-Severe Combined ImmunoDeficiency
ICAM1	InterCellular Adhesion Molecule (Molécule d'adhésion intercellulaire)
IFN-g	Interféron γ
Ig	Immunoglobulines
IgAm	IgA monomérique
IgAp	IgA polymérique
IL	Interleukine
ILC	Innate Lymphoid Cells (cellules lymphoïdes innées)
INF α	Interféron α
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine based Activating Motifs (Motifs d'activation basés sur la tyrosine des immunorécepteurs)
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motifs (Motifs inhibiteurs basés sur la tyrosine des immunorécepteurs)
J	Joining
KI	Knock-in
L	Light (Légère)
LB	Lymphocytes B
LFA1	Lymphocyte Function Associated antigen-1
LT	Lymphocytes T
LTfh	Lymphocytes T Folliculaire Helper
LTh1	Lymphocytes T helper 1
mAb	Monoclonal AntiBody (Ac Monoclonaux)
MALT	Mucosae Associated Lymphoid Tissue (Tissu lymphoïde associé aux muqueuses)
MMEJ	Microhomology-Mediated End Joining (Jonction terminale médiée par la microhomologie)
MMR	MisMatch Repair (Réparation des erreurs)
MPP	MultiPotent Progenitor (Progéniteur multipotent)
MZ	Marginal Zone (zone marginale)
NET	Neutrophil Extracellular Trap (Piège extracellulaire des neutrophiles)
NHEJ	Non-Homologous End Joining

NK	Natural Killer
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PD-1	Programmed Death-1
PNN	PolyNucléaires Neutrophiles
polyA	polyAdénylations
RAG	Recombination Activating Genes (gènes activant la recombinaison)
RNP	RiboNucléoProtéine
RSS	Recombinaison Signal Sequences
RSV	Respiratory Syncytial Virus (Virus respiratoire syncytial)
S	Sécrétoire
S1P	Sphingosine-1-Phosphate
scFv	single-chain variable Fragment (Fragment variable à chaîne unique)
SHIP	SH2-containing phosphatase
SHM	Somatic HyperMutation (hypermutation somatique)
SI	Système Immunitaire
TAC1	Transmembrane Activator and calcium modulator and cytophilin ligand interactor
TALENs	Transcription Activator-Like Effector Nuclease (nucléases effectrices de type activateur de transcription)
TCR	T cell receptor (Récepteur des lymphocytes T)
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (Désoxynucléotidyl-transférase terminale)
TGF	Transforming Growth Factor (Facteur de croissance transformant)
TIDE	Tracking Indels by Decomposition (Recherche d'indels par décomposition)
TIL	Tumor-Infiltrating Lymphocyte (Lymphocyte infiltrant la tumeur)
TLS	Tertiary lymphoid structures (Structures Lymphoïdes Tertiaires)
TRUCKS	T-cells redirected for Universal Cytokine Killing
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin (Lymphopoïétine stromale thymique)
TTR	TransThyRétine
UPR	Unfolded Protein Response (Réponse aux protéines non repliées)
V	Variable
V(D)J	V (Variable), D (Diversity), J (Joining)
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLA4	Very late antigen-4 (Antigène 4 très tardif)
VLP	Virus-Like Particules (particules pseudo-virales)
ZPNs	Zinc-Finger Nucleases (nucléases à doigt de zinc)
κ	Kappa
λ	Lambda

I. Introduction

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans un projet d'ingénierie génétique de la lignée lymphoïde B, pour des perspectives d'immunothérapie basées sur la production *in vivo* d'anticorps thérapeutiques. Afin de pouvoir mieux appréhender ce sujet riche de diversité, je propose une introduction découpée en trois parties. Dans un premier temps, je commencerai mon rapport par quelques rappels pertinents à mon sujet, sur la physiologie de la lignée B humaine. Dans un second temps, je m'intéresserai aux différentes immunothérapies disponibles à l'heure actuelle, en insistant sur les immunothérapies cellulaires. Dans un troisième temps, les méthodes d'édition du génome et plus particulièrement celles des lymphocytes B (LB) seront décrites. Cette dernière partie de l'introduction a fait l'objet au cours de ma thèse d'un article de revue en co-premier auteur dans le journal « *Blood Advances* », que j'inclus donc à ce manuscrit. Je poursuivrai par l'énumération des objectifs de ma thèse en y incluant une remise en contexte plus précise.

Je présenterai à la suite, l'ensemble des résultats obtenus tout au long de ce projet. Ces résultats se déclinent selon deux grands objectifs qui se focalisent d'une part, sur l'édition génomique de la lignée B et d'autre part, sur la mise au point d'un modèle murin pour l'étude de la fonctionnalité de cellules B ingénierées. En réponse au premier objectif, une première approche d'édition du locus JCHAIN a été étudiée, mais s'est malheureusement soldée par un échec. Cependant, la mise en lumière d'autres stratégies d'édition a permis l'écriture de deux articles scientifiques. Le premier article déposé dans bioRxiv s'intitule « Single-hit genome edition for expression of single-chain immunoglobulins by edited B cells ». Celui-ci apporte la validation d'un format unique d'anticorps, dont la séquence ADN a été adaptée pour une intégration au génome des cellules B humaines. Y est également confirmé l'expression d'un BCR spécifique dans ce type cellulaire à l'aide d'une approche CRISPR/Cas 9 permettant l'intégration d'une cassette d'expression au locus IgH.

Le second article (plus préliminaire) nommé « Use of the IgHa gene as an appropriate site for B cell editing » met en évidence de nouvelles stratégies d'édition qui participent à l'exploitation des nombreuses propriétés des cellules B. Ces différentes stratégies s'appuient sur un nouveau site de clivage au sein du locus IgH situé entre $S\alpha 2$ et $C\alpha 2$. À travers celles-ci, nous avons pu démontrer la faisabilité d'une production i) de molécule thérapeutique sans impacter le récepteur des cellules B (BCR) ; ii) d'IgA2 anti-SARS-CoV-2 par l'induction de switch à

l'IgA2 d'un hybridome ; iii) d'un anticorps sous forme d'IgA2 anti-CD20 humain et anti-HER2.

Dans le but de répondre au second objectif, nous avons établi d'une part, les conditions optimales d'implantation des cellules B humaines dans un modèle murin immunodéficient, et d'autre part la mise au point de modèles tumoraux *in vivo*. Nous avons ainsi déterminé qu'une co-injection de lymphocytes B avec des lymphocytes T CD4⁺ autologues permettaient une survie plus longue des cellules B *in vivo*.

Enfin, je discuterai de l'ensemble de ces résultats afin d'analyser les difficultés qu'il reste à surmonter pour la réalisation de ce projet ambitieux, ainsi que les méthodes disponibles pour y parvenir. Pour finir, je conclurai sur l'ensemble de mes résultats en y développant les perspectives qui en découlent.

A. Rappels concernant la lignée lymphoïde B et son hétérogénéité

Les LB, ou cellules B, appartiennent au système immunitaire adaptatif. Ces cellules B représentent en moyenne entre 3 à 15% des lymphocytes sanguins chez l'Homme.

Elles ont notamment pour rôle, au sein de la machinerie complexe qu'est le système immunitaire (SI), le support de l'immunité humorale adaptative. De fait, elles ont la capacité de produire et de sécréter des immunoglobulines (Ig) aussi nommées anticorps (Ac).

D'autres rôles cruciaux sont également joués par les cellules B, d'une part quant à la présentation des antigènes aux cellules T en association au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II, cette interaction directe entre cellules spécifiques d'épitopes liés au même antigène constituant une donnée de base des phénomènes de coopération cellulaire B-T, d'autre part quant à la production de diverses molécules immuno-régulatrices (Interleukine 10 (IL-10), « transforming growth factor » (TGFβ), granzyme-B...) par des cellules B ou des plasmablastes auxquels on attribue alors la fonction de cellules B-régulatrices (BREG).

Outre la « fonction BREG », qui est aujourd'hui vue comme un état particulier et transitoire de la différenciation B plus que comme un compartiment stable ¹, il est important de noter que les analyses récentes faites à haute dimension (en cytométrie multi-dimensionnelle ou cytométrie de masse) cartographient selon leurs marqueurs une grande variété de « subsets B fonctionnels », dont la fonction spécifique et la plasticité pour évoluer d'une fonction à une autre ne sont pas forcément encore connues. On citera notamment le récent atlas de Glass *et al*, distinguant plus de 10 catégories de cellules B matures périphériques² (**Figure 1**). On notera

aussi l'intérêt qui se développe depuis quelques années pour les cellules dites doubles négatives (IgDneg, CD27neg), telles que l'équipe d'Ignacio Sanz les a décrites et en poursuit l'étude dans les situations d'auto-immunité ou d'inflammation post-infectieuse^{3,4}. Ce nouveau type de population est semble-t-il subdivisé en sous populations nommées DN1, DN2 (plus récemment DN3). La sous population DN1 principalement présente chez les patients sains âgés, n'aurait aucun impact néfaste sur leur santé. En revanche, la sous population DN2 jouerait un potentiel rôle dans le développement de pathologies chroniques comme le lupus érythémateux systémique. Caractérisées par l'expression de CXCR5, les cellules B DN2 sont retrouvées en grand nombre chez ces patients malades. La fonction exacte de ces DN2 n'est pour l'heure pas connue, même si les premières données montrent un profil changeant selon la pathologie. La compréhension du rôle de cette population dans le système immunitaire reste superficielle et nécessite donc d'être approfondi dans le futur⁵.

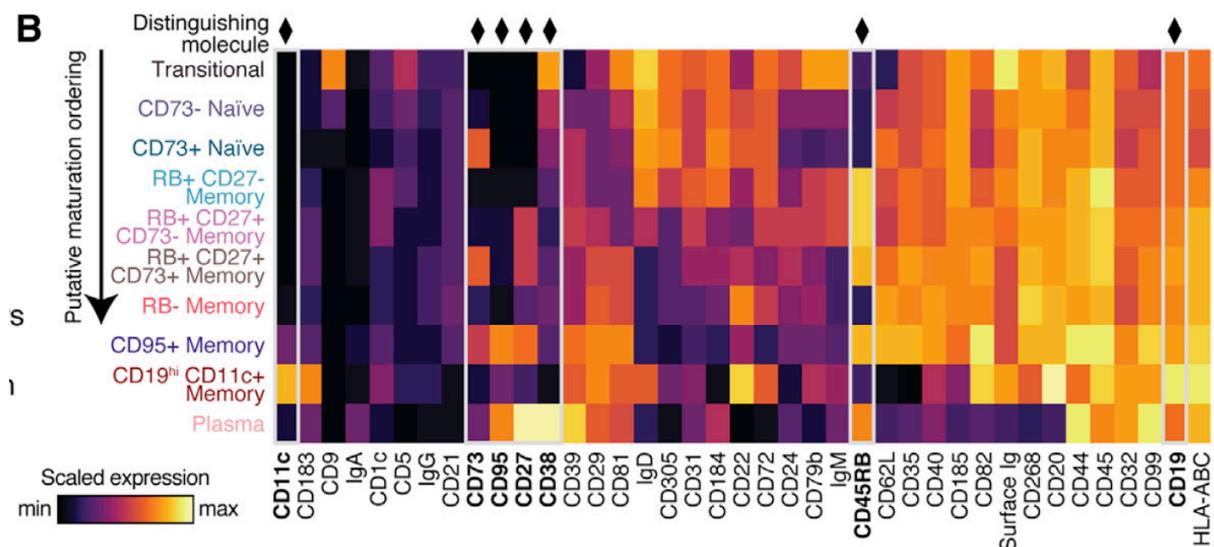


Figure 1 : Hétérogénéité fonctionnelle du lignage B humain

Identification par cytométrie de masse de 10 sous-populations de cellules B matures dont 2 naïves et 6 mémoires. “An Integrated Multi-omic Single-Cell Atlas of Human B Cell Identity”²

Cette hétérogénéité fonctionnelle du lignage B humain constitue bien sûr un élément de contexte de l'objet sur lequel j'ai travaillé pendant ma thèse, la cellule B. Cette diversité fonctionnelle n'est cependant pas un point que nous ayons encore eu l'occasion d'aborder dans nos travaux, focalisés sur la mécanistique et l'optimisation de stratégies d'édition du génome des cellules B. Je resterai donc pour la suite de mon exposé dans une classification beaucoup plus générique des cellules B selon leur distribution classique en lymphocytes, plasmablastes et plasmocytes.

1. *Lymphopoïèse B*

Au cours de la vie embryonnaire, la lymphopoïèse des cellules B se localise dans le foie fœtal puis dans la moelle osseuse. Ce n'est qu'après la naissance que cette localisation se réduit uniquement à la moelle osseuse.

La lymphopoïèse B s'inscrit de manière plus générale dans l'hématopoïèse. Ce processus regroupe l'ensemble des mécanismes biologiques impliqués dans le renouvellement et la régulation de toutes les cellules sanguines (**Figure 2**). Elle débute avec les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui ont de remarquables propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation. Après de multiples cycles de prolifération et différenciation, les CSH permettent l'obtention de tous les éléments figurés du sang. Elles se distinguent par l'expression du marqueur de surface CD34 et l'absence d'expression de CD38⁶. Au premier stade de différenciation, les cellules sont nommées progéniteurs multipotents (« multipotent progenitor » : MPP). Ce changement implique une perte de la capacité d'auto-renouvellement ainsi qu'une expression du récepteur « FMS-Like Tyrosine kinase 3 » FLT3⁷. Elles conservent toutefois un haut potentiel prolifératif. Par la suite, ces cellules vont perdre leur multipotence pour ne devenir qu'unipotentes, autrement dit elles ne seront plus en mesure de changer de lignage cellulaire. Elles ont d'abord la possibilité de s'engager dans deux catégories distinctes, d'une part les cellules myéloïdes et d'autre part les cellules lymphoïdes. Les cellules B appartiennent à la deuxième catégorie dans laquelle on retrouve également les lymphocytes T (LT) ainsi que les cellules Natural Killer (NK) et les « innate lymphoid cells » (ILC). Ces lignées cellulaires pourtant très différentes du point de vue fonctionnel, ont la particularité d'être issues d'un précurseur lymphoïde commun appelé « Common Lymphoid Progenitor », CLP⁸. Ces cellules précurseurs vont, tout au long de leur évolution dans la moelle osseuse, être en étroite collaboration avec les cellules du microenvironnement leur offrant des niches successives de survie et ou de différenciation. Elles pourront notamment interagir avec les cellules stromales mésenchymateuses (CSM) qui jouent un rôle déterminant dans leur développement. L'engagement des cellules CLP dans le lignage B est donc lié aux CSM, qui non seulement vont produire de nombreux facteurs de croissance et de survie, mais également exprimer à leur surface des récepteurs qui fournissent des signaux différenciants⁹.

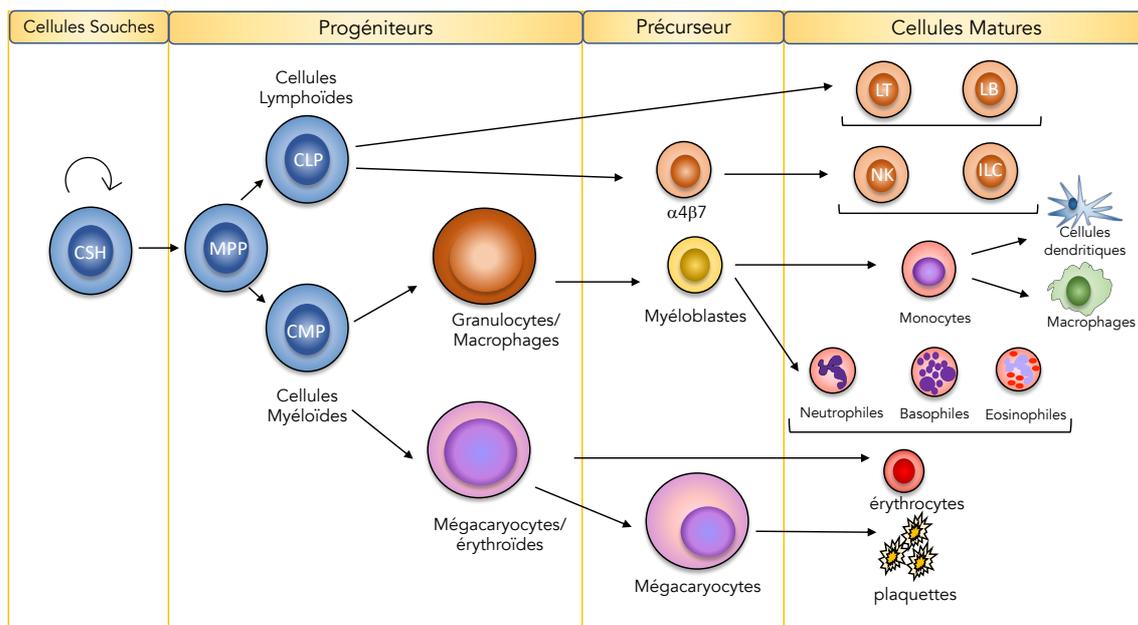


Figure 2 : Hématopoïèse

Les cellules souches hématopoïétiques vont devenir des MPP « multipotent progenitor » qui eux-mêmes vont se différencier soit en CLP « progéniteur de cellules lymphoïdes » soit en CMP « progéniteur de cellules myéloïdes ». Les CLP peuvent encore diverger en au moins 2 voies de progéniteurs des cellules de l'immunité adaptative (avec alors un choix entre lignée B et T) ou des lymphocytes de l'immunité innée (NK et ILC). Les premières cellules engagées dans les lignées B (pré-pro-B) ou T (pro-Thymocytes) suivront ensuite toutes les étapes de la différenciation des lignées B ou T, respectivement.

La différenciation précoce des cellules B se découpe en deux phases, l'une indépendante des antigènes et l'autre dépendante des antigènes. La première se localise dans le foie fœtal puis chez l'adulte dans la moelle osseuse. Quant à la deuxième, elle se répartit dans les différents organes lymphoïdes secondaires (rate/ganglions lymphatiques/amygdales/plaques de Peyer).

2. Différenciation précoce des lymphocytes B indépendante des antigènes

Durant cette première phase, différents stades de différenciation des LB peuvent être observés (en fonction du stade de développement : avant ou après naissance) (**Figure 3**). Le CD19 est l'un des marqueurs du lignage B exprimé le plus précocement (dès le stade pro-B) et ce de manière quasi exclusive.

Chaque stade correspond à l'expression de facteurs de transcription qui lui sont propres et dans lequel s'opèrent des remaniements génétiques, en particulier les réarrangements V(D)J des gènes d'immunoglobulines. Ces deux événements sont issus de facteurs intrinsèques à la cellule, mais également de signaux extracellulaires provenant du microenvironnement^{8,10}.

Alors que les CSH sont logées à proximité des ostéoblastes (avec une homéostasie régulée par la thrombopoïétine, l'angiopoïétine et le ligand CXCL12 du récepteur CXCR4), les cellules pro-B se localisent au niveau des cellules stromales productrices d'IL7 et ne sont plus en contact avec les cellules arborant CXCL12¹¹. Elles quittent ensuite la niche IL7+ lors du stade pré-B pour se diriger vers une nouvelle niche où le récepteur pré-« B-cell receptor » (BCR) qu'elles ont commencé à exprimer peut trouver un ligand, au contact de cellules exprimant la galectine-1 (Gal1)¹². La Gal1 lie le pré-BCR, avec formation de clusters de pré-BCR contenant également l'intégrine VLA4. Ces contacts peuvent activer les tyrosines kinases intracellulaires et induire un signal pré-BCR, indispensable à la différenciation vers le stade pré-BII¹³. Cette différenciation précoce est donc contrôlée par des niches cellulaires successives au sein de la moelle osseuse, jusqu'à ce que des cellules B ayant achevé leur différenciation sortent vers la circulation sanguine en tant que cellules B transitionnelles. Les hématies circulantes produisent en effet du sphingosine-1-phosphate (S1P)¹⁴, reconnu *via* le récepteur S1PR1, attirant les cellules B vers la circulation sanguine. Des LB matures recirculants auront en outre l'occasion de repasser dans la moelle osseuse, au niveau des niches péri-sinusoïdales, à l'interface avec la circulation sanguine¹⁵. Enfin, certains plasmocytes retourneront aussi vers la moelle comme nous le verrons plus loin.

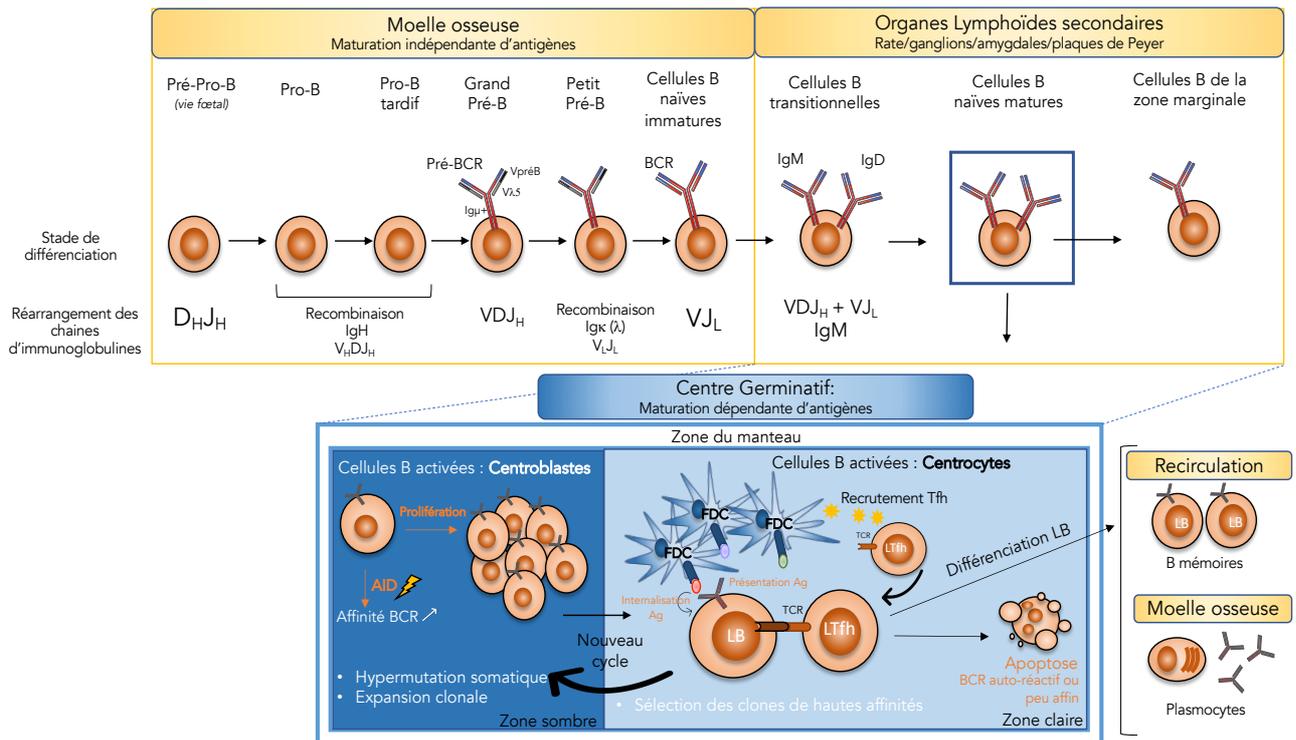


Figure 3 : Différenciation des LB humains.

La première phase, indépendante des antigènes qui est localisée dans la moelle osseuse regroupe les stades de différenciation allant du pro-B aux cellules B naïves immatures. Durant cette première phase, les réarrangements V(D)J donnent lieu à l'expression d'un pré-BCR, puis d'un BCR productif. S'ensuit une migration sous la forme de cellules B transitionnelles en périphérie vers les organes lymphoïdes secondaires. Cette deuxième phase est dépendante des antigènes. Deux options s'offrent aux cellules, soit elles s'activent en proliférant de manière accrue pour former des centres germinatifs, soit elles restent dans la zone marginale. Au sein des centres germinatifs, les cellules vont subir des mécanismes tels que l'hypermutation somatique dans le but d'améliorer l'affinité des anticorps pour leur cible. Seules les cellules ayant les anticorps les plus affins seront retenues pour continuer leur différenciation en cellules B mémoires ou bien en plasmocytes. Ces mécanismes mettent en jeu d'autres types cellulaires comme les lymphocytes T Folliculaires Helper (LTfh) ou encore les cellules dendritiques folliculaires (FDC).

Face à l'infinité d'antigènes auxquels il est confronté, notre organisme dispose d'un imposant registre de récepteurs produits par les cellules de l'immunité adaptative : la lignée B a la charge d'exprimer le répertoire des immunoglobulines, d'abord en tant que récepteurs de membrane (BCR) puis en tant qu'anticorps sécrétés permettant de lutter à distance contre des antigènes. La diversification de la production des immunoglobulines n'est possible que grâce à l'existence dans la lignée B d'une formidable capacité de remaniement génétique, focalisée sur les gènes d'Ig. Aux stades pro-B puis pré-B évoqués dans ce paragraphe, cette diversification repose d'abord sur le mécanisme que l'on appelle recombinaison V(D)J. Grâce à lui notre génome peut « outrepasser » ses limitations liées au nombre de gènes disponibles, et assembler une multitude

de nouvelles séquences constituées d'un patchwork de fragments de gènes d'Ig, pour accroître la diversité des anticorps. En effet, à partir d'un nombre limité de gènes V, D et J, les recombinaisons V(D)J, médiées par les enzymes « recombination activating genes 1 et 2 » (RAG1 et RAG2), permettent de créer par le jeu de la « diversité combinatoire » un nombre colossal de récepteurs différents.

a) *Immunoglobulines, BCR et Anticorps*

(1) *Structure*

A l'inverse de la lignée T, limitée dans ses capacités par le fait que son récepteur pour l'antigène « T cell receptor » (TCR) est incapable de se détacher de la membrane et ne permet donc qu'une action « au contact », la lignée lymphoïde B a été sélectionnée pour pouvoir successivement exprimer son « répertoire » adaptatif sous 2 formes. Dans les lymphocytes mûrs, il s'agira du BCR, une molécule ancrée à la membrane comme le TCR, couplée à des modules de signalisation, et capable d'une part d'assurer la sélection positive des cellules B en leur fournissant des signaux constitutifs de survie, et d'autre part d'entraîner l'activation cellulaire, la prolifération et l'engagement vers des étapes ultérieures de différenciation lorsque le BCR rencontre un ligand spécifique dans des conditions de stimulation ad hoc que nous reverrons. Plus tard, au cours de la différenciation B terminale, les mêmes immunoglobulines pourront être sécrétées (sous une forme alors dépourvue de domaine d'ancrage membranaire) par des cellules B alors dénommées plasmocytes. Elles pourront alors porter à très longue distance les fonctions de reconnaissance des antigènes (Ag) ; associées à diverses fonctions effectrices.

Les immunoglobulines sont formées de quatre chaînes polypeptidiques identiques 2 à 2, elles-mêmes composées de deux chaînes lourdes identiques entre-elles notées H (Heavy) ainsi que deux chaînes légères également identiques entre-elles notées L (Light). La garantie de l'identité entre les chaînes d'immunoglobulines H ou L constituant une même molécule tient à 2 phénomènes : d'une part la diversification du répertoire V(D)J des Ig se fait de façon « clonotypique » (une cellule B donnée ne produit donc qu'une séquence définie de chaîne H et de chaîne L), d'autre part, un contrôle appelé « exclusion allélique » entre les 2 allèles fonctionnels assure que tout réarrangement V(D)J fonctionnel sur un allèle stoppe normalement les réarrangements V(D)J sur l'autre allèle.

Organisées en domaines, les Ig sont stabilisées par des ponts disulfures, mais aussi différentes liaisons non-covalentes (saline, hydrogène, hydrophobe) (**Figure 4**). En moyenne les chaînes

lourdes et les chaînes légères ont un poids moléculaire d'environ 50 kDa et 25 kDa respectivement.

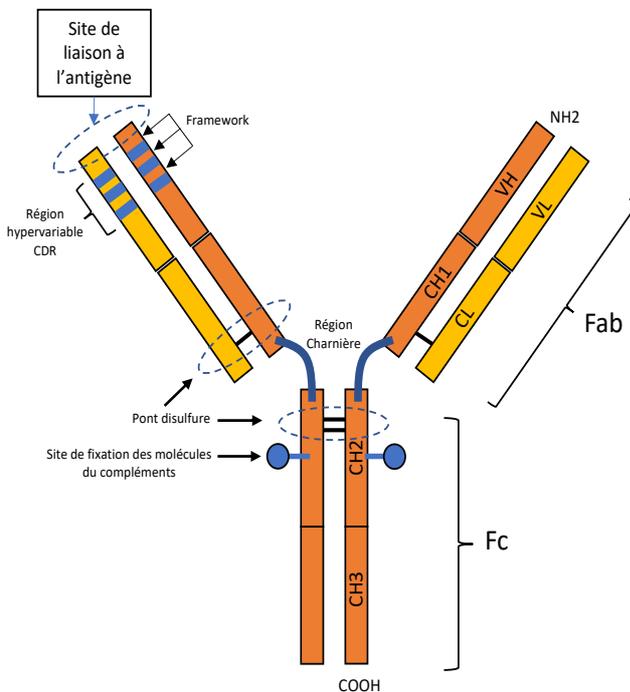


Figure 4 : Structure d'une IgG

Constituées de deux chaînes lourdes (orange) et deux chaînes légères (jaune) identiques entre elles. Les chaînes lourdes sont formées de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3) ainsi que d'un domaine variable (VH) reliés par une région charnière.

Les chaînes légères ne sont constituées que d'un seul domaine constant (CL) et d'un domaine variable (VL). Les deux chaînes sont reliées par l'intermédiaire de ponts disulfures. Les parties variables contiennent 3 régions hypervariables nommées CDR1, CDR2 et CDR3 et déterminent la spécificité d'un anticorps pour sa cible. Un anticorps possède deux structures fonctionnelles lorsqu'il est digéré par la papaine : un fragment capable de se lier à l'antigène nommé « fragment antigen-binding » (Fab) et un fragment cristallisable (Fc) qui porte les propriétés effectrices.

Il existe 5 classes de chaînes lourdes nommées Gamma (γ) ; Epsilon (ϵ) ; Mu (μ) ; Alpha (α) et Delta (δ). Ce sont ces chaînes lourdes qui déterminent la classe à laquelle appartient l'anticorps produit, soit IgG (γ), IgE (ϵ), IgM (μ), IgA (α) et IgD (δ). Les IgG et IgA présentent des variabilités de séquences codantes, entraînant la formation de 4 et 2 sous-classes d'Ig respectivement¹⁶. Les sous-classes d'IgG sont nommées IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 tandis que les sous-classes d'IgA sont nommées IgA1 et IgA2. De plus le nombre de domaines constants (CH) qui constituent chaque chaînes lourdes peut également varier d'une classe à l'autre, par exemple les IgM comportent un domaine supplémentaire par rapport aux IgG. Il existe en plus au sein de certains domaines constants (γ et α), des variabilités génétiques naturelles nommées allotypes. Ce polymorphisme est caractéristique d'un groupe d'individu dans une même espèce et se transmet de manière héréditaire. Il a été démontré dans le cas des IgG3 par exemple, que la présence de polymorphisme dans le domaine CH2, pouvait notamment altérer la fonction ADCC de cet anticorps. Ce phénomène s'explique par une perte d'affinité des IgG3 pour le récepteur Fc γ R3a (notion abordée ultérieurement)¹⁷.

Les exons M1 et M2 permettent la production d'Ig ancrées à la membrane sous forme de BCR : ils codent un domaine transmembranaire et une queue intracellulaire qui varie selon les

isotypes. Le passage de la forme membranaire des immunoglobulines à la forme sécrétée se fait par utilisation différentielle des sites des polyadénylations (polyA), situés en aval des domaines constants et des domaines membranaires.

Les chaînes légères existent sous deux types appelés kappa (κ) et lambda (λ) qui ne s'expriment jamais de manière concomitante (une extension du phénomène d'exclusion allélique !), mais peuvent éventuellement s'exprimer consécutivement lors de phénomènes « d'édition du BCR ».

Qu'il s'agisse de la chaîne lourde ou légère, chacune possède une région variable (V) et une région constante (C). Les différents domaines sont ainsi notés V_L ; V_H et C_L ; C_H .

Les parties variables se situent aux extrémités et constituent les « paratopes », c'est-à-dire les sites de liaison à « l'épitope » (portion d'un antigène interagissant physiquement avec un anticorps). Elles sont dotées de trois régions hypervariables « *complementarity determining regions* » (CDR1, CDR2, CDR3) conférant à l'anticorps une très haute affinité pour sa cible. Ces CDR sont séparés par 4 régions très conservées appelées « *framework regions* » (FR1, FR2, FR3, FR4) permettant un maintien de la structure tri-dimensionnelle de chaque domaine en feuillet β .

Une digestion enzymatique par la papaïne entraîne par ailleurs une fragmentation de la structure des anticorps en deux parties¹⁸. D'une part le fragment « antigen binding » (Fab) impliqué dans la reconnaissance de l'antigène et d'autre part le fragment cristallisable (Fc) dont le rôle est celui de supporter les propriétés effectrices de l'immunoglobuline.

On note également diverses singularités structurales au sein des différentes classes d'Ig qui leur confèrent certaines propriétés. En effet, la présence d'une région charnière octroie aux IgG, IgA et IgD la faculté d'être plus « flexibles » en comparaison des autres classes. De plus, la sécrétion par les plasmocytes (stade ultime de différenciation des cellules B) d'une glycoprotéine de petite taille (15 kDa) appelée chaîne Joining (J) permet une polymérisation des IgM et IgA. Et pour finir, les IgA et les IgM polymériques ont la particularité de devenir « sécrétoires » grâce à leur complexation avant la traversée des muqueuses avec une protéine appelée une pièce sécrétoire (S), qui n'est autre que l'exodomaine, clivé du récepteur aux Ig polymériques (pIgR).

(2) Fonctions associées aux classes d'Ig

Les immunoglobulines possèdent grâce à leur fragment Fc des fonctions effectrices capables d'induire des mécanismes comme la neutralisation, l'opsonisation, ou la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) via une interaction de leurs régions constantes avec le facteur d'activation classique de la voie du complément C1q. La reconnaissance des IgG par les récepteurs Fcγ (FcγR) peut également générer des mécanismes comme la phagocytose cellulaire dépendante d'anticorps (ADCP) ou encore la cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) via une interaction avec les différents composants du système immunitaire (macrophages, NK, cellules dendritiques, ...). Les IgE entraînent une dégranulation des mastocytes qui libèrent ainsi de très puissants médiateurs chimiques, particulièrement efficaces contre les parasites. Cette interaction est rendue possible par la fixation du Fc aux FcR présents à la surface de ces cellules immunes. Chaque classe et sous-classe d'Ig présente une affinité spécifique pour les différents FcR (

Figure 5)¹⁹ :

- IgM : FcμR, PolyIgR, Fcα/μR/CD351
- IgG : FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB FcγRIIC FcγRIIA, FcγRIIB, FcRL4 (CD307d), FcRL5 (307e), FcRn, TRIM21
- IgA : FcαRI, FcRL4, PolyIgR, Fcα/μR/CD351, Dectin1, DC-SIGN, récepteur à la transferrine
- IgE : FcεRI, FcεRII (CD23)

Name	polyIgR	FcμR	Fcα/μR	FcαRI	FcRL4	FcεRI	FcεRII	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIB	FcγRIIC	FcγRIIA	FcγRIIB	FcRn	TRIM21	FcRL5					
CD	-	-	CD351	CD89	CD307d	-	CD23	CD64	CD32A	CD32B	CD32C	CD16A	CD16B	-	-	CD307e					
Gene	PIGR	FAM3	FCAMR	FCAR	FCRL4	FCER1A	FCER2	FCGR1A	FCGR2A	FCGR2B	FCGR2C	FCGR3A	FCGR3B	FCGRT	TRIM21	FCRL5					
Alleles	/	/	/	/	/	/	/	H ₁₃₁	R ₁₃₁	I ₂₃₂	T ₂₃₂	Q ₁₃	stop ₁₃	V ₁₅₈	F ₁₅₈	NA1, NA2, SH	/	/	/		
IgM	1x10 ⁶	1x10 ⁶	1x10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
IgG1	-	-	-	-	-	-	-	6x10 ⁷	5x10 ⁶	3x10 ⁶	1x10 ⁵	ND	1x10 ⁵	-	2x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ⁵	8x10 ⁷	5x10 ⁶	1x10 ⁶	
IgG2	-	-	-	-	-	-	-	-	4x10 ⁵	1x10 ⁵	2x10 ⁴	ND	2x10 ⁴	-	7x10 ⁴	3x10 ⁴	-	5x10 ⁷	5x10 ⁶	var.	
IgG3	-	-	-	-	(+)	-	-	6x10 ⁷	9x10 ⁵	9x10 ⁵	2x10 ⁵	ND	2x10 ⁵	-	1x10 ⁷	8x10 ⁶	1x10 ⁵	3x10 ⁷	2x10 ⁶	1x10 ⁵	
IgG4	-	-	-	-	(+)	-	-	3x10 ⁷	2x10 ⁵	2x10 ⁵	2x10 ⁵	ND	2x10 ⁵	-	2x10 ⁵	2x10 ⁵	-	2x10 ⁷	5x10 ⁶	1x10 ⁶	
IgE	-	-	-	-	-	1x10 ¹⁰	5x10 ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IgA	1x10 ⁶	-	5x10 ⁶	5x10 ⁶	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Major role	Ig transport	Endocytosis, IgM regulation	Phago/Endocytosis	Activation, ITAMs-inhibition	Inhibition/Activation	Activation	IgE regulation	Activation	Activation; ITAMs-inhibition	Inhibition	Activation	Activation; ITAMs-inhibition	Decoy; Activation	IgG recycling; transport; Ag pres.	Activation; proteasome; viral degradation	Inhibition/Activation ?					
B cell	-	+	+/-	-	+/-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	low	+	+	-	-	-
T cell	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NK cell	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mono/MΦ	-	-	-	-	Mono+MΦ +/-	-	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Neutrophil	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+/-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
DC	-	-	-/FDC+	+/-	-	+/-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Basophil	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+/-	-	-	+	-	-	-	-
Mast cell	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	?	+	-	-	-
Eosinophil	-	-	-	+	-	+/-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Platelet	-	-	?	-	?	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	?	?	?	?	?
Endothelium	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+/-	-	-	-
Epithelium	+	-	?	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	?	-	-	-
Syncytiotrophoblast	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	+	?	-	-	-

Figure 5 : Ensemble des récepteurs d'Ig et de leurs caractéristiques associées

Chaque classe et sous-classe d'Ig se fixe avec une plus ou moins forte affinité aux différents FcR présents à la surface des différents effecteurs de l'immunité et de cellules épithéliales. Figure issue de l'article intitulé " Mouse and human FcR effector functions "19

Mon projet mettant principalement en jeu des anticorps de type IgG et IgA, je développerai uniquement dans cette introduction les interactions Fc-FcR pour ces deux classes d'immunoglobulines. De manière générale, les FcR s'expriment différemment selon les cellules immunitaires (

Figure 5).

FcγR humains :

Le FcγRI (CD64) est essentiellement exprimé par les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques (DC) et dans le cas d'inflammation il peut également être exprimé par des polynucléaires neutrophiles (PNN) et des mastocytes. Le FcγRIIA (CD32) est le FcγR le plus exprimé et se retrouve à la surface des cellules myéloïdes tels que les PNN, éosinophiles, basophiles mais aussi les plaquettes. Le FcγRIIB semble préférentiellement exprimé par les cellules B et les basophiles et ce de manière très forte, ainsi que dans une moindre mesure par des monocytes, des macrophages et des DC. Les FcγRIIIA (CD16A) et FcγRIIC (CD32) sont retrouvés à la surface des cellules NK et des monocytes/macrophages avec la particularité pour le second d'être également présent sur les PNN et les monocytes. Pour finir le FcγRIIIB (CD16B) est détecté à la surface des PNN et chez certains allergiques sur leurs basophiles. Tous ces récepteurs sont caractérisés comme « classiques », cependant il existe également des récepteurs que l'on nomme « non classiques » sur lesquels les Ig peuvent se fixer. Parmi ces derniers reconnaissant les IgG sont identifiés le FcRL4 (CD307d) et le FcRL5 (Cd307e), deux récepteurs-likes (possèdent un ou plusieurs domaines de la superfamille des Ig) homologues au FcγR. Ils sont exprimés uniquement à la surface des cellules B, et plus particulièrement pour le FcRL4 dans la sous-population cellules B mémoires. On retrouve également le « neonatal Fc receptor » (FcRn) qui lui est exprimé sur l'endothélium et l'épithélium, sur les DC, PNN et les monocytes/macrophages. Et pour finir, il existe le récepteur intracellulaire hTRIM21 dont l'expression est ubiquitaire¹⁹.

Chaque classe et sous classe d'Ig se lie avec une plus ou moins forte affinité sur certains de ces récepteurs. La notion de « high affinity » et « low affinité » est basée sur la capacité des FcR à fixer les Ig sous une forme plutôt qu'une autre. Lorsqu'il est dit de forte affinité, le FcR est

capable de lier les Ig libres ou monomériques. Dans le cas d'une faible affinité le FcR ne se lie qu'aux Ig sous forme d'immuns complexes, agrégés ou bien opsonisés.

Bien que les sous-classes IgG présentent une homologie de structure très importante, elles ne se lient pas de manière équivalente aux différents récepteurs d'IgG. Les IgG1 et IgG3 peuvent, à l'exception du FcRL4 pour la première, se lier à l'ensemble des récepteurs à IgG. Les IgG2 peuvent quant à elles lier l'ensemble des récepteurs à IgG, exception faite du Fc γ RIIB, Fc γ RI et du FcRL4. Tout comme les IgG2, les IgG4 peuvent se fixer aux différents récepteurs d'IgG mis à part le Fc γ RIIB.^{20,21}

L'ensemble des récepteurs énoncés plus haut sont impliqués dans une réaction d'activation médiée par la phosphorylation à l'aide de kinases (Syk, Src) de leur « immunoreceptor tyrosine based activating motifs » (ITAM) après fixation des IgG libres ou complexées. Ce motif est porté par une chaîne γ qui elle-même constitue la partie intracellulaire des Fc γ R.

Seuls les récepteurs Fc γ RIIB, le FcRL4 et le FcRL5 comptent dans leur structure un motif « immunoreceptor tyrosine based inhibitory motifs » (ITIM), qui lorsqu'il est phosphorylé *via* le recrutement de phosphatases (SHIP : SH2-containing inositol-5-phosphatase), entraîne une réaction d'inhibition. Ils sont donc impliqués dans un mécanisme de tolérance en servant de rétro-contrôle de la réponse immune qui freine l'activation excessive du système immunitaire.²²

FcRn est quant à lui dédié à un tout autre rôle qui est celui de transporteur. Il octroie aux IgG la faculté, non seulement d'être recyclées (selon un mécanisme pH-dépendant) par les cellules endothéliales vasculaires et les cellules épithéliales, mais également d'être capables de transiter des muqueuses à la circulation sanguine et vice versa. C'est aussi *via* ce récepteur que les IgG passent la barrière placentaire. De plus, il joue un rôle clé dans le transport des IgG liées aux antigènes afin de faciliter la présentation d'antigènes par les DC. Par conséquent il améliore la réponse immunitaire qui en découle²³.

Fc α R humains :

Le Fc α RI qui est le récepteur principal des IgA1 et IgA2 est exprimé fortement à la surface des PNN et des monocytes et dans une moindre mesure à la surface des polynucléaires éosinophiles, des macrophages et des DC^{24,25}. L'affinité des IgA pour ce récepteur dépend de leur conformation : sous forme monomérique l'affinité sera faible tandis que sous forme d'immun-complexe l'affinité sera forte²⁶. De plus, la liaison Fc-Fc α RI semble tributaire d'une

glycosylation en position 58 du Fc α RI dont l'absence entraine une augmentation de l'interaction IgA-Fc α RI²⁷. Le Fc α RI, pour initier des fonctions effectrices optimales, nécessite une association avec le FcR γ -chain qui comporte un motif ITAM. Ce dernier est l'élément clé car selon son activation ou son inhibition, *via* le déclenchement de l'une ou l'autre cascade de signalisation, peuvent découler des effets pro ou anti-inflammatoires (**Figure 6**). La forme monomérique des IgA qui lorsqu'elle se fixe sur le Fc α RI semble plutôt impliquée dans l'induction d'un signal inhibiteur²⁸.

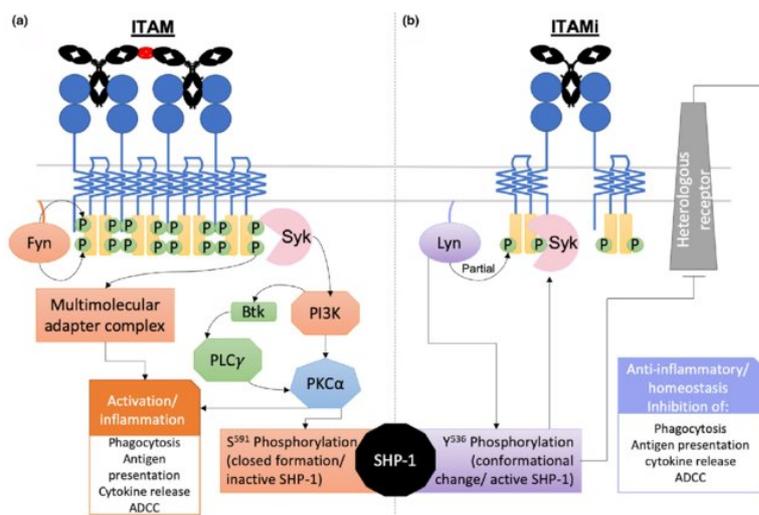


Figure 6 : Cascade de signalisation induite par l'activation ou l'inhibition du motif ITAM du FcR γ -chain

A) Phosphorylation des tyrosines du motif ITAM par les kinases Fyn et Src. Ceci permet la formation d'un complexe adaptateur multimoléculaire et/ou le recrutement de plusieurs autres kinases comme Syk. Cette dernière est impliquée dans l'activation de nombreuses protéines comme PI3K, PLC γ qui initie plusieurs voies de signalisations activatrices qui communiquent entre elles. S'ensuit le déclenchement des propriétés pro-inflammatoires de la cellule comme la phagocytose, la présentation d'antigène, le relargage de cytokines ou encore l'ADCC. **B)** Phosphorylation partielle des tyrosines du motif ITAM par la kinase Lyn conduit à l'activation de la tyrosine phosphatase (SHP-1). Cette dernière inhibe les récepteurs hétérogènes, ce qui entraîne l'inhibition des propriétés inflammatoires de la cellule.

Les IgA (ou IgM) peuvent également s'ancrer sur plusieurs autres récepteurs : polyIgR (pIgR), Fc α / μ R/CD351, le Fc α / μ R/CD351, le DC-SIGN, Dectin 1, le récepteur à la transferrine (CD71).

Le pIgR, exprimé par les cellules épithéliales à leur pôle basal, permet l'internalisation du ce récepteur ainsi que de l'IgA fixée pour permettre leur transcytose du pôle basal vers le pôle apical. L'IgA excrétée dans la lumière intestinale, grâce au clivage du pIgR par une protéolyse

pour s'affranchir de son ancrage membranaire, conservera la partie extracellulaire de ce récepteur (glycosylé). Ce fragment constituera ce que l'on nomme la pièce sécrétoire.

Le récepteur (Fc α / μ R/CD351) est retrouvé à la surface des cellules B de la zone marginale (MZ), macrophages (issus de la lamina propria ou d'amygdale) ainsi que des FDC. Ce récepteur est impliqué dans l'endocytose d'immuns complexes associés aux IgA (ou IgM)²⁹.

Le récepteur Dendritic Cell-Specific Intracellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-Integrin (DC-SIGN), est comme l'indique son nom un récepteur transmembranaire des cellules dendritiques. Ce dernier est capable de lier et d'internaliser les IgA sécrétoires³⁰. Les IgA2 ont montré une plus grande affinité pour ce récepteur en comparaison aux IgA1³¹.

Dectin-1 est un récepteur appartenant à la famille des lectines de type C. Il est exprimé par des cellules myéloïdes telles que les macrophages, les DC ou encore les neutrophiles. Il est également exprimé au pôle apical des cellules M qui tapissent l'intestin, où il y joue un rôle indispensable dans la transcytose inverse des IgA2 sécrétoires³².

Le récepteur à la transferrine (CD71) est d'abord impliqué dans l'internalisation par endocytose du fer lié à la transferrine. Il est exprimé par de très nombreuses cellules, dont les cellules mésangiales. Sa faculté d'interaction avec les IgA1 a pour la première fois été mise en évidence dans l'immunopathologie de la néphropathie à IgA par l'observation d'une colocalisation de dépôts d'IgA et de ce récepteur présent à la surface des cellules mésangiales³³.

À travers ces différentes liaisons Fc-FcR, les Ac sont en mesure d'agir indirectement en induisant des effets protecteurs ou pathogènes à long terme *via* l'activation ou le recrutement des différents composants cellulaires du SI, et en particulier des cellules de l'immunité innée.

IgM :

Le format pentamérique de cette classe d'Ig augmente considérablement la valence (10) en comparaison avec les autres isotypes (2 à 4 maximum). Cette spécificité donne un avantage certain quant au nombre possible d'antigènes fixés. Cela étant dit en pratique, une IgM ne peut fixer plus de cinq molécules à la fois pour des raisons d'encombrement stérique. Elle demeure néanmoins la classe la plus efficace pour la neutralisation de virus et l'agglutination de bactéries.

De plus, elle présente également un haut potentiel d'activation de la cascade du complément, induisant ainsi le phénomène CDC³⁴.

Malgré tout la hausse importante d'IgM circulantes n'est généralement observée que lors de la phase précoce de la réponse B, ce qui signifie que les cellules dont elles sont issues n'ont pas

encore subi de modifications secondaires de leurs gènes d'Ig. En général, les IgM ne sont donc pas les Ac les plus affins disponibles en circulation.

En tant que composants précoces des réponses immunitaires primaires, leur présence isolée est classiquement le signe d'une infection récente (même si des circonstances récentes comme la pandémie COVID ont montré que les Ig « switchées » pouvaient elles-aussi s'élever rapidement lors d'une réponse primaire).

IgG :

Comme énoncé précédemment, les IgG sont divisées en 4 sous-classes (IgG1, 2, 3 et 4). Bien que très proches structurellement, leurs propriétés respectives diffèrent.

Les IgG1 et IgG3 sont toutes deux très efficaces pour se fixer à l'ensemble des FcγR et ont donc des fonctions effectrices puissantes (particulièrement les IgG3). Elles interviennent dans le cas de réponse contre des antigènes de nature protéique. La différence majeure entre ces dernières réside dans la faible durée de demi-vie des IgG3 (8 jours) en comparaison avec les IgG1 (21 jours)¹⁹.

Les IgG2 et IgG4 ne sont généralement produits que lorsque la réponse immunitaire ne nécessite pas le recours aux effecteurs immunitaires. Les IgG2 sont essentiellement impliquées dans la réponse contre les antigènes bactériens et en particulier les capsules de nature polysaccharidique. Les IgG4 sont quant à elles retrouvées dans le contexte d'une exposition répétée à un Ag³⁵ comme par exemple dans le cas d'infection parasitaire ou lors de la désensibilisation allergique.

L'unique point commun de ces 4 sous-classes d'IgG se résume à leur capacité à traverser la barrière placentaire médiée par la liaison des IgG au FcRn³⁶. Le FcRn protège non seulement de la dégradation les IgG, mais est également impliqué dans le recyclage de ces dernières (discuté précédemment)³⁷.

IgA :

Les IgA ont une demi-vie très courte (6 jours). Elles sont excrétées dans l'ensemble des liquides biologiques : salive, sucs digestifs, sécrétions bronchiques, larmes, colostrum, etc. Elles participent à l'homéostasie des muqueuses en éliminant les pathogènes tels que les bactéries et les virus. Les IgA circulantes sont produites sous forme monomérique (IgAm) par les plasmocytes issus de la moelle osseuse ou des organes lymphoïdes secondaires. A contrario, les plasmocytes des muqueuses notamment intestinales expriment la chaîne J et sécrètent des IgA dimériques (dIgA) et/ou polymériques (IgAp).

Les IgA dimériques et polymériques peuvent ensuite être prises en charge par le récepteur pIgR, et être relarguées après transcytose au sein de la lumière intestinale en tant qu'IgA sécrétatoires (IgAs) dans le but de faciliter leur localisation préférentielle dans la couche de mucus qui tapisse la surface des cellules et d'y être protégées de la protéolyse (demi-vie allongée).

Les humains, comme tous les « primates de l'ancien monde » (tels qu'aussi chimpanzés, gorilles, et gibbons), possèdent 2 sous-classes d'IgA (IgA1 et IgA2) du fait d'une duplication ancienne du locus IgH³⁸. La proportion de ces 2 sous-classes fluctue en fonction de leur localisation : dans le sérum les IgA1 prédominent face aux IgA2 (*ratio* de 9 : 1), contrairement aux tissus muqueux où il semble y avoir un équilibre. Une répartition différentielle existe entre les deux sous-classes au sein des tissus muqueux. Les IgA1 sont localisées au niveau de la muqueuse nasale, bronchique, gastrique et pour finir au niveau de l'intestin grêle. Les IgA2 sont quant à elles principalement localisées dans le colon³⁹.

Les fonctions de ces deux sous-classes d'IgA semblent au moins en partie différentes. Elles semblent en particulier se lier à des composants différents du microbiote⁴⁰. Récemment, les IgA2 ont été montrées comme les plus pro-inflammatoires en termes d'induction de la formation de « *Neutrophil Extracellular Trap* » (NET) par les neutrophiles et de déclenchement de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Dans cette étude, les IgA1 ont montré des fonctions effectrices moins intenses, qui semblaient inhibées par la forte sialylation des glycannes associés à l'IgA1⁴¹. Ainsi les IgA1 hyposialylées voient leurs propriétés pro-inflammatoires augmenter. Les IgA1 diffèrent en effet des IgA2 par la présence d'une plus longue région charnière « *hinge* », porteuse de O-glycosylations abondantes, à la jonction des domaines CH1 et CH2. Les IgA2 ont également été décrites pour leurs propriétés neutralisantes plus importantes que celles des IgA1⁴².

Outre leurs fonctions effectrices, les IgA humaines ont également démontré des capacités à effectuer un « *sampling* » des antigènes présents au niveau des muqueuses digestives, ces antigènes étant alors importés grâce à une transcytose inverse à travers la muqueuse, et transportés jusqu'aux tissus lymphoïdes sous-muqueux. Ce *sampling* des antigènes muqueux constitue une fonction spécifique aux IgA2⁴³. Une étude récente a confirmé la valeur différente des IgA1 et des IgA2 dans des contextes pathologiques de maladies inflammatoires de l'intestin : les IgA1 se lient en effet plutôt à des bactéries du microbiote ayant un rôle bénéfique dans l'évolution de la maladie⁴⁴. La dualité des IgA, à la fois anti-inflammatoires et plutôt tolérogènes vis-à-vis des antigènes alimentaires ou du microbiote normal, mais aussi parfois pro-inflammatoires peut ainsi en partie être distribuée aux 2 sous-classes IgA1 et IgA2, la seconde étant la plus pro-inflammatoire. Cet aspect ne correspond cependant qu'à une part de

la réalité et il est clair qu'en de nombreuses occasions les IgA1 jouent aussi un rôle anti-infectieux protecteur, éventuellement pro-inflammatoire, voire pathogène au cours de pathologies dys-immunitaires comme la maladie de Berger (où des dépôts rénaux d'IgA1 finissent par détruire la fonction rénale) ou comme les dermatoses à dépôts linéaires d'IgA^{45,46}. Cette dualité a également été observé dans le cas de la cancérologie. Dans certains cas, les IgA peuvent induire un effet pro-tumoral en favorisant un environnement immunosuppresseur au sein des tumeurs. Dans ce cas de figure, les IgA vont, par l'intermédiaire des FcR, activer spécifiquement les cellules myéloïdes capables de produire des molécules anti-inflammatoires comme IL-10⁴⁷. Ainsi, les plasmocytes IgA+ infiltrant les tumeurs ont été associés à mauvais pronostic dans le cancer colorectal ou encore dans le mélanome^{48,49}.

En revanche, dans le cas particulier des cancers ovariens, les IgA sous forme polymérique ont démontré des propriétés anti-tumorales. Ceci s'explique en partie grâce à leur capacité à effectuer la transcytose en se liant au récepteur polyIgR présent en abondance à la surface des cellules cancéreuses ovariennes⁵⁰.

On notera d'ailleurs que chez la souris, où n'existe qu'une classe d'IgA, celle-ci révèle aussi une dualité de fonctions pro- et/ou anti-inflammatoires, et participe à un équilibre complexe entre immunité muqueuse et microbiote .

IgE :

Les IgE ont des propriétés de cytophilie très particulières et se fixent, notamment *via* le récepteur FcεRI, sur la membrane des basophiles et des mastocytes. Ces propriétés et les phénomènes d'ADCC ou de neutralisations qui en résultent leur confèrent une capacité de protection contre les parasites, les venins et les toxines, et antitumorale. Leur action est très violente et efficace, mais peut malheureusement se retourner contre l'hôte dans certaines circonstances, vis-à-vis d'Ag parasitaires brusquement relargués au cours d'une infection, ou vis-à-vis d'allergènes. Ainsi, elles sont mieux connues pour leur implication dans les réactions allergiques, potentiellement mortelles et subissent donc une régulation tout à fait particulière qu'on ne traitera pas ici.

Les IgD :

Leur forme majeure est celle du BCR IgD, surtout présent sur les cellules B au repos, dont la coexpression avec le BCR IgM semble jouer un rôle de limitation des réponses aux auto-antigènes⁵¹. En tant qu'anticorps sécrété de très faible abondance, leur rôle reste discuté. Elles sont surtout produites au niveau de plasmocytes muqueux (en particulier au niveau des

amygdales humaines), après un « switch » atypique, qui n'implique pas le superenhancer 3'RR du locus IgH, mais fait intervenir des jonctions par alternate end-joining et la protéine Rad52^{52,53}. On leur prête un rôle dans l'immunité anti-infectieuse au niveau des muqueuses et elles semblent avoir une cytophilie vis-à-vis des polynucléaires basophiles, leur conférant aussi un rôle immunomodulateur et pro-TH2⁵⁴.

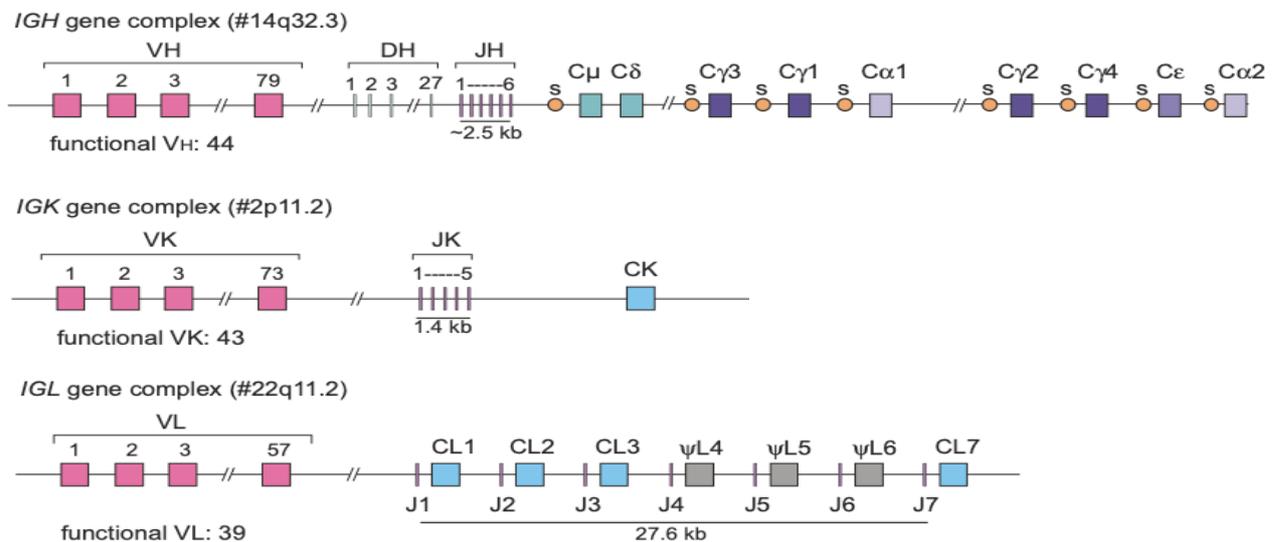
(3) Organisation des gènes d'Ig

Le BCR n'est autre qu'une Ig de surface issue du réarrangement des gènes des immunoglobulines au sein des LB. Ces gènes sont localisés sur 3 chromosomes différents. Chez l'Homme, les gènes des chaînes lourdes (C μ , C α 1, C α 2, C γ 1, C γ 2, C γ 3, C γ 4, C δ et C ϵ) se situent sur le chromosome 14 au locus *IGH*, quant aux chaînes légères κ et λ , elles se situent respectivement sur le chromosome 2 (*IGK*) et 22 (*IGL*).

Ces gènes sont organisés en 4 groupes en fonction des différents segments codés : V (Variable), D (Diversity), J (Joining) et C (constant). Ils sont présents en de multiples copies dans le chromosome. Les chaînes lourdes dénombrent 79 segments V_H, 27 segments D_H et 6 segments J_H alors que les chaînes légères recensent aux loci *IGK* et *IGL* 73 segments V_K, 5 segments J_K et 57 segments V_L, 7 segments J_L respectivement. Les segments D sont absents des gènes des chaînes légères⁵⁵. (

Figure 7)

Figure 7 : Organisation des gènes d'Ig humaines



Représentation schématique des trois loci contenant les gènes d'immunoglobulines *IGH*, *IGK* et *IGL*. Tous les loci comportent un nombre spécifique de segments Variable (V), de segments Joining (J) et de segments Constant (C) mais seul le locus *IGH* possède des segments Diversity (D). Les segments C du locus *IGH* sont tous, exception faite de C δ , précédés d'une région Switch (S).

Adaptée de la publication « Population matched (pm) germline allelic variants of immunoglobulin (IG) loci: Relevance in infectious diseases and vaccination studies in human populations »⁵⁶.

b) Mécanismes des recombinaisons V(D)J au cours de la différenciation B

Le réarrangement des chaînes lourdes et légères se fait de manière séquentielle au cours de la différenciation des lymphocytes B. Les recombinaisons V(D)J débutent au niveau du locus *IGH* lorsque les cellules B sont au stade pro-B. À ce stade les enzymes RAG1 et RAG2 (codées par les gènes *RAG*) s'expriment pour induire des cassures double brin grâce à leur activité endonucléase⁵⁷. Elles reconnaissent spécifiquement des séquences signal hautement conservées « Recombinaison signal sequences » (RSS) qui flanquent les différents segments V, D et J. La fixation de ces enzymes aux séquences RSS induit une cassure double brin entre la séquence codante et les RSS, libérant des extrémités signal « à bouts francs » et des extrémités « codantes » refermées en « épingles à cheveu », ces dernières étant ensuite ouvertes par l'enzyme Artemis^{58,59}. Ces extrémités recruteront ensuite les protéines (notamment Ku70/80 et DNA-PKcs) impliquées dans le système de réparation « non-homologous end joining » (NHEJ)⁶⁰. Cette réparation s'accompagne de petites délétions ou de l'ajout de petites séquences palindromiques (liées à l'ouverture asymétrique des structures en épingles à cheveux) nommées « Nucléotides P », ce qui accroît la diversité de la région CDR3 des anticorps⁶¹. S'ajoute à ce mécanisme une dernière étape impliquant l'intervention de la Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) qui est capable d'incorporer des nucléotides (insertions « N ») aux extrémités 3'^{62,63}. L'ensemble de ces modifications augmente considérablement la diversité des régions CDR3 d'un anticorps (diversité jonctionnelle). Cependant, il arrive fréquemment que ces réarrangements et modifications aléatoires soient non-productifs du fait de la création d'un codon stop ou d'un décalage du cadre de lecture ou encore de la création d'une séquence VDJ inadaptée à la réponse, conduisant à l'élimination des cellules concernées^{64,65}.

La position des RSS est spécifique à chaque groupe, soit 3' pour V, 5' pour J et 3' ainsi que 5' pour D. Les RSS sont formés d'un nonamère (ACAAAACC) et d'un heptamère (CACAGTG) séparés par une séquence espaceur « spacer » dont la longueur et la composition varient entre 12 et 23 pb. La longueur et le positionnement de ces séquences sont directement impliqués dans l'association préférentielle des différents fragments puisqu'ils suivent la règle « 12/23 »⁶⁶. Autrement dit les segments V et J ne peuvent interagir qu'avec les segments D, ce qui signifie que les segments V et J sont dans l'incapacité de se lier. Ces interactions se réalisent au hasard

puisque'il est possible d'associer n'importe quel segment avec un autre, du moment que cela respecte la règle 12/23.

Toutefois, elles se produisent selon un ordre bien défini au cours de la différenciation des LB⁶⁷ (**Figure 8**).

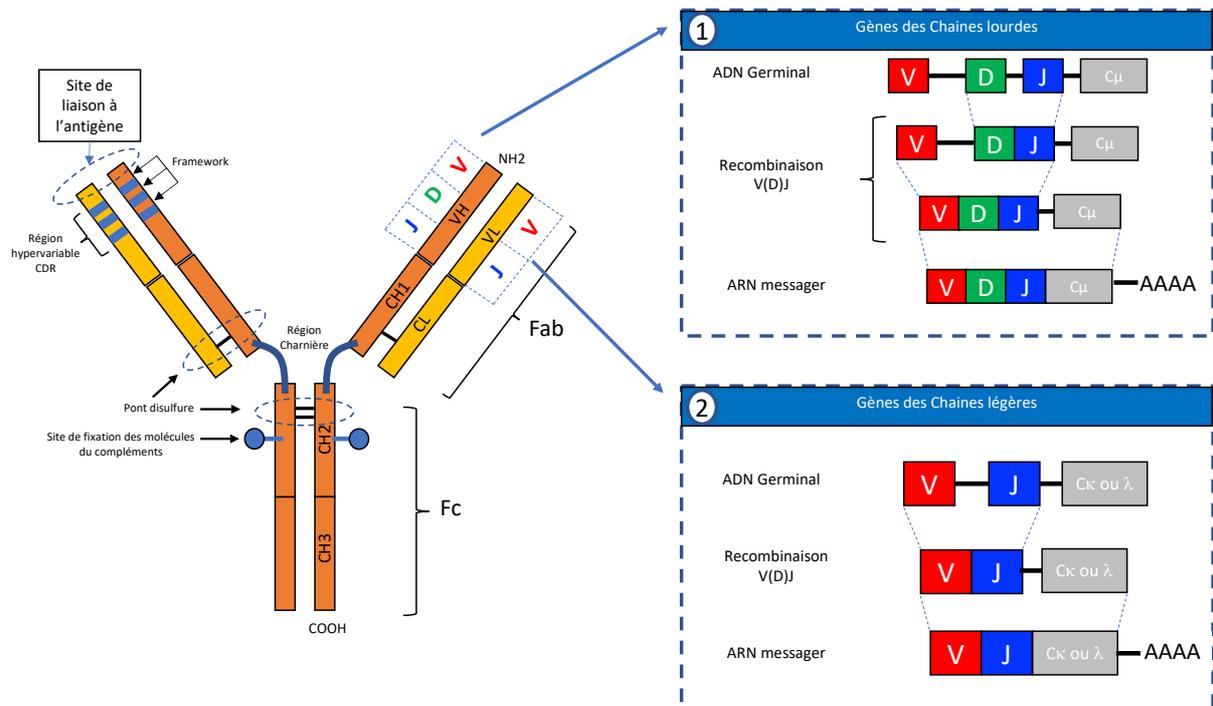


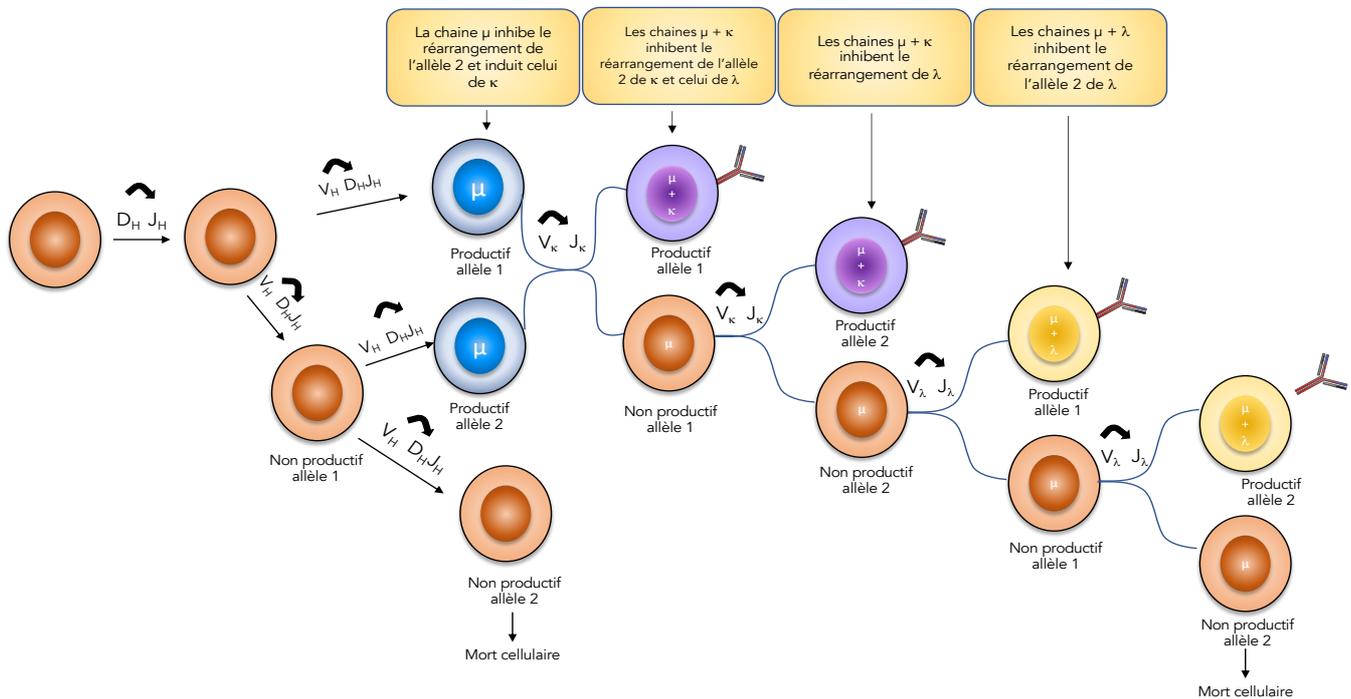
Figure 8 : Recombinaison séquentielle V(D)J des gènes d'immunoglobulines

Les segments Variable (V), Diversity (D) et Joining (J) codent pour la partie variable d'un anticorps. 1) Le réarrangement des gènes d'Ig commence par les gènes de la chaîne lourde. Une première recombinaison s'opère aléatoirement entre un segment D et J. Puis une seconde recombinaison s'effectue entre les gènes DJ réarrangés et un gène V. S'ensuit une recombinaison du V(D)J réarrangé avec le gène constant μ . L'ARN messenger obtenu sera par la suite transcrit pour produire les chaînes lourdes des Ac.

2) Si le réarrangement des gènes des chaînes lourdes est productif, alors les gènes de la chaînes légères se recombinent en commençant par une recombinaison d'un segment V et d'un J. Le réarrangement se poursuit par une recombinaison du VJ réarrangé avec un segment constant Kappa (κ) ou Lambda (λ). L'ARN messenger obtenu sera par la suite transcrit pour produire les chaînes légères des Ac.

La proximité (environ 50 kb) des segments D_H et J_H dans le locus permet une recombinaison bi-allélique plus rapide ce qui explique qu'elle s'opère en premier durant stade pro-B précoce. En revanche, le segment V se situe à 2,5Mb de distance dans le locus *IGH* et 3Mb dans le locus *IGK*, ce qui signifie qu'une recombinaison des segments V_H aux segments DJ_H n'est possible que si l'entièreté du locus subit une contraction de l'acide désoxyribonucléique (ADN) en formant des boucles afin de les juxtaposer⁶⁸. Cette recombinaison mono-allélique est soumise à l'exclusion allélique ce qui signifie qu'un seul des allèles est réarrangé à la fois (**Figure 9**).

Si le réarrangement sur le premier allèle est non-productif alors un deuxième réarrangement s'effectue sur le second allèle. Ce mécanisme est étroitement lié à la régulation (surexpression



ou répression) de l'expression des enzymes RAG1 et RAG2 au cours des recombinaisons V(D)J, le but étant d'empêcher l'expression de différentes chaînes lourdes ou légères de manière concomitante. Ce phénomène d'exclusion allélique assure ainsi l'expression d'un BCR unique à la surface des cellules.

Figure 9 : Exclusion allélique

Représentation schématique de l'exclusion allélique lors des réarrangements des gènes d'Ig des cellules B au cours de leur développement. Le réarrangement V_H sur DJ_H préalablement associés s'exécute sur un premier allèle. S'il est non productif, le deuxième allèle est alors réarrangé. Si jamais aucun de ces deux allèles ne présentent de réarrangement productif dans ce cas la cellule entre en apoptose. Si toutefois le réarrangement est productif alors le même processus est observé pour les réarrangements des chaînes légères, à la différence qu'un réarrangement non productif κ n'entraîne pas d'apoptose mais induit plutôt le réarrangement des gènes λ . En revanche, si le réarrangement des gènes λ ne sont toujours pas productifs alors la cellule entre en apoptose. Figure partiellement adaptée de la publication « Regulation of the assembly and expression of Variable-Region Genes »⁶⁹

Ces réarrangements, s'ils sont productifs, donnent lieu à l'expression d'une chaîne lourde μ au stade pro-B tardif. L'entrée dans le stade « large pre-B » est associée à l'expression d'une pseudo-chaîne légère formée de l'assemblage des deux protéines $V_{préB}$ et $\lambda 5$ (ou λ -like chez l'Homme). L'appariement de cette pseudo-chaîne et de la chaîne μ ainsi que la signalisation portée par les protéines $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ permettent au stade « large pre-B » l'expression d'un pré-

BCR⁷⁰. Ce dernier joue un rôle important dans la tolérance et la survie de ces cellules⁷¹. De cette signalisation résulte l'apparition du stade « small pre-B » issu de cycles successifs de prolifération. Ce n'est qu'à cette étape que les enzymes RAG1 et RAG2 sont de nouveau exprimées pour opérer le réarrangement des chaînes légères. Ce dernier commence toujours par le réarrangement des chaînes κ sur un allèle, s'il est non productif ou bien auto-réactif un deuxième est alors effectué sur le second allèle (selon le phénomène d'exclusion allélique énoncé précédemment). Si toutefois cela ne suffit pas alors les chaînes λ sont réarrangées selon le même procédé^{67,72}. Il arrive malgré tout que ces réarrangements ne soient pas productifs ou demeurent auto-réactifs ce que provoque l'entrée en apoptose de ces cellules.

L'expression de chaînes légères fonctionnelles ayant la capacité de s'apparier aux chaînes lourdes permet l'expression d'un BCR complet à la surface de la membrane des cellules B dites immatures. Ce BCR nouvellement formé est un marqueur distinctif entre les cellules B immatures et les cellules précurseurs B. Son expression induit un signal de répression de l'expression des enzymes RAG1 et RAG2 jouant ainsi le rôle de rétrocontrôle. Il est également impliqué dans la sélection négative des cellules B auto-réactives dans la moelle osseuse. Dans le cas où la signalisation induite par le BCR ne semble pas correcte (suractivation ou pas de signal) les cellules ne quittent pas la moelle osseuse. Ce point de contrôle indispensable permet en cas de BCR auto-réactif de provoquer soit l'anergie, soit l'apoptose, soit « l'édition » du récepteur^{73,74}. Cette dernière consiste en une modification de la chaîne légère toujours selon le phénomène d'exclusion allélique. Si celle-ci ne permet pas aux cellules B de s'affranchir de la cause de leur auto-réactivité alors elles seront vouées à disparaître en subissant une apoptose ou bien seront inactivées par processus d'anergie^{75,76}.

Le BCR s'exprime toujours en premier sous la forme d'une IgM de surface, ceci est notamment dû à la proximité des segments J et du gène μ situé en aval de ces segments. Ce phénomène est imputé au mécanisme d'épissage de l'acide ribonucléique (ARN) et non aux recombinaisons V(D)J.

Les recombinaisons V(D)J octroient un premier niveau de diversité des anticorps grâce au nombre élevé (de 10^5 à 10^6) de combinaisons possibles. De manière intéressante, deux mécanismes nommés l'hypermutation somatique (SHM) et la commutation de classe isotypique « class-switch recombination » (CSR) ont été mis en évidence pour non seulement accroître la diversité des anticorps mais également les rendre plus affins.

c) Mécanismes d'amélioration de l'affinité et de l'activité effectrice des anticorps

Les mécanismes sous-tendant l'amélioration de l'affinité des anticorps sont directement liés aux propriétés de l'enzyme « activation induced cytidine deaminase » (AID)⁷⁷. Cette enzyme est capable de transformer une désoxycytidine en une désoxyuridine par désamination (C→U). Exprimée principalement par les cellules B activées, elle est retrouvée dans les centres germinatifs mais également dans quelques cellules B extrafolliculaires^{78,79}. Spécifique de la lignée B, elle est indispensable pour la maturation d'affinité des anticorps. Elle cible préférentiellement des motifs WRCY (W =A/T, R=A/G, Y=C/T) aussi nommés « hotspot ». Son activité désaminase se concentre sur la région V des Ig et la région switch (S) dans le locus des Ig entraînant l'activation de mécanismes tels que la SHM et la CSR respectivement. La nature des éléments qui permet de focaliser l'action d'AID sur les gènes d'Ig (et sur un panel d'autres gènes subissant des attaques « off-target ») reste l'objet d'une recherche intense. La transcription joue un rôle majeur et il existe notamment un « domaine d'hypermutation » de 1 ou 2 kilobases accessible à la SHM en aval des promoteurs d'Ig⁸⁰. De multiples autres éléments interviennent dans la régulation des « attaques » simple brin d'AID ou des cassures double brin éventuellement consécutives à ces attaques, tels que les marques chromatiniennes, la transcription convergente, les repliements du locus IgH médiés par son superenhancer 3'RR, les phénomènes de « loop extrusion », la survenue de R-loops au niveau de séquences répétitives et/ou riches en structures de type G-quadruplexes, le processing des ARN non-codants par la machinerie de l'exosome, qui régulent l'accès d'AID à ses gènes cibles. Nous ne les détaillerons pas ici même s'il s'agit d'un champ de recherches particulièrement bouillonnant

81-84

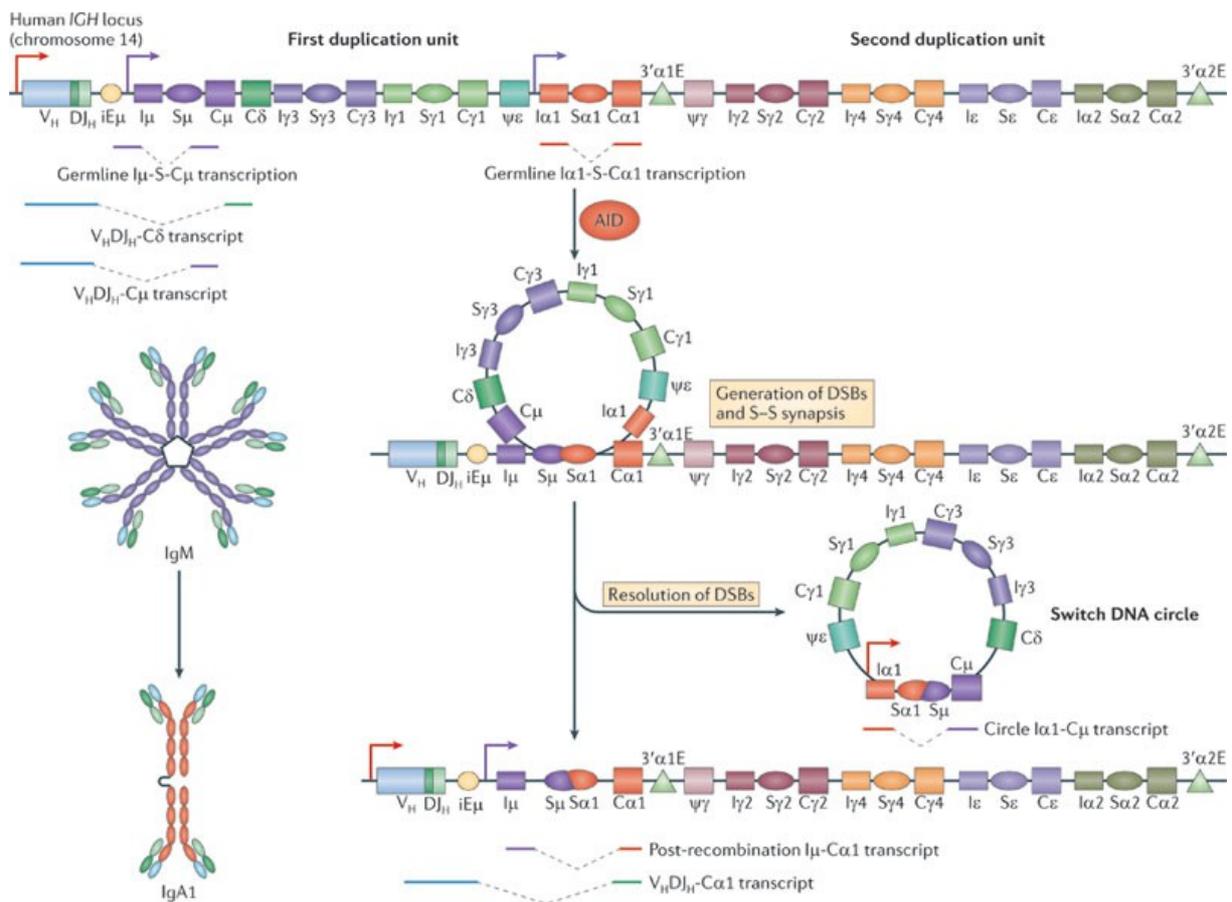
Hypermutation somatique (SHM) et commutation de classe (CSR)

L'hypermutation somatique vise à améliorer l'affinité d'un anticorps en induisant des mutations aléatoires au sein des régions CDR de la partie variable des Ig. Elle intervient lors de la prolifération des cellules B, et principalement lors de la formation de GC, donc au cours de réponses immunitaires T-dépendantes. La fréquence des mutations des gènes d'Ig, très élevée en comparaison de ce qu'elle est sur l'ensemble du génome, est d'une mutation toutes les 1000 pb dans les cellules en division⁸⁵. En aval de l'attaque d'AID au niveau de cytosines déaminées en uraciles surviennent divers processus de réparation que nous ne détaillerons pas ici. Spécifiquement au niveau des gènes d'Ig, l'activation de ces mécanismes de réparation se fait

de façon « *error-prone* » (alors que pour la majorité des autres gènes transcrits dans les cellules B, les attaques accidentelles d'AID sont résolues en règle de façon « *error-free* »). Les mécanismes qui favorisent la réparation « *error-prone* » au niveau des gènes d'Ig peuvent survenir à l'issue de deux grands schémas de réparation, l'un reposant sur le « basic excision repair » (BER) (retirant les bases anormales de l'ADN, comme l'uracile, pour laisser des sites abasiques) et l'autre sur le « *mismatch repair* » (MMR). Par ailleurs, la conversion d'une cytosine en uracile peut également dans le cas de la SHM, être fixée par la réplication de l'ADN, entraînant alors une transition de C à T⁸⁶.

Les attaques des cytosines par AID, lorsqu'elles sont multiples au niveau de sites proches, et lorsqu'elles touchent des régions cibles dédiées, peuvent aussi être à l'origine de cassures double brins et de recombinaison. L'organisation du locus IgH est telle, qu'elle nécessite l'intervention de recombinaisons, capables de modifier l'organisation génomique du locus, afin d'exprimer successivement l'ensemble des classes d'Ig. Ce mécanisme répond au nom de commutation de classe isotypique aussi appelé CSR. Il s'établit dans les cellules B activées avant la différenciation en centre germinatif (abordée ultérieurement)^{87,88,89}. Comme pour la SHM, la CSR est dépendante de l'AID, qui dans ce cas précis cible les régions switch (S) présentes en amont de chaque gène C_H (exception faite de C_δ)^{90,91}. Le ciblage préférentiel des régions S par l'enzyme AID, est notamment dû à l'abondance de motifs WRC dans leur séquence. Il s'ensuit une cassure double brin permettant l'excision de la portion d'ADN comprise entre les deux régions S. En parallèle, une recombinaison entre les deux régions S clivées (l'une donneuse et l'autre acceptrice) est observée. Ce phénomène permet une juxtaposition du VDJ réarrangé et du groupe d'exon C_H situé en aval de la région S acceptrice. La réparation de la cassure double brin est effectuée par des mécanismes NHEJ dit « classique » ou « alternatif »⁹². Cette réaction en chaîne laisse l'opportunité aux IgG, IgA ou encore IgE de s'exprimer à la place des IgM (**Figure 10**). Cependant, il n'est que rarement possible de revenir en arrière, car la commutation de classe est définitive, sauf en cas de recombinaison inter-allélique. A ce sujet, on notera que si le schéma principal de CSR correspond à des recombinaisons intra-chromosomiques (*cis*-CSR), ces recombinaisons touchent le plus souvent les deux allèles, et dans environ 10% des cas, ces deux allèles peuvent se livrer à une sorte de translocation réciproque, qui définit alors un processus de CSR inter-allélique (*trans*-CSR)^{93,94}. L'intérêt fonctionnel majeur du mécanisme de CSR réside dans l'évolution des propriétés effectrices de l'anticorps produit, sans toutefois impacter la spécificité de ce dernier.

Le choix de l'isotype est basé sur la réception, par les cellules B, de signaux extérieurs comme les cytokines ou encore l'interaction avec les cellules T⁹⁵. Ces signaux agissent en particulier en stimulant la transcription germinale des gènes constants ciblés pour le switch, ces transcrits germinaux constituant alors à la fois des marqueurs d'accessibilité d'un gène donné, et des éléments mécanistiques favorisant le recrutement local d'AID, la formation de R-loops et la synapse entre des régions switch simultanément ciblées préalablement à leur recombinaison^{84,91,96}.



Nature Reviews | Immunology

Figure 10 : Mécanisme de commutation de classe isotypique

Exemple schématique d'une commutation de classe isotypique entre une IgM et une IgA1. La coupure double brin par l'enzyme AID au sein des régions Switch (S_μ et $S_{\alpha 1}$), induit un rapprochement de ces régions afin d'être liguées via les systèmes de réparation intrinsèque de la cellule. Ainsi le VDJ réarrangé préalablement est suivi du segment contenant $\alpha 1$ donnant lieu à une transcription d'un Ac complet sous forme IgA1. Quant à l'autre portion de gène initialement présente dans la lignée germinale, elle est éliminée en formant un ADN sous forme circulaire.

Figure issue de la publication «Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond»⁹⁷

3. *Maturation des lymphocytes B dépendante des antigènes*

a) *Cellules B transitionnelles*

Constituant un pont entre les cellules B immatures et les cellules B naïves, les cellules B transitionnelles caractérisées par le phénotypage CD24^{hi}/CD38^{hi} se déclinent en sous-types successifs T1, T2 et T3. Elles se distinguent entre elles par l'expression de marqueurs phénotypiques, de plus ou moins forte intensité, en fonction de la population⁹⁸. Ces cellules sont retrouvées aussi bien dans la moelle osseuse que dans le sang périphérique ou encore dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, amygdale, ganglions lymphatiques et « gut-associated lymphoid tissue » (GALT))^{98,99,100,101}. Certaines cellules B transitionnelles démontrent un potentiel régulateur proche des cellules B régulatrices dû à la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Cette dernière est en partie responsable *in vitro* d'une diminution de productions des cytokines pro-inflammatoires *via* une inhibition de la différenciation des lymphocytes T CD4+ helper 1 (LTh1)¹⁰². En comparaison des autres sous-populations de cellules B, ces cellules transitionnelles présentent une baisse d'expression de « tumor necrosis factors α » (TFN α) et une certaine capacité anti-inflammatoire¹⁰³.

b) *Cellules B de la zone marginale*

La différenciation des cellules B transitionnelles en cellules B de la MZ semble corrélée avec un signal BCR faible couplé à un signal *via* le récepteur Notch 2.

Les cellules B de la MZ se logent dans les organes lymphoïdes secondaires (principalement rate, mais aussi ganglion lymphoïde, amygdale, ...) ^{104,105}. Elles sont volontiers spécifiques d'antigènes polysaccharidiques et jouent ainsi un rôle très important dans l'immunité contre des germes encapsulés. La reconnaissance de motifs bactériens communs et d'auto-antigènes par ces cellules se produit de façon peu spécifique et T-indépendante. Ainsi, elles sont plus proches de l'immunité innée que de l'immunité adaptative. Toutefois, elles ont le potentiel pour subir la CSR grâce à la fixation de « B-cell activating factor » (BAFF) sur leur récepteur « transmembrane activator and calcium modulator and cytophilin ligand interactor » (TACI)¹⁰⁶. Chez l'Homme, des cellules B de phénotype MZ, CD27+ IgM+ sont présentes non seulement au niveau de la rate mais aussi au niveau du sang périphérique. Une autre de leur particularité semble être d'avoir accumulée des mutations préalablement à tout contact avec l'antigène (même si une éventuelle origine post-GC de certaines de ces cellules de phénotype MZ reste discutée !)¹⁰⁷⁻¹¹⁰.

Indépendamment des LT, les cellules de la MZ peuvent s'activer pour se différencier rapidement en plasmocytes à courte durée de vie (discuté ultérieurement), essentiellement IgM⁺¹¹¹. De cette manière, ces cellules constituent une première ligne de défense en attendant l'apparition d'une réponse plus spécifique fournie par les cellules B de la zone folliculaire.

c) Cellules B de la zone folliculaire

Les cellules B présentes dans la zone folliculaire (FO) des follicules primaires sont essentiellement sous forme naïve. Lorsqu'une cellule B naïve reconnaît un Ag exogène, elle s'active et migre vers une zone d'interaction LT-LB. Deux réactions peuvent alors se produire, soit les cellules B s'activent et se différencient immédiatement en plasmocytes à courte durée de vie médiant une réponse humorale extrafolliculaire rapide, soit elles forment des follicules secondaires dans lesquels se retrouvent des structures appelées centres germinatifs ou « germinal center » (GC)¹¹². L'activation des cellules B FO s'y poursuit avec la réception de signaux issus de LT CD4⁺ antigène-spécifiques avec un profil Tfh.

d) Centres germinatifs

La maturation d'affinité des cellules B prend place dans les GC notamment par le biais de la SHM et d'une sélection clonale. Ces structures n'ont pas vocation à persister, bien qu'elles puissent être détectées durant plusieurs semaines voire plusieurs mois, en fonction du temps nécessaire à l'élimination de l'antigène responsable de leur formation. Les GC sont divisés en deux grandes parties : la zone sombre et la zone claire ; ainsi nommées en raison de leur apparence en microscopie (*ratio* noyau/cytoplasme).

Au cours d'une infection ou bien d'une immunisation, les cellules B activées par un antigène, au travers d'un signal BCR, augmentent l'expression du récepteur de chimiokine CCR7. L'expression de ligands spécifiques tels que CCL19 et CCL21 dans la zone LT, entraîne la migration des cellules B activées à la bordure du follicule, dans la zone d'interaction entre les LB et les LT CD4⁺ helper¹¹³. La présentation d'un fragment peptidique antigénique par les LB *via* le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II aux cellules T CD4⁺ helper (elles-mêmes éduquées par des cellules dendritiques), leur octroie un signal de co-stimulation et de survie^{114,113}. En découle la prolifération massive des cellules B conduisant à la formation de GC. A noter tout de même qu'il est possible qu'une partie de ces cellules n'entre pas dans une

réponse GC, mais se différencie immédiatement en plasmocytes à courte durée de vie ou bien en cellules B mémoires^{87,115}.

Les cellules B de la zone sombre, nommées centroblastes, sont de taille large et possèdent une très haute activité proliférative. Ce compartiment est le lieu où se produit, d'une part une division rapide (en moyenne les B du GC subissent 3 cycles cellulaires) des cellules B activées avec un temps très court de cycle cellulaire (4h à 6h)¹¹⁶. D'autre part, ce lieu est également celui où la SHM prend place, participant à la maturation d'affinité des anticorps.

La migration (par une répression de CXCR4 dans la zone sombre et surexpression de CXCR5 dans la zone claire) des centroblastes dans la zone claire induit un changement phénotypique conduisant à une perte du profil blastique qui se rapproche d'une forme quiescente appelée centrocyte.

La sélection positive se situe au cœur de cette zone et fait intervenir plusieurs types cellulaires comme les LT CD8+ impliqués d'une part dans l'élimination de cellules du GC infectées par les virus¹¹⁷ et d'autre part dans l'éviction de l'émergence de cellules cancéreuses¹¹⁸.

De manière plus sporadique, certaines cellules dendritiques conventionnelles et macrophages spécialisées dans la phagocytose y sont retrouvées à l'interface des deux zones afin d'éliminer les très nombreuses cellules B non sélectionnées¹¹⁹. On y retrouve également les deux grands types cellulaires indispensables à la sélection positive : FDC spécialisées dans la présentation prolongée d'Ag et de complexes immuns à leur surface et les LTfh CD4+.

Les cellules B, dont les BCR ont été mutés au sein de la zone sombre par SHM, vont former des complexes immuns avec les FDC qui assurent la présentation d'antigène. En plus de servir de réservoirs d'Ag stockés sur le long terme, les FDC ont un rôle de supportrices, exprimant des récepteurs de surface (« InterCellular Adhesion Molecule » (ICAM1), « vascular cell adhesion molecule » (VCAM), CD21, récepteur du complément pouvant fixer des complexes immuns, Fc α/μ ...) et produisant des médiateurs capables d'attirer à leur contact et de soutenir l'activation des cellules lymphoïdes du GC, telle la cytokine BAFF (signal de survie B)¹²⁰ ou encore la chimiokine CXCL13 impliquée dans le recrutement des cellules B CXCR5+ mais également des LTfh CXCR5+ permettant de ce fait leur rapprochement¹²¹.

Le signal induit par l'interaction entre les FDC et les cellules B *via* le BCR est important pour une maturation optimale d'affinité. Il provoque l'internalisation par les cellules B de l'antigène présenté, qui pourront à leur tour présenter un peptide antigénique *via* leur CMH II aux Tfh

CD4⁺ ayant un TCR spécifique de l'antigène. Ces derniers sont particulièrement importants puisqu'ils régulent la progression des cellules dans le GC. En effet, ce nouveau contact prodigue aux cellules B des signaux de survie comme l'IL4 (qui induit l'expression de Bcl-2) ainsi que des signaux de prolifération (CD40L) et différenciation (IL21)^{122,123}.

Ne seront sélectionnées pour s'expandre uniquement les cellules présentant un BCR de haute spécificité, les autres seront, elles, éliminées par apoptose. Cette sélection positive T-dépendante n'est possible que parce qu'il existe une compétition entre les différents clones obtenus. En d'autres termes, les cellules de moindre affinité sont privées de signaux de prolifération et la forte propension à l'apoptose des cellules du GC s'accompagne donc de leur élimination. Dans certains cas, la compétition n'est pas très élevée, voire inexistante, ce qui conduit à l'apparition d'un clone peu spécifique pour un antigène donné¹²⁴.

Les centrocytes peuvent à l'issue de cette sélection positive se différencier en plasmocytes ou en cellules B mémoires, ou bien ils peuvent à nouveau entrer dans la zone sombre pour y subir de nouvelles mutations et proliférer. Les cycles multiples de sélection et mutation sont par exemple à l'origine de l'obtention de plasmocytes de très haute affinité. Le choix par les cellules B du GC d'une différenciation en plasmocytes ou cellules B mémoires n'est pas encore tout à fait élucidé. Des travaux semblent démontrer que les cellules ayant une très forte affinité pour un antigène se différencient plus facilement en plasmocytes alors que les cellules mémoires restent volontiers d'affinité intermédiaire et semblent garder un potentiel ultérieur de SHM pour de futurs challenges antigéniques¹¹².

4. Stade ultime de différenciation

a) B mémoires

Le nombre quasi-infini d'Ag qu'un organisme puisse rencontrer au cours de sa vie n'empêche bien sûr en rien la probabilité de rencontres multiples avec l'un d'entre eux. Ainsi, l'un des fondements de notre immunité repose sur l'aptitude de notre système immunitaire à développer une mémoire, favorisant ainsi des réponses plus rapides et intenses à l'occasion de ces nouvelles rencontres avec un Ag connu. La neutralisation ou l'élimination plus rapide de l'antigène ou du pathogène indésirable est ainsi observée, ce qui constitue une base de l'immunité vaccinale.

Cette mémoire est notamment portée par les cellules B mémoires qui présentent une espérance de vie plus longue que les cellules B naïves¹²⁵. En majorité, elles se distinguent chez l'Homme, au point de vue phénotypique, par l'expression du marqueur CD27 en plus du marqueur

CD19^{126,127}. Elles dérivent de l'activation puis de la prolifération de cellules B naïves et ce, au cœur de follicules formés eux-mêmes au sein des différents organes lymphoïdes secondaires. Majoritairement issues de la réaction GC, les cellules B mémoires semblent toutefois pouvoir être dans une certaine mesure générées aussi de manière GC-indépendante¹²⁸. La plupart des cellules B mémoires présentent des mutations importantes dans leurs gènes d'IgV et donc un BCR de meilleures affinités que les cellules B naïves¹²⁷.

Les organes lymphoïdes périphériques sont les principaux réservoirs des cellules B mémoires mais celles-ci sont également présentes dans la circulation sanguine sous forme quiescente. Elles jouent grâce à leur recirculation permanente un rôle de surveillance. À la moindre stimulation, elles prolifèrent et se différencient, et ce, de manière plus rapide que les cellules B naïves¹²⁹. Le destin des cellules B mémoires est conditionné par leur affinité pour leur cible. Une haute affinité induit une meilleure présentation aux cellules Tfh et donc une augmentation du temps d'interaction entre les deux types cellulaires. Des travaux ont montré qu'un contact prolongé conduit préférentiellement à une différenciation des cellules B mémoires de haute affinité à entrer dans une réaction de centre germinatif.¹³⁰

L'isotype de surface des cellules B mémoires semble également jouer un rôle déterminant dans le devenir de ces cellules. Dogan I *et al.* ont montré chez la souris que les cellules B mémoires IgM⁺ prolifèrent plus pour former un nouveau centre germinatif alors que les cellules B mémoires IgG⁺, ou IgA⁺ se différencient préférentiellement en plasmablastes (stade de différenciation précédent les plasmocytes)^{131,132}.

b) Plasmocytes

La mémoire immunitaire ne repose pas seulement sur les cellules B mémoires, mais également sur les cellules productrices d'anticorps appelées plasmocytes. Ils peuvent sécréter en moyenne 10⁸ molécules par heure et une cellule peut sécréter jusqu'à 2 ng par jour^{133,134,135,136}.

Avant d'atteindre ce stade, les plasmocytes passent par deux autres stades nommés pré-plasmablastes et plasmablastes. Il est possible de les distinguer à l'aide de marqueurs phénotypiques. Au stade pré-plasmablaste, ces cellules présentent seulement une diminution de l'expression du marqueur CD20. Tandis qu'au stade plasmablaste, elles commencent également à exprimer le CD38. Au dernier stade, les plasmocytes expriment en plus le marqueur CD138^{137,138}. Ce dernier ne peut cependant pas être utilisé comme un marqueur absolu des

plasmocytes, car il est également exprimé par les cellules endothéliales et les cellules pré-B^{139,140}.

Au cours de cette évolution, ces cellules subissent d'importants changements transcriptomiques leur permettant de passer du stade prolifératif (plasmablastes) au stade ultime de différenciation (plasmocytes) dont l'une des particularités réside dans l'arrêt de la division de ces cellules.

A ce stade, les cellules répriment les gènes spécifiques du programme lymphocytaire B comme PAX5, CD19, CD79A, CD79B.... Elles répriment également le programme transitoirement activé lors de l'activation B au sein du GC, et notamment des gènes tels BCL6, BACH2 et AID grâce à l'expression de Blimp-1. Ce dernier est un facteur de transcription également capable d'induire l'expression de gènes comme celui de la chaîne J ou encore ceux impliqués dans la sécrétion d'Ig, tels XBP-1s (forme épissée de XBP1), CHOP). XBP1s est connecté à l'induction de la voie de l'*unfolded protein response* (UPR), qui est liée à l'hypertranscription des gènes d'Ig et l'hypersécrétion d'immunoglobulines pouvant « surcharger » le réticulum endoplasmique ; cette voie UPR est particulièrement puissante dans les cellules plasmocytaires et communes avec d'autres cellules hyper-sécrétantes. De plus, l'expression de Blimp-1 permet d'une part, d'augmenter la taille et la granulosité des cellules et d'autre part, de bloquer la prolifération *via* la répression de la protéine c-Myc¹⁴¹.

Les plasmocytes peuvent avoir au moins deux destins, avec d'un côté les plasmocytes à courte durée de vie et d'un autre côté à longue durée de vie. Les premiers, notamment d'origine extrafolliculaire, sécrètent surtout des IgM, mais aussi des IgG, IgA et IgE dont les régions variables sont souvent quasi-germinales, et sont générés indépendamment d'une réaction GC au sein de la rate, des ganglions lymphoïdes et aussi très activement au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses^{142,143}. De façon inattendue, des plasmocytes extrafolliculaires produisant des IgA et des IgE à la fonction homéostatique ont aussi été récemment décrits chez la souris au niveau du thymus, où ils s'activent sous l'effet de l'IL4 sécrété par des cellules iNKT¹⁴⁴.

Les plasmocytes à longue durée de vie semblent pour la plupart issus d'une réaction GC, et ils sont donc marqués par une charge conséquente de SHM ainsi qu'une pression de sélection, leur conférant une très haute affinité pour leur cible. Les plasmocytes à longue durée de vie ont pour la majorité d'entre eux effectué la CSR, et sont donc en mesure de produire l'une ou l'autre des différentes classes IgG, IgA ou encore des IgE.

Présents en faible proportion dans la circulation sanguine, les plasmocytes une fois complètement différenciés retournent vers des niches optimales pour leur survie prolongée, telle que la moelle osseuse. Ce phénomène est notamment dû à l'expression par les plasmocytes de CXCR4 dont le ligand CXCL12 est exprimé par les cellules stromales de la moelle osseuse¹⁴⁵. L'ancrage de ces cellules dans la moelle osseuse est en partie possible *via* l'expression de molécules d'adhésion comme «Very late antigen-4» (VLA4) ou bien «Lymphocyte Function Associated antigen-1» (LFA1)¹⁴⁶. En outre, le microenvironnement fournit de nombreux facteurs de survie, par exemple des cytokines (IL-6, APRIL/BAFF). Même si la niche principale des plasmocytes à longue durée de vie est la moelle osseuse, ils peuvent également s'implanter durablement au sein la lamina propria intestinale lorsqu'il s'agit de plasmocytes IgA+. Dans ce cas précis, des travaux ont montré que des plasmocytes IgA+ peuvent perdurer au moins 22 ans au sein de leur niche grâce aux différentes interactions avec les cellules des tissus lymphoïdes associés à l'intestin GALT¹⁴⁷.

B. L'immunothérapie : du commencement à 2022

Par opposition à la chimiothérapie, l'immunothérapie repose sur le principe d'utiliser contre une maladie infectieuse, tumorale ou inflammatoire des armes qui soient des composants du système immunitaire. Notre système immunitaire joue en effet essentiellement un rôle protecteur, que l'on va donc se charger ici de compléter, renforcer, stimuler, moduler ou suppléer. Ainsi, l'immunothérapie est fondée sur la redirection ou encore l'amélioration de notre système immunitaire dans le but d'en augmenter l'efficacité. Dans ce but de nombreuses stratégies sont possibles, dont chacune pourra utiliser ou cibler différents composants du système immunitaire.

Une grande diversité de mécanismes immunitaires impliqués dans l'élimination de pathogènes, de cellules cancéreuses ou encore dans la survenue de certaines pathologies liées à l'auto-immunité a été mise en évidence au cours de ces dernières décennies. Cette compréhension nouvelle a mis en lumière de nouvelles cibles thérapeutiques dont les applications continuent de se diversifier.

L'immunothérapie prend donc des formes très diverses. En perpétuelle évolution, elle n'a eu de cesse de progresser. De « passive » elle est devenue « active » puis « adoptive ».

1. Immunothérapie passive ou pseudo-passive

a) Sérothérapie

Les balbutiements de l'immunothérapie passive ont débuté avec les travaux de Behring et Kitasato dans les années 1890. Ces derniers ont mis en évidence la présence d'antitoxines antidiphthériques et antitétaniques dans le sérum de chevaux ayant reçu de faibles quantités de toxines. Tout juste un an après cette découverte, un médecin de Berlin, le Dr Geissler soigna avec succès un enfant atteint de diphtérie à l'aide de sérum équin issu d'animaux immunisés. Ces résultats furent confirmés à grande échelle en 1894 avec les travaux du Dr Roux¹⁴⁹. Ainsi est né le concept de la sérothérapie qui repose sur l'injection de sérum issu d'animaux ou bien d'humains immunisés à un individu receveur dépourvu de cette immunité. L'objectif est de protéger immédiatement le patient contre une maladie donnée à l'aide des anticorps présents dans le sérum.

Bien que cette approche (dans sa forme originelle) ait permis de sauver un grand nombre patients atteints de maladies infectieuses (diphtérie, tétanos, scarlatine ou encore la pneumonie), elle restait associée à certains effets secondaires. En particulier pour les sérums animaux, l'injection de protéines xénogéniques en grandes quantités provoquait progressivement l'induction d'une réponse immune de receveur avec un fort risque de développement d'une « maladie sérique » (avec dépôt diffus de complexes immuns) si le traitement était poursuivi. Sont également possibles dans un tel contexte des réactions allergiques¹⁵⁰ allant parfois jusqu'au choc anaphylactique. L'apparition dans les années 1930 de méthodes de purifications du sérum pour éliminer une partie des protéines sériques¹⁵¹ puis permettant le fractionnement des anticorps sous forme fonctionnelle (avec propriétés de neutralisation conservées tout en ayant alors l'avantage d'être mieux tolérés) ont grandement amélioré la tolérance de ces traitements et diminué ou retardé le développement de « maladies sériques » sans pour autant supprimer complètement cette complication du traitement. Afin d'éviter ce problème, le recours au sérum de patients s'est donc plutôt développé lorsqu'il était disponible.

Vis-à-vis des infections, l'usage des antibiotiques pour soigner les maladies infectieuses, très efficaces et mieux tolérés, a bien sûr diminué les nécessités historiques de recours à la sérothérapie. En revanche, elle continue d'être appliquée dans des cas spécifiques tel que l'élimination de venin, les toxines ou encore certaines infections virales, et on a vu récemment

au cours du COVID-19 se développer des projets de thérapie à base de sérums de convalescents¹⁵².

b) Anticorps monoclonaux et leurs dérivés

Au-delà de l'usage des sérums, la généralisation de l'usage des anticorps monoclonaux a permis de disposer d'agents dont la définition moléculaire devient cette fois précise, et dont la production ne dépend pas de donneurs immunisés (animaux ou humains) mais peut-être confiée à des bioréacteurs. Les Ac monoclonaux (mAb) ont aussi la particularité de ne cibler qu'un déterminant antigénique bien précis d'un antigène donné. Leur production à grande échelle a été rendue possible grâce à la technologie des hybridomes mise au point en 1975 par Georges Kohler et Cesar Milstein¹⁵³. Son principe repose sur la fusion d'un plasmocyte ou d'un hybridome malin déjà immortalisé en lignée (et ne produisant plus lui-même d'Ig endogène, souvent la lignée SP2/0 ou NS1) avec un clone lymphocytaire Ag-spécifique issu de l'immunisation d'un animal ou d'un patient. De fait l'hybridome obtenu hérite de la lignée plasmocytaire sa capacité à survivre et proliférer *in vitro* ainsi que sa capacité de sécrétion d'Ig tout en ayant acquis la spécificité pour l'antigène conférée par une cellule B du sujet ou de l'animal donneur immunisé. Grâce à cette technique, il a été possible d'obtenir de manière relativement facile une production constante d'anticorps thérapeutiques de haute spécificité. De plus, en dehors du don initial de cellules immunes, cette méthode présente l'avantage de pouvoir sur le long terme s'émanciper des contraintes liées aux donneurs de sérum. Cette avancée majeure a été à l'origine d'un développement exponentiel d'applications thérapeutiques d'immunothérapie passive médiée par des mAb animaux (surtout murins), chimériques, humanisés ou même totalement humains.

(1) Formats

Les mAbs utilisés en immunothérapie humaine se présentent pour leur immense majorité sous la forme d'IgG (principalement IgG1 humaines) en raison de leurs fonctions effectrices variées ainsi que de la demi-vie plus longue de cette classe d'Ig. Le fait que la production *in vitro*, la purification, la pharmacodynamie et la toxicologie de cette classe d'Ig soient maintenant bien maîtrisées explique aussi la quasi-exclusivité que se sont octroyées les IgG dans ces approches. Le choix de la sous-classe d'IgG est déterminant puisqu'il conditionne la réponse immunitaire

qui en découle *via* le Fc¹⁵⁴. Les IgG2 et IgG4 moins pro-inflammatoires (voire considérées comme bloquantes pour les IgG4) sont principalement choisies comme antagonistes, notamment quand il s'agit de neutraliser un ligand ou un récepteur, tandis que les IgG1 sont utilisées pour leurs propriétés cytotoxiques et pro-inflammatoires. Bien que les fonctions effectrices des IgG3 puissent être (dans certains cas) d'intensité supérieure ou égale à celles des IgG1, elles sont moins utilisées en thérapie en raison de leur plus courte demi-vie.

Outre les IgG, les IgA ont également été testées de façon pré-clinique comme candidates potentielles pour de futurs traitements d'immunothérapie, notamment dans le cas de pathologies virales ou cancéreuses¹⁵⁵. La problématique qui bloque pour le moment leur utilisation en clinique est la difficulté d'obtenir industriellement et de conditionner des IgA stables. Ni leur pharmacodynamie ni leur toxicologie ne sont en outre explorées à ce jour.

Depuis leur création les mAbs ont énormément évolué grâce à l'ingénierie génétique. Il existe 4 grandes catégories d'Ac, selon le « *ratio* souris/humain » de leur séquence ADN (tableau 1).

Catégorie d'Ac		Ac murin	Ac chimère		Ac humanisé	Ac humain
Ratio séquence souris/humains		100% souris	25% souris et 75% humains :		Moins de 10% souris	100% humain
Suffixe associé		-MOMAB	-XIMAB		-ZUMAB	-MUMAB
Exemple : (mAb approuvés par la FDA)	Nom	Muromomab	Abciximab (ReoPro®)	Rituximab : Rituxan/Mabthéra®	Pertuzumab et Trastuzumab	Adalimumab
	Format	IgG2	Fab	IgG1	IgG1	IgG1
	Cible	CD3 sur les lymphocytes T	Glycoprotéine plaquettaire GPIIb/IIIa	Protéine CD20 présente à la surface des LB	Facteur de croissance épidermique HER2	TNF α
	Application thérapeutique	Anti-rejet de greffe	Anticoagulant dans les pathologies cardiovasculaires	Les lymphomes non Hodgkiniens	Cancer du sein	Maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique.
Inconvénients		Apparition d'Ac humains anti-anticorps murins ou HAMA (Human anti-mouse Antibodies) ¹⁵⁶	des Ac humains dirigés contre ces Ac chimériques ou HACA (Human Anti-Chimeric Antibodies) ¹⁵⁷		Perte d'une partie de leur affinité au cours du processus de fabrication en comparaison avec l'Ac d'origine	Processus de fabrication relativement complexe

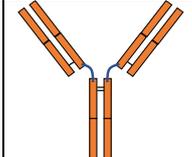
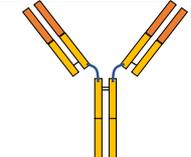
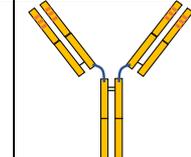
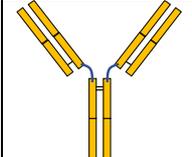
Schéma				
--------	---	---	---	---

Tableau 1 : Catégorie d'anticorps monoclonaux

Les mAbs se présentent sous bien des formes, complètes ou seulement de fragments (single-chain variable Fragment (scFv), Fab) avec ou sans conjugaison à une drogue (antibody-drug conjugate, ADC), ou une molécule radioactive pour la radio-immunothérapie) ou encore avec une reconnaissance uni/bi/tri/multispécifique. La conjugaison à un fragment Fc d'Ig permet aussi de générer des formes solubles d'un certain nombre de récepteurs cytokiniques, qui peuvent alors être utilisées pour piéger une cytokine et contrer son activité. L'ensemble de ces formats est plus amplement développé dans le dernier chapitre de cette introduction puisqu'ils dérivent de l'ingénierie génétique.

(2) Application thérapeutique

L'immunothérapie à base d'Ac a connu un essor ces dernières années avec des centaines de mAb approuvés par la « Food and Drug Administration » (FDA) ou en essais cliniques plus ou moins avancés¹⁵⁸. Les mAbs ont un domaine d'application très large, allant des pathologies inflammatoires chroniques aux cancers en passant par les rejets de greffes¹⁵⁹. La majorité des mAbs approuvés est associée à la cancérologie (**Figure 11**) bien que la pandémie COVID-19 ait permis de mettre en lumière l'intérêt de cette approche dans le cas de maladies infectieuses, notamment sous la forme d'associations de mAbs synergiques¹⁵⁸.

A noter dans le cas de traitements anti-cancéreux que ces mAbs ne sont utilisés qu'en seconde intention en combinaison avec une chimiothérapie ou bien une radiothérapie.

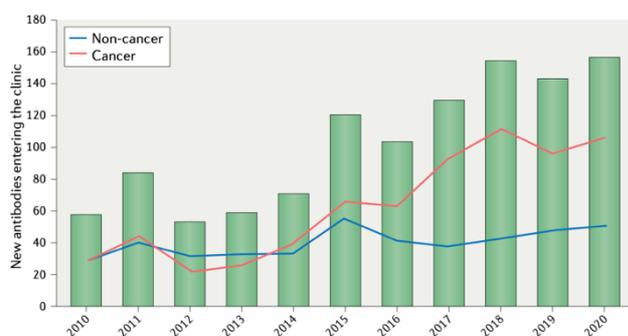


Figure 11 : Répartition des domaines d'application des anticorps monoclonaux

Tirée de l'article « FDA approves 100th monoclonal antibody product. »¹⁵⁸

Blocage de cytokines pro-inflammatoires

La cible des mAbs se détermine bien sûr en fonction de la pathologie. Dans le cas d'une maladie inflammatoire ou auto-immune, on cherche à canaliser la réponse pro-inflammatoire et des mAbs peuvent alors être employés pour bloquer l'action d'une cytokine. Dirigés directement contre la cytokine elle-même, le « mepolizumab » et le « emapalumab » ciblent respectivement l'IL-5 dans le syndrome d'hyperéosinophilie et l'Interféron γ (IFN- γ) dans la lymphohistiocytose hémaphagocytaire (HLH) respectivement^{160,161}. Il est également possible d'empêcher la cytokine de se fixer sur son récepteur spécifique en utilisant la propriété antagoniste des mAb. Cette stratégie est notamment utilisée avec le « tocilizumab » pour bloquer le récepteur à IL-6 dans différentes pathologies^{162,163,164}, ou encore l' « adalimumab » dirigé contre le TNF α dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde (approuvé en 2002 par le FDA), selon une approche qui peut aussi se décliner par une compétition à l'aide de l'anticorps infliximab contre le récepteur au TNF α ou à l'aide d'un récepteur soluble pour le TNF (etanercept).

Blocage de points de contrôle immunitaire

Les cellules du système immunitaire ont, pour se prémunir d'une activation trop intense, des récepteurs à leur surface appelés points de contrôle immunitaire qui modulent leur activation. Leur expression est nécessaire pour réguler la durée et l'intensité de la réponse immunitaire afin d'éviter tout emballement de cette dernière. Parmi ces points de contrôle, on retrouve le « cytotoxic T Lymphocyte-associated antigen 4 » (CTLA4) et le récepteur « programmed death-1 » (PD-1) tous deux exprimés par les LT. Les cellules cancéreuses cherchant à échapper au système immunitaire détournent ce mécanisme à leur avantage en inhibant la réponse anti-tumorale des LT. Ainsi pour empêcher cette inhibition, des mAbs antagonistes comme l'ipilimumab (anti-CTLA4), le nivolumab (anti-PD1) et/ou pembrolizumab (contre le ligand PDL1 de PD1) ont été créés^{165,166}. Cette stratégie a démontré son efficacité notamment en restaurant les fonctions des LT (prolifération, production de cytokines, survie)¹⁶⁷.

Blocage de mécanismes de régulation

Les cellules tumorales sont capables de détourner certains mécanismes de régulation comme l'interaction CD47-SIRP α (Signal regulatory protein α) *via* la surexpression de la protéine CD47^{168,169}. Cette protéine transmembranaire ubiquitaire, d'ordinaire exprimée à un niveau basal faible, se lie à la protéine SIRP α présente à la surface des macrophages. Cette interaction induit un signal « ne me mange pas », inhibant ainsi la phagocytose par les macrophages. Afin

d'empêcher cette liaison entre les cellules tumorales et les macrophages, un mAb anti-CD47 jouant un rôle antagoniste a été développé. Il permet la restitution des fonctions phagocytaires des macrophages et semble en plus améliorer la réponse LT CD8⁺ face aux cellules tumorales ayant recours à ce subterfuge¹⁷⁰.

Élimination des cellules cibles médiée par leur cytotoxicité

Le rituximab (détails tableau 1) est le premier mAb approuvé par la FDA comme traitement anti-cancéreux dans le cas de la leucémie lymphoïde aigue et celui des lymphomes non-Hodgkiniens. Très utilisé en clinique à l'heure actuelle, il cible la protéine CD20 exprimée aux différents stades de développement (hormis précurseur et plasmocytaire) des cellules B saines mais également malignes¹⁷¹. Cet Ac chimérique présente l'avantage de posséder des fonctions effectrices (ADCC, ADCP ou encore CDC) *via* son Fc capables d'induire la mort des cellules qu'il cible^{172,173}. Plusieurs nouveaux anti-CD20 de « next-generation » le concurrencent aujourd'hui (humanisés comme l'ocrelizumab, l'obinutuzumab et le veltuzumab, ou complètement humain : l'ofatumumab).

Cette liste très partielle d'applications thérapeutiques livre un aperçu des possibilités qu'offrent les immunothérapies à base de mAb.

Il est à retenir qu'au-delà de l'humanisation croissante des régions constantes des mAb thérapeutiques (qui présentent un intérêt tant pour améliorer la tolérance de ces traitements que pour améliorer leurs propriétés effectrices), un travail important se poursuit sans relâche afin de produire des molécules de biothérapie dont l'activité effectrice est améliorée ou dont la demi-vie est maîtrisée à façon. Ce travail concerne notamment

- Les sites de glycosylation de la région Fc des IgG, propres à moduler leur potentiel anti-inflammatoire,
- Les sites de liaison avec les récepteurs FcγR et FcRn, visant à améliorer l'efficacité et/ou la demi-vie des IgG dans l'organisme
- L'usage d'IgG4 spontanément capables d'échanger des monomères de « demi-IgG » avec les IgG4 circulantes et de se conduire ensuite comme des ligands monovalents
- La génération d'anticorps bi ou multi-spécifiques.

En conclusion, l'immunothérapie passive est un moyen efficace pour agir rapidement sur une pathologie. Cependant, elle ne procure qu'une immunité transitoire. A noter tout de même qu'une mémoire immunitaire peut se développer à la suite d'un traitement anti-infectieux ou

antitumorale par un mAb, notamment grâce à sa région Fc qui recrute différents effecteurs du système immunitaire et lui fait ainsi en quelque sorte jouer le rôle d'adjuvant vaccinal^{174,175}. Dans les deux cas, les mAb ont démontré des propriétés immunomodulatrices conduisant au développement d'une réponse humorale et cellulaire puissante capable de protéger son hôte durablement.

L'efficacité, la durabilité ainsi que l'immunogénicité des anticorps, sont directement liés à leurs propriétés pharmacocinétiques. Ces dernières varient selon l'individu, la dose administrée, la pathologie, la co-administration de médicaments, mais également selon l'anticorps lui-même. Plusieurs anticorps dirigés contre une même cible n'auront pas nécessairement le même comportement *in vivo*. Si l'on prend l'exemple des anti-TFN, le Etanercept présente une demi-vie très courte (3-5 jours) contrairement à l'adalimumab (environ deux semaines) avec en plus une altération de ses fonctions effectrices médiées par la liaison Fc-FcR. Le choix ou l'élaboration d'un anticorps thérapeutique est donc intrinsèquement lié à ses propriétés pharmacocinétiques puisqu'elles jouent sur sa clairance et son efficacité.

L'immunothérapie passive n'est donc destinée qu'à un usage de substitution. Elle ne peut avoir un effet prolongé qu'à la condition d'être renouvelée très régulièrement et d'autres options thérapeutiques doivent être prises lorsque l'on recherche une couverture immune plus pérenne.

2. *Immunothérapie active*

a) *Cytokines : immunothérapie active non spécifique*

Les cytokines sont de petites protéines, à demi-vie courte, capables d'initier rapidement une réponse immunitaire grâce à leurs propriétés immunomodulatrices. Nombre d'entre elles ont été étudiées dans le but d'une application thérapeutique. Seuls l'interféron α (INF α) et l'IL-2 ont été approuvés par la FDA comme immunothérapie anti-cancéreuse dans les années 1980-1990^{176,177}. Malheureusement les fortes doses administrées pour compenser la faible durée de vie de ces cytokines ont provoqué des effets secondaires importants comme celui du syndrome de libération de cytokines^{178,179}. Durant une longue période, cette forme d'immunothérapie fut donc délaissée au profit de l'usage de mAb thérapeutique.

L'ingénierie génétique ayant grandement progressé ces dernières années, des améliorations ont pu être apportées afin de s'affranchir des contraintes liées à l'utilisation de cytokines en immunothérapie. Sont alors apparues une variété de cytokines plus sophistiquées les unes que les autres, parmi lesquelles on retrouve les « super-cytokines », les « immunocytokines », des

« engager cytokines » et les cytokines « synthétiques ». Chacune d'entre d'elles porte une modification qui s'accompagne d'une amélioration, soit de reconnaissance de la cible, soit d'efficacité d'activation de la cellule cible, ou encore d'un allongement de leur durée de vie¹⁸⁰. Cette nouvelle approche, bien que prometteuse n'est pour le moment qu'au stade pré-clinique ou en cours d'essai clinique.

b) Vaccin : immunothérapie active spécifique

Avant même de comprendre les mécanismes en action lors de la vaccination, nos ancêtres ont eu de longue date l'intuition de son mode d'action, un peu semblable à celui de la mithridatisation vis-à-vis d'un poison, et visant à renforcer les défenses de l'organisme contre un germe. Dès le XVI^e siècle en Chine, la variolisation s'est développée comme une méthode d'infection volontaire contrôlée (avec du pus provenant d'un sujet ayant fait une forme bénigne de la maladie, que l'on pensait donc atténuée), visant à se prémunir contre une infection ultérieure plus sévère. Même si elle présentait des risques non négligeables d'infection et de contagion, elle s'est ainsi répandue pour se prémunir de la variole. Elle consistait à s'injecter du pus séché issu de pustules de variole en sous-cutané¹⁸¹. Ce n'est qu'en 1798, avec les travaux d'Edward Jenner que le voile sur le principe de la vaccination (utilisant non pas le virus pathogène de la variole, mais un virus apparenté et moins agressif chez l'Homme, la vaccine), fut levé. Ce dernier repose sur l'induction d'une réponse immunitaire (innée et adaptative) contre un analogue atténué (ou inactivé) d'un agent pathogène spécifique, octroyant ainsi une protection à long terme et ce, sans pour autant développer la pathologie dont le germe en cause est responsable¹⁸². Plus tardivement dans les années 1870-1880, les découvertes de Louis Pasteur et de ses étudiants ont permis la mise au point de plusieurs vaccins, parmi lesquels on retrouve le célèbre vaccin contre la rage. À ce jour, cette avancée demeure l'une des plus importantes de la médecine et a rendu possible le contrôle de nombreuses maladies infectieuses à travers le monde, voire leur éradication. Elle a notamment, grâce à une grande campagne de vaccination organisée par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), permis très récemment (2020-2021) d'éradiquer la variole.

Au cours du temps et des avancées technologiques, la composition des vaccins a été modifiée afin de limiter le risque de maladies vaccinales, notamment chez les patients immunodéprimés ou les femmes enceintes, tout en octroyant une protection à long terme (

Figure 12). En effet, les premiers vaccins se composaient uniquement d'agents pathogènes vivants atténués/altérés, c'est-à-dire dont le pouvoir pathogène et la virulence avaient volontairement été affaiblis. Particulièrement immunogène, ce type de vaccin présente l'avantage d'induire une réponse immune efficace avec peu d'injections¹⁸³.

Ont ensuite été développés des vaccins, dits « non-vivants » ou « inertes », adaptés au plus grand nombre puisque plus sûrs. Ils ne provoquent pas de pathologies et peu de réactivité cependant ils sont parfois moins immunogènes et donc moins protecteurs. Cela se traduit par une augmentation du nombre d'injections nécessaires et/ou la nécessité d'associer ce type de vaccin avec un adjuvant (par exemple de l'huile minérale, des squalènes ou du sel d'aluminium, très pro-inflammatoires au niveau du site d'injection) pour obtenir une mémoire immunitaire à long terme. Ce type de vaccin, très répandu dans l'industrie pharmaceutique, provoque (selon sa formulation) une réponse immune qui lui est propre. L'enjeu majeur de ces vaccins est de limiter la réactivité locale, pour une bonne tolérance, tout en gardant une efficacité vaccinale élevée. Les vaccins « non-vivants » se divisent en deux grandes catégories : les vaccins à pathogènes entiers inactivés et les vaccins sous-unitaires. Les premiers renferment des pathogènes qui ont été inactivés par la chaleur, l'irradiation ou encore chimiquement afin d'empêcher leur réplication. Dans le second cas, seuls des fragments de pathogène sont utilisés pour activer le système immunitaire. Il peut s'agir de protéines recombinantes (obtenues par ingénierie génétique), de polysaccharides, de « virus-like particules » (VLP) ou encore de toxines détoxifiées nommées toxoïdes¹⁸⁴.

Dernièrement, de nouvelles approches ont été développées comme les vaccins à ADN ou à ARNm codant pour une protéine immunogène. Ces vaccins ont connu un destin planétaire en quelques mois et ont pu faire la preuve de leur bonne tolérance et de leur efficacité à l'occasion de la pandémie mondiale COVID-19. En France, ils ont été approuvés en 2021 par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) pour lutter contre le SARS-CoV-2. Dans un cas comme dans l'autre, ils codent pour la protéine de surface Spike du SARS-CoV-2 en raison de son immunogénicité et de l'intérêt de cibler ce spike pour générer des anticorps neutralisants chez le sujet vacciné. La protéine spike est capable de se lier au récepteur ACE2 présent à la surface des cellules des voies respiratoires. Provoquant un rapprochement et une fusion des membranes du virus et des cellules hôtes, elle est directement impliquée dans le mécanisme d'infection du SARS-CoV-2¹⁸⁵. Cette stratégie a été rapportée comme efficace pour induire une réponse immune, avec notamment l'apparition d'anticorps anti-spike hautement spécifiques grâce à l'induction d'une réponse cellulaire B GC-dépendante, capable d'assurer une protection¹⁸⁶.

POLYSACCHARIDE AND CONJUGATED POLYSACCHARIDE

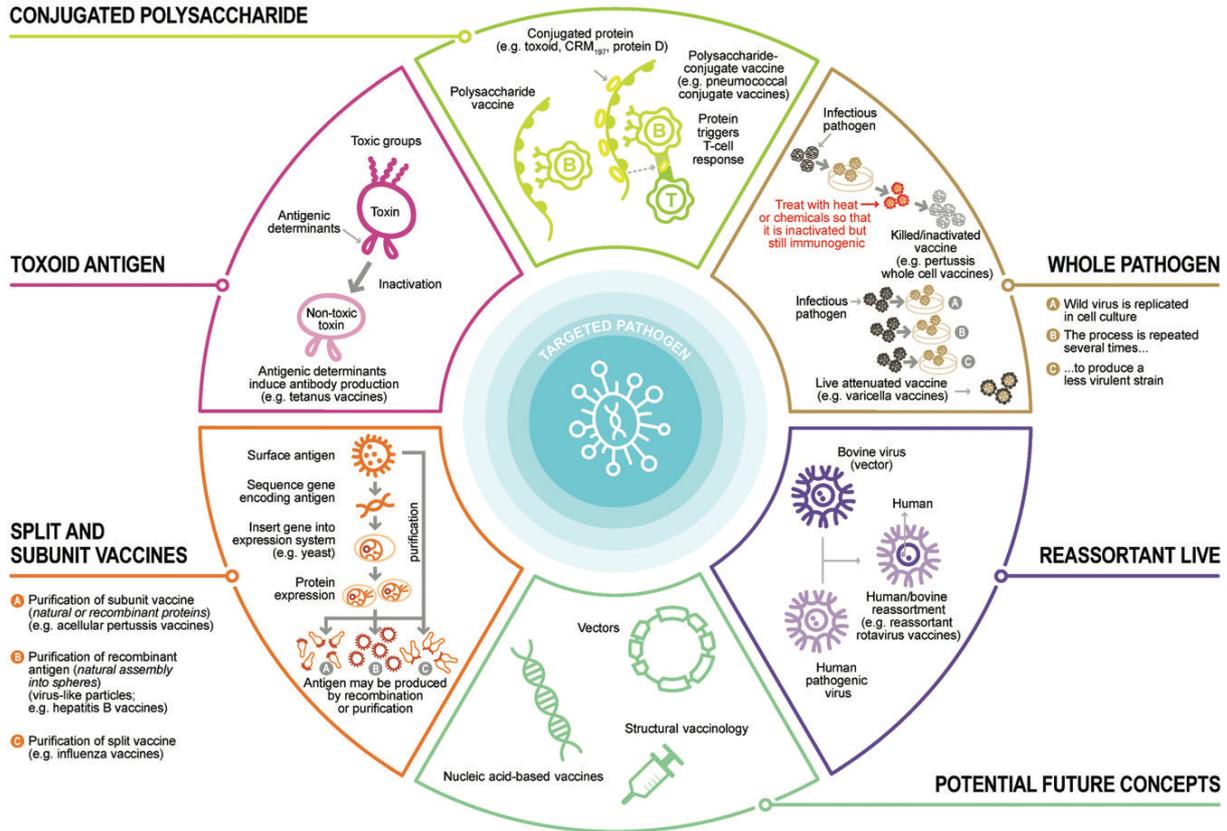


Figure 12 : Ensemble des différentes stratégies de vaccination

La composition d'un vaccin est conditionnée par l'approche vaccinale choisie. Il peut aussi bien contenir des virus atténués, des pathogènes entiers inactivés, des toxoïdes, des fragments de pathogènes comme des polysaccharides seuls ou conjugués ou encore des protéines recombinantes immunogènes issu de pathogènes. Figure issue de la publication « Understanding modern-day vaccines: what you need to know »¹⁸⁴

3. Immunothérapie adoptive

Cette forme d'immunothérapie est basée sur l'administration de cellules vivantes (génétiquement modifiées ou non) à des patients. Ces cellules peuvent être issues soit directement du patient à soigner (autogreffe) soit d'un donneur sain (allogreffe).

a) Greffes de moelle osseuse

Cette immunothérapie adoptive est la première de son genre à avoir été développée et testée chez l'Homme. Georges Mathé est l'un des pionniers de la greffe de moelle osseuse allogénique (à partir de donneur homologue) dans le traitement de leucémie aiguë. Ses premiers tests ont permis de sauver 5 sur 6 physiciens, dont le pronostic vital était engagé en raison d'une

exposition trop importante à des ondes radioactives (dans un réacteur nucléaire)¹⁸⁷. Cette approche pourtant prometteuse a bien failli ne jamais arriver jusqu'en clinique. Le succès escompté lors des premiers tests de traitement de patients leucémiques (type lymphome de Hodgkin) par greffe de moelle osseuse ne fut malheureusement pas toujours au rendez-vous. En effet, de sévères réactions immunologiques liées au rejet précoce du greffon que l'on nomme maladie du greffon contre l'hôte « graft-versus-Host Disease » (GvHD), rendaient non seulement le traitement inefficace mais entraînaient également de sérieux effets secondaires (atteintes cutanées, lésions hépatiques, ...). Toutefois, des réactions du greffon contre les cellules leucémiques « graft versus leukemia » (GVL) étaient également observées et donnaient à penser que cette immunothérapie pouvait s'avérer efficace. Afin de limiter l'apparition de la GvHD au profit de la GVL, des recherches sur la cause du développement de la GvHD ont été menées¹⁸⁸. Avec la découverte du CMH, une meilleure compréhension des mécanismes à l'œuvre au cours d'une transplantation a pu parallèlement être obtenue¹⁸⁹. Depuis lors, de nombreuses améliorations ont été apportées (utilisation de molécules de chimiothérapie (moins agressives pour l'hôte), source de greffons diversifiée, traitement adapté en cas d'infection, etc.) et ont permis le déploiement de cette immunothérapie¹⁹⁰.

L'approche thérapeutique qui consiste à éliminer les cellules cancéreuses (cancer hématologique) à l'aide de fortes doses d'irradiation ou de chimiothérapie s'est avérée très efficace mais, provoquait une aplasie médullaire systématiquement fatale pour le patient. En effet, ce type de traitement non spécifique impacte aussi bien les cellules cancéreuses que les cellules saines. L'autogreffe de CSH s'est alors imposée comme la meilleure option pour restituer, rapidement et sans rejet possible, le système immunitaire du patient. Ici l'implantation de ces cellules (capables de se différencier en n'importe quel élément figuré du sang) n'a donc pas de visée curative en soit mais permet de contrecarrer les effets secondaires néfastes du traitement initial.

Ces deux approches sont toujours utilisées à l'heure actuelle en clinique et démontrent les bienfaits du transfert adoptif de cellules autologues ou bien homologues.

b) Lymphocytes infiltrant les tumeurs

Parmi les premières immunothérapies adoptives mises au point, on retrouve celles s'appuyant sur les lymphocytes infiltrant les tumeurs « tumor-infiltrating lymphocyte » (TIL) qui ne

s'appliquent qu'en cas de tumeurs solides dites « chaudes ». Ces dernières présentent en règle générale de nombreuses mutations avec une forte immunogénicité et un enrichissement en LT^{191,192}. On notera à ce sujet la démonstration récente au niveau d'un certain nombre de tumeurs solides « chaudes » d'une infiltration que ne se limite pas aux cellules T, mais aussi à des cellules B productrices d'anticorps spécifiques de la tumeur, au niveau de structures lymphoïdes tertiaires (TLS), cette infiltration B constituant un excellent marqueur prédictif de bonne réponse aux traitements d'immunothérapie (type immune checkpoint inhibition)¹⁹³⁻¹⁹⁶. Le principe de cette thérapie consiste à isoler, à partir d'une biopsie de patient, les lymphocytes ayant infiltré la tumeur puis à les expandre *ex-vivo* (selon un protocole défini pour augmenter le nombre de LT *in vitro*) avant de les réinjecter par la suite au patient. Cette approche est combinée avec de fortes doses d'IL-2 à raison de 15 injections (dans la limite de toxicité) ainsi qu'avec un pré-conditionnement du patient¹⁹⁷. A l'issue de ce procédé, une population hétérogène de LT est obtenue, au sein de laquelle peut être retrouvée une variété de TCR capables de reconnaître différents antigènes tumoraux. Cette spécificité confère un net avantage dans la reconnaissance et l'élimination de tumeurs solides car celles-ci ont tendance à masquer ou muter l'antigène pris pour cible lors de traitement thérapeutique.

Des essais cliniques ont démontré un bénéfice clinique significatif lorsque les TIL ont été employés dans des cancers de type mélanome métastatique ou encore cancer du col de l'utérus^{197,198}. Malgré ces résultats et le peu de toxicité induit par les TIL, cette thérapie reste à ce jour d'ordre expérimental. Ceci est notamment dû à la dépendance des LT aux doses élevées d'IL-2, engendrant alors des effets secondaires importants chez l'Homme (vu dans la partie « cytokines »), pour leur croissance et leur activité *in vivo*. Bien d'autres challenges se dressent en travers de l'application thérapeutique des TIL en clinique. Cependant cette méthode semble prometteuse, en particulier contre les cancers solides pour lesquels le nombre d'approches thérapeutiques reste limité.

c) « Chimeric antigen receptor » (CAR)

Après la découverte de l'immunothérapie par mAb, un nouveau cap dans l'avancée des immunothérapies a pu être franchi grâce à l'ingénierie génétique. Des cellules modifiées génétiquement pour exprimer un récepteur chimérique ont pu être reprogrammées pour cibler un antigène tumoral ou un antigène issu d'un pathogène. Un ADN est intégré aléatoirement, *via* un vecteur viral, dans le génome des cellules à modifier pour permettre ainsi l'expression à

la membrane du CAR. Cet ADN code pour une chaîne unique, constituée elle-même de trois domaines (**Figure 13**) :

- Un domaine extracellulaire sous la forme d'un ScFv (partie variable d'un anticorps : VH et VL relié par un peptide court flexible) capable de reconnaître sa cible en s'affranchissant des limites imposées par le CMH.
- Un domaine transmembranaire permettant l'ancrage à la membrane
- Un ou plusieurs domaines intracellulaires de co-stimulation (souvent CD28, 4-1BB)

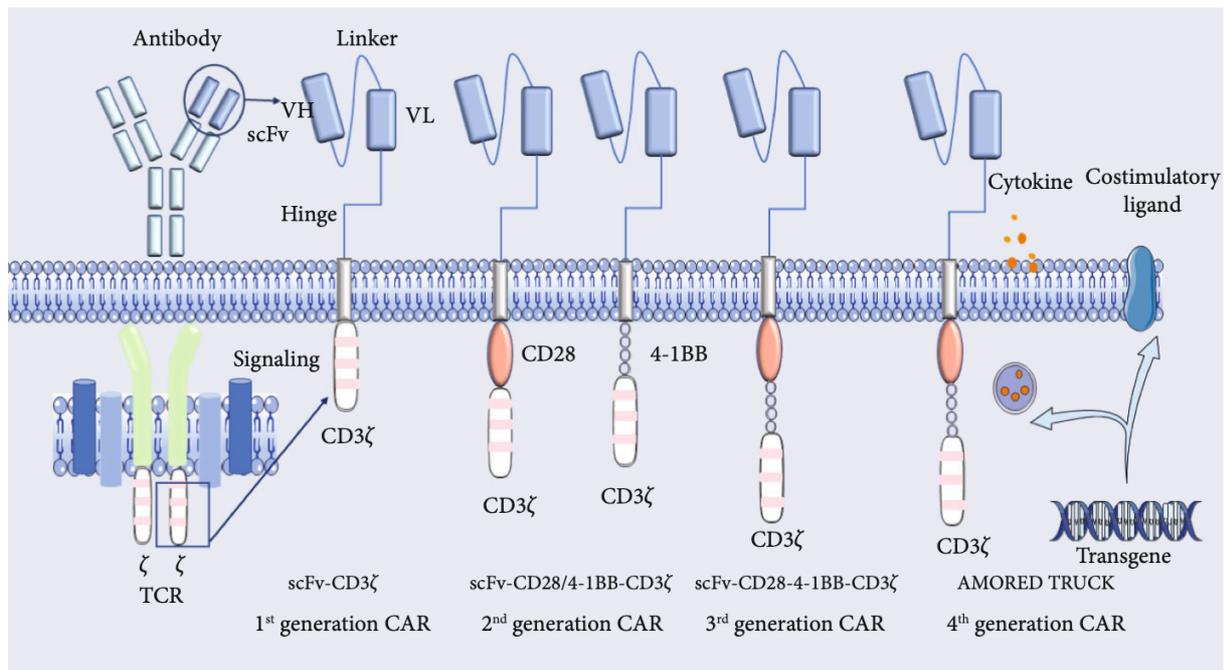


Figure 13 : Design des 4 générations de CAR

Représentation schématique des 4 générations de CAR développés au cours de ces dernières années. La première génération n'est composée que d'un ScFv et d'un domaine d'activation CD3ζ. La deuxième génération (plus efficace que la première) possède en plus un domaine de co-stimulation intracellulaire (souvent CD28 ou 4-1BB). La troisième génération (pas plus efficace que la deuxième), contient plus d'un domaine de co-stimulation. La quatrième possède un transgène inducible par activation permettant d'exprimer par exemple des cytokines. Figure tirée de "CAR-T Cell Therapy in Cancer: Tribulations and Road Ahead" ¹⁹⁹

On dénombre à ce jour 4 générations successives de CAR classées selon les modifications apportées notamment au niveau des domaines intracellulaires, le but étant d'améliorer la signalisation induite par l'interaction entre la cellule et sa cible pour augmenter l'efficacité.

D'abord expérimentée dans les cellules T, cette approche se décline désormais dans d'autres types cellulaires comme les NK.

CAR-T

Les cellules CAR-T ont su se faire une place importante dans le domaine de l'immunothérapie et plus particulièrement celle tournée vers la cancérologie. À l'heure actuelle, 5 types de cellules CAR-T, nommées Kymriah (tisagenlecleucel, tisacel)²⁰⁰, Yescarta (axicabtagene ciloleucel, Axi-Cel)²⁰¹, Tecartus (brexucabtagene autoleucel, KTE-X19)²⁰², Breyanzi (lisocabtagene maraleucel, lisocel)²⁰³, Abecma (idecabtagene vicleucel, Idecel) ont été approuvées par la FDA dans le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë B récidivante ou réfractaire, des tumeurs malignes lymphoïdes B ou encore du myélome multiple. Dans ces cancers que l'on pensait jusqu'ici incurables, les cellules CAR-T ont démontré des taux d'efficacité pouvant aller de 50 à 90% selon le type de cancer. Ces résultats sans précédent ont permis de redonner un véritable espoir de guérison aux patients atteints de ce type de cancers.

Malgré ces remarquables résultats, de nombreuses difficultés restent à surmonter pour assurer la sécurité de ce traitement. Les effets secondaires induits par les cellules CAR-T sont en lien direct avec leur efficacité mais peuvent parfois se révéler extrêmement délétères pour le patient. Parmi ces effets toxiques les plus communs, on retrouve le syndrome de libération de cytokines « *cytokine release syndrome* » (CRS), la neurotoxicité ou encore le phénomène « *on-target/off-tumor effect* »^{205,206,207}.

Le CRS et la neurotoxicité sont principalement causés par une production excessive de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, causant un sur-emballement du système immunitaire, qui dans certains cas peut s'avérer fatal^{163,208,209}. Des traitements à base de mAb anti-IL-6R (Tocilizumab) et de glucocorticoïdes sont proposés en clinique pour limiter la survenue de ces effets.

L'ensemble des cellules CAR-T validées en clinique à ce jour cible des antigènes communs aux tissus sains et tumoraux (CD19 et « B-cell maturation antigen » (BCMA)). Ainsi, ces cellules CAR-T attaquent sans distinction ces deux tissus, c'est ce que l'on appelle le phénomène « *on-target/off-tumor effect* ». Dans le cas du CD19, les patients présentent *ipso facto* une lymphopénie B profonde conduisant à une perte partielle de leur immunité humorale.

Plusieurs axes d'amélioration sont actuellement à l'étude afin de réduire drastiquement les effets secondaires médiés par les cellules CAR-T tout en conservant une efficacité antitumorale.

Certaines approches expérimentales se sont focalisées sur l'amélioration de la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules CAR-T grâce à la découverte d'antigènes plus

spécifiques, l'expression de CAR bispécifiques ou encore l'expression conditionnelle du CAR. Les CAR bispécifiques déjouent la faculté des cellules tumorales à masquer leur antigène de surface en ciblant deux antigènes à la fois. Des résultats très encourageants de régression tumorale ont notamment pu être observés chez des patients en rechute ou avec un myélome réfractaire²¹⁰. L'expression conditionnelle du CAR a été rendue possible notamment grâce à l'expression d'un récepteur senseur nommé « synNotch ». Ce dernier permet la reconnaissance d'un antigène présent à la surface de cellules tumorales. Cette liaison induit la libération d'un facteur de transcription permettant l'expression du CAR²¹¹. Cette approche permet la reconnaissance de plusieurs antigènes tumoraux à la fois avec en plus la particularité d'induire des effets antitumoraux plus spécifiques. Dernièrement, ce système a été testé dans un modèle murin de glioblastome (tumeur solide) dans lequel il a démontré une meilleure persistance *in vivo* des CAR-T associée à une spécificité accrue pour la tumeur²¹².

D'autres approches se focalisent quant à elles sur le développement de moyens efficaces et sécurisés afin de stopper définitivement ou non l'action des cellules CAR-T. L'une des stratégies les plus populaires associe l'intégration d'un CAR avec un gène suicide. Ce dernier peut par exemple coder pour une protéine Cas 9 inducible capable, après dimérisation à l'aide de molécule chimique, de déclencher l'apoptose de la cellule par l'activation de la cascade des caspases²¹³. La preuve de concept a été apportée *in vivo* grâce au contrôle de la croissance tumorale de cellules leucémiques transduites avec un iC9.CAR.CD19²¹⁴. Bien que cette méthode soit très séduisante, le coût élevé de cette thérapie cellulaire met en évidence la nécessité de développer des systèmes réversibles, qui en cas de besoin puissent être réactivés. Des cellules CAR-T CD19⁺ soumises au système Tet-on (basé sur le système d'induction conditionnelle de la tétracycline) ont été efficacement contrôlées à l'aide de la doxycycline²¹⁵. Ce système de CAR inducible a notamment pu être validé dans d'autres modèles^{216,217}. Il présente néanmoins le désavantage d'être dépendant d'un antibiotique, qui pourrait à terme entraîner des effets toxiques systémiques voire favoriser l'apparition de bactéries résistantes.

Une autre limite des cellules CAR-T est leur délai de fabrication qui s'élève à 2 semaines. Ce délai peut s'avérer problématique dans le cas de cancer agressif. De plus, l'intervention d'un vecteur viral est potentiellement risquée puisque son intégration aléatoire au génome pourrait induire l'expression d'un oncogène. Aucune donnée n'a pour l'instant confirmé ce risque, cependant, il semble évident qu'une alternative plus simple et moins risquée lui soit préférable

(une partie y est dédiée dans le troisième chapitre de cette thèse). Par ailleurs, le développement de méthode d'édition précise comme CRISPR/Cas 9 offre une alternative séduisante pour obtenir un meilleur contrôle de l'insertion de gène codant pour un CAR. Cette approche a notamment été appliquée en ciblant spécifiquement le locus TRAC de cellules T afin de perturber l'expression endogène du TCR α tout en induisant l'expression d'un CAR^{218,219}. Il a ainsi été observé une amélioration des fonctionnalités avec une régulation optimale de l'expression du CAR limitant l'épuisement des cellules T.

De manière intéressante, cette méthodologie a ouvert la porte à l'élaboration de cellules CAR-T universelles. Jusqu'à présent le risque de réaction GvHD lors de greffes allogéniques de cellules T était élevé. Des stratégies comme l'élimination des TCR α/β et B2M par CRISPR/Cas9 associées à l'expression de CAR sont en cours d'évaluation chez des patients atteints de lymphome à cellules B (NCT04035434), myélome multiple (NCT03166878) ou encore de cancer du poumon (NCT03166878).

Dans l'hypothèse où les résultats obtenus seraient équivalents voire meilleurs qu'avec des cellules CAR-T, il est tout à fait envisageable d'imaginer le développement de thérapies cellulaires CAR-T universelles.

CAR-NK

Les cellules NK sont des lymphocytes cytotoxiques spécialisés dans la lyse de cellules anormales (cancéreuses) ou infectées par des pathogènes. Les différentes fonctions effectrices dont elles sont dotées leur confèrent un potentiel cytotoxique. Pour commencer, elles ont des fonctions cytolytiques médiées par la dégranulation de granules toxiques comme le granzyme B, ou encore elles peuvent provoquer la mort de la cellule cible en induisant l'activation de caspases à travers leur liaison au récepteur de mort Fas présent à la surface de toutes les cellules. Elles possèdent également des fonctions immunomodulatrices *via* la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ ²²⁰. De plus, les cellules NK sont directement impliquées dans les réactions d'ADCC grâce à l'expression membranaire de Fc γ RIIIa. Il est à noter que ces cellules peuvent distinguer les cellules du Soi et du Non-Soi, à l'aide de récepteurs inhibiteurs (par exemple : KIR ou NKG2A) capables de se lier au CMH I des cellules et d'un récepteur activateurs (comme le NKG2D). Les signaux perçus par les cellules NK à travers ces différents récepteurs induisent une polarisation de la réponse tolérogène ou inflammatoire à l'encontre de la cellule cible²²¹.

Ces nombreuses propriétés font de cette cellule une candidate de choix pour l'élaboration de thérapie cellulaire alternative aux cellules CAR-T.

Bien moins avancées en clinique que les cellules CAR-T, les cellules CAR-NK ont cependant donné des résultats très prometteurs. Un des premiers essais cliniques a pu apporter la preuve qu'une infusion allogénique de cellules NK n'induisait chez les patients aucun effet secondaire décrit dans les thérapies cellulaires CAR-T, ni aucune réaction GvHD²²². Ceci démontre le possible caractère « off-the-shell » des thérapies cellulaires basées sur des cellules CAR-NK. Cet aspect est particulièrement important puisqu'il permettrait de faciliter le procédé de fabrication en comparaison aux cellules CAR-T. De manière intéressante, des résultats intermédiaires d'essais cliniques montrent chez certains patients en rechute ou atteints de lymphomes à grandes cellules B une rémission complète lorsqu'ils sont traités avec des cellules CAR-NK^{223,224}.

Certaines avancées proposées pour leur homologue T (vu précédemment) comme l'ajout d'une Cas 9 inducible ont également pu être adaptées pour des constructions de CAR exprimées par des cellules NK²²⁵. En d'autres termes, les améliorations apportées aux cellules CAR-T pourront vraisemblablement être utilisées pour de futures cellules CAR-NK.

Le problème majeur que comporte cette thérapie cellulaire est l'obtention de la persistance *in vivo* des CAR-NK afin qu'elle puisse être effective. En théorie la 4^{ème} génération de CAR qui contient un domaine «T-cells redirected for Universal Cytokine Killing » (TRUCKS)²²⁶ devrait améliorer la prolifération, la persistance et l'activité antitumorale des cellules CAR-NK. Les premiers essais cliniques semblent abonder dans ce sens, en démontrant une persistance d'au moins 12 mois (avec cependant un niveau relativement bas)²²³.

En conclusion, les cellules CAR-NK sont des thérapies cellulaires qu'on l'on va certainement voir se développer dans les années à venir. Bien sûr, plusieurs points seront à améliorer, comme la prolifération, l'activation et la durabilité *in vivo*, si l'on souhaite produire ce traitement à grande échelle.

Immunotherapy perspectives in the new era of B-cell editing

Natsuko Ueda,^{1,*} Marine Cahen,^{2,*} Yannic Danger,¹ Jérôme Moreaux,³ Christophe Sirac,² and Michel Cogné^{1,2}

¹INSERM U1236, University of Rennes 1, Etablissement Français du Sang, Rennes, France; ²INSERM U1262, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR) 7276, Limoges University, Limoges, France; and ³CNRS UMR 9002, Institute of Human Genetics, Montpellier, France

Since the early days of vaccination, targeted immunotherapy has gone through multiple conceptual changes and challenges. It now provides the most efficient and up-to-date strategies for either preventing or treating infections and cancer. Its most recent and successful weapons are autologous T cells carrying chimeric antigen receptors, engineered purposely for binding cancer-specific antigens and therefore used for so-called adoptive immunotherapy. We now face the merger of such achievements in cell therapy: using lymphocytes redirected on purpose to bind specific antigens and the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) revolution, which conferred genome-editing methodologies with both safety and efficacy. This unique affiliation will soon and considerably expand the scope of diseases susceptible to adoptive immunotherapy and of immune cells available for being reshaped as therapeutic tools, including B cells. Following the monumental success story of passive immunotherapy with monoclonal antibodies (mAbs), we are thus entering into a new era, where a combination of gene therapy/cell therapy will enable reprogramming of the patient's immune system and notably endow his B cells with the ability to produce therapeutic mAbs on their own.

Introduction

Various strategies are currently available for passive immunotherapy, notably with monoclonal antibodies (mAbs) mimicking endogenous immunoglobulins for targeting an antigen (Ag), and thus well tolerated. Active immunotherapy is, on the contrary, based on the patient's own immune system, as after vaccination. Finally, adoptive immunotherapy reshapes autologous Ag-specific cells on purpose and is now to be boosted by new genetic engineering methods. Although future chimeric antigen receptors (CAR) T-cell protocols will likely replace lentiviral expression by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-mediated retailoring of T-cell receptor (TCR) genes, gene editing could also be applied to other cell lineages, especially B cells.

B cells provide the best suited immunoglobulin factory for producing either membrane-bound or secreted immunoglobulin in lymphocytes or plasma cells (PCs). In lymphocytes, membrane immunoglobulin provides the Ag-binding component of the B-cell receptor, which, on Ag sensing and presentation, triggers immunoglobulin class switching and affinity maturation before activated cells differentiate into immunoglobulin-secreting PCs.

The modular architecture of immunoglobulin was synthetically remodeled under multiple formats: single-chain (sc) fragments, minibodies, bi-specific Abs, and immunotoxins. Gene engineering methodologies now make it doable to express such retailored immunoglobulin in primary B cells, the in vivo use of which might then address multiple unmet health needs. Endogenously synthesized mAbs would notably be valuable in situations needing either (1) lifelong treatment (autoimmune, inflammatory, infectious, genetic, or residual cancer diseases), (2) permanent infusion (circumventing the

Submitted 13 November 2020; accepted 9 February 2021; published online 23 March 2021. DOI 10.1182/bloodadvances.2020003792. © 2021 by The American Society of Hematology

*N.U. and M.C. contributed equally to this study.

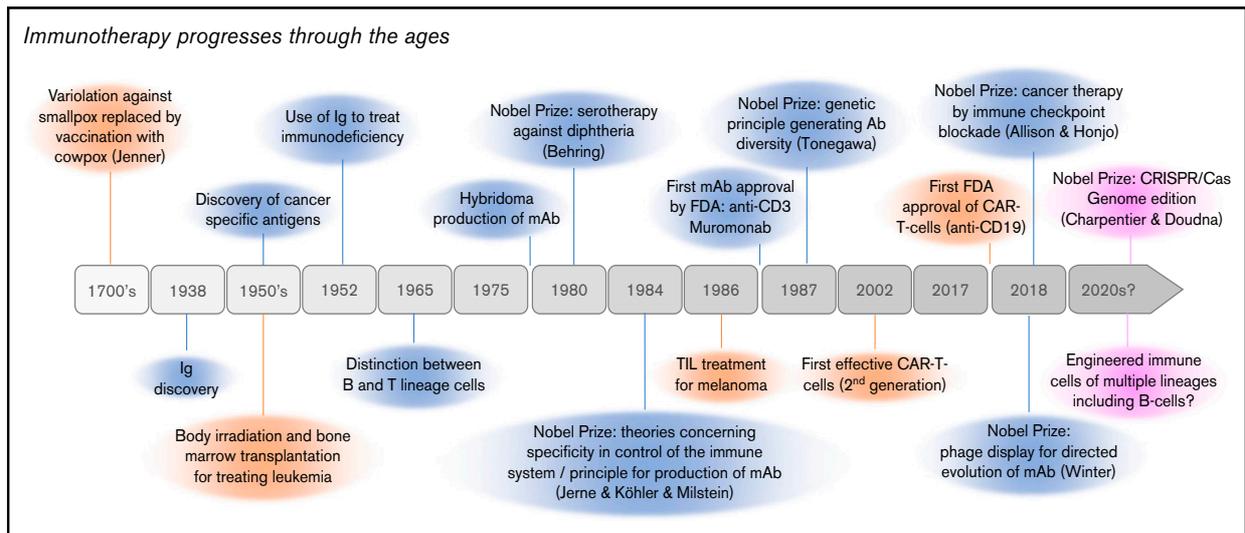


Figure 1. A timeline of the history of immunotherapy. Although based on old medical practices such as variolation, the progresses of immunotherapy methods have strongly accelerated in the recent years with multiple discoveries concerning mostly antibodies (in blue), antigens and cellular immunity (in orange), and more recently genome edition (in red). Although this figure mentions important milestones and notably Nobel Prizes, all these progresses have clearly resulted from the joint and incremental efforts of multiple scientists and medical teams throughout the world.

issues of pharmacodynamic variations seen with intravenous injection and of rapid *in vivo* catabolism seen with bi- and trispecific mAbs), (3) local delivery in sites where PCs are homing, and/or (4) efficient expression despite unfit structure (for mAbs affected by chemistry, manufacturing, and control issues because of nonoptimal structures).

This review provides an overview of such recent promising advances for adoptive immunotherapy.

Immunotherapy from the origins

Active immunotherapy began centuries ago with variolation to immunize people against smallpox and led to the concept of vaccination with viruses closely related to a pathogen but attenuated or non-pathogenic (Figure 1). Many vaccines now consist of purified or synthetic microbial components or simply nucleic acids encoding them. Recombinant viruses also provide platforms for developing new vaccines against emerging pathogens such as the recently arisen SARS-CoV-2.

Passive immunotherapy reached an initial milestone with a Nobel Prize in Medicine (1901), awarded to Behring for serotherapy of diphtheria, based on the administration of serum from convalescent patients. Besides infections, anti-rhesus D immunoglobulin G (IgG) from immunized donors are also widely administrated to mothers after delivery to prevent alloimmunization. Finally, passive immunotherapy strategies now include a huge array of recombinant mAbs targeting tumor or microbial Ag for specifically treating multiple disorders.

Cytokines can also be used to modulate immune responses, and inversely, mAbs are available for counteracting the action of tumor necrosis factor α or interleukin-6 (IL-6) in inflammatory conditions, notably those resulting from adoptive immunotherapy.

Cell therapy began in the 1950s for treating leukemia with bone marrow transplantation, which became safer after the discovery of the human leukocyte antigen system. Such allogenic transplants

often associate with graft-versus-host disease, which can now be controlled and used for its graft-versus-tumor effects.

Cancer therapy can also make use of autologous tumor-infiltrating lymphocytes,¹ which notably proved efficient for treating melanomas. Recently, it became possible to engineer T cells expressing CAR T cells,² and use of immune cells generated from induced pluripotent stem cells also emerged.^{3,4} Although such therapies become a new standard, using other lineages could expand the spectrum of immunotherapies, and B cells are specifically attractive in this regard, given their capacities to produce large amounts of immunoglobulin and to support immune memory.

Recent developments in immunotherapy

Although antibodies and immune cells are the most specific tools for immunotherapy, new strategies for manipulating their production are further expanding the spectrum of their applications (Figure 2).

Recent developments in mAb therapy

mAbs provide the largest class of biomedicines for treating cancers, infections, and autoimmunity, and their efficacy constantly improves. Murine mAbs have been largely replaced by less immunogenic chimeric, humanized, or even entirely human mAbs. Abs can be conjugated with cytotoxic drugs and with other functional proteins for conveying them to specific targets. The improved targeting of antibody-drug conjugates translates into lower toxicity of the attached drug. Antibody-drug conjugate specificity can even be increased by making use of bispecific mAbs. Strategies for enhancing mAb stability are also available either through optimized binding to the neonatal Fc receptor (FcRn) or through conjugation with hydrophilic polymers such as polyethylene glycol. Reciprocally, a classical strategy to extend the half-life of recombinant proteins and eventually strengthen their immunomodulating properties is to fuse them with an IgG Fc domain that notably results in their recycling by the FcRn. Etanercept, a soluble tumor necrosis factor receptor

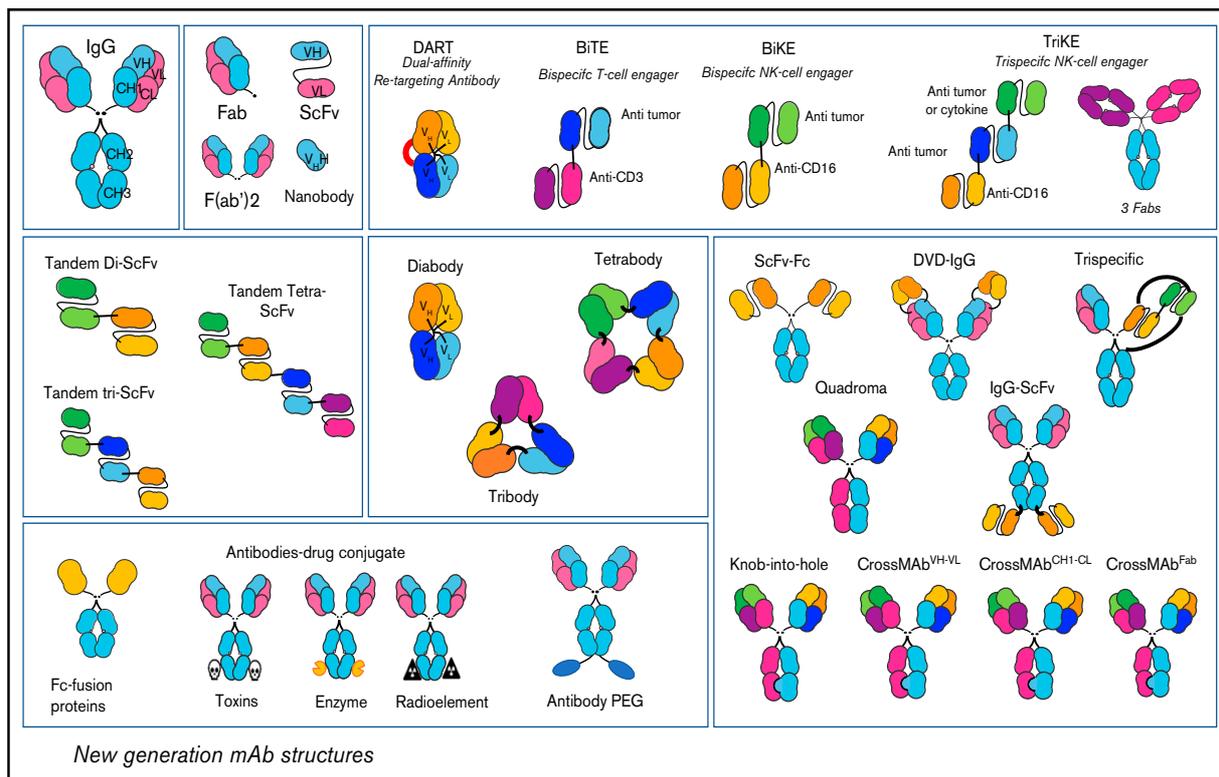


Figure 2. New-generation mAb structures. Because of biological engineering, multiple structures of antibodies exist today. Therapeutic mAb structures are increasingly humanized, some are only fragments (ScFv, nanobody), and others are combined with drugs such as toxins, enzymes, radioelements, or with chemicals like polyethylene glycol. There are also Abs able to bind 2 or 3 different targets at the same time named BiTE (bispecific T-cell engager), BiKE (bispecific NK-cell engager), TriKE (trispecific NK-cell engager), quadroma, Knob-into-hole, CrossMabVH-VL, CrossMabCH1-CL, CrossMabFab, and dual variable domain IgG (DVD-IgG).

(TNFR)-Fc; abatacept, a soluble cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA4)-Fc; and luspatercept (activinRIIb-Fc) are such immunomodulatory fusion proteins.

There are still some limitations with mAb therapy, such as the treatment escape or the formation of aggregates,⁵ and we thus need next-generation strategies delivering Abs with modulated half-life, effector properties, biodistribution, and toxicity. This also includes functional Ab fragments, monovalent Fabs or bivalent F(ab')₂, single-domain Abs (nanobodies), and single-chain variable fragments (ScFv). Nanobodies composed of VL, VH, or V_HH (ie, the type of V domain naturally found in some sc camelid Abs) are small-size molecules that remain as specific as conventional Abs. They are highly soluble, do not aggregate, and efficiently reach poorly vascularized tissues, and, in the absence of effector domains, they mostly act as antagonists or allosteric inhibitors.⁶

ScFvs are composed of linked VH and VL domains, eventually combined as dimers (diabody), trimers (tribody), or even tetramers (tetrabody), to increase their avidity for the target. Associating different ScFvs can cumulate their specificities, as for bispecific T-cell engagers (BiTEs) aimed at bridging target with effector cells. Blinatumomab, for example, bridges CD19⁺ target cells with cytotoxic T cells, and a trispecific Ab was proposed to target myeloma cells together with CD3 on T cells and the costimulatory CD28.⁷ Similarly, natural killer cell engagers (NKCEs) associate anti-CD16 binding NK cells, with 1 (BiKE) or 2 (TriKE) other scFvs specific for cancer cells. Some TriKEs additionally bind a cytokine,

enhancing NK activity.⁸ Instead of 3 Fabs, another format of NKCEs includes an Fc domain, naturally binding CD16, together with an anti-NKG2A checkpoint inhibitor Fab further increasing NK activity by blocking the NKG2A/MHC class I inhibitory signal.⁹ Being smaller than regular mAbs, such next-generation Abs can reach a broader biodistribution.¹⁰

Multivalent Abs are also attractive next-generation weapons against pathogens and notably brought broad anti-HIV specificity and protection in a nonhuman primate (NHP) model.¹¹

Current stage of cell therapy with retargeted T cells (CAR T cells)

CAR T-cell therapy is the latest success story in cell therapy. It is based on the forced expression of a new Ag-binding receptor able to activate transduced or transfected primary T cells against a given Ag (usually a tumor Ag).¹² Additional modifications of engineered T cells were also proposed to ensure local secretion by T cell of a soluble anticancer molecule, using CAR T cells as micro-pharmacies.¹³

As for CAR T cells tisagenlecleucel (Kymriah; Novartis) and axicabtagene ciloleucel (Yescarta; Gilead), approved in 2017 against CD19, current CAR T cells mostly rely on retroviruses and lentiviruses. Although there is no report of oncogenic insertion in the case of CAR T cells, such vectors still carry this potential risk, calling for the development of safer gene delivery strategies. Electroporation is a common mean for introducing naked DNA, RNA, or proteins into

cells, and CAR T cells were indeed also obtained after simple plasmid electroporation but only with transient expression.^{14,15} DNA insertion and stable expression with rarer oncogenic integration than with retroviruses were also obtained using transposase-based systems.^{16,17}

DNA mini-circles (devoid of bacterial DNA) are also efficient vectors and have yielded functional CAR T cells persisting *in vivo* for more than 28 days.¹⁸ They, however, still carry a risk of random genomic insertion.

Electroporation of mRNA provides an alternative to DNA and can yield expression greater than 90%, with 80% cell viability.¹⁹ Although restricted to transient (<1 week) expression, this is hereby attractive in terms of safety, with no risk of oncogenic integration and obviating the need for any suicide safety system for eliminating transfected cells in case of side effects.²⁰ It, however, remains to be demonstrated whether such transient CAR expression would yield cancer remission.²¹

Although simple electroporation of nucleic acids is costly in terms of cell viability, use of nanoparticles captured through endocytosis was recently used for improving CAR T-cell transfection.²² This strategy could also be applied for mRNA transfection.²³ Altogether, CAR T-cell therapy still carries limitations related to efficiency, persistence of engineered T cells, safety, and pricing. Future protocols resolving these limitations and notably including precise genome editing will crucially help to broaden their applications.

Cell therapy in the era of precise genome editing

Although random genomic insertion carries safety issues, new genome editing tools now make it possible to induce on-purpose mutations, deletions, and insertions. These tools, especially the CRISPR/Cas9 system and its variants, are entering into therapeutic applications at least based on their *ex vivo* use.^{24,25} Precise genome editing thus begins to be developed for safer generation of CAR T cells by targeting the TCR loci, simultaneously disrupting endogenous TCR expression and bringing expression of a specific CAR.

Recent developments of gene editing tools. After zinc finger nucleases and transcription activator-like effector nucleases first provided DNA scissors and were efficiently used for TCR gene editing,²⁶⁻²⁸ CRISPR/Cas9 has become the most efficient and versatile system for genome engineering via RNA-guided cleavage.²⁹ The CRISPR/Cas9 toolbox now uses single guide RNA molecules, combining both RNA molecules necessary for initiating a specific cleavage,³⁰ and the Cas9 nuclease delivered to cells by DNA or mRNA transfection or simply as a protein.³¹ Variants of this system such as nickases, dead Cas9 binding DNA without cleavage, or concomitant use of Cas9 inhibitors can further improve specificity or promote precise base replacements.³² Cas9 breaks can be repaired by homology-directed repair (HDR) and then promote precise integration of a template DNA flanked with adequate homology arms.^{33,34} These technologies are in constant development and strongly expand the possibilities of manipulating DNA, with a huge diversity of potential applications.

CRISPR edition in cell therapy. CRISPR tools recently allowed to insert a CD19-specific CAR in the T-cell receptor alpha (TCRA) locus, improving both CAR expression, cytotoxicity, and persistence of functional CAR T cells in a preclinical model.³⁵

Successful TCR gene replacement was then obtained both with an adeno-associated virus (AAV), which favors HDR,³⁶ and with a simple naked DNA template.³⁷ The possibility to simultaneously target several loci with CRISPR also opens the way for multiengineered universal off-the-shelf CAR T cells (designed for tolerance by various recipients and limited graft-versus-host disease). Ren et al³⁸ notably succeeded in simultaneous CRISPR inactivation of *TCR*, *B2M*, and *PDCD1* genes, generating universal CAR T cells without human leukocyte antigen class I expression and capable of bypassing the PD-1 checkpoint inhibition.

The current challenge of CRISPR engineering in human T cells is to increase the proportion of successfully transformed cells, which is currently below that reached after viral transduction. Multiple attempts to improve HDR efficiency during CRISPR edition are thus currently tested.^{39,40} Cas9 variants with higher fidelity might also reduce off-target genomic lesions.⁴¹ Such developments should more efficiently yield next-generation CAR T cells in a context where this therapy is increasingly used. Beyond the remaining challenges of mastering side effects and safety issues, it is also tempting to explore gene editing strategies for the therapeutic use of other types of human lymphoid cells and notably B cells.

Future immunotherapy strategies from the immunoglobulin/B-cell side

Gene therapy for *in vivo* mAb production (vectored immunotherapy)

Vectored immunotherapy with viruses. Although retro/lentiviruses have a known risk of oncogenesis,⁴² AAVs currently stand as convenient vectors for gene delivery, neither integrating into the host genome nor associating with any disease, and successful therapy based on AAVs was demonstrated against hemophilia.^{43,44} Applications to mAb delivery, termed vectored immunoprophylaxis, emerged for various infectious pathogens such as HIV⁴⁵ (Figure 3) and proved efficient in mice against *Plasmodium falciparum* and Ebola virus and in monkeys against Simian immunodeficiency virus.⁴⁶⁻⁴⁸ Vectored immunoprophylaxis might also treat tumors and increased survival was notably obtained with AAV-encoded trastuzumab in mice carrying HER2⁺ tumors.⁴⁹

The limited packaging capacity of AAVs has prompted to improve the design of cassettes coding for mAb chains. Addition of a self-processing P2A peptide allowed to encode both H and L chains using a monocistronic cassette.⁵⁰ Several other formats of mAb-encoding cassettes were expressed from AAVs, but the frequent anti-AAV immune response constitutes a brake for clinical applications, together with antidrug antibodies targeting the therapeutic mAb. Despite such limitations, the AAV platform remains an interesting, vectored immunotherapy option.

Naked DNA-encoded mAbs. Naked DNA-encoded mAbs (DMAbs) stand as another platform for mAb *in vivo* delivery. It is relatively safe because naked DNA is neither infectious nor immunogenic by itself. Many studies thus used DMAbs to treat infection⁵¹⁻⁵⁷ or cancer.^{58,59} This strategy was initially limited by low expression, but delivery and expression have now been optimized.⁶⁰

Two mAb formats, either complete or restricted to the Fab, were compared by the DMAb strategy in the context of chikungunya

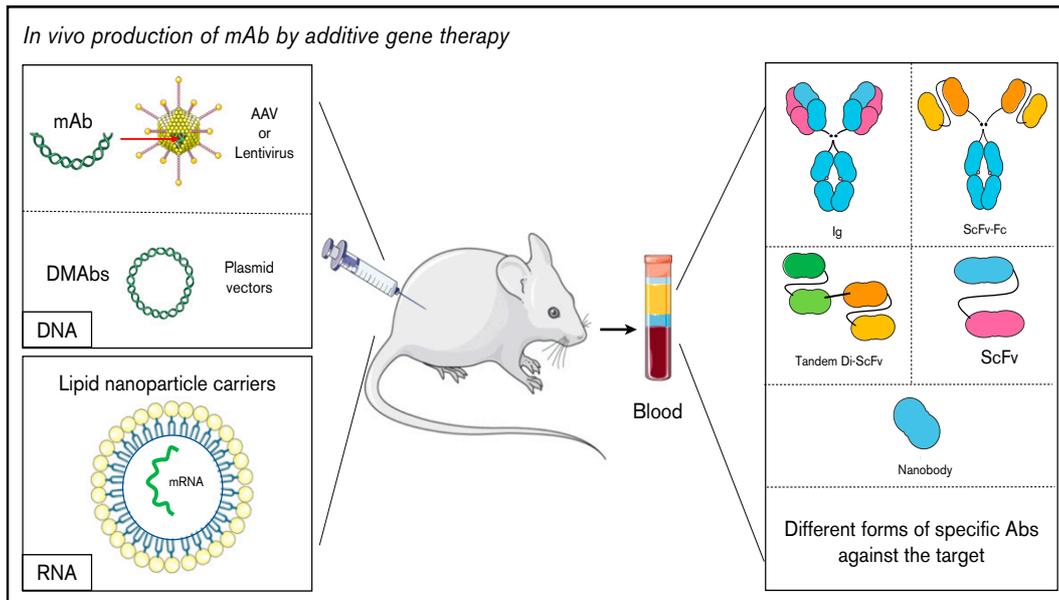


Figure 3. In vivo production of mAb by additive gene therapy. The mAbs can be produced by direct or indirect injection (using viruses such as lentiviruses or AAVs) of DNA encoding the desired antibody. They can also be produced by the injection of mRNA carried by lipid nanoparticles. mAbs are then detected in biological fluids. It is possible to obtain different antibody formats such as a complete immunoglobulin, an ScFv, or a nanobody depending on the original sequence.

infection, with the former providing the best immunity.⁵³ Although this strategy can rely on a single DNA fragment linking H and L chain sequences with a P2A site, simultaneous injection of several DMAbs was also shown possible.^{51,52,54} In both influenza and HIV infection, combined DMAb yielded immunity.^{52,54} Muthumani et al⁵³ highlighted another combination strategy by simultaneously injecting a DNA vaccine encoding the CHIKV envelope and a DMAb that neutralizes the CHIKV. Patel et al,⁵⁶ for their part, successfully used DMAb to produce a bispecific mAb that targets 2 proteins essential to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. Preliminary experiments in NHPs with DMAb targeting the Zika virus suggested that this could be translatable to humans because it raised sufficient Ab levels for controlling viral load.⁵⁶ DMAb targeting HIV also showed strong in vivo IgG expression in NHP.⁵²

Besides infections, this strategy is pertinent to oncology and demonstrated significant antitumor activity in vivo (being as effective as a conventional mAb) for controlling tumor growth,^{58,59} increasing CD8 T-cell infiltration, and decreasing the infiltration of T regulatory cells into tumors.⁵⁸

DMAb can thus be of interest for short- and medium-term treatment of various pathologies by rapidly and efficiently supporting the production of specific mAbs.⁵⁵ Repeated DMAb injections are, however, needed when prolonged treatment is required. Safety issues also finally remain associated with the potential risk of oncogenic random genomic insertion.

RNA injection: a safer alternative? As for CAR induction, in vivo mAb production has also motivated safe RNA-based approaches (with no risk of genomic insertion, oncogenic hit, or vector immunogenicity). Using lipid nanoparticles as carriers, Pardi et al⁶¹ optimized the cytosolic transfer of the mRNA encoding H and L chains of an anti-HIV neutralizing mAb. A single intravenous dose

of mRNA-lipid nanoparticles (LNPs) yielded in vivo mAb expression at 170 $\mu\text{g/mL}$ after 24 hours, and weekly administration made it possible to maintain a high mAb concentration. This protected mice against challenge with an HIV derivative and showed that mRNA-LNP coding for mAbs could replace mAb injection. In a recent and encouraging study, Kose et al⁶² also showed that an mRNA encoding a chikungunya-neutralizing human mAb expressed after a single intravenous injection of mRNA-LNPs decreased the viremia of mice challenged with the virus. Besides, it has also been shown that effective RNA-based approaches can be applied to cancer immunotherapy.^{63,64}

Contrary to DNA injection, this strategy requires repeated administration to maintain a stable mAb level in vivo. Its transient efficacy (as for regular mAb treatment) can thus be a limitation for long-term treatments of chronic diseases, and more trials are still needed to ensure the absence of side effects. Despite this limitation, this drug format is significantly cheaper than proteins because the production of synthetic mRNA therapeutics⁶⁵ does not require expensive cell culture and purification systems. This is an important aspect, given the very high cost of mAb therapy.

Genome editing for in vivo mAb production

Genome editing technologies have strongly expanded the possibilities of manipulating DNA. When applied to Ab production, they allow more precise control via gene engineering of B-lineage cells.

Although in vivo cell modification therapies might be a future goal, ex vivo modification after cell sorting obviates the need for cell targeting.⁶⁶ Another advantage is the possibility to analyze and characterize the modified cells before reintroducing them back into the host.⁶⁷ In the context of mAb therapy, B-lineage cells isolated from peripheral blood or lymphoid organs are perfect targets, because they are the ultimate antibody-secreting cells.⁶⁸ A system

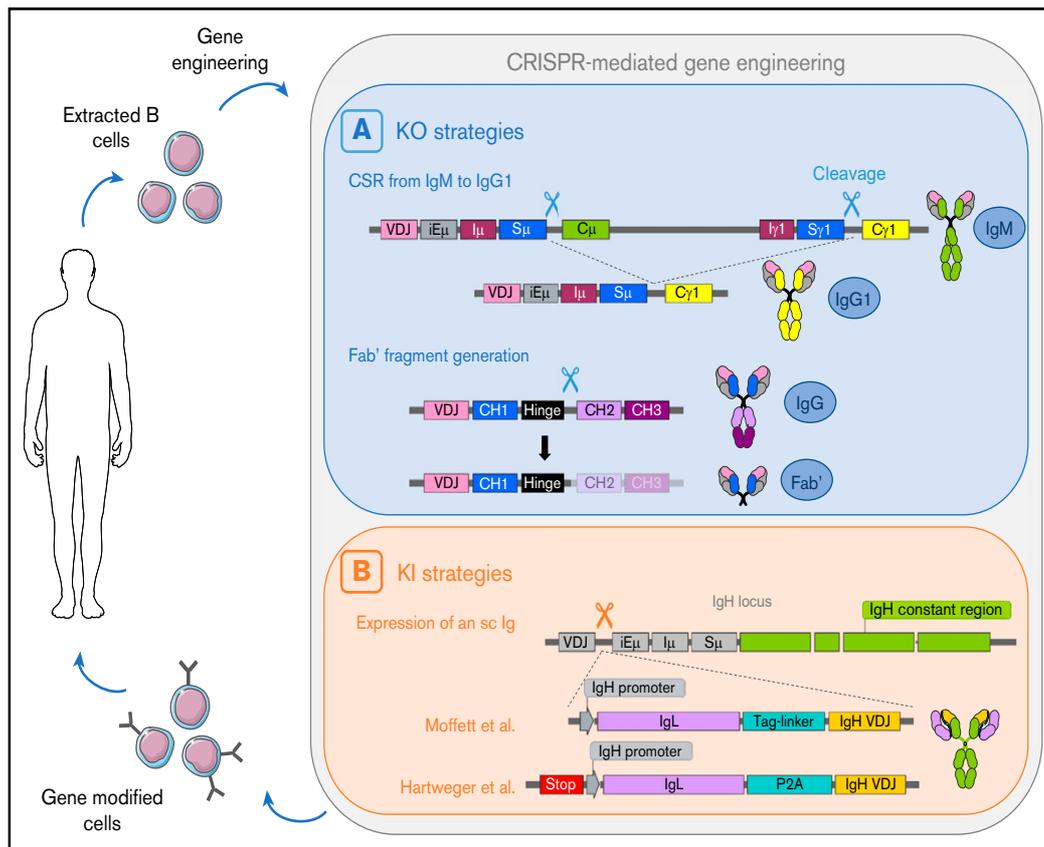


Figure 4. A potential cycle of B cell-mediated therapies including an ex vivo genome edition step. B cells are extracted from the patient, gene-edited using CRISPR/Cas9 technology, and infused back to the patient. (A) Two cleavages can lead to deletion of the C_{μ} gene and class switch recombination from IgM to IgG.⁷⁷ One cleavage between the hinge region and the constant region allows the generation of a Fab' fragment.⁷⁷ (B) Insertion of a cassette encoding the VH chain and a light chain linked with a tag-linker leads to expression of an sc immunoglobulin with modified specificity.⁷⁹ Hartweiger et al⁸⁰ described a similar strategy with an additional stop codon to disrupt expression of the endogenous immunoglobulin. iE, enhancer; I, intervening; S, switch; C, constant.

where B cells are isolated from peripheral blood, modified ex vivo for mAb secretion and injected back into the organism (Figure 4), would be an ideal therapeutic strategy with applications for both cancer and viral infection treatment.⁶⁹

Successful B-cell modification was first obtained using lentiviral transduction methods.⁷⁰⁻⁷² Primary human hematopoietic cells, including B cells, were efficiently transduced with lentiviral vectors encoding anti-HIV broadly neutralizing Abs. Edited cells engrafted and persisted in blood and lymphoid tissues in vivo in humanized mice, efficiently secreting antiviral broadly neutralizing Abs.⁷²

However, nonspecific lentiviral insertions could target regions essential for cell viability or function, compromising clinical applications.⁶⁹ CRISPR/Cas9 site-specific cleavage can by contrast result in precise insertion by HDR.^{67,69} Cas9, guide RNA (gRNA), and the repair template for HDR can be brought into target cells as plasmids, mRNAs, or a ribonucleoprotein (RNP).^{66,69} In primary human B cells, RNPs seem to be highly efficient, whereas Cas9-encoding DNA and mRNA often lead to poor or no DNA cleavage.^{66,69} To optimize HDR in cells at the S/G2 phases of the cell cycle,^{34,73,74} various B-cell expansion mixtures were tested,^{66,69,75} and the optimal B-cell

activation cocktail included CD40L, cytosine-phosphate-guanine (CpG), IL-2, IL-10, and IL-15.⁷⁵

Efficient CRISPR/Cas9-mediated knockout in human B cells was obtained in several conditions.^{66,69,75,76} Cheong et al⁷⁷ used lentiviral vectors carrying Cas9 and gRNA sequence. By using 2 gRNAs, 1 specific for a region near S_{μ} and 1 near S_{γ} , they induced deletions and efficiently mimicked class switch recombination in both mouse and human primary B cells. They also succeeded in generating Fab' fragment-secreting hybridomas after deleting the Fc domain-coding region, with secretion at a level comparable to the original complete immunoglobulin. This strategy would simplify the process of producing Fab' in vitro as proteins, which is currently based mainly on protease cleavage. Recently, an integrase-defective lentiviral vector was also used to target precise insertion of an antibody cassette into the *GAPDH* gene and yielded efficient expression in plasma cells.⁷⁸

Expressing transgenic immunoglobulins (ie, H2L2 polymers) in normal B cells in fact involves several challenges: high expression, stoichiometric expression of both chains, and, if possible, disruption of endogenous immunoglobulin genes to minimize the assembly of chimeric immunoglobulin (ie, randomly mixing transgenic and endogenous immunoglobulin chains of unpredictable specificity).

It is thus desirable to design transgenic protocols also disrupting endogenous immunoglobulin production. HDR knock-in (KI) at the immunoglobulin locus was thus explored using various strategies. The first successful immunoglobulin gene KI in B cells used an RNP/AAV combination.^{69,75,79} Reporter cassettes were efficient inserted,^{69,75} and gene modification for secretion of a survival factor was achieved in human PCs.⁷⁵ Moffett et al⁷⁹ engineered the IgH locus to make cells secrete a mAb that bound the respiratory syncytial virus (RSV). Their cassette was introduced upstream of the E_μ enhancer and included a heavy chain promoter, the light (L) chain, a long linker, and the variable region of the H chain. Such an sc strategy both disrupted endogenous IgH chain production and forced an appropriate pairing of the transgenic heavy (H) and L chain peptides. This cassette, followed by a site for splicing of the VDJ exon to the endogenous C_μ gene, thus encoded a complete (although sc) antibody. Electroporation with RNP for cleavage was followed by incubation with AAV providing the KI cassette. This strategy led to efficient expression of engineered immunoglobulin in primary human B cells, later differentiating into PCs and secreting the engineered mAb.

Combination of RNP with double-strand or single-strand (ssDNA) DNA templates was also reported. In mice, a KI cassette for an anti-RSV mAb provided as a double-strand DNA template successfully yielded anti-RSV immunity.⁷⁹ Transferred cells were then able to differentiate *in vivo* into both long-lived PCs and switched memory B cells. Greiner et al⁶⁶ inserted ssDNA templates into the H or L chain loci to engineer B cells producing either mAbs or nanobodies that aimed at neutralizing tumor necrosis factor α . Hartweiger et al⁸⁰ also used an ssDNA template to produce mAbs against HIV-1 and showed them to be functional when produced either by engineered mouse or human B cells. Their strategy simultaneously disrupted the κ L chain in primary B cells using RNPs and expressed a transgenic H and L chains cassette, inserted in the first IgH intron (downstream of JH). This cassette began with a stop cassette to interrupt the transcription of the endogenous VDJ, followed by a VH promoter, a sequence encoding Ig κ , a P2A cleavage site, and the VDJ region of the transgenic H chain. Splicing of a KI VDJ onto the endogenous constant region (as also cited for the work of Moffett et al⁷⁹) has the advantage to be compatible with eventual class-switch recombination and production of the engineered mAb under various classes.

For all immunoglobulin gene engineering strategies presented thus far, a common issue is the low editing efficiency, especially in primary B cells. A recent paper reported a method to increase editing yield, using nanoparticles and modifications of the HDR template.⁸¹ Truncated Cas9 target sequences were added at both ends of the repair template, allowing them to recruit Cas9. Using Cas9 variants coupled with nuclear localization sequences, as a shuttle bringing the template to the genomic DNA, was also used, together with poly-L-glutamic acid to stabilize RNP nanoparticles associated with HDR template. Altogether, these tricks enhanced editing efficiency in different cell types, especially when used jointly. In B cells, it improved editing efficiency by fivefold. Poly-L-glutamic acid even permitted stabilized RNPs to resist freeze-thaw cycles and lyophilization without losing efficiency.

Despite remaining difficulties and challenges, primary B-cell editing is obviously promising and worth efforts. Modified B cells can

differentiate into memory B cells and/or Ab-secreting PCs,^{75,79} and successful differentiation of reinfused modified B cells was reported.^{82,83} Transferred PCs could eliminate the need for periodic mAb injections,⁶⁹ required for some current therapies because of limited persistence in the organism.⁷² In some patients with immune deficiency, it could replace vaccines to protect against infections.⁶⁹ Contrary to the fixed structure of mAbs, engineered B cells might also be eventually capable of evolving into variants, notably through class switching, when appropriate insertion template is used.^{80,83,84} Another possible evolution of an adoptive B-cell receptor in edited B lymphocytes might be the entry into new rounds of Ag binding selection and *in vivo* affinity maturation.^{79,84} Such a feature would be tremendously helpful for providing durable immunity against mutating antigens such as viruses or cancer cells (evolving during chronic infection or reinfection or cancer relapse). Such adoptive immunotherapy would then dynamically reformat humoral immunity on purpose, by redesigning B-cell specificity while preserving their ability to evolve along successive immune challenges.

Among the methodologic breaks still needed before clinical applications, increasing the amount of mAb secreted by edited B cells is first. In most published models, mAb concentration rarely reached the level needed for immunity and rapidly declined.⁷⁹ *Ex vivo* amplification of primary B cells and conditions for their commitment into either short or long-lived survival remain ill defined. Understanding how *ex vivo* amplification could preserve or strengthen a long-lived commitment will need to be mastered for optimal B-cell engineering after optimized culture. Moreover, as only mouse models were used thus far, experimentation in NHP is required before clinical applications. By better mimicking the human patterns of viral infections or tumor progression, this will notably allow to estimate the number of cells required for a protective immunity and the best conditions for their successful graft.

Another major concern relates to the safety of gene edition in a lineage highly exposed to oncogenic transformation and off-target mutations driven by the activation-induced deaminase activity.^{79,80,84-86} Cas9 off-target mutations can be reduced by using nickase variants such as D10A⁸⁵ and then needing 2 adjacent on-target cleavage sites. This strongly reduces the risk of an off-target double-strand break. Mutant Cas9 with reduced off-target activity are also reported.⁸⁶ Safety issues for B-cell adoptive immunotherapy could also partly be solved by efficient schemes for clearing edited cells in case of undesired side effects. Efficient therapies are available for total B-cell or plasma cell deletion with anti-CD20 or anti-CD38 therapeutic mAbs. More specifically, suicide strategies such as inducible apoptosis by Cas12^{87,88} were validated in T-cell adoptive immunotherapy protocols and could be applied to edited B cells.

Overall, despite these various efficiency and safety issues, there are already strong preliminary elements showing that adoptive B-cell immunotherapy is feasible and should soon take its part in the therapeutic arsenal, solving a number of unmet needs in human health.

Acknowledgments

This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) Foundation for Cancer Research grant

RF20180207070 (M. Cogné) and French National Research Agency grant 18-CE18-0022-02 (M. Cogné).

Authorship

Contribution: N.U., M. Cahen, and M. Cogné conceptualized the study; N.U., M. Cahen, Y.D., and M. Cogné prepared the original draft; N.U., M. Cahen, J.M., C.S., and M. Cogné reviewed and edited the manuscript; M. Cogné supervised the study; and C.S. and M. Cogné provided funding.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: N.U., 0000-0001-6204-6264; M. Cahen, 0000-0002-9058-9351; Y.D., 0000-0002-5611-5048; J.M., 0000-0002-5717-3207; C.S., 0000-0002-1183-4989; M. Cogné, 0000-0002-8519-4427.

Correspondence: Michel Cogné, INSERM U1236, Faculté de Médecine, University of Rennes, 2 Av du Pr. Léon Bernard, 35000 Rennes, France; e-mail: michel.cogne@inserm.fr.

References

1. Garber K. Pursuit of tumor-infiltrating lymphocyte immunotherapy speeds up. *Nat Biotechnol.* 2019;37(9):969-971.
2. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(16):1509-1518.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676.
4. Miyashita A, Fukushima S, Nakahara S, et al. Immunotherapy against metastatic melanoma with human IPS cell-derived myeloid cell lines producing type I interferons. *Cancer Immunol Res.* 2016;4(3):248-258.
5. Nabhan M, Pallardy M, Turbica I. Immunogenicity of bioproducts: cellular models to evaluate the impact of therapeutic antibody aggregates. *Front Immunol.* 2020;11:725.
6. Kijanka M, Dorresteijn B, Oliveira S, van Bergen en Henegouwen PMP. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomed.* 2015;10(1):161-174.
7. Wu L, Seung E, Xu L, et al. Trispecific antibodies enhance the therapeutic efficacy of tumor-directed T cells through T cell receptor co-stimulation. *Nat Can.* 2020;1(1):86-98.
8. Wiernik A, Foley B, Zhang B, et al. Targeting natural killer cells to acute myeloid leukemia in vitro with a CD16 x 33 bispecific killer cell engager and ADAM17 inhibition. *Clin Cancer Res.* 2013;19(14):3844-3855.
9. Gauthier L, Morel A, Anceriz N, et al. Multifunctional natural killer cell engagers targeting Nkp46 trigger protective tumor immunity. *Cell.* 2019;177(7):1701-1713.e16.
10. Davis ZB, Vallera DA, Miller JS, Felices M. Natural killer cells unleashed: checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy. *Semin Immunol.* 2017;31:64-75.
11. Xu L, Pegu A, Rao E, et al. Trispecific broadly neutralizing HIV antibodies mediate potent SHIV protection in macaques. *Science.* 2017;358(6359):85-90.
12. Jackson HJ, Rafiq S, Brentjens RJ. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(6):370-383.
13. Boice M, Salloum D, Mourcin F, et al. Loss of the HVEM tumor suppressor in lymphoma and restoration by modified CAR-T cells. *Cell.* 2016;167(2):405-418.e13.
14. Wang W, Ma Y, Li J, et al. Specificity redirection by CAR with human VEGFR-1 affinity endows T lymphocytes with tumor-killing ability and anti-angiogenic potency. *Gene Ther.* 2013;20(10):970-978.
15. Chen Z-Y, He C-Y, Ehrhardt A, Kay MA. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol Ther.* 2003;8(3):495-500.
16. Vargas JE, Chicaybam L, Stein RT, Tanuri A, Delgado-Cañedo A, Bonamino MH. Retroviral vectors and transposons for stable gene therapy: advances, current challenges and perspectives. *J Transl Med.* 2016;14(1):288.
17. Magnani CF, Mezzanotte C, Cappuzzello C, et al. Preclinical efficacy and safety of cd19car cytokine-induced killer cells transfected with sleeping beauty transposon for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Hum Gene Ther.* 2018;29(5):602-613.
18. Han J, Gao F, Geng S, et al. Minicircle DNA-engineered CAR T cells suppressed tumor growth in mice. *Mol Cancer Ther.* 2020;19(1):178-186.
19. Zhao Y, Zheng Z, Cohen CJ, et al. High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation. *Mol Ther.* 2006;13(1):151-159.
20. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev.* 2019;34:45-55.
21. Krug C, Wiesinger M, Abken H, et al. A GMP-compliant protocol to expand and transfect cancer patient T cells with mRNA encoding a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(10):999-1008.
22. Smith TT, Stephan SB, Moffett HF, et al. In situ programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers. *Nat Nanotechnol.* 2017;12(8):813-820.
23. Billingsley MM, Singh N, Ravikumar P, Zhang R, June CH, Mitchell MJ. Ionizable lipid nanoparticle-mediated mRNA delivery for human CAR T cell engineering. *Nano Lett.* 2020;20(3):1578-1589.
24. Ho BX, Loh SJH, Chan WK, Soh BS. In vivo genome editing as a therapeutic approach. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9):2721.
25. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF III. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013;31(7):397-405.

26. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(3):1156-1160.
27. Chandrasegaran S, Carroll D. Origins of programmable nucleases for genome engineering. *J Mol Biol*. 2016;428(5 Pt B5 Pt B):963-989.
28. Qasim W, Zhan H, Samarasinghe S, et al. Molecular remission of infant B-ALL after infusion of universal TALEN gene-edited CAR T cells. *Sci Transl Med*. 2017;9(374):eaaj2013.
29. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709-1712.
30. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821.
31. Yin H, Kauffman KJ, Anderson DG. Delivery technologies for genome editing. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(6):387-399.
32. Marino ND, Pinilla-Redondo R, Csörgő B, Bondy-Denomy J. Anti-CRISPR protein applications: natural brakes for CRISPR-Cas technologies. *Nat Methods*. 2020;17(5):471-479.
33. Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet*. 2010;11(9):636-646.
34. Yamamoto Y, Gerbi SA. Making ends meet: targeted integration of DNA fragments by genome editing. *Chromosoma*. 2018;127(4):405-420.
35. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*. 2017;543(7643):113-117.
36. Moço PD, Aharony N, Kamen A. Adeno-associated viral vectors for homology-directed generation of CAR-T cells. *Biotechnol J*. 2020;15(1):e1900286.
37. Roth TL, Puig-Saus C, Yu R, et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature*. 2018;559(7714):405-409.
38. Ren J, Liu X, Fang C, Jiang S, June CH, Zhao Y. Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1 inhibition. *Clin Cancer Res*. 2017;23(9):2255-2266.
39. Tang X-D, Gao F, Liu M-J, Fan QL, Chen DK, Ma WT. Methods for enhancing clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated homology-directed repair efficiency. *Front Genet*. 2019;10:551.
40. Aird EJ, Lovendahl KN, St Martin A, Harris RS, Gordon WR. Increasing Cas9-mediated homology-directed repair efficiency through covalent tethering of DNA repair template. *Commun Biol*. 2018;1:54.
41. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*. 2015;523(7561):481-485.
42. Yi Y, Noh MJ, Lee KH. Current advances in retroviral gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2011;11(3):218-228.
43. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response [published correction in *Nat Med*. 2006;12(5):592]. *Nat Med*. 2006;12(3):342-347.
44. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med*. 2014;371(21):1994-2004.
45. Balazs AB, Chen J, Hong CM, Rao DS, Yang L, Baltimore D. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature*. 2011;481(7379):81-84.
46. Deal C, Balazs AB, Espinosa DA, Zavala F, Baltimore D, Ketner G. Vectored antibody gene delivery protects against *Plasmodium falciparum* sporozoite challenge in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(34):12528-12532.
47. van Lieshout LP, Soule G, Sorensen D, et al. Intramuscular adeno-associated virus-mediated expression of monoclonal antibodies provides 100% protection against Ebola virus infection in mice. *J Infect Dis*. 2018;217(6):916-925.
48. Martinez-Navio JM, Fuchs SP, Pantry SN, et al. Adeno-associated virus delivery of anti-HIV monoclonal antibodies can drive long-term virologic suppression. *Immunity*. 2019;50(3):567-575.e5.
49. Rothwell WT, Bell P, Richman LK, et al. Intrathecal viral vector delivery of trastuzumab prevents or inhibits tumor growth of human HER2-positive xenografts in mice. *Cancer Res*. 2018;78(21):6171-6182.
50. Fang J, Qian J-J, Yi S, et al. Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat Biotechnol*. 2005;23(5):584-590.
51. Flingai S, Plummer EM, Patel A, et al. Protection against dengue disease by synthetic nucleic acid antibody prophylaxis/immunotherapy. *Sci Rep*. 2015;5(1):12616.
52. Wise MC, Xu Z, Tello-Ruiz E, et al. In vivo delivery of synthetic DNA-encoded antibodies induces broad HIV-1-neutralizing activity. *J Clin Invest*. 2020;130(2):827-837.
53. Muthumani K, Block P, Flingai S, et al. Rapid and long-term immunity elicited by DNA-encoded antibody prophylaxis and DNA vaccination against chikungunya virus. *J Infect Dis*. 2016;214(3):369-378.
54. Elliott STC, Kallewaard NL, Benjamin E, et al. DmAb inoculation of synthetic cross reactive antibodies protects against lethal influenza A and B infections. *NPJ Vaccines*. 2017;2(1):18.
55. Patel A, DiGiandomenico A, Keller AE, et al. An engineered bispecific DNA-encoded IgG antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa* in a pneumonia challenge model. *Nat Commun*. 2017;8(1):637.
56. Esquivel RN, Patel A, Kudchodkar SB, et al. In vivo delivery of a DNA-encoded monoclonal antibody protects non-human primates against zika virus. *Mol Ther*. 2019;27(5):974-985.

57. Patel A, Park DH, Davis CW, et al. In vivo delivery of synthetic human DNA-encoded monoclonal antibodies protect against ebolavirus infection in a mouse model. *Cell Rep*. 2018;25(7):1982-1993.e4.
58. Duperret EK, Trautz A, Stoltz R, et al. Synthetic DNA-encoded monoclonal antibody delivery of anti-CTLA-4 antibodies induces tumor shrinkage in vivo. *Cancer Res*. 2018;78:6363-6370.
59. Muthumani K, Marnin L, Kudchodkar SB, et al. Novel prostate cancer immunotherapy with a DNA-encoded anti-prostate-specific membrane antigen monoclonal antibody. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(12):1577-1588.
60. Tjelle TE, Corthay A, Lunde E, et al. Monoclonal antibodies produced by muscle after plasmid injection and electroporation. *Mol Ther*. 2004;9(3):328-336.
61. Pardi N, Secreto AJ, Shan X, et al. Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge. *Nat Commun*. 2017;8(1):14630.
62. Kose N, Fox JM, Sapparapu G, et al. A lipid-encapsulated mRNA encoding a potentially neutralizing human monoclonal antibody protects against chikungunya infection. *Sci Immunol*. 2019;4(35):eaaw6647.
63. Stadler CR, Bähr-Mahmud H, Celik L, et al. Elimination of large tumors in mice by mRNA-encoded bispecific antibodies [published correction in *Nat Med*. 2017;23:1241]. *Nat Med*. 2017;23(7):815-817.
64. Rybakova Y, Kowalski PS, Huang Y, et al. mRNA delivery for therapeutic anti-HER2 antibody expression in vivo. *Mol Ther*. 2019;27(8):1415-1423.
65. Pardi N, Hogan MJ, Weissman D. Recent advances in mRNA vaccine technology. *Curr Opin Immunol*. 2020;65:14-20.
66. Greiner V, Bou Puerto R, Liu S, Herbel C, Carmona EM, Goldberg MS. CRISPR-mediated editing of the B cell receptor in primary human B cells. *iScience*. 2019;12:369-378.
67. Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol*. 2016;34(9):933-941.
68. Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*. 1998;8(3):363-372.
69. Johnson MJ, Laoharawee K, Lahr WS, Webber BR, Moriarity BS. Engineering of primary human B cells with CRISPR/Cas9 targeted nuclease. *Sci Rep*. 2018;8(1):12144.
70. Luo XM, Maarschalk E, O'Connell RM, Wang P, Yang L, Baltimore D. Engineering human hematopoietic stem/progenitor cells to produce a broadly neutralizing anti-HIV antibody after in vitro maturation to human B lymphocytes. *Blood*. 2009;113(7):1422-1431.
71. Fusil F, Calattini S, Amirache F, et al. A lentiviral vector allowing physiologically regulated membrane-anchored and secreted antibody expression depending on B-cell maturation status. *Mol Ther*. 2015;23(11):1734-1747.
72. Kuhlmann A-S, Haworth KG, Barber-Axthelm IM, et al. Long-term persistence of anti-HIV broadly neutralizing antibody-secreting hematopoietic cells in humanized mice. *Mol Ther*. 2019;27(1):164-177.
73. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*. 1998;17(18):5497-5508.
74. Heyer W-D, Ehmsen KT, Liu J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 2010;44(1):113-139.
75. Hung KL, Meitlis I, Hale M, et al. Engineering protein-secreting plasma cells by homology-directed repair in primary human B cells. *Mol Ther*. 2018;26(2):456-467.
76. Wu CM, Roth TL, Baglaenko Y, et al. Genetic engineering in primary human B cells with CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *J Immunol Methods*. 2018;457:33-40.
77. Cheong T-C, Compagno M, Chiarle R. Editing of mouse and human immunoglobulin genes by CRISPR-Cas9 system. *Nat Commun*. 2016;7(1):10934.
78. Luo B, Zhan Y, Luo M, et al. Engineering of α -PD-1 antibody-expressing long-lived plasma cells by CRISPR/Cas9-mediated targeted gene integration. *Cell Death Dis*. 2020;11(11):973.
79. Moffett HF, Harms CK, Fitzpatrick KS, Tooley MR, Boonyaratanakornkit J, Taylor JJ. B cells engineered to express pathogen-specific antibodies protect against infection. *Sci Immunol*. 2019;4(35):eaax0644.
80. Hartweger H, McGuire AT, Horning M, et al. HIV-specific humoral immune responses by CRISPR/Cas9-edited B cells. *J Exp Med*. 2019;216(6):1301-1310.
81. Nguyen DN, Roth TL, Li PJ, et al. Polymer-stabilized Cas9 nanoparticles and modified repair templates increase genome editing efficiency. *Nat Biotechnol*. 2020;38(1):44-49.
82. Wang X, Ray R, Kratochvil S, et al. Multiplexed CRISPR/CAS9-mediated engineering of pre-clinical mouse models bearing native human B cell receptors. *EMBO J*. 2021;40(2):e105926.
83. Nahmad AD, Raviv Y, Horovitz-Fried M, et al. Engineered B cells expressing an anti-HIV antibody enable memory retention, isotype switching and clonal expansion. *Nat Commun*. 2020;11(1):5851.
84. Voss JE, Gonzalez-Martin A, Andrabi R, et al. Reprogramming the antigen specificity of B cells using genome-editing technologies. *eLife*. 2019;8:8.
85. Zhang X-H, Tee LY, Wang X-G, Huang Q-S, Yang S-H. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015;4:e264.
86. Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR, et al. A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2018;24(8):1216-1224.
87. Zhou X, Brenner MK. Improving the safety of T-cell therapies using an inducible caspase-9 gene. *Exp Hematol*. 2016;44(11):1013-1019.
88. Di Stasi A, Tey S-K, Dotti G, et al. Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy. *N Engl J Med*. 2011;365(18):1673-1683.

II. Objectifs

Dans l'objectif global d'obtenir une immunothérapie cellulaire basée sur le remaniement des gènes de cellules B humaines nous avons établi plusieurs axes de travail :

- Stratégies d'édition génomique de la lignée B humaine à l'aide de l'outil CRISPR/Cas 9
 - Ciblage du locus JCHAIN
 - Ciblage du locus IgH
 - Validation d'un nouveau format d'anticorps
 - Validation d'un nouveau format d'anticorps simple chaîne
 - Expression d'un anticorps simple chaîne par remplacement du BCR endogène dans des cellules B humaines
 - Diversification des stratégies d'édits dans le but d'exploiter le maximum de propriétés des cellules B
 - Expression d'une molécule thérapeutique sans impacter l'expression du BCR endogène dans des cellules B humaines
 - Induction du switch à IgA2 d'un hybridome anti-SARS-CoV-2
 - Expression d'un anticorps simple chaîne immédiatement switché IgA2 en remplaçant le BCR endogène dans des cellules B humaines
- Mise au point d'un modèle murin pour l'étude de la fonctionnalité de cellules B ingénierées
 - Mise au point des conditions optimales d'implantation des cellules B *in vivo* dans le but d'obtenir des plasmocytes à longue durée de vie
 - Mise au point de deux modèles tumoraux exprimant chacun la cible des anticorps produits (HER2 et CD20 humain)

Dernièrement, l'immunothérapie adoptive a connu une révolution grâce au recours à des cellules autologues ou allogénique rendues Ag-spécifiques *via* le génie génétique. Issues de cette stratégie, les « chimeric antigen receptor » (CAR) T cells sont les plus connues. Actuellement, les CAR-T cells sont génétiquement modifiées en introduisant (à l'aide d'un vecteur viral) dans le génome de ces cellules, un gène qui code pour un récepteur chimérique. Elles acquièrent ainsi l'expression d'un récepteur spécifique d'une cible.

Même si ces méthodes se sont largement développées sur la base d'une expression lentivirale, elles vont prochainement se décliner de plus en plus selon des stratégies d'édition génétique précise. L'édition du génome s'est vue facilitée par l'apparition de méthodes comme CRISPR/Cas9 qui, par sa simplicité, sa précision et son efficacité de ciblage, limitent le risque d'insertion oncogénique et de mutations « off-target ». Ces approches en essor se diversifient quant aux méthodes, aux récepteurs exprimés, et aux lignées « éditées ». Il est ainsi très raisonnable d'explorer aujourd'hui la production d'immunoglobulines (ou de molécules apparentées) par des cellules B qui seraient reformatées dans un but d'immunothérapie adoptive.

La lignée B constitue à l'évidence la source la plus adaptée de cellules capables de produire des Ig membranaires au stade des LB, ou des Ig sécrétées au stade plasmocytaire. Outre cette aptitude, une autre raison majeure de concevoir l'usage de cellules B thérapeutiques repose sur l'existence de nombreux moyens très efficaces de mettre fin à leur activité si nécessaire (avec de nombreuses thérapies anti-B, tel le rituximab ou anti-plasmocytaire), qui peuvent ajouter une sécurité supplémentaire, au-delà des moyens de contrôles disponibles en général pour les cellules remaniées en thérapie génique (usage de gènes suicides).

Les cellules B ont, pour la première fois, été modifiées (avec succès) par transduction lentivirale^{227,228,229}. L'expression *in vivo* d'un Ac anti-HIV broadly neutralizing Abs (bnAbs) par ces cellules modifiées et implantées dans un modèle de xénogreffe à une souris humanisée²²⁹ montre la faisabilité d'un recours aux cellules B pour l'expression d'Ac. Comme expliqué plus haut, ce type d'approche comporte des risques non négligeables, car l'insertion lentivirale est non spécifique. Le clivage CRISPR/Cas 9 site-spécifique peut au contraire entraîner une insertion précise par recombinaison dirigée par des homologies « homology-directed repair » (HDR).^{230,231} Le format sous lequel sont introduits (dans les cellules cibles) la Cas 9, les guides ARN (ARNg) et la matrice de réparation pour l'HDR peut varier du plasmide, aux ARNm ou encore à une ribonucléoprotéine (RNP)^{231,232}. Dans le cas des cellules B primaires, les RNP semblent la plus efficace des stratégies^{231,232}. De manière intéressante, plusieurs équipes ont montré l'efficacité de ce système dans des cellules B pour réaliser un knock-out. Plus particulièrement Cheong *et al* ont, par le biais de deux ARNg ciblant spécifiquement S μ et S α , réussi à induire la commutation de classe dans des cellules B primaires de souris et humaines²³³. Cette approche pourrait notamment servir à développer des mAbs sous forme d'IgA (ciblage muqueux) ou d'IgG1 (Ac fortement neutralisant) à partir de cellules B exprimant naturellement ce mAb. Dans le cas où l'objectif est d'introduire le gène

d'une Ig transgénique dans le génome de cellules B, le challenge est d'autant plus élevé. En effet, obtenir une expression forte tout en ayant une expression stœchiométrique des deux chaînes qui composent un Ac est nécessaire pour un parfait assemblage de l'Ig. Les premières données de la littérature sur les stratégies d'insertion (Knock-in, KI) se sont basées sur le ciblage du locus IgH dans le but de perturber les gènes d'Ig endogènes afin de minimiser l'assemblage d'Ig chimérique (mélange aléatoire et donc imprévisible entre les chaînes d'Ig transgéniques et endogènes). Diverses stratégies de KI ont été proposées, en particulier liées aux cassettes d'insertions. Avec leur cassette simple chaîne, Moffett *et al*²³⁴ ont non seulement été en mesure d'interrompre la production de la chaîne d'IgH mais aussi capables de forcer l'appariement des deux chaînes pour permettre l'expression efficace de l'Ig modifiées dans les cellules B primaires humaines. De manière intéressante, la stratégie d'épissage d'un KI VDJ sur la région constante endogène présentée dans les travaux d'Hartweger *et al*²³⁵, rend possible une éventuelle recombinaison de commutation de classe et la production du mAb conçu sous diverses classes.

Dans ce contexte, mon projet contribue à un projet « Agence nationale de la recherche » (ANR) de mon équipe d'accueil (ingénierie des B humains par un consortium de 3 équipes, vers la production de mAbs *in vivo*). Cette stratégie démocratiserait l'emploi de certains formats mAbs d'usage délicat car peu stables ou à courte demi-vie (simple-chaîne, nanobodies, bispécifiques...).

La production *in vivo* par cellules reformatées pourrait résoudre des situations nécessitant :

- Un traitement chronique à vie (cancer, auto-immunité, inflammation ou infection chronique)
- Une infusion permanente, avec une concentration sérique et une biodisponibilité constante, d'un mAb (même s'il s'agit d'un mAb à demi-vie courte)
- Une éventuelle délivrance locale au niveau d'un tissu riche en plasmocytes (moelle osseuse, *lamina propria* ?)
- Le contournement de verrous de fabrication pour des mAbs instables (classes d'Ig dont la bioproduction n'est pas maîtrisée, telles les IgA ...).

Il serait bien sûr attractif d'éditer le BCR de lymphocytes B mémoires pour permettre de réagir à la persistance ou la réapparition d'un Ag et c'est une approche à laquelle j'ai collaboré avec Natsuko UEDA au fil de sa propre thèse. Cependant, l'objectif primaire le plus personnel de ma thèse est l'édition des plasmocytes (éventuellement à longue durée de vie) en vue de la sécrétion permanente d'un Ac protecteur anti-CD20 ou anti-HER2 (comme après une infection

ou un vaccin). Ces cellules sont en partie responsables de la protection immunitaire à long terme, en assurant un niveau suffisant d'Ac circulants pour contrer efficacement le retour d'un Ag. L'enjeu de mon projet est donc de réussir à non seulement reprogrammer des plasmocytes, mais aussi qu'ils soient « long-lived », aspect pour lequel j'ai travaillé à la mise en place d'un modèle murin humanisé « human-severe combined immunodeficiency » (Hu-SCID), dans lequel il nous soit possible de suivre l'évolution *in vivo* de cellules manipulées avec succès *in vitro*.

La crise sanitaire COVID nous impacte tous d'une façon ou d'une autre. Les patients atteints de cancer ont notamment été retardés dans leur diagnostic initial, leur suivi et parfois leur traitement, tous ces aspects étant pourtant essentiels à leur guérison. De plus, les traitements parfois immunosuppresseurs que reçoivent certains patients affaiblissent leurs défenses immunitaires et les rendent plus vulnérables à l'infection au SARS-CoV-2 ou aux surinfections associées. Il est donc primordial de limiter les risques pour ces personnes en leur faisant bénéficier d'une immunothérapie protectrice le plus rapidement possible. Dans un souci de participation à l'effort de recherche internationale, notre équipe s'est impliquée pendant la pandémie en développant un axe COVID incluant d'une part des approches d'immunomonitoring et de suivi des répertoires immuns, mais aussi l'obtention d'hybridomes spécifiques producteurs d'anticorps anti-viraux. Nous avons testé sur l'un de ces hybridomes une stratégie de switch induit visant à dériver de l'anticorps IgG initialement produit un variant IgA (les IgA ont en effet un intérêt en termes de transit vers les sites muqueux où sévit le virus). Notre stratégie repose sur l'induction de commutation de classe, selon le modèle décrit par Cheong *et al*²³³, vers IgA2 (ciblage muqueux) ou IgG1(Ac hautement neutralisant) d'hybridomes producteurs d'Ac neutralisants anti-spike du SARS-CoV-2. De plus, avec l'apparition de nouveaux variants du virus, nous nous sommes intéressés à des hybridomes producteurs d'anticorps neutralisant l'ensemble de ces variants viraux et un anticorps aux propriétés « broadly neutralizing » a plus spécialement été étudié.

III. Résultats

- **Stratégie d'édition non poursuivie : édition de la chaîne J**
- **Article 1: Single-hit genome edition for expression of single-chain immunoglobulins by edited B cells**

Natsuko UEDA^{1*}, Marine CAHEN^{1,2*}, Christophe SIRAC², Anne GALY³, Jérôme MOREAUX⁴, Yannic DANGER¹, Michel COGNÉ¹

Publication: bioRxiv 2022.06.02.494471; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.06.02.494471>

- **Article 2: Use of the IGHA2 gene as an appropriate site for human B cell editing**
Marine CAHEN^{1,2*}, Natsuko UEDA^{1*}, Ophélie DÉZÉ¹, Brice LAFFLEUR¹, Grégory NOËL¹, Laurent DELEURME¹, Yannic DANGER¹, Michel COGNÉ¹

En préparation

*** Both authors equally contributed to this study.**

- **Mise au point d'un modèle murin pour l'étude de fonctionnalité *in vivo* des différents formats d'anticorps produits par des cellules B humaines modifiées génétiquement.**

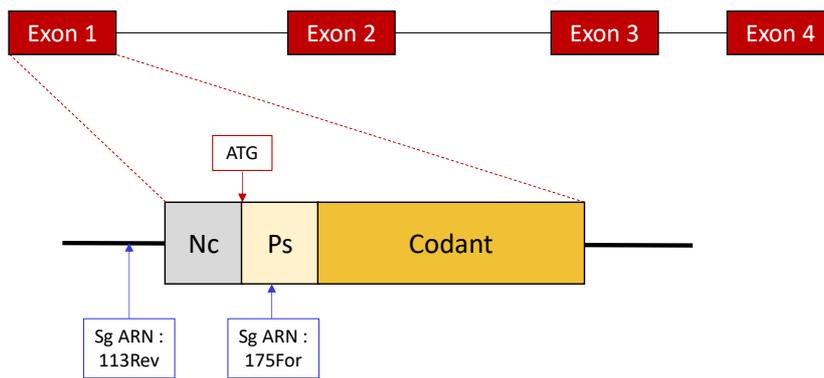
A. Stratégie d'édition non poursuivie : édition de la chaîne J

La chaîne « joining » (J) est une protéine de 15kDa composée de 137 acides aminés, impliquée dans la polymérisation des IgM et des IgA. L'absence de la chaîne J n'impacte que très peu la polymérisation des IgM et des IgA tandis qu'elle semble indispensable au transport à travers les muqueuses des IgA^{236,237,238}. Elle est impliquée dans le phénomène de la transcytose des IgA et des IgM puisqu'elle participe à la fixation *via* sa partie C-terminale au récepteur pIgR²³⁹. En cas d'absence, ce phénomène est altéré de manière significative tout du moins pour les IgA^{237,240}.

Chez l'Homme le gène *JCHAIN* codant pour la chaîne J se situe sur le chromosome 4q13.3 et comporte 4 exons²⁴¹. Cette protéine est exprimée par l'ensemble des plasmocytes indépendamment de la classe d'Ig qu'ils produisent²³⁹.

De la même façon que le site α au locus IgH, le gène de la chaîne J peut sembler un candidat idéal pour servir à la modification génétique *via* CRISPR/Cas 9 des cellules B afin d'intégrer à ce locus des transgènes codant pour des molécules recombinantes thérapeutiques. En effet, d'une part ce gène est situé dans un locus hyperactif au stade plasmocytaire, et d'autre part son inactivation (surtout si elle est mono-allélique) ne risque pas d'altérer l'expression du BCR et des Ig endogènes et pourrait donc permettre la sécrétion d'une protéine thérapeutique, non pas en remplacement de l'Ig endogène mais en surplus de celle-ci.

Dans cet objectif, nous avons déterminé deux stratégies d'édition de ce gène, toutes deux reposant sur l'exploitation des mécanismes transcriptionnels endogènes. En d'autres termes nous avons créé des cassettes d'insertion sans promoteur afin qu'elles ne puissent s'exprimer que lorsqu'elles s'intègrent au site attendu, immédiatement en aval du promoteur de la chaîne J. De cette façon, nous limitons le risque d'une insertion « *off-target* » transcrite à une autre position du génome. Ainsi, nous avons choisi de cibler en particulier des sites CRISPR situés immédiatement au voisinage de l'extrémité 5' de l'exon 1 de la chaîne J à l'aide de deux guides ARN, le 113Rev situés en amont du site d'initiation de la transcription (ATG) et le 175For en aval de ce site au niveau du peptide signal (**Figure 14**).



Nc: Non-codant
 Ps : peptide signal
 Sg RNA : single guide ARN

Figure 14 : Représentation schématique des deux stratégies d'édition de la chaîne J

L'ARN guide 113Rev est situé entre le promoteur et l'exon 1 de la chaîne J. L'ARN guide 175For est situé au milieu de la séquence du peptide signal de l'exon 1 de la chaîne J.

L'efficacité de ces deux guides ARN a d'abord été évaluée dans la lignée cellulaire BL41. Ces guides ont été transfectés sous forme de complexes RNP (guide ARN + Cas 9) à l'aide d'un Nucleofector 2D (Lonza). Cette efficacité a été évaluée selon deux techniques : le « Surveyor nuclease assay » (**Figure 15**) et le Tracking Indels by Decomposition (TIDE).

Lors d'une cassure de l'ADN, les cellules utilisent principalement le mécanisme de réparation NHEJ. Ce dernier, bien qu'efficace, génère de nombreuses erreurs (insertion ou délétion de nucléotides) créant ainsi des mutations au site de coupure. Le test Surveyor est une technique capable de mettre en évidence la coupure induite par l'outil moléculaire CRISPR/Cas 9 en repérant ces erreurs de réparation. Un fragment de l'ADN de cellules modifiées, comprenant le site de clivage médié par le système CRISPR/Cas 9, est amplifié par PCR. A l'aide d'une variation de température, les ADN doubles brins sont séparés puis réassemblés aléatoirement. Cette réhybridation fait alors apparaître des hétéroduplexes comportant des mésappariements correspondant au site de coupure. L'endonucléase T7, qui est capable de détecter les mutations, reconnaît et clive ces hétéroduplexes au niveau de ces mésappariements. L'ADN alors coupé fait apparaître deux nouveaux fragments plus petits qu'il est possible d'observer sur gel d'agarose. Ainsi en absence de clivage par CRISPR/Cas 9, les ADN doubles brins se reforment sans mésappariements, empêchant ainsi le clivage par l'endonucléase T7. Les ADN alors intacts conservent leur taille originelle, qui une nouvelle fois peut être observée sur gel d'agarose.

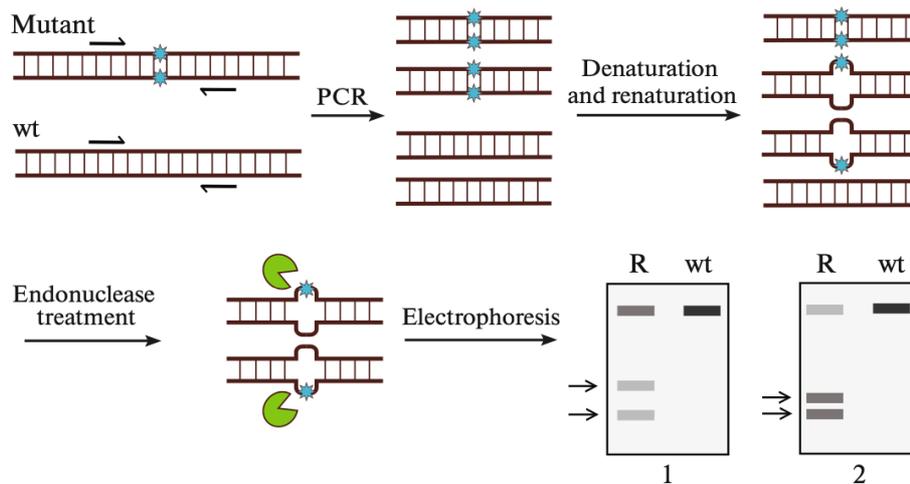


Figure 15 : Principe du test "Surveyor nuclease assay"

À partir d'ADN extrait de cellules éditées, une PCR est effectuée pour amplifier spécifiquement la région qui contient le site de clivage du CRISPR/Cas 9. Un pool hétérogène de fragment d'ADN sera alors obtenus contenant ou non des insertions/délétions de nucléotides dû à une réparation par le système NHEJ. Ces doubles brins d'ADN vont ensuite se déshybrider par chauffage puis se réhybrider aléatoirement par un programme de température lent de réhybridation. L'ensemble de ces hétéroduplexes nouvellement formés contiennent à présent des mésappariements. Un traitement par l'endonucléase T7 capable de reconnaître ces mésappariements clive les fragments d'ADN en deux (puisque'il n'y a qu'une seule coupure dans cet exemple) à l'endroit de ces mésappariements. L'ensemble de ces fragments d'ADN peut alors être observé par migration sur gel d'agarose. L'apparition de bandes plus petites est la preuve qu'un clivage qui a été réparé a bien eu lieu, démontrant ainsi l'efficacité de clivage médié par le système CRISPR/Cas 9 dans ce cas de figure. Figure tirée de l'article "Methods of Evaluating the Efficiency of CRISPR/Cas Genome Editing"²⁴².

Sur le principe, la technique TIDE est relativement similaire au test Surveyor puisqu'il cherche également à mettre en évidence les erreurs de réparation induites par le NHEJ pour déterminer l'efficacité de clivage par le système CRISPR/Cas 9. Cette technique est une analyse informatique comparative de séquences ADN entre un ADN de référence non clivé et l'ADN ayant subi un clivage. Plus le nombre de modifications de séquences (insertion ou délétion d'un nucléotide) est élevé, plus le pourcentage d'efficacité de coupure de l'ADN est élevé.

L'efficacité de clivage pour les deux types de complexes RNP était cohérente entre les deux techniques d'analyses. Ils ont démontré une très bonne efficacité, de l'ordre d'environ 50% pour le guide 113Rev et de 64% pour le guide 175For (**Figure 16**).

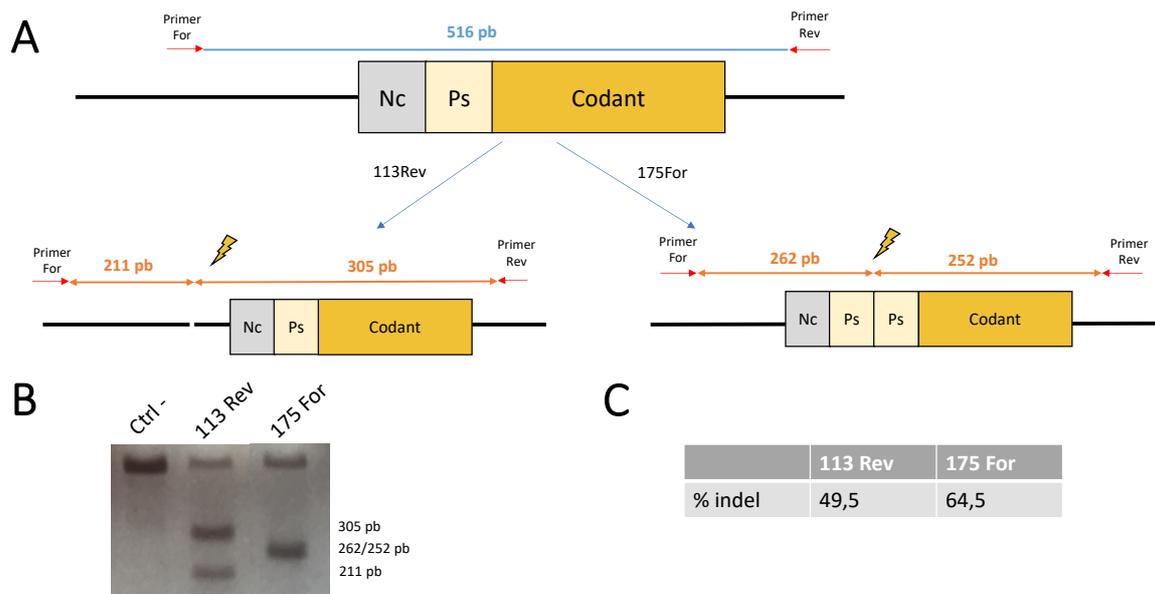


Figure 16 : Validation de l'efficacité de clivage par CRISPR/Cas de la chaîne J

A. Visualisation schématique des fragments d'ADN obtenus après clivages par CRISPR/Cas 9 à l'aide des deux guides ARN (113Rev et 175For). **B.** Migration sur gel d'agarose des fragments d'ADN obtenus avec le test « surveyor nuclease assay » sur l'ADN de cellules contrôles (Ctrl -) non clivé ainsi que sur l'ADN de cellules clivé à l'aide du guide 113Rev ou 175For. **C.** Analyse TIDE du clivage médié par les RNP formés du guide ARN 113Rev ou 175For.

Cette étape ayant été validée, nous avons poursuivi nos expérimentations en développant pour chacune de ces stratégies d'édition des cassettes d'expression adaptées. Dans le cas d'un clivage à l'aide du guide 113Rev situé en amont du site d'initiation de la transcription, nous avons choisi d'exprimer un gène rapporteur (tdTomato) puisque nous étions *de facto* en amont du peptide signal de la chaîne J. De plus, cet emplacement est parfait pour exprimer une protéine intracytoplasmique.

Dans le cas d'un clivage à l'aide du guide 175For nous étions a contrario situés en aval du site d'initiation de la transcription et plus particulièrement au centre du peptide signal de la chaîne J. Cet emplacement nous avait alors semblé idéal pour permettre l'expression d'une protéine recombinante sécrétée (type « minibody »). Nous avons donc établi une stratégie ambitieuse, nécessitant une adaptation de notre cassette d'expression en intégrant, entre le bras d'homologie 5' et la séquence codante du « minibody », un fragment de séquence de peptide signal VH d'une Ig humaine, créant ainsi un peptide signal hybride (**Figure 17**).

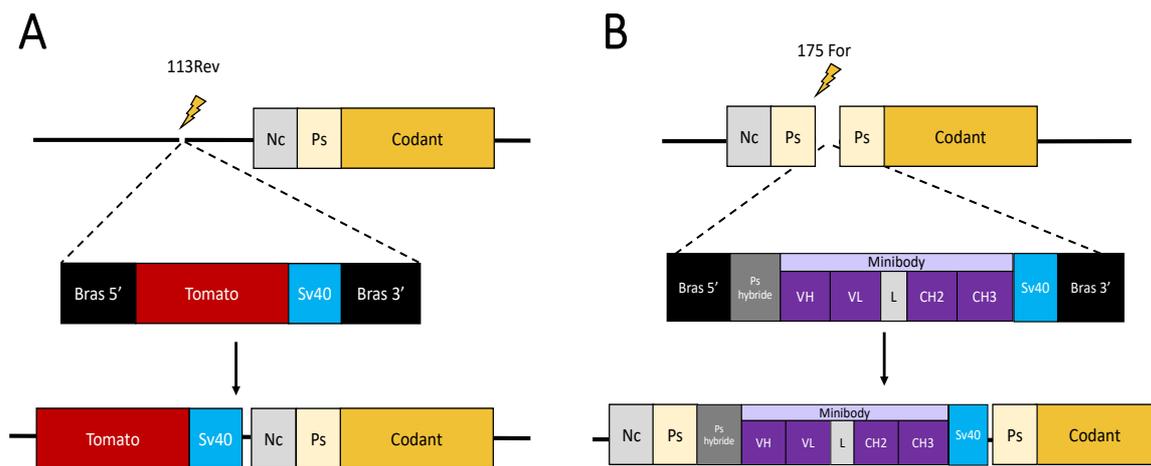


Figure 17 : Représentation schématique des cassettes d'expression adaptées aux différents sites de clivage

A. Schéma d'intégration de la cassette d'expression *tdTOMATO* au site 113Rev. Cette cassette se compose d'un bras d'homologie 5', du gène *tdTOMATO*, d'un SV40 associé à un codon stop puis d'un bras d'homologie 3'. **B.** Schéma d'intégration de la cassette d'expression « minibody » au site 175For. Cette cassette se compose d'un bras d'homologie 5', d'un fragment de séquence peptide signal VH humain, de gène codant le « minibody », d'un SV40polyA associé à un codon stop puis d'un bras d'homologie 3'.

Dans le but d'évaluer l'intégration de ces deux cassettes au sein du locus de la chaîne J, nous avons deux read-out possibles. Le premier, basé sur la cytométrie, nous permettait de connaître la capacité d'expression de nos cassettes. Le second, basé sur une PCR à trois primers, nous permettait de vérifier précisément l'intégration au locus de nos deux cassettes.

Le chaîne J étant exprimée uniquement au stade plasmocytaire, nous avons testé l'insertion de la cassette *tdTomato* dans deux lignées cellulaires, une lignée B (BL41) et une lignée plasmocytaire (XG-7). De cette façon, nous pouvions être certains, qu'il ne s'agissait pas d'un défaut d'expression de la chaîne J mais bien d'un problème d'expression de notre cassette d'expression dans l'hypothèse où nous n'aurions aucune expression.

Après de multiples tentatives, force a été de constater qu'il n'y avait aucune expression du gène *tdTomato* dans l'une ou l'autre de nos lignées (**Figure 18 A**). De manière étonnante, nous avons pu observer la bonne intégration au locus de la chaîne J de notre gène d'expression à l'aide de la PCR à trois primers qui révélait l'apparition d'une deuxième bande après électroporation du complexe RNP et de la cassette d'expression *tdTomato* (**Figure 18 B**).

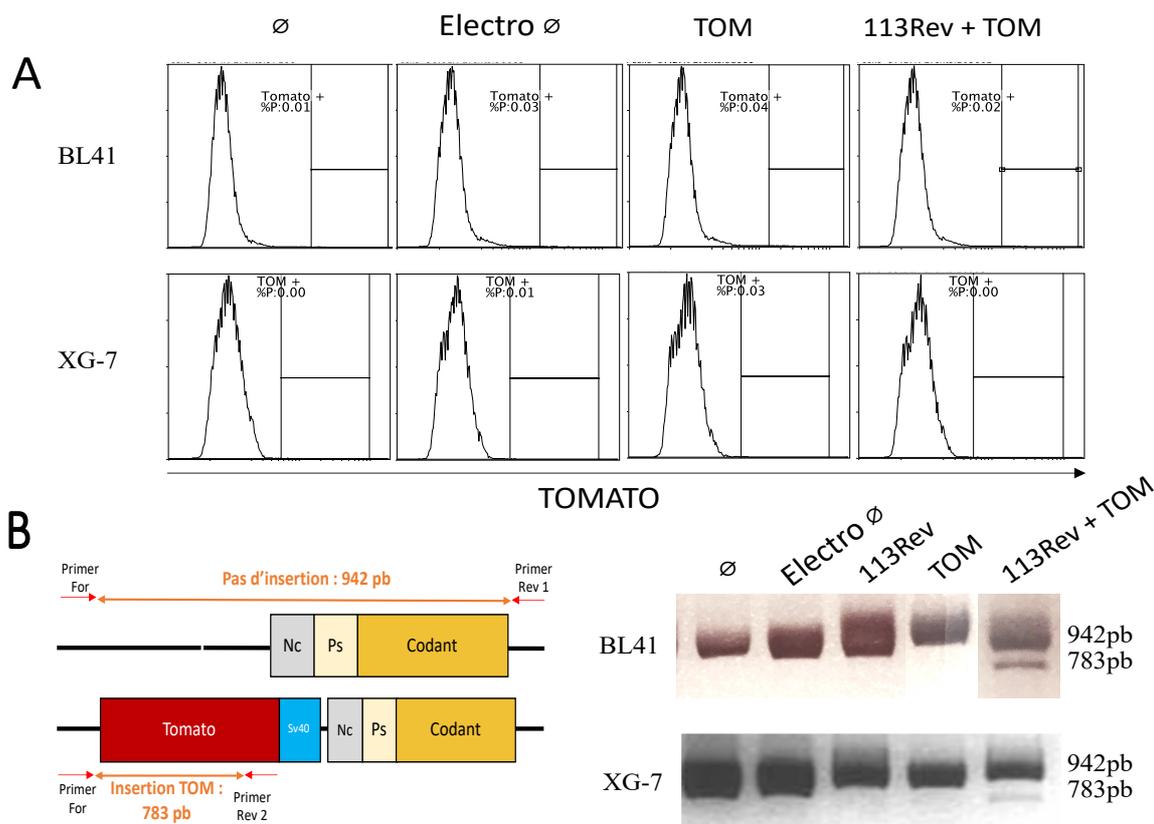


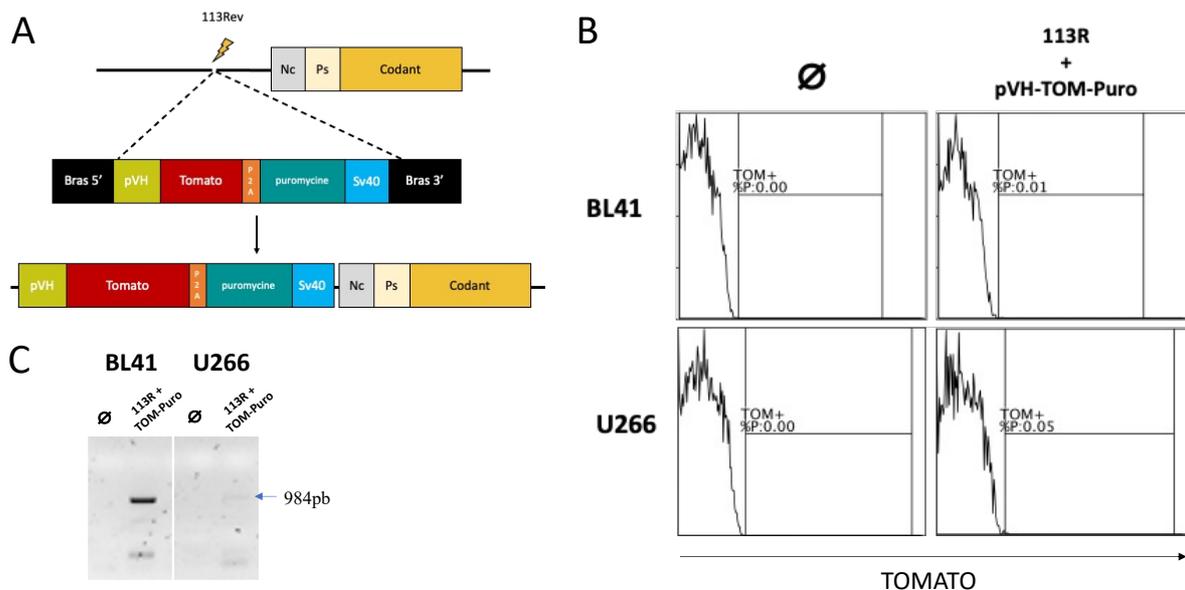
Figure 18 : Intégration au sein du locus chaîne J d'un gène rapporteur en position 113Rev

A. Détection de l'expression du gène rapporteur par cytométrie en flux de cellules BL41 ou XG-7 éditées ou non par électroporation du complexe RNP associé à la cassette d'expression tdTOMATO. Trois contrôles ont été effectués en parallèle : non électroporé \emptyset ; uniquement électroporé et électroporé seulement avec la cassette d'expression tdTOMATO. **B.** PCR à trois primers déposée sur gel d'agarose à 2%. L'intégration du gène est vérifiée grâce à l'apparition d'une bande de la taille de 783pb. L'absence d'intégration est associée à l'apparition d'une bande de la taille de 942 pb.

L'hypothèse que nous avons alors formulée a été que nous empêchions peut-être l'activation du promoteur endogène en intégrant à ce site un nouveau gène. Afin de vérifier si c'était le cas, nous avons décidé de créer une nouvelle cassette d'expression comportant cette fois-ci un promoteur pVH nous permettant de nous affranchir de l'expression du promoteur endogène. A cette cassette nous avons également ajouté un gène de résistance à la puromycine dans le but de pouvoir sélectionner les cellules ayant intégrées la cassette d'expression. Ainsi nous avons un moyen d'enrichir ces cellules, et ce même si le nombre de cellules était faible (**Figure 19A**). Une nouvelle fois, nous avons testé d'intégrer cette construction dans une lignée B (BL41) et une lignée plasmocytaire (U266). De manière décevante, nous n'avons pas réussi à obtenir d'expression de notre gène rapporteur en présence d'une sélection puromycine malgré la présence du promoteur dans la construction (**Figure 19B**). Une nouvelle fois, nous avons pu

constater que pourtant, on pouvait valider l'intégration au locus de notre cassette d'expression à l'aide d'une PCR classique (la PCR à 3 primers ne pouvant pas être utilisée en raison de la similarité de taille des bandes attendues entre la WT (942 pb) et celle avec insertion (984pb)). Il semblerait que l'intégration se soit moins bien passée dans la lignée plasmocytaire car la bande correspondant à l'insertion est très faible en comparaison de la lignée B (**Figure 19C**).

Figure 19 : Intégration au sein du locus chaîne J d'un gène rapporteur avec promoteur VH



en amont en position 113Rev

A. Schéma de la nouvelle cassette d'expression tdTomato. Un promoteur VH est ajouté en amont du gène tdTomato qui lui-même est suivi du gène de résistance à la puromycine séparé par un site de clivage (P2A) et se termine par le SV40. **B.** Détection de l'expression du gène rapporteur par cytométrie en flux de cellules BL41 ou U266 éditées ou non par électroporation du complexe RNP associé à la cassette d'expression tdTomato. **C.** PCR déposée sur gel d'agarose à 2%. La première PCR (gauche) met en évidence la bande WT à 942 pb dans chacune des conditions. La deuxième PCR (droite) met en évidence une bande après intégration du gène à 984 pb. Ces deux PCR ont été réalisées avec l'ADN des deux lignées cellulaires selon deux conditions : non électroporé Ø et électroporé avec les complexes RNP et nouvelle la cassette d'expression tdTomato

La seconde stratégie d'édition, impliquant l'intégration d'un gène codant le « minibody » au site 175For, s'est malheureusement soldée par le même échec d'expression (malgré des signaux PCR attestant d'un certain degré d'insertion). Nous avons essayé (sans succès) de détecter la présence du « minibody » dans le surnageant de culture de lignées cellulaires éditées par CRISPR/Cas 9 via un marquage indirect analysé par cytométrie en flux (**Figure 20A**). La lignée BL41 ne sécrétant que très peu d'Ig, nous n'étions pas tellement surpris de ce résultat. En revanche la lignée XG-7 étant une lignée plasmocytaire, nous espérons obtenir la sécrétion de

notre « minibody ». Là encore, nous avons pourtant confirmé par PCR l'intégration au locus de notre cassette d'expression dans les deux lignées cellulaires (**Figure 20B**).

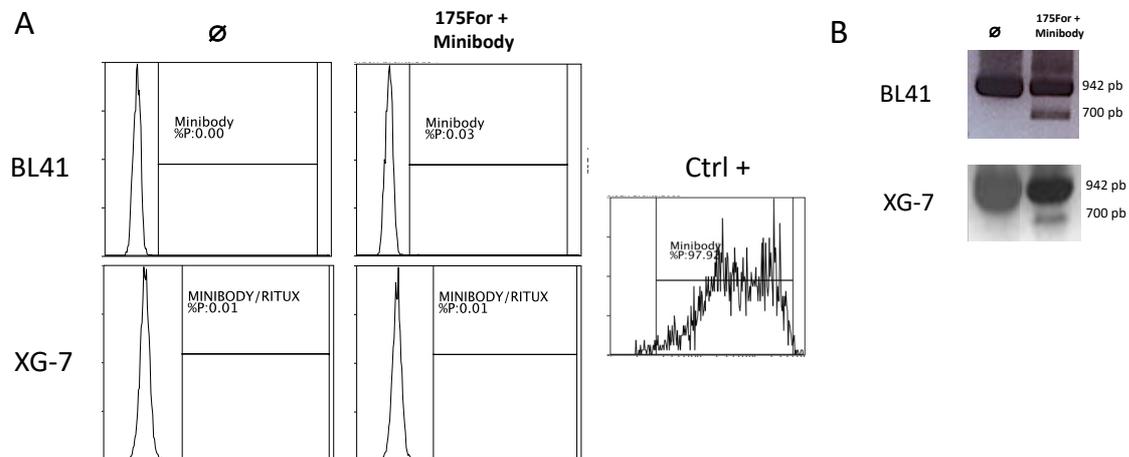


Figure 20 : Intégration au sein du locus chaîne J du gène codant pour le "minibody" en position 175For

A. Détection cytométrique indirecte à l'aide d'un anticorps anti-Fab humain de la liaison du Minibody anti-hCD20 aux cellules EL4-hCD20+ dans le surnageant de culture des lignées cellulaires BL41 et XG-7 7 jours après l'électroporation du complexe RNP associé au gène codant le « Minibody ». **B.** PCR à trois primers déposée sur gel d'agarose à 2%. L'intégration du gène est vérifiée grâce à l'apparition d'une bande de la taille de 700 pb. L'absence d'intégration est associée à l'apparition d'une bande de la taille de 942 pb.

En conclusion de toutes ces expérimentations, nous avons décidé par souci d'efficacité, de nous réorienter sur une autre approche d'édition d'un gène qui puisse lui aussi permettre une expression dans les plasmocytes. Nous nous sommes donc ensuite consacrés au locus IgH et aux stratégies d'éditions décrites ci-après. A l'heure actuelle, nous n'avons aucune hypothèse valable qui puisse expliquer la raison de nos échecs d'expression (malgré un clivage efficace et des insertions CRISPR efficaces) au sein du locus Jchain. Dans le cadre large de ce projet, il serait bien sûr intéressant d'en déterminer la cause afin de pouvoir établir une nouvelle stratégie d'édition de la chaîne J. Ce site étant particulièrement intéressant pour toutes les raisons évoquées précédemment il serait dommage de ne pas poursuivre cette voie et frustrant de rester sur un échec non compris.

B. Article 1: Single-hit genome edition for expression of single-chain immunoglobulins by edited B cells

L'immunothérapie adoptive a connu depuis quelques années un essor important, notamment avec le développement des thérapies cellulaires CAR-T. Ces approches en essor se diversifient de par les méthodes, les récepteurs exprimés, et les lignées « éditées ». Elles laissent envisager l'intérêt d'une production d'un mAb par des cellules B reformatées, donc dans la lignée la plus apte à produire des immunoglobulines (Ig). En dépit de la complexité que représente l'ingénierie de cellules B, plusieurs équipes ont pu démontrer sa faisabilité à l'aide de l'outil CRISPR/Cas 9. La plupart des stratégies d'ingénierie se sont focalisées sur l'expression d'un mAb par intégration au locus IgH en perturbant l'expression de la chaîne endogène des cellules B. Sur la base d'une approche similaire, nous avons conçu un nouveau format d'anticorps codé par une simple chaîne (« ScFull-Ig ») capable de changer la spécificité antigénique de la cellule. La combinaison d'une intégration au locus IgH entre JH6 et E μ associée à ce nouveau format octroie un environnement propice, aussi bien à la maturation d'affinité qu'au changement de classe isotypique du mAb produit.

À l'aide de ScFull-Ig recombinant dirigé contre le CD20 humain (hCD20) ou le HER2, nous avons pu valider la structure et la fonctionnalité de ce nouveau format. Nous avons également apporté la preuve, dans une lignée humaine ainsi que dans des cellules B primaires, de l'expression d'un BCR anti-hCD20 ou anti-HER2 par intégration au locus IgH de notre cassette d'expression.

L'ensemble de ces résultats participe au développement de stratégies d'édition des cellules B adaptées à de futures thérapies cellulaires adoptives.

BAR-B

Single-hit genome edition for expression of single-chain immunoglobulins by edited B cells

Natsuko UEDA^{1*}, Marine CAHEN^{1,2*}, Christophe SIRAC², Anne GALY³, Jérôme MOREAUX⁴, Yannic DANGER, Michel COGNÉ

¹INSERM U 1236, University of Rennes 1, Etablissement Français du Sang, 35000 Rennes, France.

²INSERM U1262, CNRS UMR 7276, Limoges University, Control of the B-cell Response & Lymphoproliferation, 87025 Limoges, France.

³ Université Paris-Saclay, Univ Evry, Inserm, Genethon, Integrare research unit UMR_S951, 91000, Evry, France

⁴CNRS-UM UMR 9002, Institute of Human Genetics, 34090 Montpellier, France.

Correspondence: michel.cogne@inserm.fr

*** Both authors equally contributed to this study.**

BAR-B

ABSTRACT

Lymphocytes have become attractive agents for adoptive immunotherapy but only the reformatting of T cells is efficiently mastered. Despite some recent breakthroughs, B cells remain challenging targets, with regard to both their long-term survival after *in vitro* manipulation and the rewiring of immunoglobulin (Ig) expression. Working on these two aspects, we have designed a new format of single-chain Ig ("scFull-Ig") coding cassette, the insertion of which at a single genomic position can redirect B cells toward a new antigen specificity, while preserving all functional domains of the B cell receptor. Precise genomic edition at a single locus then provides the most efficient and safe strategy to both disrupt endogenous Ig expression while encoding a new Ig paratope. As proofs of concept, functionality of such scFull BCR was validated by checking specific binding of two different classical targets of tumor immunotherapy, HER2 and CD20. Once the strategy validated in cell lines, it was also validated in primary B cells, again showing successful engineering of BCR expression. These results contribute to pave the way for future B cell-based adoptive cell therapy.

INTRODUCTION

Efficient monoclonal antibodies (mAb) are available for the treatment of multiple chronic diseases and notably cancers. The high specificity of such biotherapies hereby limits their side effects in comparison to conventional treatments such as chemotherapy of cancer. However, mAbs can in some cases yield poor response or resistance, especially in those patients undergoing the lowest serum trough concentration (C_{min})¹. Repeated and frequent injections of mAb are then required to prevent relapses, which can request prolonged and costly care and be restrictive for these patients. This is especially true for mAbs with rapid serum clearance, such as panitumumab or cetuximab or bispecific antibodies¹. Strategies that could result into permanent infusion of such antibodies, for instance as endogenously produced by the patient's cells, would thus represent a strong asset. The usage of some antibodies of high therapeutic interest but with chemical instability or manufacturing contingencies could also be rescued by direct *in vivo* production in the patient's body. This strategy could also be pertinent for conferring long-term immunity to some immunodeficient patients with a preserved B cell pool but poorly responsive to classical vaccination.

B lineage cells are indeed the best-suited cell type for the correct folding and secretion of immunoglobulins (Ig) under their various membrane bound or secreted formats². While plasma cells are able to secrete large amounts of soluble antibodies, memory B cells can in addition establish an immune memory and be responsive to antigen (Ag) re-challenge, hereby contributing to protection against recurrent infections. Editing Ig expression in such cells could thus potentially endow patients with long-term immune response to a specific Ag. Several recent studies have shown that CRISPR-edition of the B cell genome is feasible in primary B cells and could reformat Ig production on purpose. Regarding cancer immunotherapy and learning from the success of CAR-T cells, which have now permitted complete remission in many patients and demonstrated their ability to safely integrate the patients' immune system for years³⁻⁵, the conditions that could allow successful adoptive cell therapy based on B cells are thus worth being explored and optimized. In such a strategy, B cells taken from an individual would be genetically modified to produce Ig of a desired specificity and then injected back to the original donor. Successful engraftment of such engineered cells would then be expected to yield

BAR-B

long-term stable infusion of a therapeutic mAb into body fluids, and/or an immune memory artificially built against a tumor Ag.

We used for this purpose CRISPR-mediated gene knock-in (KI), as the best tool for precise gene edition^{6,7}, in order to hijack the innate capacities of B cells to produce Ig molecules. The insertion site for the KI was chosen within the Ig heavy chain (IgH) locus in order to obtain simultaneously both the disruption of the endogenous IgH synthesis and the integration of the KI cassette in a position mimicking all the normal features of Ig expression. These include B-lineage-specific transcription, upregulated transcription in activated B cells and plasma cells, regulation of alternative splicing between membrane-type and secreted-type transcripts, ability to undergo class switch recombination upon recombination between the endogenous S μ region and a downstream S region from the IgH locus.

In vitro cell culture and maintenance of B cells together with genetic engineering remain challenging. We optimized B cell culture conditions and CRISPR edition. We now describe an efficient strategy to gene edit human primary B cells in order to produce a complete Ig of a given specificity after a single genetic edition. The genetic engineering of Ig theoretically requires the modification of two loci, for the heavy (H) and light (L) chains. To express the desired Ig and disrupt endogenous Ig production after a single gene modification, we designed a new single chain format of a whole Ig, the “scFull-Ig”. This format ensures stoichiometric expression of both Ig chains and precludes any mispairing with an endogenous Ig light chain. It also carries the advantage of positioning both the V_HDJ_H region and V_LJ_L region immediately downstream of the V_H promoter, at a position accessible to somatic hypermutation (SHM), while constant regions lie downstream. With this strategy, modified primary B cells proved to be able to successfully express scFull-Ig format BCR membrane molecules, hereby acquiring the relevant Ag-binding activity.

MATERIALS AND METHODS

scFull-Ig structure validation

At the protein level, we wished to produce full-length Ig under a single chain format by using two linker (Lnk) sequences for assembling Ig domains in the following order: [V_H-Lnk-V_LC_L-Lnk-C_H]. For building adequate gene cassettes encoding such an scFull-Ig, we thus assembled the coding sequences from a chosen mAb in the following 5' to 3' order: V_H leader exon, V_HDJ_H exon, a first linker (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGCGCGGCGGCTCCAGTGGTGGTGGATCC), V_LJ_L exon, C_L exon, followed by a 2nd linker (TCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGAGGTGGTGGTGGTGGCGGATCA). This Ag-specific upstream part of the gene construct was either followed with a C_H coding sequence in order to directly encode a complete IgG, or flanked with a splice donor site and its 3' flanking sequence identical to that from a J_H element, in order to be expressed after a KI upstream of an endogenous C_H gene. Adequately designed sequences were synthesized (Genecust) and cloned in a pcDNA3 expression vector. HEK293T cells were transfected with different constructs to validate expression. After 72h, the supernatants were collected, cleared by centrifugation, and stored at 2-8°C for further experiments. Supernatants were analyzed by western blot after reduction by 2-mercaptoethanol (Bio-Rad). Electrophoresis was carried out using nUView Tris-Glycine 8-16% gels (NuSep) and proteins were then transferred on a PVDF membrane. Membranes were stained using anti- κ (Southern biotech) and anti- λ antibodies (Southern biotech) followed by an HRP-conjugated donkey anti-goat IgG antibody (Santa

BAR-B

Cruz Biotechnology), or using HRP-conjugated goat anti-human IgG antibody (Sigma). Immunoblots were revealed using SuperSignal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Controls used were Rituximab (MabThera, Roche) and Pertuzumab (Perjeta, Roche).

ADCC assays were carried out using CD16-expressing reporter cells from the Jurkat-Lucia NFAT-CD16 cell line (jktl-nfat-cd16, Invivogen) following manufacturer's protocol. Briefly, target cells (MCF7 or hCD20⁺ EL4) were incubated with antibodies for one hour, after which Jurkat-Lucia NFAT-CD16 cells were added. After incubating for 6 hours, the supernatant was transferred into a white microplate, and QUANTI-Luc solution (Invivogen) was added. The light signal reporting Jurkat cell activation was quantified using a luminometer.

Cell culture

BL41 cells were grown in RPMI 1640 GlutaMAX medium (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco), 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco) and Penicillin-Streptomycin-Glutamine (1 unit/ml penicillin, 1 µg/ml streptomycin, 2.92 µg/ml L-glutamine, Gibco). One day before CRISPR experiments, cells were seeded at $0.2 \cdot 10^6$ cells/ml to be in an exponential phase of growth.

HEK293T cells were grown in DMEM medium (Gibco) supplemented with 10% FBS (Capricorn) and PS-G. Cells were seeded 2 or 3 days before transfection experiment by MACSfectin reagent (Miltenyi Biotec), to achieve cell density recommended by the supplier.

Primary B cell isolation and culture

Buffy coats from healthy volunteers were obtained from the Etablissement Français du Sang (Rennes, France) (after informed consent, and under agreement #AC-2019-3853). B cells were isolated using either the StraightFrom™ Buffy Coat CD19 Microbead Kit or the Human B cell Isolation Kit II (both from Miltenyi Biotec), following the manufacturer's protocols. When using Human B cell Isolation Kit II, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Histopaque (Sigma) or Lymphocyte Separation Medium (Eurobio Scientific) and red blood cells were lysed with NaCl solution during washing steps. B cells were then cultured in RPMI 1640 GlutaMAX medium (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco), 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco) and PS-G (Gibco). During four days, B cells were stimulated with 1 µg/ml CpG oligodeoxyribonucleotide 2006 (Miltenyi Biotec), 2.4 µg/ml F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgA + IgG + IgM (H+L) (Jackson ImmunoResearch), 50 U/ml recombinant IL-2 (R&D Systems) and 100 ng/ml recombinant human soluble CD40L (Immunex) ("1st step stimulation cocktail") at $0.75 \cdot 10^6$ cells/ml. At day two, IL-10 (R&D Systems) was added at 5 ng/ml. At day four, activated B cells were washed and cultured at $0.5 \cdot 10^6$ cells/ml with 50 U/ml IL-2 (R&D Systems), 5 ng/ml IL-4 (R&D Systems) and 12 ng/ml IL-10 (R&D Systems) in order to promote the differentiation into plasmablasts ("2nd step differentiation cocktail")⁸. To obtain plasma cells, cells were washed at day 7 and cultured at $0.5 \cdot 10^6$ cells/ml with 50 U/ml IL-2 (R&D Systems), 250 U/ml IFN-α (R&D Systems), 20 ng/ml IL-6 (Peprotech) and 12 ng/ml IL-10 (R&D Systems).

Donor DNA preparation and gene edition

Plasmids containing templates for CRISPR-mediated KI were assembled using the NEBuilder HIFI assembly kit (New England Biolabs) starting from PCR amplified fragments. Donor DNA for CRISPR-mediated KI were prepared from these plasmids by PCR amplification. PCR products were then purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel), with a final target concentration of 500-1000 ng/µl.

BAR-B

After comparing several sites in-between JH6 and the E μ enhancer of the IgH locus, we focused our experiments by targeting the following sequence, GGAAAGAGAACTGTCGGAGT, with an appropriate sgRNA. For CRISPR edition, 100 pmol of Cas9 (IDT) were incubated with 500 pmol of sgRNA (Synthego) for 15 min at RT. Cells were nucleofected using Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza) for cell lines and P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit L (Lonza) for primary B cells. 1.10^6 - 3.10^6 cells were centrifuged 10 min at 90 g and resuspended in 100 μ l supplemented Nucleofector solution. The Cas9/sgRNA mix was then added to the cell suspension and cells were transfected with Nucleofector I program X-01 for cell lines and Nucleofector 4D program EO-117 for primary B cells. 900 μ l culture medium was added immediately after transfection and cells were left resting for 5-10 min. Cells were then transferred into culture plates in 5 ml medium for cell lines or 1.5 ml for primary B cells.

When KI was performed, the donor DNA was added to the Cas9/sgRNA mix before addition to cells. For primary B cell transfections, if required, PGA (Sigma) was added to sgRNA before mixing with Cas9 at a final concentration of 4 mg/ml, Electroporation Enhancer (IDT) was added to the Cas9/sgRNA mix at a final concentration of 4 μ M just before addition of cells, and HDR Enhancer (IDT) was added to the culture medium at a final concentration of 30 μ M after transfection and removed by medium renewal after 40 h.

DNA and RNA analysis

Correct CRISPR/Cas9 targeting of edited cells was checked by analyzing DNA through Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) analysis and by sequencing edited transcripts. Cell pellets were lysed using QuickExtract DNA Extraction Solution (Lucigen) following supplier's protocol. The region of interest was amplified by PCR, and Sanger Sequencing was performed on the product by Genewiz. Returned sequences were analyzed by TIDE (<http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>).

RNA was extracted from transfected cells using NucleoSpin RNA Plus XS kit (Macherey-Nagel). cDNA of the IgH transcripts was synthesized and amplified by PCR, using one primer binding specifically to the scFull-Ig KI cassette and the other one to either μ or α constant domain. PCR products were then sequenced (Genewiz) to confirm the correct splicing of the inserted sequence on the endogenous CH1 constant domain of the IgH locus.

All primers used in the study are listed in Supplementary information.

Flow cytometry

Cell surface staining for the anti-HER2 BCR was performed with Recombinant Human ErbB2/Her2 Fc Chimera Protein (R&D Systems) and APC anti-His Tag antibody (Biolegend) for 30 min each. DAPI (Serva) was used to mark dead cells. Stained cells were analyzed on a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Mann-Whitney tests with GraphPad Prism 8 software. Data shown as mean \pm SD, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

BAR-B

RESULTS

The scFull-Ig design allows efficient secretion

We designed and validated a new single-chain format of Ig, the scFull-Ig (Figure 1.A). This design connects via a linker the variable domain of the heavy chain with the variable and constant domains of the κ light chain, then followed by a second linker and the full constant region of the Ig heavy chain. In order to first validate the functionality of this antibody format, we produced the secreted forms of scFull mAb targeting CD20 or HER2. Recombinant scFull-IgG was produced by transfecting HEK293T cells with the adequate expression vector, which included a cassette successively linking a V_H promoter, the rituximab or pertuzumab V_HDJ_H exon, a first linker, the complete κ light chain, a second linker ([VDJ_{ritux/pertu}-Lnk-V κ J κ _{ritux/pertu}-C κ -Lnk]) and finally the complete coding sequence of a human γ 1 heavy chain constant domains. We successfully produced scFull-IgG secreted in supernatants with concentrations reaching 374.1 ng/ml for anti-CD20 scFull-IgG and 364.4 ng/ml for anti-HER2 scFull-IgG. Supernatants containing scFull mAb were purified on protein A column for further characterization, with the same protocol as classical human IgG. Expression of Ig of the expected structure was confirmed by western blot using anti-hIgG, anti- κ and anti- λ antibodies (Figure 1.B). All stainings confirmed a single-chain structure linking heavy and light chains. We assessed and validated the binding of the anti-CD20 scFull-Ig on hCD20⁺ EL4 target cells (Figure 1.C). The functionality of these scFull-Ig was tested by assessing their capacity to induce antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). As for rituximab and pertuzumab, anti-CD20 scFull-IgG and the anti-HER2 scFull-IgG were able to specifically induce ADCC against cells carrying the target antigen (*i.e.* hCD20⁺ EL4 cells, and MCF7 cells, respectively) even when used at low doses in the range of 10 ng/ml (Figure 1.D). Taken together, these data validate the functionality of the scFull-Ig format for producing Ag-specific antibodies.

Knock-in of a single scFull-Ig cassette allows efficient BCR expression in a B cell line

Besides the advantages of a single-chain for ensuring stoichiometry and physical association of the paired H/L structure, the scFull format was designed in order to allow recombinant Ig production through a single CRISPR-mediated genomic edition, at the IgH locus. The [VDJ-Lnk-V κ J κ -C κ -Lnk] cassettes, preceded by a V_H promoter, were introduced in-between the J_H region and the E_{μ} enhancer (Figure 2.A). Insertion at this location allows the expression of the edited Ig while concomitantly disrupting expression of the endogenous Ig. We preliminarily validated the high accessibility of this genomic location for CRISPR edition in the BL41 lymphoma cell line, using an HDR template which included a pVH-promoter-tdTomato reporter cassette. This experiment also validated the efficacy of 500 bp-long homology arms which were finally designed with terminal truncated Cas9 target sequences (tCTS) at both ends of the HDR template to optimize HDR⁹. This altogether regularly yielded fluorescence with about 30% of fluorescent cells (Sup Figure 1). Based on this result and using the same HDR flanking arms, we then moved on to the KI of scFull-Ig expressing cassettes at the very same genomic location. In order to be appropriately spliced onto endogenous IgH constant genes, the scFull-Ig gene cassettes [VDJ-Lnk-V κ J κ -C κ -Lnk] previously validated above, were then also flanked by a downstream J_H splice donor site (J_H3' splice). In such a configuration, the [VDJ-Lnk-V κ J κ -C κ -Lnk] can be spliced on the immediate downstream constant gene and replace the endogenous V_HDJ_H exon in IgH transcripts (Figure 2.A). A KI at this position should affect neither the process of alternate splicing of membrane-type vs secreted type IgH C transcripts, nor the process of class switch recombination (CSR) of the locus. In cells undergoing CSR and/or plasma cell differentiation, such a KI is thus expected to yield (as for a normal endogenous IgH gene), multiple clonally related BCR and secreted Ig formats, related to the various Ig classes but sharing the same clonotypic Ag specificity.

BAR-B

To further validate the strategy *in vitro*, we focused on the scFull-Ig targeting HER2, which displayed the highest functionality. We first tested the anti-HER2 scFull-Ig cassette in BL41 lymphoma cells with a mature B lymphocyte phenotype, featuring IgM isotype BCR expression. This experiment assessed the expression of the membrane-bound scFull-Ig IgM (Figure 2.B). After CRISPR-insertion of a [VDJ_{pertu}-L-VκJκ_{pertu}-Cκ-L-J_H3'splice], around 8 to 9.5% of cells were successfully edited and acquired ability to bind soluble HER2, the best efficiency being again obtained, as for insertion of the tdTomato cassette, when HDR arms were ending with tCTS sequences promoting their binding (without cleavage) by the specific gRNA and Cas9.

To confirm the correct splicing of the HDR template on the endogenous IgM constant regions, we extracted the RNA of gene-edited cells at day seven from transfection and sequenced the IgH transcript after reverse transcription and amplification by PCR. One primer was designed to bind the scFull-Ig KI cassette and the other one the μ constant domain, allowing PCR amplification of the expected product only when the KI cassette correctly spliced with the endogenous constant domain. Correct splicing was observed, consistent with the membrane expression and functionality (Sup Figure 2.A).

Editing of BCR expression through the KI of an scFull-Ig cassette is thus efficiently promoted by CRISPR-mediated insertion in a human B cell line, prompting to extend this strategy to human primary B cells obtained from donors.

Editing of Ig expression in primary B cells

Primary B cells were magnetically sorted from buffy coats and cultured for two days under our "1st step stimulation cocktail" (including CpG, anti-BCR, CD40L and IL-2). At day two, CRISPR-mediated gene editing was carried out with the same conditions as for BL41 cells but with addition of Electroporation Enhancer and HDR Enhancer (IDT), following supplier's instructions. Expression of anti-HER2 scFull-Ig at the cell membrane was evaluated at day seven. Around 3% of edited cells were then able to bind soluble HER2, the best efficiency obtained when using a donor DNA with tCTS sequences, with addition of poly-glutamic acid (PGA), Electroporation Enhancer and HDR Enhancer (Figure 3). As for BL41 cells, the correct splicing of the HDR template on the endogenous constant regions was confirmed by transcript analysis. At day seven, we confirmed correct RNA splicing of the scFull KI cassette onto endogenous constant Ig genes, corresponding to the expression of not only IgM but also class-switched isotypes such as IgA, as identified by RT-PCR with adequate specific primers (Sup Figure 2.B). Altogether, these data validate the fact that KI of the [VDJ_{pertu}-L-VκJκ_{pertu}-Cκ-L-J_H3'splice] cassette in the IgH locus upstream of the Eμ enhancer allows expression of the scFull-Ig in primary B cells both in association with Cμ and with downstream class-switched isotypes.

DISCUSSION

Adoptive cell therapy has remarkably developed in the last decade. While T cells are currently the main actors of such strategies, B cells have recently received preliminary interest. B-lineage cells can abundantly secrete proteins and initial attempts to make them produce therapeutic proteins have relied on random lentiviral integration, notably for secreting Ig or coagulation factors^{10,11}. For Ig, such strategies however expose to generating cells with dual specificity and/or with a mixture of desired and undesired H-L associations. CRISPR-edition of Ig loci is thus much more attractive since it can simultaneously terminate expression of the endogenous Ig and replace it with a mAb of interest¹²⁻¹⁴. In this regard, re-formatting the IgH locus is of special interest due to the competence of this locus for various spontaneous variations, with its notable ability to yield both membrane-bound and secreted Ig. Due to these intrinsic properties of the IgH locus, edited human B cells could thus fulfill two different and complementary therapeutic goals: either secreting a mAb of interest on the long term when differentiated into long-lived CD138⁺ CD20⁻ plasma cells, or patrolling in the patient's lymphoid tissues

BAR-B

as Ag-specific CD20⁺ CD27⁺ memory B cells to secrete the edited Ig only after Ag encounter. If done in a manner respecting the physiological organization of the human IgH locus, such an edition could even remain compatible with class-switching and then provide edited IgM molecules together with a variety of secondary class-switched variants carrying diversified constant regions, *i.e.* susceptible to exert a diversified spectrum of effector functions. Ultimately, if the edited V regions stand within the IgH locus territory accessible to SHM (*i.e.* within 1.5 kb downstream of V_H gene transcription initiation)¹⁵, the edited Ig could theoretically follow the path of affinity maturation and either increase its original affinity for the target Ag or get adapted to antigenic variations. The latter property would be of special interest for Ag showing spontaneous variations, as it occurs in chronic viral infections and in some cancer cells.

Previous studies have proposed single KI strategies in the IgH locus for expression of both the Ig H and L chains (eventually associating both chains covalently through a long linker peptide)^{13,16}. However, they included some Ig constant sequences at an odd location belonging to the 1.5 kb upstream domain affected by SHM, immediately 3' of the gene promoter^{13,16}. By contrast, we elaborated a versatile strategy for also hijacking Ig production in B cells through a single IgH locus edition, based on the expression of scFull-Ig sequences starting with tandemly associated V_H and V_L sequences. In case edited B cells get activated, the scFull design should thus spare C exons from most of the SHM activity, and by contrast expose both the V_H and the V_L domains to affinity maturation. The scFull-Ig format proposed in this study thus combines several advantages. The single-chain design simplifies gene edition and warrants assembly of given IgH and IgL chains as a unique full Ig molecule. This format also complies with the objective of including both the V_H and V_L regions within an upstream transcribed IgH domain optimally exposed to high SHM in activated B lymphocytes. The other major expected outputs of this strategy, since based on IgH locus edition, are to allow expression of both membrane-associated BCR and secreted antibodies including an intact endogenous Fc domain, therefore expected to keep Ig effector functions unchanged.

This study aimed at validating functionality of such a single-chain format with regards to its capacity to be efficiently secreted, to maintain Ag specificity of the scFv domain while getting it finally associated with a classical and unmodified Fc domain. We indeed checked in the models of anti-CD20 rituximab and anti-HER2 pertuzumab, two classical therapeutic mAbs, that they kept the ability to efficiently induce ADCC against target cells when secreted under an scFull-IgG format.

Since insertion of linker elements within an Fv domain could eventually alter Ag binding, preservation of Ag specificity stands as an initial quality control for any mAb expressed in a single-chain format. We accordingly assessed preserved Ag binding in two models, based on heavy and light chain integration following the scFull design. Using CRIPSR-based edition of the IgH locus and KI of scFull-Ig cassettes, we confirmed in both models that both a human B cell line and human primary B cells can be efficiently gene modified for the expression of Ig: the upstream part of the cassette including both V regions and the C_L exon was correctly spliced onto the endogenous IgH C regions and edited B lymphocytes hereby expressed a BCR of the expected Ag specificity. Membrane-bound scFull-Ig efficiently interacted with the antigen and transcript sequencing revealed that scFull-Ig expressed in primary B cells was not only related to IgM, but also to class-switched isotypes such as IgA.

Many adjustments remain necessary before making edited human B cells good candidates for cellular therapy. One of the major issues is to enhance the efficacy of KI in this cell type. First of all, the KI efficiency relies on the delivery method of the DNA template to B cells, needing to combine high efficiency and low toxicity. Even if viral vectors such as Adeno-Associated Virus (AAV) are efficient carriers, we decided for safety reasons to focus our efforts on a simple virus free protocol, for which safe and well-designed production and purification methods should be easily transferable under Good

BAR-B

Manufacturing Practices (GMP) conditions, as necessary for future preclinical development. Regarding safety, naked DNA-based strategies could indeed compete with other virus-free methods such as nanoparticle carriers^{17,18} or mAb encoded by mRNA¹⁹.

One limitation of B cell editing lies in the difficulty to perform HDR with exogenous DNA template at the optimal insertion site of the IgH locus. In order to optimize KI efficiency, we have checked the effect of varying the Cas9/sgRNA ratio as well as the amount of DNA template and we then stucked to the best conditions. Primary cell culture conditions prior and after the KI experiment were also worked out, in order to optimize both cell viability and HDR rates. Regarding the gene transfection itself, various HDR-enhancing molecules were tested in established cell lines and primary B cells, with the additional goal of limiting cell death after transfection. Based on Nguyen et al.⁹ publication, we were finally able to improve the rate of correct insertion at the IgH locus and the homogeneity of our results by using tCTS-modified dsDNA template, for routinely obtaining significantly high expression of the knock-in cassettes.

Altogether, while the protocol proposed in this study is quite efficient, further optimization will remain useful. In the future, strategies blocking the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway²⁰ might also deserve to be applied to targeted B cells in order to promote HDR. Both the HDR rate and the cell survival might also potentially be further improved by using ssDNA templates²¹, or by carrying pre-electroporation DNA-sensor inhibition, as reported for T cell editing²². Since B cells abundantly express intra-cellular Toll-like receptors, this could reduce the transfected DNA toxicity.

In conclusion, we report an efficient strategy to edit human B cells through a single precise gene modification of the IgH locus. This disrupts expression of the endogenous V_H domain and replaces it with a cassette providing most of the [Fv / C_L] region from a mAb of interest, although in a single-chain format. Since this strategy rebuilds a complete Ig by reassociating the KI [Fv / C_L] region to the endogenous [CH1 + Fc] part encoded by the IgH locus, it hereby warrants expression of the IgH chain under all possible normal variations, either expressed at the cell membrane as a BCR in lymphocytes or secreted by cells following plasma cell differentiation, or eventually switched or mutated once B cells have been activated. Edited B cells will then be ready for transfer into recipient mouse models, in order to assess antibody secretion and the potential adoptive humoral immunity.

BAR-B

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. scFull-Ig

(A) Structure of an scFull-IgG. The scFull-Ig design combines all the domains from a complete Ig but under a single-chain format. The IgH variable domain is connected via a linker (*green*) to the light chain, itself followed by a second linker and the full IgH constant part. For CRISPR-mediated expression in B cells, the KI cassette only encodes for the IgH variable domain and the IgL sequences (*pink*). It is followed by a splice donor site to allow splicing on the endogenous genes encoding for the IgH constant exons (*blue*).

(B) Detection of scFull-IgG expression by western blot using anti-hIgG, anti-hIgK and anti-hIgλ antibodies confirms expression of a single-chain molecule of the expected size.

(C) Validation of target binding by anti-CD20 scFull-IgG secreted by transfected cells. hCD20⁺ EL4 cells were used as targets, and using WT EL4 cells as a control, staining was revealed with a fluorescent anti-IgG secondary antibody.

(D) Validation of functionality (ADCC). scFull-IgG secreted by transfected cells induced ADCC on target cells.

Figure 2. Knock-in in BL41 cell line

(A) Locus. The VDJ-L-Vκ-Cκ-L cassette is introduced between J_H and the Eμ enhancer with CRISPR-mediated cleavage. Insertion at this location using a V_H promoter allows expression of the edited Ig while disrupting expression of the endogenous Ig. Because the endogenous constant region is used, alternative splicing is not affected. The produced Ig can therefore be expressed as membrane-bound or secreted. All target regions for CSR are also preserved, while SHM could simultaneously affect the V_H and V_κ regions.

(B) Expression of membrane-bound scFull-Ig. Cell surface staining for the anti-HER2 BCR was performed on gene edited BL41 cells, with His-tagged HER2 protein and APC-labelled anti-His antibody. tCTS, truncated Cas9 Target Sequence.

Figure 3. Knock-in in primary B cells, expression of the membrane-bound form.

Cell surface staining for the anti-HER2 BCR was performed on edited human primary B cells, in the same way as for BL41 cells.

BAR-B

REFERENCES

1. Paci, A. *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship of therapeutic monoclonal antibodies used in oncology: Part 1, monoclonal antibodies, antibody-drug conjugates and bispecific T-cell engagers. *Eur J Cancer* **128**, 107–118 (2020).
2. Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K. & Ahmed, R. Humoral Immunity Due to Long-Lived Plasma Cells. *Immunity* **8**, 363–372 (1998).
3. Grupp, S. A. *et al.* Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. *The New England Journal of Medicine* **368**, 1509–1518 (2013).
4. Jackson, H. J., Rafiq, S. & Brentjens, R. J. Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol* **13**, 370–383 (2016).
5. Melenhorst, J. J. *et al.* Decade-long leukaemia remissions with persistence of CD4+ CAR T cells. *Nature* **602**, 503–509 (2022).
6. Barrangou, R. & Doudna, J. A. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature Biotechnology* **34**, 933–941 (2016).
7. Johnson, M. J., Laoharawee, K., Lahr, W. S., Webber, B. R. & Moriarity, B. S. Engineering of Primary Human B cells with CRISPR/Cas9 Targeted Nuclease. *Scientific Reports* **8**, (2018).
8. Le Gallou, S. *et al.* IL-2 Requirement for Human Plasma Cell Generation: Coupling Differentiation and Proliferation by Enhancing MAPK–ERK Signaling. *J.I.* **189**, 161–173 (2012).
9. Nguyen, D. N. *et al.* Polymer-stabilized Cas9 nanoparticles and modified repair templates increase genome editing efficiency. *Nature Biotechnology* **38**, 44–49 (2020).
10. Fusil, F. *et al.* A Lentiviral Vector Allowing Physiologically Regulated Membrane-anchored and Secreted Antibody Expression Depending on B-cell Maturation Status. *Mol. Ther.* **23**, 1734–1747 (2015).
11. Levy, C. *et al.* Baboon envelope pseudotyped lentiviral vectors efficiently transduce human B cells and allow active factor IX B cell secretion in vivo in NOD/SCID γ c $^{-/-}$ mice. *J. Thromb. Haemost.* **14**, 2478–2492 (2016).
12. Hartweger, H. *et al.* HIV-specific humoral immune responses by CRISPR/Cas9-edited B cells. *J. Exp. Med.* **216**, 1301–1310 (2019).
13. Moffett, H. F. *et al.* B cells engineered to express pathogen-specific antibodies using CRISPR/Cas9 protect against infection. *Science Immunol.* **4**, (2019).
14. Luo, B. *et al.* Engineering of α -PD-1 antibody-expressing long-lived plasma cells by CRISPR/Cas9-mediated targeted gene integration. *Cell Death Dis* **11**, 973 (2020).
15. Peters, A. & Storb, U. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* **4**, 57–65 (1996).
16. Hartweger, H. *et al.* HIV-specific humoral immune responses by CRISPR/Cas9-edited B cells. *The Journal of experimental medicine* **216**, 1301–1310 (2019).
17. Nawaz, W. *et al.* Nanotechnology and immunoengineering: How nanotechnology can boost CAR-T therapy. *Acta Biomater* (2020) doi:10.1016/j.actbio.2020.04.015.

BAR-B

18. Smith, T. T. *et al.* In situ programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers. *Nat Nanotechnol* **12**, 813–820 (2017).
19. Pardi, N. *et al.* Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge. *Nat Commun* **8**, 14630 (2017).
20. Fu, Y.-W. *et al.* Dynamics and competition of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins and AAV donor-mediated NHEJ, MMEJ and HDR editing. *Nucleic Acids Res* **49**, 969–985 (2021).
21. Shy, B. R. *et al.* Hybrid ssDNA repair templates enable high yield genome engineering in primary cells for disease modeling and cell therapy manufacturing. 2021.09.02.458799 (2021) doi:10.1101/2021.09.02.458799.
22. Kath, J. *et al.* Pharmacological interventions enhance virus-free generation of TRAC-replaced CAR T cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* **25**, 311–330 (2022).

BAR-B

18. Smith, T. T. *et al.* In situ programming of leukaemia-specific T cells using synthetic DNA nanocarriers. *Nat Nanotechnol* **12**, 813–820 (2017).
19. Pardi, N. *et al.* Administration of nucleoside-modified mRNA encoding broadly neutralizing antibody protects humanized mice from HIV-1 challenge. *Nat Commun* **8**, 14630 (2017).
20. Fu, Y.-W. *et al.* Dynamics and competition of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins and AAV donor-mediated NHEJ, MMEJ and HDR editing. *Nucleic Acids Res* **49**, 969–985 (2021).
21. Shy, B. R. *et al.* Hybrid ssDNA repair templates enable high yield genome engineering in primary cells for disease modeling and cell therapy manufacturing. 2021.09.02.458799 (2021) doi:10.1101/2021.09.02.458799.
22. Kath, J. *et al.* Pharmacological interventions enhance virus-free generation of TRAC-replaced CAR T cells. *Mol Ther Methods Clin Dev* **25**, 311–330 (2022).

Figure 1. ScFull-Ig

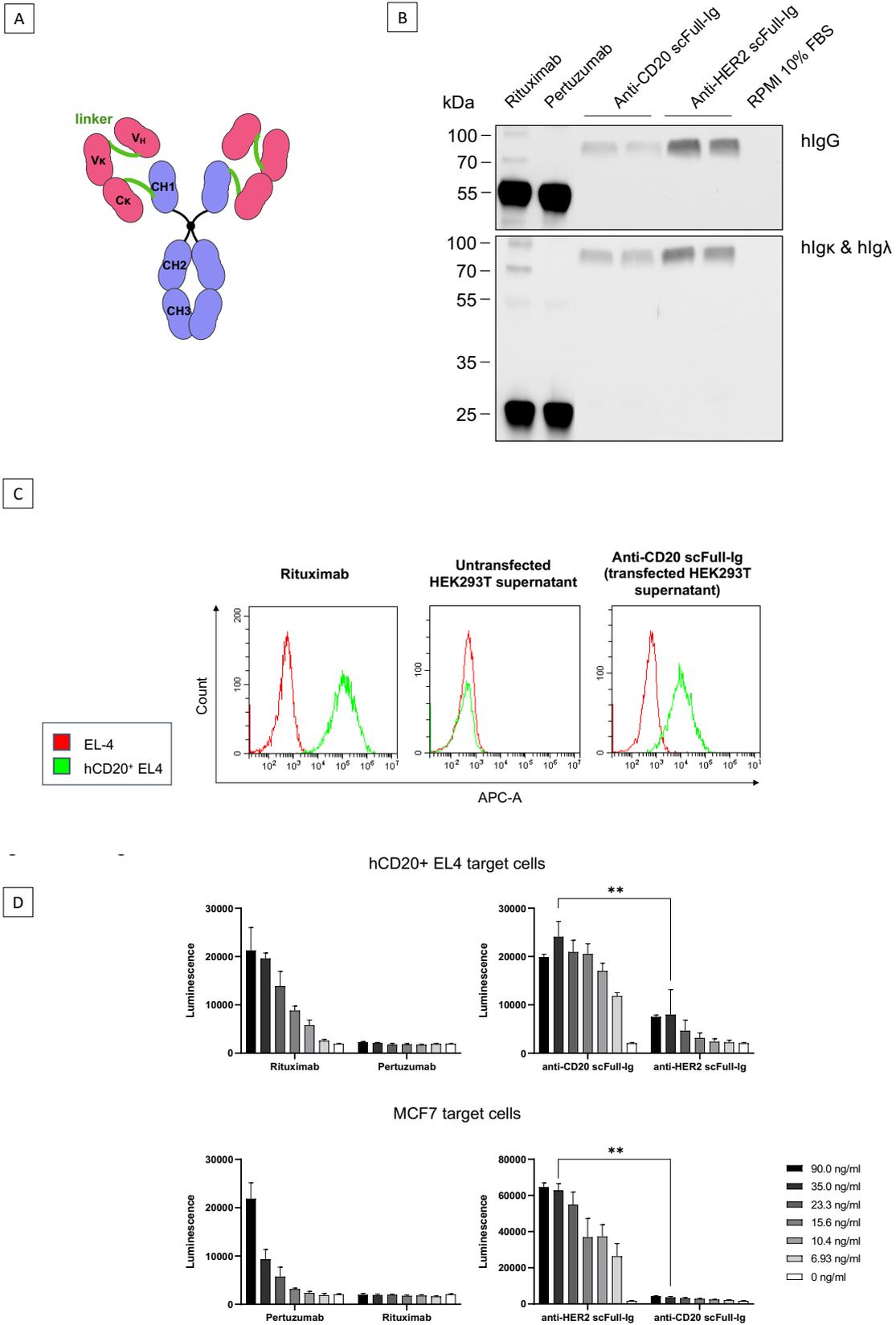
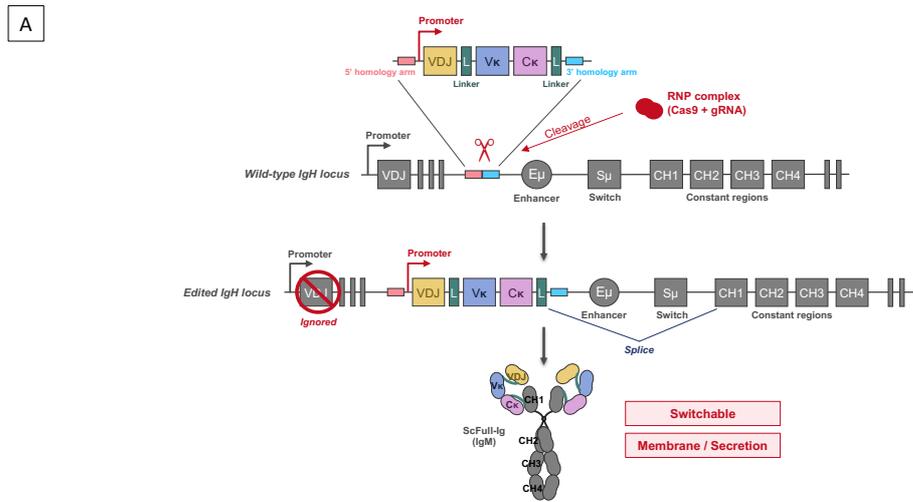


Figure 2. Knock-in in BL41 cell line



B

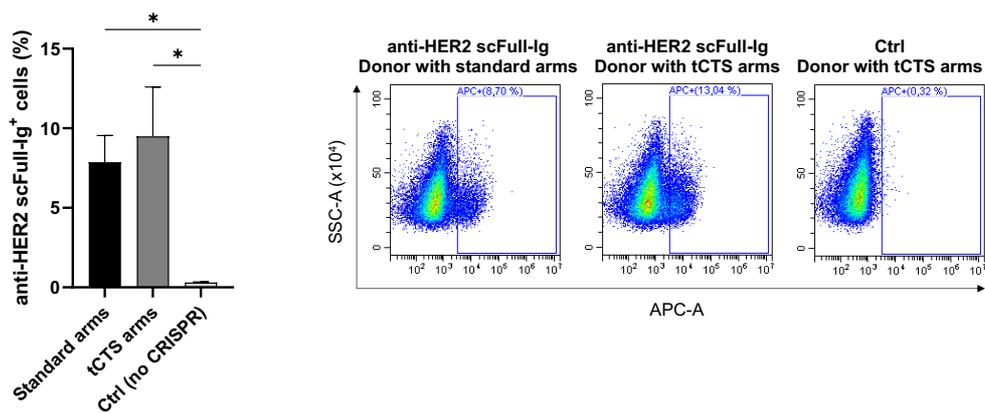
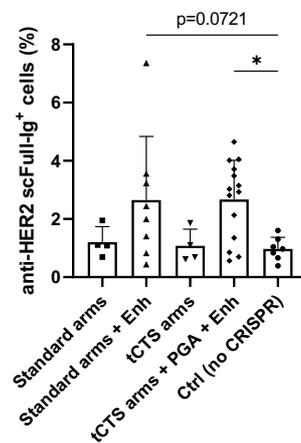


Figure 3. Knock-in in primary B cells, expression of the membrane-bound form



BAR-B

Single-hit genome edition for expression of single-chain immunoglobulins by edited B cells

Natsuko UEDA^{1*}, Marine CAHEN^{1,2*}, Christophe SIRAC², Anne GALY³, Jérôme MOREAUX⁴, Yannic DANGER, Michel COGNÉ

¹INSERM U 1236, University of Rennes 1, Etablissement Français du Sang, 35000 Rennes, France.

²INSERM U1262, CNRS UMR 7276, Limoges University, Control of the B-cell Response & Lymphoproliferation, 87025 Limoges, France.

³ Université Paris-Saclay, Univ Evry, Inserm, Genethon, Integrare research unit UMR_S951, 91000, Evry, France

⁴CNRS-UM UMR 9002, Institute of Human Genetics, 34090 Montpellier, France.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

BAR-B

Primer sequences

Primer	Sequence
Donor DNA amplification - For	TGGCCACTCTAGGGCCTTT
Donor DNA amplification - Rev	AGCTTGCTTTGGCCTCAATC
Donor DNA amplification (tCTS) - For	TGGCGGGACTAGTGGCCCTTAGAGAACTGTCGGAGTGGGAA GAATGGCCACTCTAGGGC
Donor DNA amplification (tCTS) - Rev	TGGCGGGACTAGTGGCCCTTAGAGAACTGTCGGAGTGGGAG CTTGCTTTGGCCTCAATT
TIDE analysis - For	TGGGTTTTGTGGGGTGAGG
TIDE analysis - Rev	GCTTTGGCCTCAATCCAGAC
μ transcript analysis - RT	CGGGTRCTGCTGATGTCAGA
μ/α transcript analysis - PCR For	CCGCGGCCGCGCCACCATGGACTGGACCTG
μ transcript analysis - PCR Rev	CTCGTATCCGACGGGGAATT
α transcript analysis - RT	AAGTCCAGACCACATAGGG
α transcript analysis - PCR Rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCGAYGAC CACGTTCCCATCT

KI cassette sequences

Tomato

AAGAATGGCCACTCTAGGGCCTTTGTTTTCTGCTACTGCCTGTGGGGTTTCTGAGCATTGCAGGTTGGTCCTC
GGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGGCGGACTGGCCAGGAGGGGATGGGCACTGGGGTGCCTTGAGGATCTG
GGAGCCTCTGTGATTTTCCGATGCCTTTGGAAAATGGGACTCAGGTTGGGTGCGTCTGATGGAGTAACTGAG
CCTGGGGGCTTGGGGAGCCACATTTGGACGAGATGCCTGAACAAACCAGGGGTCTTAGTGATGGCTGAGGAA
TGTGTCTCAGGAGCGGTGTCTGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCGTGAAATATTTCTTTAG
AATTATGAGGTGCGCTGTGTGTCAACCTGCATCTTAAATTCTTTATTGGCTGGAAAGAGAAGTGTCCGACGGCC
GAAGCTTAAAAACCTCAGAGGATTTGTCATCTCTAGGCCTGCTCAGTAGAGGTTGCTATATAGCAGGGAAACA
TGCAAATAAGGCCTCTCTTCTCATGAAAACGAGTCTGAACTAACCTTGAATCTGAAGCAAAGGGGATCAGC
CCGAGATTCTCATTAGTATCAACTGAACACACATCCGCGGCCGATGGTTTCCAAGGGTGAGGAGGTTA
TCAAAGAGTTCATGAGATCAAGGTTAGGATGGAAGGTTCCATGAACGGTACAGGATTCGAGATCGAGGGCG
AGGGTGAAGGTAGACCCTACGAGGGCACCCAAACCGCAAAGCTCAAAGTACTAAGGGTGGTCTTTGCCCT
TCGCTTGGGACATCTGTCCCCCAATTCATGTATGGCTCTAAGGCATACGTTAAGCATCTGCTGACATCCCCG
ATTACAAAAAGTTGCTCTCCAGAGGGTTCAAGTGGGAAAGGGTCTGAACTTCGAGGATGGAGGTTGT
GACTGTGACCCAAGATTCTAGTTTGCAGGACGGCACTTTGATCTACAAGGTGAAGATGAGAGGCACAACTTT
CCTCCCGATGGTCCAGTCATGCAAAAGAAAATATGGGTTGGGAAGCCTCCACTGAGAGGCTTTACCCAAGAG
ACGGCGTTCTTAAGGGTGAATCCACCAAGCTCTCAAATTAAGGATGGAGGCCACTACTTGGTGGAGTTCAA
GACCATCTACATGGCTAAGAAGCCGTGCAACTCCCCGGCTATTACTACGTGGACACTAACTCGATATCACCT
CCCACAACGAGGACTACCCATCGTTGAACAATATGAGAGGTCTGAGGGTGCACATCACCTTTTCTGGGTCA
GGTACTGGAAGCACCGGTAGTGGCAGCTCTGGCACCGTTCATCCGAGGATAATAACATGGCTGTGATCAAG
GAGTTTATGCGCTTCAAAGTCCGTATGGAGGGCTCAATGAATGGCCACGAGTTCGAGATCGAAGGAGAGGGT
GAGGGCCGCCATATGAGGGCACTCAGACAGCTAAGTTGAAAGTCAACAAGGGTGGACCACTTCTTTGCTT
GGGATATTCTCACCACAGTTTATGTACGGTTCCAAGGCTTACGTGAAACACCCAGCCGATATCCAGATTAT
AAGAAGTTGCTTTCCAGAAGGATTTAAGTGGGAGCGGTTATGAACTTCGAGGACGGTGGTTTGGTTACAG
TCACCAAGACTCCTCCCTTCAAGATGGTACGCTTATCTACAAGGTCAAATGCGTGGAACCAATTTCCACCA
GACGGCCAGTTATGCAGAAGAAGACTATGGGCTGGGAGGCTTCAACAGAGCGCTTGTATCCCCGCGATGGA
GTGTTGAAGGGCGAGATTACCCAGGCATTGAAGTTGAAGGACGGTGGACATTACCTCGTGGAGTTAAGACC

BAR-B

ATCTACATGGCCAAGAAACCCGTTCAATTGCCTGGTTACTACTACGTTGATACCAAGTTGGACATTACCTCCCAC
AACGAGGATTACACCATTGTGCAACAGTACGAGCGTTCCGAGGGCCGCCACCACCTCTCCTCTACGGTATGG
ACGAGTTGTACAAGTGAACTTGTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTC
ACAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTAAGTGGGTGAA
TCCAGCCAGGAGGGACGCGTAGCCCCGTCTTGATGAGAGCAGGGTTGGGGCAGGGGTAGCCCAGAAACG
GTGGCTGCCCTCTGACAGGGGCTTAGGGAGGCTCCAGGACCTCAGTGCCTGAAGCTGGTTTCCATGAGAA
AAGGATTGTTTATCTTAGGAGGCATGCTTACTGTTAAAAGACAGGATATGTTTGAAGTGGCTTCTGAGAAAA
TGGTTAAGAAAATTATGACTTAAAAATGTGAGAGATTTCAAGTATATTAATTTTTTAACTGTCCAAGTATTG
AAATCTTATCATTTGATTAACACCCATGAGTGATATGTGTCTGGAATTGAGGCCAAAGCAAGCT

ScFull-Ig HER2

AAGAATGGCCACTCTAGGGCCTTTGTTTTCTGCTACTGCCTGTGGGGTTTCTGAGCATTGCAGGTTGGTCCTC
GGGGCATGTTCCGAGGGGACCTGGGCGGACTGGCCAGGAGGGGATGGGCACTGGGGTGCCTTGAGGATCTG
GGAGCCTCTGTGGATTTCCGATGCCTTTGGAAAATGGGACTCAGGTTGGGTGCGTCTGATGGAGTAACTGAG
CCTGGGGGCTTGGGGAGCCACATTTGGACGAGATGCCTGAACAAACCAGGGGTCTTAGTGATGGCTGAGGAA
TGTGTCTCAGGAGCGGTGTCTGTAGGACTGCAAGATCGCTGCACAGCAGCGAATCGTGAATATTTCTTTAG
AATTATGAGGTGCGCTGTGTGTCAACCTGCATCTAAATCTTTATTGGCTGGAAAGAGAAGTGTCCGGACGGCC
GAAGCTTAAAAACCTCAGAGGATTTGTCATCTCTAGGCCTGCTCAGTAGAGGTTGCTATATAGCAGGGAAACA
TGCAAATAAGGCCTCTCTCTCATGAAAACGAGTCTGAACTAACCTTGAATCTGAAGCAAAGGGGATCAGC
CCGAGATTCTCATTAGTGATCAACACTGAACACACATCCGCGGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGCA
TCCTCTTGGTGGCAGCAGCAACAGGTAAGGGGCTCCCCAGTCTCGGGGTTGAGGCAGAAACCAGGCCACT
CAAGTGAGGCTTTACCCACCCCTGTCTCTCCACAGGTACCTACTCCGAAGTGCAGCTCGTCAAAGCGGTG
GCGGACTGGTTCAGCCCGGTGGTTCTCTGCGGCTGTCTGTGCTGCCTCGGGTTTACGTTCACTGACTACACA
ATGGACTGGGTGCGTCAGGCTCCTGGAAAGGATTGGAGTGGGTAGCCGACGTTAATCCAACTCCGGCGGG
AGCATCTACAACCAGAGGTTCAAGGGGAGTTCACTCTGAGCGTGGATCGTCCAAGAACACGCTGTACCTCC
AGATGAACTCTCAGGGCCGAGGACACGGCTGTTACTATTGCGCGAGGAACCTGGGTCTTCTTCTACTTC
GACTACTGGGGACAGGGAACCTGGTGACCGTCACTCCGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGC
GGCGGCGGCTCCAGTGGTGGTGGATCCGATATTAGATGACCCAGTCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGG
GCGACCGAGTACCATCACATGCAAGGCTTCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGATGGTACCAGCAGAAGCC
AGGCAAAGCACCCAAGCTGCTGATCTATAGCGCCTCTACCGGTATACCGGCGTGCCTCTAGATTCTCTGGCA
GTGGGTGAGGAACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTGCTACCTACTATTGCCAG
CAGTACTATATCTACCCATATACTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCT
CCGTCTTCATTTTCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAAT
TTCTACCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGTCT
GTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACG
AGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCAACATCAGGGGCTGTCTCTCTGTGACTAAGAGCTTTAACAG
AGGAGAGTGTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGAGGTGGGTGCGGTGGCGGCGGATCAGGTGAGTCTCAC
AACCTCTCTCTGCTTAACTCTGAAGGTTTTGCTGCATTTTTGGGGGGGTGAATCCAGCCAGGAGGGACG
CGTAGCCCCGTCTTGATGAGAGCAGGGTTGGGGCAGGGGTAGCCAGAAACGGTGGCTGCCGCTCTGAC
AGGGGCTTAGGGAGGCTCCAGGACCTCAGTGCCTGAAGCTGGTTTCCATGAGAAAAGGATTGTTTATCTTAG
GAGGCATGCTTACTGTTAAAAGACAGGATATGTTTGAAGTGGCTTCTGAGAAAAATGGTTAAGAAAATTATGA
CTTAAAAATGTGAGAGATTTTCAAGTATATTAATTTTTTAACTGTCCAAGTATTTGAAATCTTATCATTTGATT
AACACCCATGAGTGATATGTGTCTGGAATTGAGGCCAAAGCAAGCT

LEGENDS TO SUPPLEMENTAL FIGURES:

Supplemental Figure 1. tdTomato knock-in in BL41.

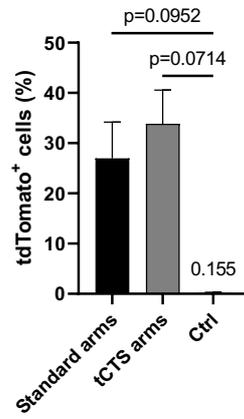
A CRISPR-mediated tdTomato reporter gene KI was carried out in BL41 cells. With about 30% of tdTomato positive cells, we validated the possibility to insert a large expression cassette in this locus. The efficiency of tCTS-modified homology arms was also confirmed. tCTS, truncated Cas9 Target Sequence.

Supplemental Figure 2. Validation of correct splicing of the knock-in exons on the endogenous IgH constant exons

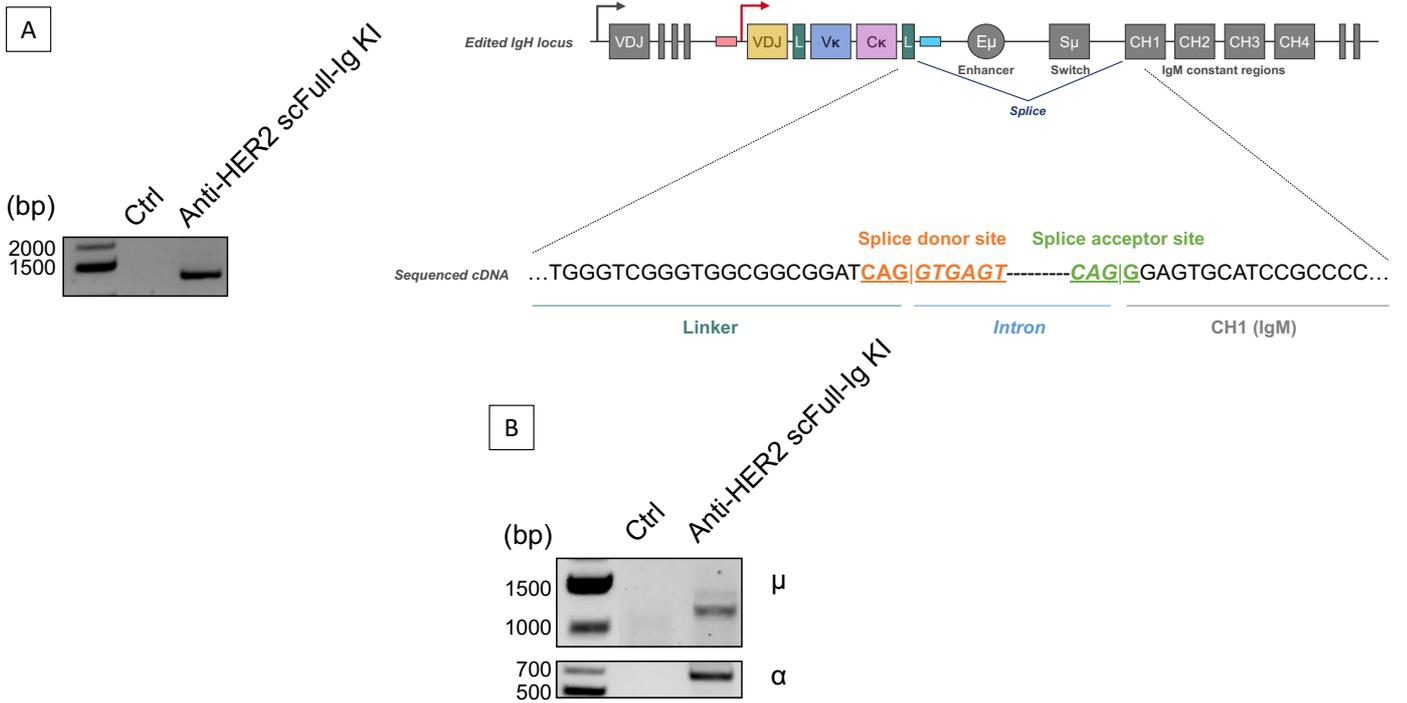
(A) In BL41 cells. RNA of edited cells was extracted, and the IgH transcript was sequenced after reverse transcription and PCR. Correct splicing of the inserted cassette on the endogenous constant region was confirmed.

(B) In primary B cells. RNA of edited primary B cells was extracted, and splicing was confirmed by performing RT-PCR on IgH transcripts, on unswitched C μ gene or C α gene after class-switching.

Sup Figure 1. tdTomato knock-in in BL41



Sup. Figure 2. Validation of correct splicing of the knock-in exons on the endogenous IgH constant exons



C. Article 2: Use of the IGHA2 gene as an appropriate site for human B cell editing

Par rapport aux autres types cellulaires, les cellules B sont probablement les plus adaptées à la production de molécules recombinantes telles que les anticorps ou leurs dérivés (nanobody, minibody, bi-spécifiques). Leurs multiples propriétés rendent ces cellules particulièrement attractives dans le domaine des thérapies cellulaires adoptives. Elles peuvent en particulier se différencier en plasmocytes à longue durée de vie qui produisent continuellement et à grande échelle des anticorps. En outre, elles ont une propension à réarranger leurs gènes d'immunoglobuline pour induire une commutation de classe isotypique (CSR). Les anticorps IgA qui résultent de ce mécanisme ont un fort potentiel thérapeutique qui n'est pas à démontrer. Afin d'exploiter ces spécificités, nous présentons ici les multiples bénéfiques thérapeutiques de l'édition du génome des cellules B en ciblant avec l'outil CRISPR/Cas 9 le locus IgH et plus particulièrement le gène IGHA2. Dans cet article, nous démontrons au moins trois stratégies d'édition alternatives possibles. La première consiste à produire des protéines recombinantes sans perturber le BCR endogène des cellules B. La deuxième est l'induction de la CSR médié par CRISPR/Cas 9 à l'isotype IgA2 de cellules spécifiques (hybridome) afin d'obtenir l'expression de surface et la sécrétion d'IgA2 spécifiques. Enfin, la troisième stratégie combine l'induction CSR à l'IgA2 avec le remplacement de la région variable de l'Ig endogène en perturbant l'expression du BCR endogène. Cette stratégie, comme la deuxième, permet l'expression de surface ainsi que la sécrétion d'IgA2, avec l'avantage d'un plus large éventail de cibles thérapeutiques. Tous ces résultats élargissent le champ d'application de l'immunothérapie adoptive par l'exploitation des caractéristiques intrinsèques des cellules B.

Use of the IgH α gene as an appropriate site for B cell editing

Marine CAHEN, Natsuko UEDA, Ophélie DÉZÉ, Brice LAFFLEUR, Anne GALY, Grégory NOËL, Laurent DELEURME, Yannic DANGER, Michel COGNÉ

Abstract

B lineage cells can likely outcompete any other cell lineage for producing recombinant antibodies or related bio-therapeutic molecules. Since able to survive on the long-term, these cells thus stand as attractive agents for adoptive immunotherapy. Upon differentiation into long-lived plasma cells, they can indeed dispense a continuous inflow of antibodies. Immunoglobulin (Ig) loci are expressed in a B-cell specific manner and at levels unbeatable by any other locus, making them ideal sites for gene editing. In addition, the large IgH locus includes several functional classes of genes, normally expressed after class switch recombination (CSR). Each of them provides a platform of interest, encoding a specific Ig class to which an edited Ig variable domain could be associated on purpose, hereby acquiring

specific functions. Notably, IgA antibodies have unique properties with potential therapeutic interest. We explored in this study the accessibility of the human IGHA2 gene to three different strategies of gene editing. The first one consists of using the highly accessible chromatin of the IGHA2 gene for inserting a gene cassette, hereafter highly expressed under B-cell specific conditions. In a second approach, we artificially triggered CSR to IgA2 for selected cells, enforcing their surface expression and/or secretion of specific IgA2. Finally, a third strategy combined IgA2 CSR with replacement of the endogenous Ig variable region, hereby yielding an antigen-specific, and potentially therapeutic single-chain IgA.

Altogether and through different strategies, B-cell based adoptive immunotherapy could continuously deliver a given mAb to a patient. This could notably by-pass unfavorable chemistry, manufacturing, and control (CMC) properties, as for the IgA class which CMC issues until now excluded from therapeutic applications.

Introduction

Adoptive immunotherapy with *ex vivo* engineered autologous cells, such as CAR-T cells, has recently revolutionized the genre, including with CRISPR-Cas9-mediated genetic editing of the T-cell receptor for retuning its Ag-specificity. These strategies are expanding and diversifying in terms of methods, expressed receptors, and edited cell lineages. Recently, several reports highlighted the feasibility of B-cell editing for adoptive immunotherapy in mouse models²⁴³⁻²⁴⁹. B lineage cells clearly constitute the ideal candidates for producing membrane immunoglobulins (Ig) at the B-cell stage or secreted Ig at the plasma cell stage. Their ability to survive as memory B-cells or long-lived plasma cells (LLPCs), once terminally differentiated, further makes them attractive for potential therapeutic aims. B cells can provide long-term immunity by consistently producing antibodies (Abs) both locally and in the circulation. Providing therapeutic monoclonal Abs (mAbs) on the long-term is desirable for multiple chronic pathologies such as cancer, autoimmunity, or chronic infections. B-cell editing could thus provide a new opportunity for purveying specific therapeutic mAbs to patients through their direct *in vivo* production, whether these mAbs have a classical structure or correspond to other formats, such as single-chain Abs, nanobodies, bispecific Abs, or minibodies. This approach was used for introducing in the mouse GAPDH gene a B-cell specific cassette encoding an anti-PD1 antibody²⁵⁰. This approach is especially relevant for

short-lived therapeutic biotherapies, such as some bispecific Abs, which could be hereby permanently infused into the body fluids. It could also make it feasible to produce complex biomolecules for which secretion is readily possible for plasma cells *in vivo* while *in vitro* production and/or purification are not mastered, as it is notably the case for antibodies with complex glycosylation patterns such as IgA.

Studies have demonstrated the key role of mucosal Abs, and most specifically IgA, in the elimination and protection against SARS-CoV-2 during the 2019 global pandemic^{251,252}. More broadly, IgA can crucially help master infections at mucosal sites, control the composition of the microbiota and prevent viral infections^{253–255}. Unfortunately, IgA secretion at mucosal sites is only efficiently induced after mucosal immunization *in vivo*. More generally, human IgA can only be produced endogenously, notably under its dimeric or polymeric forms which are exported through the mucosal epithelia. Human IgA are indeed highly N-glycosylated, or even O-glycosylated for IgA1, heterogeneously polymerized and poorly stable Abs, the recombinant production of which is not currently mastered and therefore remains unsuitable for systemic administration to patients.

In this context, B-cell engineering could potentially open alternative strategies that make reconsider IgA-based therapeutic approaches. The proof of concept that B-cells can be forced to switch by CRISPR/Cas9 technique has been established *in vitro*²⁵⁶. Whether such a strategy could be used for changing on-purpose the class of Abs produced *in vivo* against a given Ag, or whether the human IgH α genes could be engineered in order to graft V regions corresponding to a mAb of interest remains to be established.

In this study, we explored various aspects of human IgH α -gene editing. We focused on the IGHA2 gene since, in comparison to IgA1, IgA2 reportedly carries the more potent properties in terms of pathogen neutralization and for the activation of effector cells²⁵⁷. We thus evaluated the efficiency of IGHA2 gene editing in various configurations, either for on-purpose class-switching or for using this gene as an efficient location for the expression of transgenic Abs (either from the IgA class or not). Since the IGHA2 gene is in an open configuration in B-cells and lies in close proximity to the strong IgH locus 3' super-enhancer, it indeed stands as a potentially valuable "platform" for expressing any transfected gene in a B-cell specific manner.

Materials and methods

Cell lines

BL41 and RAMOS human Burkitt's lymphoma cell lines and LP1 human myeloma cell line were cultured in RPMI 1640 GlutaMAX medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 1mM Sodium Pyruvate (Gibco), 1 unit/ml penicillin, 1 μ g/mL -streptomycin (Gibco) and 2.92 μ g/mL L-glutamine (Gibco) at 37°C with 5% CO₂. For EL-4-hCD20 cell line, the media was supplemented with 2- β Mercaptoethanol.

Purification, culture, and activation of human primary B lymphocytes

Human primary B cells were isolated from buffy coats collected from healthy volunteers at the Etablissement Français du Sang (Rennes, France) (after informed consent, and under agreement #AC-2019-3853). Human primary B-cells were positively sorted with the *StraightFromTM Buffy Coat CD19 Microbead Kit* (Miltenyi Biotec) with a purity >90%.

The medium for human primary B cell culture was RPMI 1640 GlutaMAX medium (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco), 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco), 2.92 μ g/mL L-glutamine (Gibco), 1 unit/ml penicillin, 1 μ g/mL -streptomycin (Gibco). For four days, B cells

were activated in 24-well plates at $0.75 \cdot 10^6$ cells/mL with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CpG oligodeoxyribonucleotide 2006 (Miltenyi Biotec), 2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgA + IgG + IgM (H+L) (Jackson ImmunoResearch), 50 U/ml recombinant IL-2 (R&D Systems) and 100 ng/ml recombinant human soluble CD40L (Immunex). At Day 2, 5 ng/ml IL-10 (R&D Systems) was added in each well. At Day 4, medium was removed, B cells were washed twice and cultured again in 24-well plates at $0.5 \cdot 10^6$ cells/mL in culture medium with 50 U/ml IL-2 (R&D Systems), 5 ng/ml IL-4 (R&D Systems) and 12 ng/ml IL-10 (R&D Systems), in order to promote differentiation into plasmablasts.

Plasmid constructions and donor DNA preparation

In order to obtain donor DNA for specific genomic integration after CRISPR/Cas9 cleavage at the IgH locus, we constructed six plasmids containing cassettes encoding the tdTomato gene, an anti-CD20 minibody, an anti-CD20 scFvC κ L or an anti-HER2 scFvC κ L with flanking arms adapted to each homology-directed repair (HDR) strategy. All constructs were assembled with NEBuilder HIFI assembly kit (New England Biolabs) from PCR amplified fragments. PCR templates used for construction were either synthetic gene fragments (ordered from GeneCust), plasmids, or human genomic DNA (in particular for homology arms).

Donor DNA used for transfection and HDR were produced by PCR amplification of above-mentioned plasmid constructions. All PCR products were purified using NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel). Donor DNA templates are listed in supplementary Table 2.

Gene edition

For CRISPR-Cas9 experiments, 100 pmol of the Cas9 protein (IDT) and 500 pmol of each sgRNA (Synthego) were assembled as an RNP complex through pre-incubation for 15 minutes at 37°C. All sgRNA used in the study were designed with the CRISPOR tool (<http://crispor.tefor.net/>) and are listed in supplementary data. Transfection of cell lines and primary B cells was done by electroporation on Nucleofector 2D (Lonza) with Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza) using the X-001 Program, and Nucleofector 4D (Lonza) with P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit L (Lonza) using the EO-117 program, respectively.

For transfection, cells were centrifuged at 90 x g during 10 min and resuspended at $1 \cdot 10^6$ - $2 \cdot 10^6$ cells per 100 μL of supplemented transfection buffer supplied in the kit. RNP complex with suspension cells were transferred into NucleocuvetteTM (Lonza). Cell lines and primary B cells were electroporated using pulse code X-001 and EO-117, respectively. After electroporation, 900 μL of RPMI medium were immediately added and cells were left at RT for 5-10 minutes. Cell lines were transferred into 6-well plates with RPMI medium (5 mL/well); primary B cells were transferred into 24-well plates with 1 ml medium per well.

For targeted DNA insertions, 2 μg of donor DNA were added to the RNP mixture. Donor DNA and RNP complex were added into NucleocuvetteTM (Lonza) with 4 μM electroporation enhancer (IDT), just before electroporation. 30 μM HDR enhancer (IDT) or small molecules, 0,01 μM Trichostatin A (cayman chemical company) and 2 μM M1438/Nedisertib (MedChemTronica), were added to the medium after transfection, and removed 24 hours later by replacing the culture medium.

sgRNA validation

The cleavage induced by the different sgRNA coupled with Cas9 as RNP complex was tested to ensure their efficiency. For this purpose, DNA was extracted from edited cells. Cell pellets were lysed 2 μL Proteinase K (Invitrogen) in 500 μL of PK Buffer (tris 100nM, NaCl 200 mM,

EDTA 5 mM, SDS 10% 10 μ L) incubated at 56°C overnight. Then 1 mL/sample 100% ethanol then gently homogenized and spun 2 min at 13000 rpm. After discarding supernatants, DNA was washed with 500 μ L ethanol 75% and spun 2 min at 13000 rpm. Supernatant was again discarded and DNA allowed to dry for 10 min. DNA was finally resuspended into water. PCR was performed on extracted DNA using primers flanking CRISPR cleavage sites. Sequencing of PCR amplicons was done by Sanger sequencing. To determine the efficiency of sgRNAs, sequences were compared between edited and non-edited cells through Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) analysis. (<http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>).

PCR detection of genomic integrations

To confirm correct insertion at the genomic level we used a PCR with 3 primers, competitively amplifying in the same tube the wild-type band and the edited band (2 forward and reverse primers flanking the wild-type CRISPR target site, a third one within the expected DNA insertion, primer sequences are listed in Supplementary Table 2). PCR was performed on DNA extracted from edited cells with Phusion Taq polymerase (ThermoFisher) following manufacturer's instructions.

Flow cytometry

To monitor tdTomato expression, cells were washed with PBS and resuspended into 300 μ L of PBS, using 0,3 μ g/mL of DAPI (Serva) before cytometry analysis, in order to distinguish live and dead cells. Switched IgA cells were stained with mouse anti-IgA2 AF647-conjugated antibody (Southern Biotech).

To assess the expression of specific anti-human CD20 or anti-HER2 BCR, we performed indirect staining with the soluble antigens bound by these BCR. Cells were first incubated for 30 minutes at 4°C with either His-tagged recombinant human CD20 (Sino Biological) or His-tagged recombinant human ErbB2/Her2 Fc chimera protein (R&D Systems). After washing, cells were stained 30 minutes at 4°C with anti-His tag APC-conjugated antibody (Biolegend). Cells were washed again and resuspended into 300 μ L of PBS, 1 μ L of DAPI (Serva) being added just before cytometry analysis. Stained cells were analyzed on a Cytoflex flow cytometer (Beckman Coulter).

Enzyme-linked immunosorbent assays

For the anti-human IgA ELISA, 96-well plates were coated at 4°C overnight with 50 μ L/well unlabeled goat anti-human IgA antibody (Southern Biotech) at 1 μ g/mL. After washing twice with PBS-Tween 0.1% and once with PBS, coated wells were blocked with 200 μ L/well PBS supplemented with 3% bovine serum albumin (BSA) (one hour at 37°C). Samples were added in duplicate at 50 μ L/well and incubated 2h at 37°C. After washings, 50 μ L/well alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgA antibody (Southern Biotech) were added and incubated 1h30 at 37°C. After washings, detection was performed using a solution of SIGMAFAST N-Nitrophenyl phosphate tablets (SIGMA), following manufacturer's instructions. Reaction was stopped with 30 μ L/well 3N NaOH and absorbance was read at 405nm.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Mann-Whitney tests with GraphPad Prism 8 software. Data are shown as mean \pm SD, * p<0.05, ** p<0.01.

Results

- I) The human IGHA2 gene is accessible to CRISPR/Cas9-mediated gene editing and gene insertion

We designed gRNAs at positions located in-between the S α 2 region and the first coding exon (CH1) of the IGHA2 gene, *i.e.*, within an intron and close to the IgH 3'RR transcriptional enhancer (Figure 1A). This location also has the advantage to include unique sequences, which are necessary for precise gene edition, in particular sequences that are specific to IGHA2 and absent in IGHA1.

These gRNAs were first evaluated for the amount of cleavage after RNP transfection, and efficiently generated indels around the cleavage site when tested in a surveyor assay with endonuclease T7. Cleavage efficiency was respectively around 20% and 12% in BL41 cell line and primary B cell evaluated by TIDE analysis. (Fig supplemental 1)

In parallel, we evaluated whether this genomic location could allow gene insertion in B cells and efficient expression of an inserted cassette. For that goal, a cassette associating a pVH promoter to the fluorescent reporter gene tdTomato was first used. This cassette was flanked with adequate 0.5 kb-long arms homologous to the DNA regions adjacent to the IGHA2 CRISPR target region, in order to support homology-directed recombination (HDR) on both sides of the DNA break (Figure 1.A). The [pVH-tdTomato] cassette was then associated with an appropriate RNP conjugate and evaluated for insertion efficiency (and expression hereby) by transfecting either the BL41 Burkitt's lymphoma cell line or human primary B cells. Accordingly, it yielded efficient expression of tdTomato validated by flow cytometry, with approximately 1% of primary B cells and 10% of BL41 cells expressing this cassette (Figure 1.B).

The lower efficiency of knock-in in primary B cells compared to an established lymphoma cell line did not come as a surprise and, rather than a specific feature of the IGHA2 gene, it reflects the less efficient HDR in primary cells, as already observed by us and by others²⁵⁸.

We implemented various strategies in order to improve the efficiency of HDR, notably by using homology arms ending with truncated CRISPR target sites (tCTS)²⁵⁹, and by supplementing the transfection media with inhibitors of non-homologous end-joining (NHEJ) such as small molecules M3814 and TSA²⁶⁰ or a commercial "HDR enhancer" mix (IDT). Each of these elements incrementally improved the knock-in efficiency (Supplementary data Figure 2), and we thus ended with a routine transfection method including all of them.

Beyond expression of a reporter gene, we wished to evaluate whether a therapeutic protein could be produced by B cells engineered at the IGHA2 position of the IgH locus, again through a non-deletional insertion, *i.e.*, without disrupting the production of the endogenous IgH chain encoded by upstream constant genes. We designed a new format of "minibody" construct associating a single-chain Fv (scFv) fragment with an Fc γ fragment. The scFv part of this minibody associates an upstream VHDJH domain followed with a linker peptide and a downstream V κ J κ domain identical to rituximab (anti-CD20 mAb) (Figure 2.A). To first validate the functionality of this structure, the minibody was produced in the CHO cell line and tested for binding to the murine cell line EL4-hCD20⁺ (a murine T-cell line transfected to express human CD20)²⁶¹. This demonstrated the ability of the "anti-CD20 minibody" to be functionally secreted and to bind its specific target (Figure 2.B).

The cassette encoding the anti-CD20 minibody was then flanked with the IGHA2 specific homology arms, in order to be inserted upstream of the C α 2 CH1 exon, as previously done with

the tdTomato gene cassette (Figure 3.A). The corresponding construct was then electroporated in association with an appropriate RNP complex into the plasma cell line LP1. Competitive amplification by PCR of both the WT IGHA2 band and the recombinant band corresponding to the knocked-in cassette validated the efficient insertion of the cassette at the expected genomic position (Figure 3B). Expression of the knocked-in gene by LP1 cells was then evaluated by analyzing cell supernatant 1-week post-electroporation, validating the efficient secretion of anti-CD20 minibody by cell cytometry using EL4-hCD20⁺ as target cells (Figure 3C).

Altogether, both tdTomato expression in B lymphocytes and minibody secretion in plasma cells indicate that the IGHA2 genomic location is appropriate for efficient expression of a transgene in B cells, with the advantage of a locus highly expressed in the B-cell lineage and the usage of a position chosen for not disrupting endogenous Ig / BCR production, provided the cell functionally expressed IgM or a switched in-between IGHM and IGHA2. More broadly, this HIGA2 site could thus be edited by CRISPR/Cas9-based strategy in order to support production of therapeutic molecules of interest by plasma cells, and not only antibodies.

II) CRISPR/Cas9-mediated CSR to IgA2 in human B-cells

While CSR normally happens in B cells under stimulation by adequate cytokines, it was also reported to be possible after CRISPR/Cas9-induced cleavage of the IgH locus²⁵⁶. This strategy could open the possibility to switch any non-IgA secreting plasma cell of desired specificity towards the secretion of IgA2, with all the effector properties hereby, notably regarding mucosal immunity and activation of myeloid cells. In order to check that such a CRISPR/Cas9-induced class switching could efficiently target the IGHA2 gene, we used CRISPR/Cas9-mediated CSR for deriving IgA2 class-switched variants from several human B-cell lines and from primary B cells. We designed two sgRNAs, one targeting a site upstream of the S μ region and another one targeting a site downstream of S α 2. These gRNAs were then associated with the Cas9 protein to form RNP complexes, and transfected into B cells in order to induce double-stranded DNA breaks at two distant positions of the IgH locus, thus mimicking the action of the *activation-induced cytidine deaminase* (AID) in CSR (Figure 4A). This strategy was applied to the lymphoma cell lines BL41 and RAMOS, and readily yielded up to 12% of cells having lost IgM expression and replaced by IgA2 membrane expression. In polyclonal primary B cells from healthy donors, this procedure increased by 5-fold the amount of IgA2 expressing cells (Figure 4B), validating our strategy.

In order to evaluate not only BCR expression but also IgA2 secretion, we targeted the hybridoma SpLT70, which previously produced an anti-SARS-CoV-2 broadly neutralizing antibody (bnAb) of the IgG class. The CRISPR/Cas9-mediated CSR procedure then yielded variant cells secreting an equivalent bnAb, switched to the IgA2 class (Figure 4C). This variant has a neutralizing activity for the Wuhan, delta, and omicron variants of SARS-CoV-2.

Altogether, CRISPR/Cas9-induced CSR to the IGHA2 gene thus looks efficient both for obtaining membrane expression and/or secretion of IgA2 molecules. This process could thus be of interest in situations where B cells of a given Ag-specificity are available and can be sorted among peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), opening the possibility to convert them into IgA2-switched variants that could then secrete antibodies known for strongly activating neutrophils and for ensuring immune reactions against invading pathogens at mucosal sites²⁵⁷.

III) Coupling CRISPR/Cas9-mediated CSR to IGHA2 and V-region replacement

As mentioned, IgA antibodies are attractive tools for immunotherapy due to their unique abilities to trigger myeloid cell activation and to reach mucosal sites. However, neither the *in vitro* production nor the systemic administration of IgA-based biotherapy is currently mastered. IgA mAb could by contrast be delivered to patients by the endogenous route of B-cell editing. Based on the above observation that the IGHA2 gene was accessible to both CRISPR/Cas9-induced CSR and CRISPR/Cas9-induced insertion, we decided to combine both strategies by inducing simultaneous CSR breaks upstream of S μ and downstream of S α 2, and in the same time inserting at the junction of the broken S μ /S α regions a gene cassette which encoded a complete single-chain antigen-binding fragment (scFvC κ L cassette). This cassette ended with an appropriate linker sequence and donor splicing site for ensuring an in-frame junction with the CH1 exon of the acceptor endogenous IGHA2 gene, as previously described²⁵⁸. A pVH promoter preceded the scFvC κ L cassette, at a position supporting efficient transcription.

This strategy was thus designed to disrupt the endogenous IgH production and replace it with the recombinant molecule. Inclusion of a co-translated L chain within this scFvC κ L also ensured that pairing of the recombinant H chain only occurs with that covalently linked L chain, precluding association of the endogenous L chain with the edited H chain. This strategy is thus altogether replacing the expression of the endogenous Ig.

This experiment used the same IGHA2 site as for the above-described CRISPR/Cas9-mediated CSR. Two upstream cleavage sites in the JH-CH μ were tested, either located at the previously validated position of *sgRNA 368*²⁵⁸, in-between JH6 and the E μ enhancer, or in-between E μ and S μ (*sgRNA IgH5*).

To evaluate whether insertions could be efficiently obtained between such distant IGHM/IGHA2 breaks, we first inserted a pVH-tdTomato reporter gene cassette, flanked with *ad hoc* arms for promoting HDR on both sides of the CRISPR/Cas9 junction (Figure 5A). This experiment with a reporter gene proved efficient in both the BL41 cell line and in primary human B cells, with no significant difference upon usage of either *sgRNA 368* or *sgRNA IgH5*, and yielded around 12% of tdTomato⁺ BL41 cells *vs* around 1.5% of tdTomato⁺ primary B cells (Figure 5B)

The next step of the experiment was to insert the scFvC κ L cassettes at the μ α CRISPR/Cas9 junction in primary B cells using IgHA2 and 368 sgRNAs (Figure 6A). This yielded expression of a recombinant IgA BCR in about 1% of primary B cells, either with an anti-CD20 scFvC κ L, based on rituximab sequences, or with an anti-HER2 scFvC κ L, based on pertuzumab sequences (Figure 6B). Correct splicing of the knocked-in scFvC κ L fragment with the acceptor C α 2 CH1 region was also confirmed by RACE-PCR amplification of the corresponding transcript (à ajouter à la Fig7). These experiments thus altogether validated the possibility to replace the Ag-binding region of Ig expressed in B cells while simultaneously switching the class of the expressed H chain.

Discussion

After T cells and NK cells, B cells are now worth being considered for potential adoptive cell therapy approaches. As professional Ig producers, B cells also appear ideally suited for eventually dispensing therapeutic Abs to patients after on-purpose editing of their Ig genes. Although long considered as fragile cells poorly accessible to *in vitro* modifications, several reports with both mouse and human B cells have now demonstrated the feasibility of lentiviral modification or CRISPR/Cas9 editing in primary B cells with the goal of modifying Ig synthesis^{243,245,246,258,262}. In the present study, we focused on the IGHA2 gene as an ideal location for genomic editing in the B-cell lineage, with at least 3 distinct strategies with high potential therapeutic interest.

A first and simple strategy builds on the qualification of plasma cells as efficient “*antibody factories*”, eventually able to survive for years as LLPCs²⁶³, which could then be used for secretion of recombinant molecules in addition to their endogenous products. This goal thus needs an efficient platform for gene expression, which lentiviral vectors can provide²⁴³ but then with potential risks of random and deleterious genomic insertions. The availability of precise gene editing tools now makes it much safer and reasonable to edit a qualified genomic position. The GAPDH and PRDM1 loci were notably shown as able to support transcription of an Ig gene cassette in plasma cells^{246,264}. However, the most highly transcribed loci in plasma cells are by far Ig loci, and they could obviously stand as the best possible place for expressing a therapeutic gene. We thus first explored whether an efficient platform for gene expression in human B cells could be provided by the IGHA2 gene, as the most downstream gene of the IgH locus *i.e.*, the closest to the IgH 3’RR super-enhancer. This transcriptional enhancer is indeed especially active for promoting Ig transcription in activated B cells and plasma cells⁸¹. By inserting either a reporter cassette at this position or a construct encoding a therapeutic minibody, we obtained efficient expression and validated the IGHA2 gene as a platform of interest in the B-cell lineage. This position of the locus also carries the advantage that only a small fraction of human B cells expresses IgA2. We can thus expect that in most cases, even upon insertion in the functionally expressed IgH allele, endogenous Ig production will not be disrupted and normal B cell function will not be compromised by the additional expression of an inserted transgene, whether at the lymphocyte or the plasma cell stage.

A second strategy with attractive potential applications consists into the forced class switching to the IgA class. Ig properties indeed strongly vary between the various classes, notably according to their binding of various Fc receptors and to their eventual ability to activate the complement through different pathways. IgA Abs are abundantly produced in healthy individuals and present in all biological fluids. They activate the complement through the alternate and the lectin pathways, they are captured by multiple membrane receptors of immune cells, including DC-SIGN, transferrin receptor, Fc α / μ and Fc α R1. Polymeric IgA is conveyed to mucosal sites after binding the polymeric Ig receptor (pIgR) at the apical site of epithelial cells, and it is reverse transported by M-cells after binding dectin-1. Because of their unique abilities to activate myeloid cells, trigger the complement cascades and act at mucosal sites, IgA Abs play essential roles in the elimination of bacterial or viral pathogens from mucosal epithelia. Induction of specific IgA after vaccination was also clearly correlated with protection against *Rotavirus* infection²⁶⁵. While patients with selective IgA deficiency accordingly show some susceptibility to mucosal infections, they are also exposed to celiac disease and auto-immunity pointing to the dual role of IgA in protective immunity and tolerance²⁶⁶. Regarding the usage of IgA mAbs, multiple reports have documented unique properties of IgA, both against pathogens or against tumor antigens^{261,267,268}. Ag-specific IgA

notably proved able to prevent HIV infection in monkeys²⁵⁵. Despite these highly attractive properties, many obstacles have currently precluded systemic administration of IgA mAbs, not only due to their naturally short *in vivo* half-life (6 days), but also mostly because of their biochemical instability when produced *in vitro* or the challenge to industrially master their complex N-glycosylation and O-glycosylation patterns.

In agreement with a previous description of CRISPR/Cas9-induced CSR²⁵⁶, joining two breaks at distant positions of the IgH locus, we observed in this study that the IGHA2 gene was readily available for CRISPR/Cas9-induced α CSR in both human B cell lines and primary cells. As for classical CSR, this genetic reshaping is respecting Ag specificity and ability of Ig to neutralize its target, as shown in this study with the specific case of an anti-SARS-CoV-2 bnAb secreting B-cell line, switched *in vitro* from IgG to IgA2 secretion. Noticeably in patients from the recent COVID-19 pandemic, early IgA production was correlated with SARS-CoV-2 neutralization²⁶⁹.

Availability of on-purpose IgA class-switching procedures can now open up alternate strategies for IgA-based therapy, bypassing the need for *in vitro* production and purification of IgA but rather using *ex vivo* α CSR of B cells of interest. This could be pertinent for patients with clinically manifest IgA deficiency, associated with mucosal infections, as well as for promoting mucosal immunity after systemic vaccination, provided circulating B cells including Ag-specific cells can be enriched and efficiently submitted to *ex vivo* α CSR.

Although the issue of which human IgA class can ensure the best protection remains controversial and have occasionally given advantage to IgA1 regarding prevention of HIV infection²⁵⁵, IgA2 was recently shown as the most pro-inflammatory and can therefore stand as more relevant for therapeutic applications²⁵⁷.

The most attractive B-cell editing strategies recently focused on the edition of the IgH locus, since this allows the disruption of endogenous H chain production while replacing it with a recombinant Ig sequence of interest. Various strategies are then possible in order either to ensure a simultaneous edition of the L chain gene or, more efficiently, to obtain through a single IgH gene edition the expression of both Ig chains. The latter option has been proposed either by encoding both chains as a long precursor further cleaved at a P2A site to generate H and L chains²⁴⁵, or by stably associating both Ig chains as an scAb^{247,258}.

In the present study, we built on our previous design of an original scFvC κ L cassette beginning with the combined VDJ and VJ regions of the desired Ab. This approach is of particular interest in B cells by placing both V regions within the 1 kb-domain exposed to somatic hypermutation (SHM), downstream of the pVH promoter, when B cells get activated and express AID. In this situation, edited B cells could thus theoretically undergo BCR affinity maturation while all of the exons encoding the transgenic Ig constant domains lie far from the VH promoter and should not be at risk of deleterious mutations. We recently validated that this cassette was functionally associated with Ig μ chains when inserted in the JH-C μ intron, and that its association with IgG constant domains, as a single-chain “scFull-Ig”, was functional for Ag binding and carried full IgG effector properties. In addition to SHM, the scFvC κ L knock-in can also undergo class switching upon cell activation as for a classically rearranged IgH locus. In the present study we show that the same design of an scFull single-chain Ab, can be totally imposed to edited B cells, simultaneously imposing through a single hit both the expression of a paratope with defined Ag specificity, and an on-purpose class-switching, here of the IgA2 class.

Altogether, for our experimentations, we have chosen non-viral approaches to avoid potential side effects related to viral vectors. While we validated the significant expression of our gene cassettes after knock-in in the IGHA2 region, further improvements of recombination

efficiency are expected. Despite the limited number of IGHA2 specific sites (without homology to IGHA1, while these genes were recently duplicated during evolution and are highly homologous), it will notably be essential to optimize the efficiency of CRISPR/Cas9 targeting and of integration of the template in order to obtain the highest possible expression with the lowest possible number of target cells.

In conclusion, we have developed three approaches to genetically engineer B cells at the IGHA2 gene. This location appears as ideally suited for harboring gene cassettes that encode therapeutic molecules, as well as for inducing IgA class switching on purpose into polyclonal primary B cells of interest, or finally for entrusting B cells with the *in vivo* production of monoclonal IgA biotherapies which are potentially of high interest but cannot currently be mastered by classical methods.

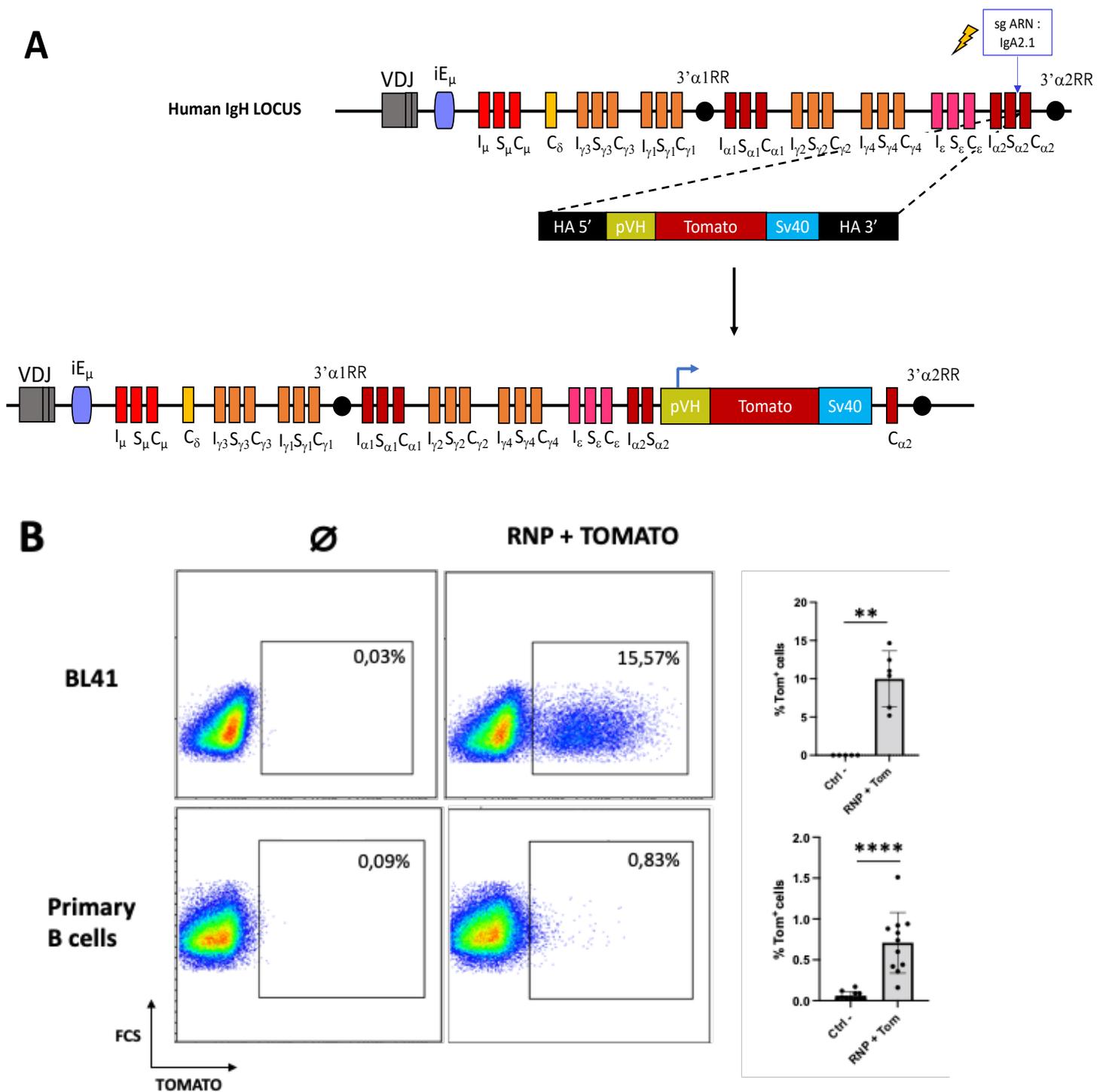


Figure 1: Validation of a2 site as an appropriate site for B-cell editing by integration of tdTomato reporter gene

A. Schematic representation of the insertion strategy with the tdTomato reporter gene at site a2. The DNA template contains 5' and 3' homology arms (HA) corresponding respectively to the DNA sequence on either side of the cleavage site by single guide RNA (sgRNA) IgA2.1 + Cas9 (Ribonucleoprotein (RNP)). tdTomato gene is preceded by the promoter VH and followed by the SV40 polyA sequence. **B.** Detection by flow cytometry of tdTomato expression 6-7 days after RNP complex and DNA template electroporation in a B cell line (BL41) (N=6) and human primary B cells (N=11).

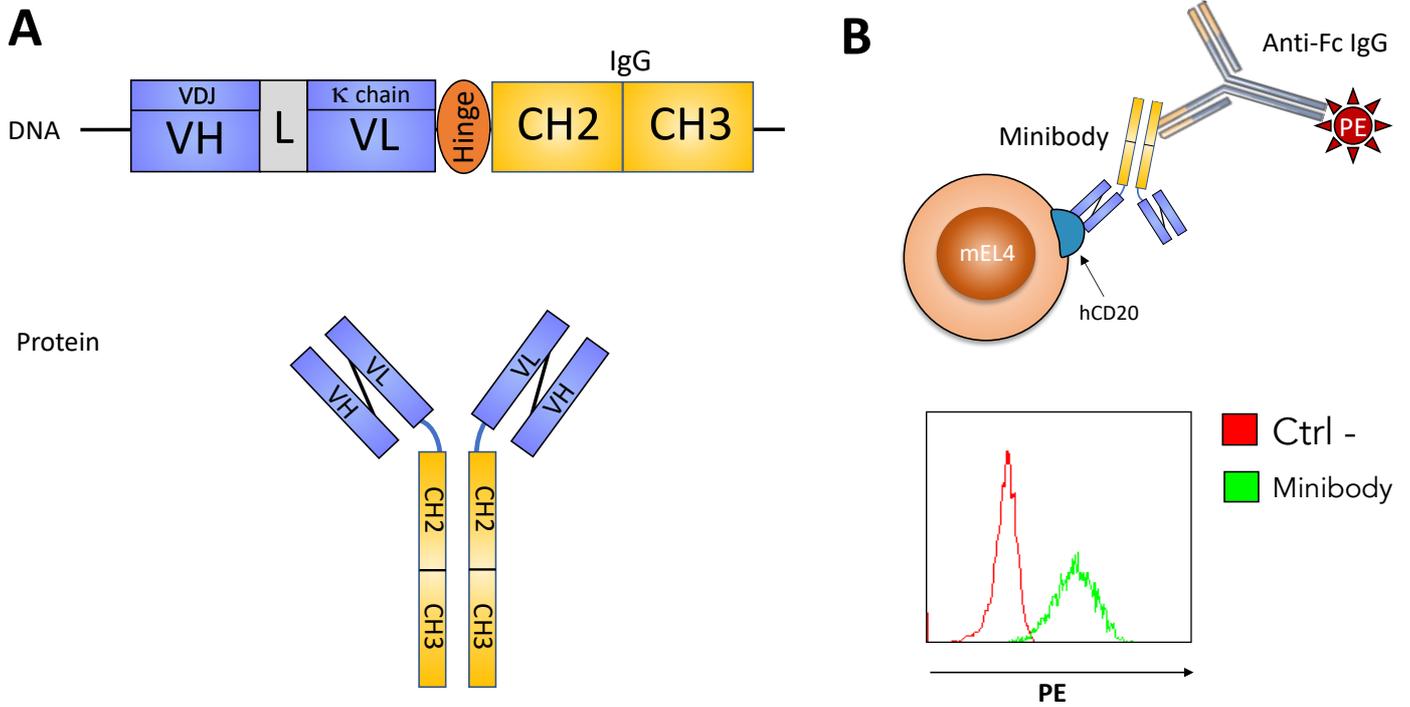


Figure 2: anti-human CD20 « Minibody »

A. Schematic DNA sequence and protein of Minibody. VDJ sequence is connected *via* a linker to kappa light chain, itself followed by sequence coding a hinge able to rely to Fc IgG (CH2-CH3) sequence. **B.** Indirect cytometric detection of anti-hCD20 Minibody binding to EL4-hCD20⁺ cells in 293T supernatant after transient insertion.

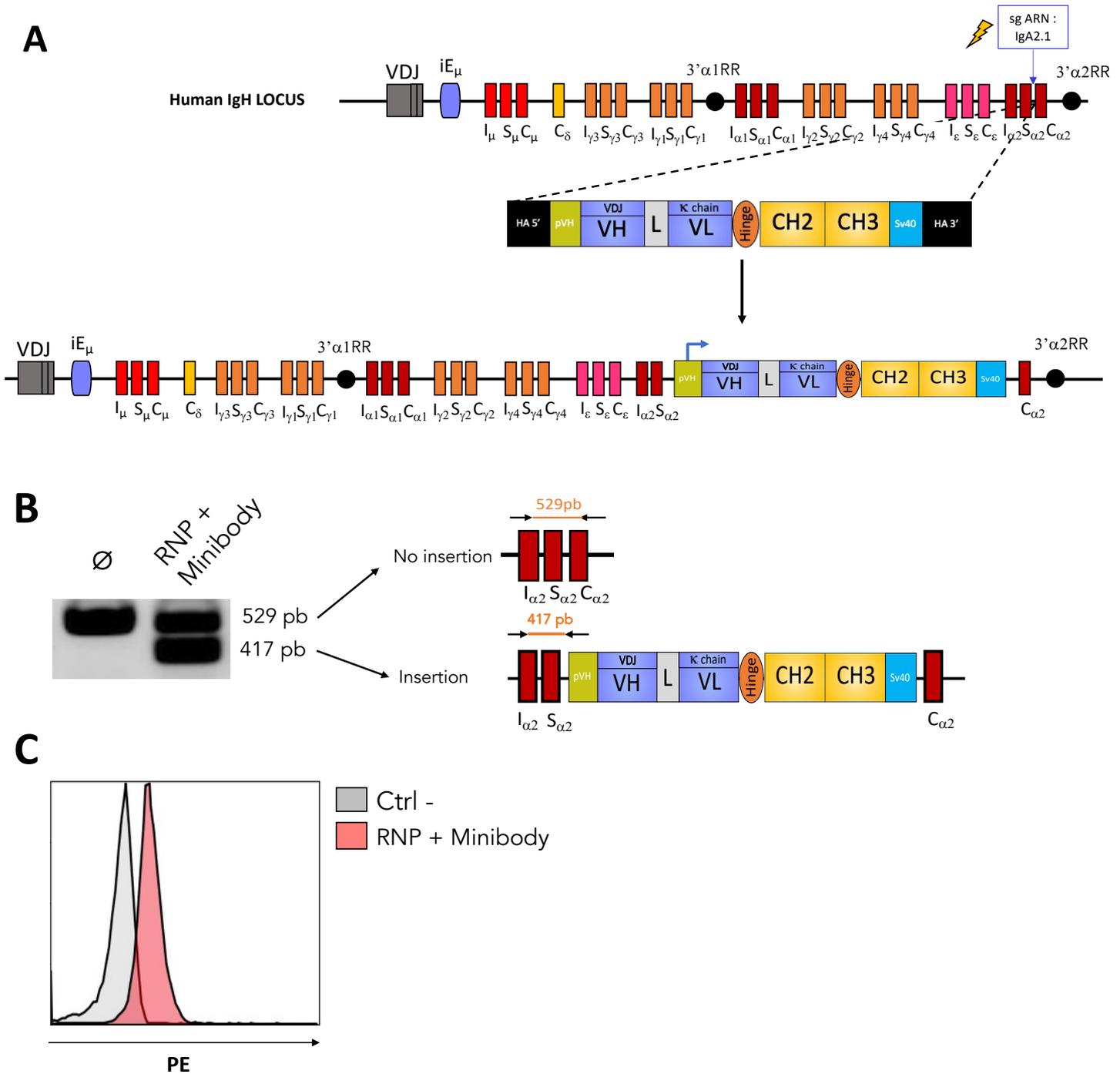


Figure 3: Integration of « Minibody » template as a passenger gene at a2 site

A. Schematic representation of the insertion strategy with the « Minibody » template at a2 site. The DNA template contains the 5' and 3' homology arms (HA) corresponding respectively to DNA present on either side of the cleavage site by single guide RNA (sgRNA) IgA2.1 + Cas9 (Ribonucleoprotein (RNP)). The « Minibody » gene is preceded by the promoter VH and followed by the SV40 polyA sequence. **B.** Validation of insertion at genomic level by PCR using 3 primers. Specific « minibody » template insertion at a2 site is detected by a band at 417 bp. **C.** Indirect cytometric detection of anti-hCD20⁺ Minibody binding to EL4-hCD20⁺ cells in plasma cell line (LP1) supernatant 7 days after electroporation of RNP complex + Minibody template.

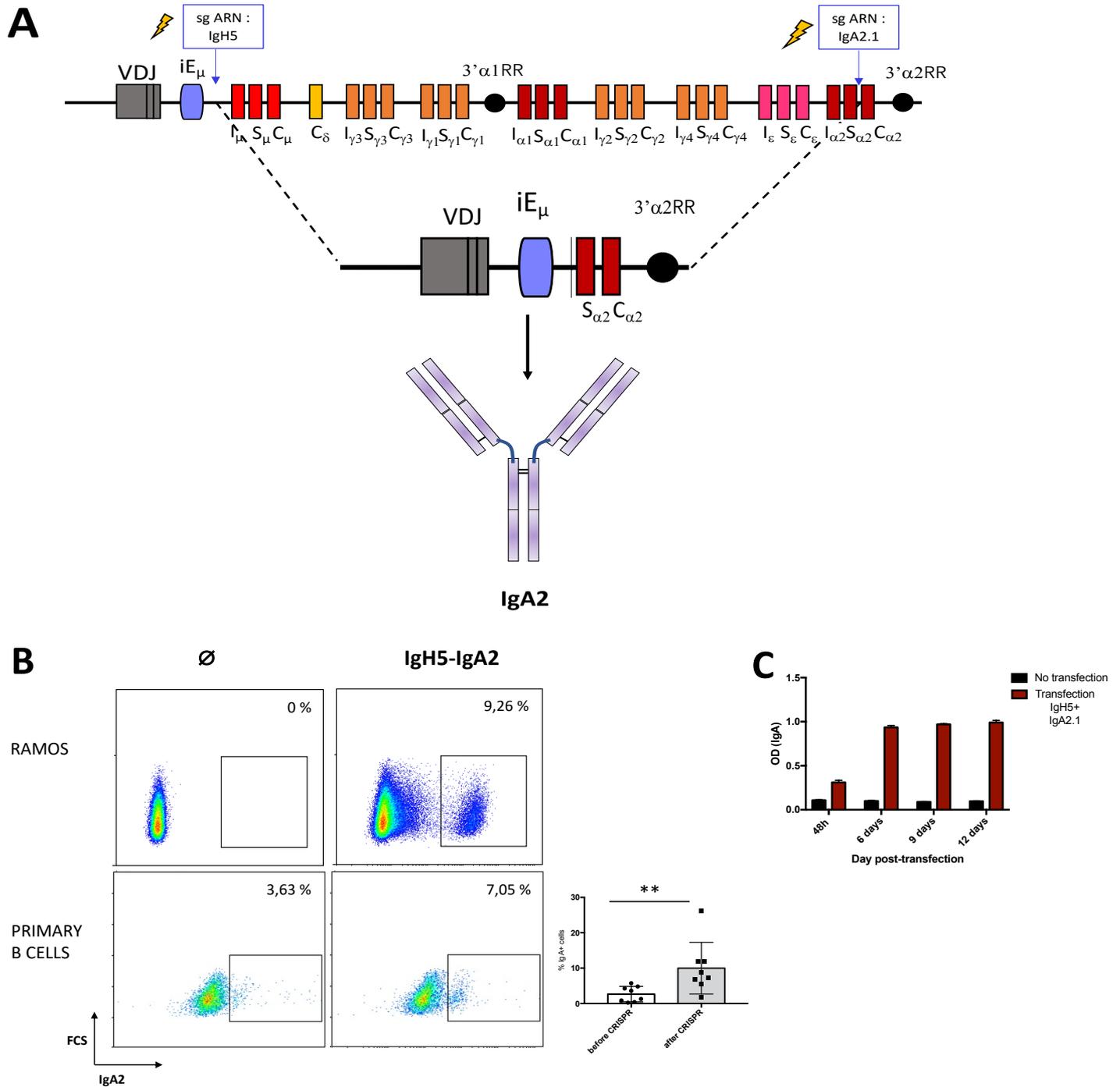


Figure 4: CRISPR/Cas9-induced class switching to IgA2 in a B cell line, human primary B cells and hybridoma anti-spike

A. Schematic representation of IgA2 forced class switching by combination of two DNA double-strand breaks in the IgH locus with RNP complexes composed of IgH5 and IgA2.1 sgRNA. **B.** Strategy validation in a B cell line (RAMOS) and primary B cells (N=8) by detection of IgA2 membrane expression by cytometry. **C.** IgA by ELISA in supernatant collected over 12 days from an anti-SARS-CoV-2 hybridoma forced into IgA switching by electroporation of RNP.

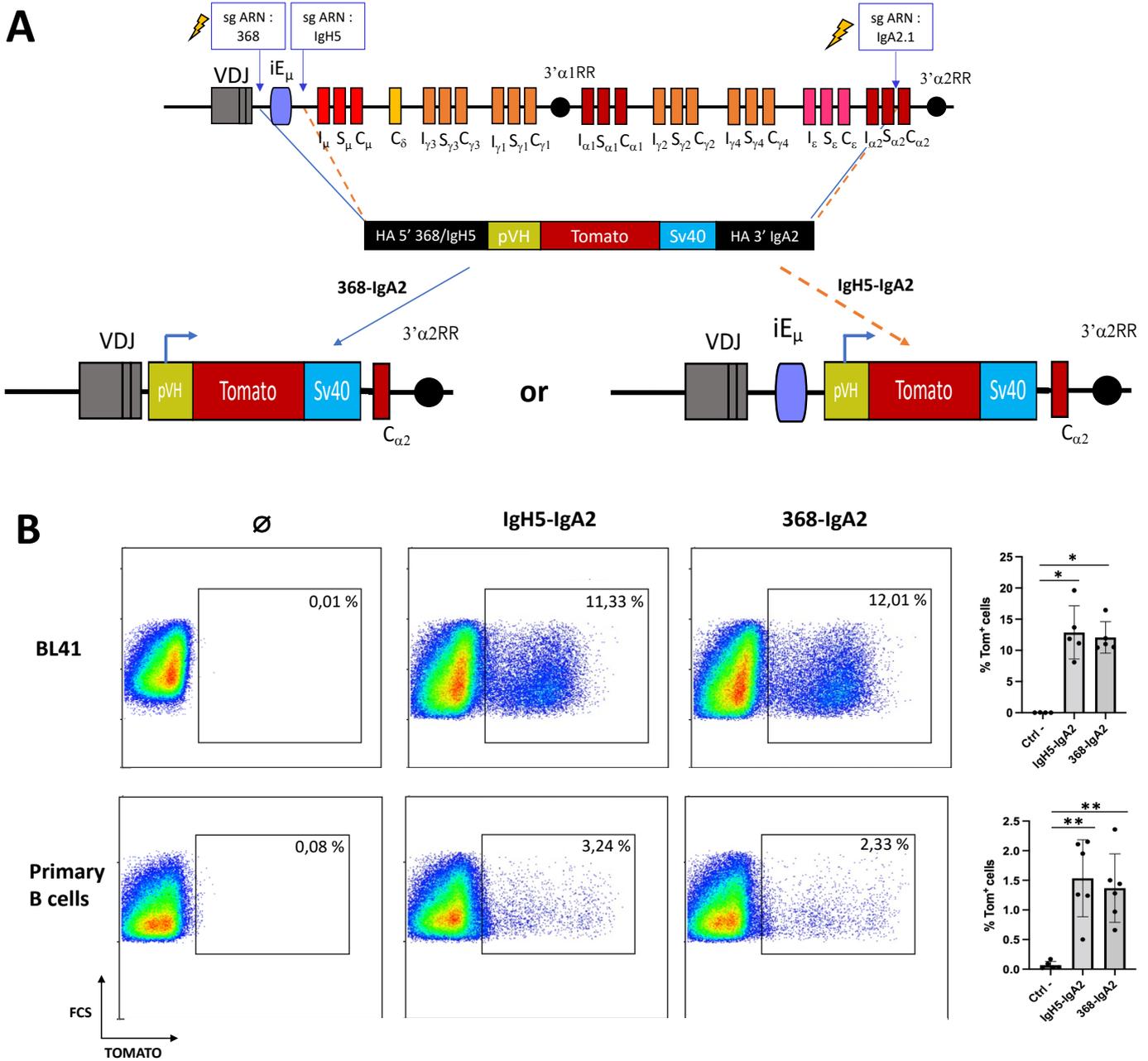


Figure 5: Validation of the combination of IgA2 induced class switching and insertion of DNA template as an appropriate B-cell editing strategy, by integration of a tdTomato reporter gene

A. Schematic representation of the insertion strategy with the tdTomato reporter gene after IgA2 forced class switch. The DNA template contains 5' and 3' homology arms corresponding respectively to DNA present on either side of cleavage site after IgA2 forced switch, meaning 5' HA corresponding to either IgH5 site cleavage or 368 site cleavage and 3' HA corresponding to IgA2.1 site. tdTomato gene is preceded of the promoter VH and followed by a SV40 polyA sequence. **B.** Detection of tdTomato expression 6-7 days after RNP complexes and DNA template electroporation by cytometry in a B cell line (BL41) (N=5) and human primary B cells (N=6).

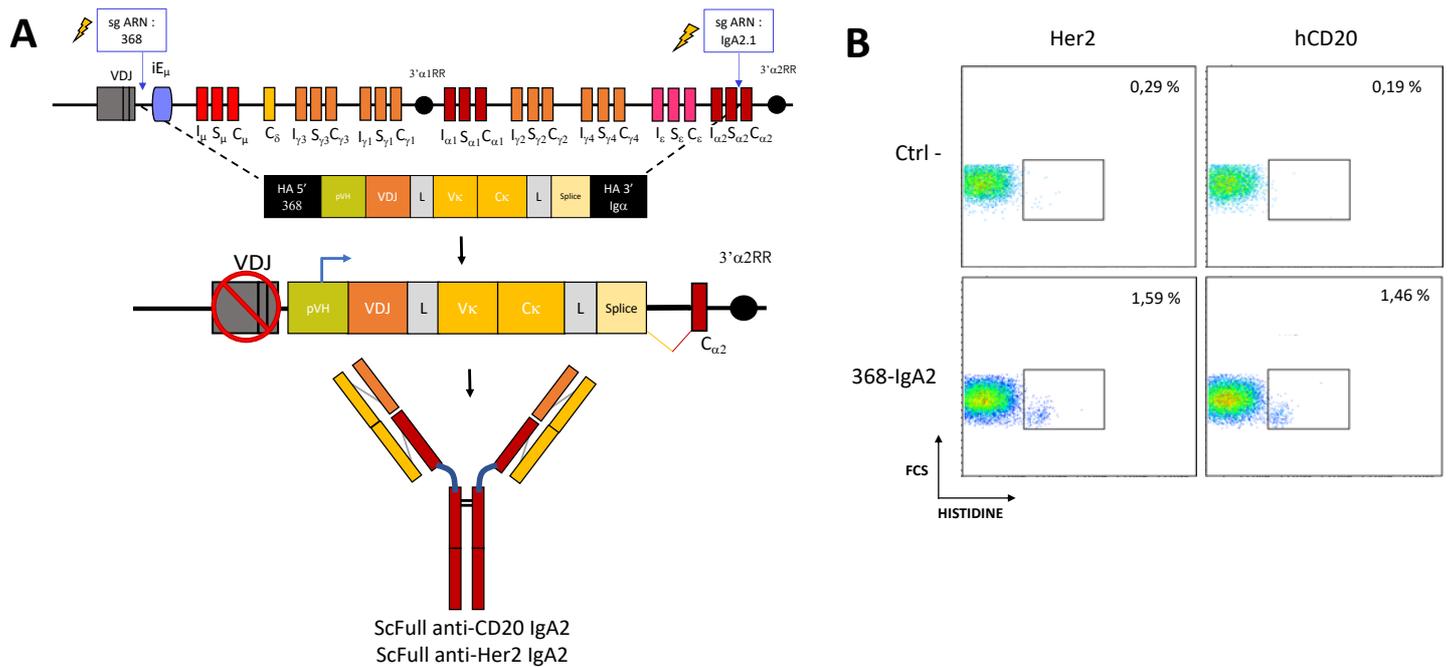


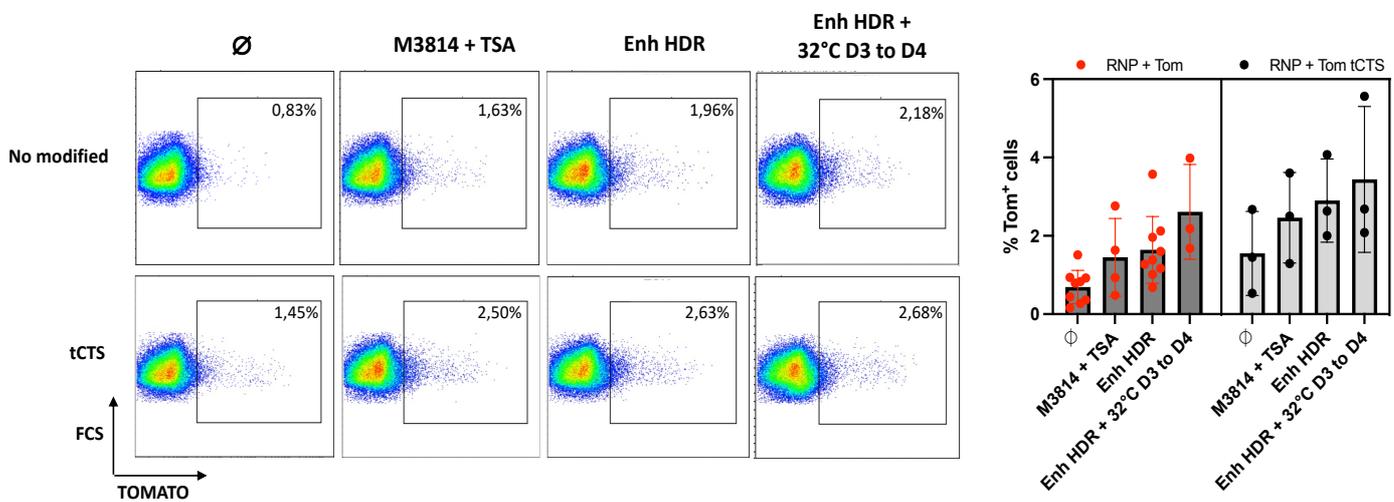
Figure 6: Knock-in of anti-hCD20 or anti-HER2 scFull-Ig combined with IgA2 forced switch provide a specific IgA antibody

A. Schematic representation of the scFull-Ig insertion strategy after IgA2 forced switch. The DNA template contains 5' and 3' homology arms (HA) corresponding respectively to DNA sequence on either side of the cleavage site after IgA2 forced switch, meaning 5' HA corresponding 368 site cut and 3' HA corresponding to IgA2.1 site. Single chain Ig (scFull-Ig) is composed of scFvCκL with a splice donor site at the 3' end to allow the splicing on the a2 constant gene. It is preceded by the promoter VH to allow the expression of the cassette. **B.** Anti-CD20 or anti-HER2 scFull-Ig expressing primary B cells are detected by flow cytometry using His-tagged human CD20 or HER2 recognized by an anti-histidine antibody coupled to a fluorochrome (N=1).

Supplementary data:

sgRNA	Indels in BL41	Indels in Primary B cells
IgA2.1	20 %	12 %
368	50 %	35 %

Sup Figure 1: TIDE analysis



Sup Figure 2: Non-viral insertion can be improved by tCTS strategy used with a NHEJ inhibitor

	RNA sequence	Sens	Primer TIDE	
			Forward	Reverse
SgRNA_IgA2.1	ccaGAGCUCCCCUGGGUAAC	5'-3'	GAGCTGAGGTGGCTGCTAAT	AGTGGCTGAGTCCCCTGAG
SgRNA_368	GGAAAGAGAACUGUCGGAGU	5'-3'	TGGGTTTTTGTGGGGTGAGG	GCTTTGGCCTCAATCCAGAC
SgRNA_IgH5				

Table 1: Sequences of sgRNAs and primer sequences for TIDE analysis

Sequence of sg RNA IgH5 is confidential

	siRNA	Regular Primers PCR		ICIS Primers PCR		Reverse	PCR amplicons		3 Primers PCR - integration genomic band size
		Forward	Reverse	Forward	Reverse				
Tomato (IgA2)	IgA2.1 : cgaGAGCUCCCUUGGUUAC	TGTAAGTGGCTGGCCCTGG	GTCAAGCTTCTGTGCGCTTC	TGGCGGACTAGTGGCGGT CagctccctggatcaAGGTGT ACTGAGCTGCCCTGG	CACCACTCCAGCAGCGGT agctccctggatcaAGGTGT GCTTCTGTCGGTTTC	GAGCTGAGGTGGCTCTAA T Rev: AGTGGCTGAGTCCCTGG Rev 2 : GGCCTATTGGCATGTTCC	WT : 529 bp insertion: 285 bp		
Minibody anti-hCD20 (IgA2)	IgA2.1 : cgaGAGCUCCCUUGGUUAC	TGCGTTGACCTGGCGTG	CATCCAGCGACACAGTTTC	TGGGGGACTAGTGGCGGT CagctccctggatcaAGGTGT GTTGACCTGGCGTG	CACCACTCCAGCAGCGGT agctccctggatcaAGGTGT CAGGCACACAGTTTC	GAGCTGAGGTGGCTCTAA T Rev: AGTGGCTGAGTCCCTGG Rev 2 : GGCCTATTGGCATGTTCC	WT : 529 bp insertion: 417 bp		
Tomato (IgA2-368)	IgA2.1 : cgaGAGCUCCCUUGGUUAC GGAAAGAGACUGUCGGAGU	GCCACTAGGGCTTGT	GACGACCAGTCCCATCT			TGGGTTTTGGTGGGTAG G Rev: GCTTGGCCTCAATTCAGA C Rev 2 : GGCCTATTGGCATGTTCC	WT : 897 bp insertion: 619 bp		
Tomato (IgA2-IgH5)	IgA2.1 : cgaGAGCUCCCUUGGUUAC IgH5 : confidential	ACAGGACTGTGAGACCC T	CTTTCGCTCAGGTCACACT			TCTGATAGAGTGGCTTCAT TTT Rev: ATCCCTCCCTCTGAGTCT Rev 2 : GGCCTATTGGCATGTTCC	WT : 905 bp insertion: 707 bp		
ScFab anti-HER2 (IgA2-368)	IgA2.1 : cgaGAGCUCCCUUGGUUAC 368: GGAAAGAGACUGUCGGAGU	GGGTTCTTGAGCATGCA G	CATCCAGCGACACAGTTTC			TGGGTTTTGGTGGGTAG G Rev: GCTTGGCCTCAATTCAGA C Rev 2 : GGCCTATTGGCATGTTCC	WT : 897 bp insertion: 773 bp		
ScFab anti-CD20 (IgA2-368)	IgA2.1 : cgaGAGCUCCCUUGGUUAC 368: GGAAAGAGACUGUCGGAGU	GGGTTCTTGAGCATGCA G	CATCCAGCGACACAGTTTC			TGGGTTTTGGTGGGTAG G Rev: GCTTGGCCTCAATTCAGA C Rev 2 : GGCCTATTGGCATGTTCC	WT : 897 bp insertion: 773 bp		

D. Mise au point d'un modèle murin pour l'étude de fonctionnalité *in vivo* des différents formats d'anticorps produits par des cellules B humaines modifiées génétiquement.

Dans la perspective de tester la fonctionnalité de nos molécules recombinantes thérapeutiques, nous avons, en parallèle, mis au point un modèle murin permissif à l'implantation de cellules B humaines et à la progression tumorale de deux lignées cellulaires exprimant les antigènes cibles de nos différents formats d'anticorps (CD20 humain et HER2).

Dans un premier temps nous avons déterminé les meilleures conditions d'implantation de cellules B humaines au sein de souris immunodéficientes « humanisées », les BALB/c Rag2^{-/-} IL-2R γ c^{-/-} SIRP α .^{NOD} (BRGS). En parallèle et dans la perspective de disposer de modèles qui puissent nous permettre ultérieurement de tester l'efficacité d'une immunothérapie anti-tumorale ciblée contre les antigènes classiques HER2 ou CD20, nous avons mis au point deux modèles de tumeurs *in vivo*, dont la croissance peut être aisément monitorée et qui porte dans un cas CD20 et dans l'autre HER2.

1. Optimisation de xéno greffes de cellules B humaines au sein de souris immunodéficientes

L'implantation des cellules B humaines (et de leur différenciation sous une forme sécrétante) a été déterminée pour l'ensemble des expérimentations par un suivi au cours du temps de la quantification d'anticorps humains mesurables dans le sérum des souris.

Plusieurs paramètres ont été étudiés pour tenter d'optimiser l'implantation de cellules B humaines primaires au sein d'un modèle murin. Nous avons tout d'abord évalué le stade de différenciation B le plus propice à l'implantation ainsi que la quantité de cellules nécessaires (

Figure 21). La différenciation des cellules B humaines a été réalisée *in vitro* à l'aide d'un protocole mis au point au sein de notre laboratoire. Dans nos expériences, deux stades de différenciation correspondant aux stades pré-plasmablaste et plasmablaste ont été testés. Il semble qu'une meilleure implantation s'effectue lorsque les cellules sont au stade plasmablaste, c'est-à-dire lorsqu'elles ont été stimulées durant 7 jours *in vitro* avant leur greffe dans un modèle murin. De plus, nous avons déterminé en comparant deux quantités de cellules qu'une dose plus importante ($5 \cdot 10^6$ cellules) lors de la greffe augmentait leur chance d'implantation.

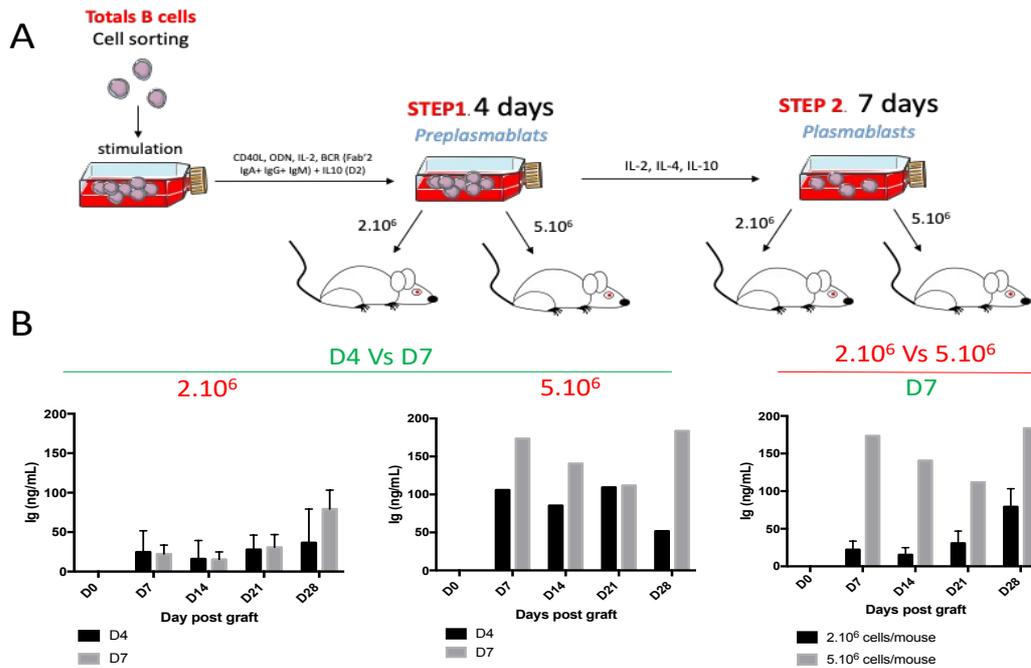


Figure 21 : Évaluation du timing et du nombre de cellules B humaines pour obtenir une meilleure implantation chez un modèle murin immunodéficient

A. Schéma du protocole de différenciation de cellules B humaines *in vitro*. Deux cocktails de cytokines sont utilisés en séquentiel pour permettre dans un premier temps une expansion des cellules puis dans un second temps une différenciation des cellules B vers un stade plasmocytaire. Les xéno greffes de souris par voie intraveineuse ont été réalisées à Jour 4 et Jour 7 post-stimulation avec deux quantités (2.10^6 et 5.10^6 cellules/souris) de cellules testées à chaque fois. **B.** Suivi de la production d'anticorps humain à l'aide d'un ELISA anti-kappa et anti-lambda humain dans le sérum de souris ayant reçu une xéno greffe de cellules B humaines selon les conditions décrites dans la partie A.

Il est souvent décrit dans la littérature qu'un traitement préalable est administré aux souris receveuses pour donner l'opportunité aux cellules greffées de s'implanter en s'affranchissant de toute compétition avec les cellules initialement présentes. Le pré-conditionnement est une méthode visant à l'élimination temporaire des cellules de la souris receveuse.

Le modèle murin (BRGS) utilisé dans nos expérimentations est déficient en cellules T, B et NK et présente également un défaut de phagocytose par les macrophages : il ne nécessite donc pas en théorie de pré-conditionnement. Cependant nous avons observé pour un projet annexe que dans ce modèle la greffe de CSH humaines était améliorée par un pré-conditionnement à l'irradiation. De plus, d'autres équipes de notre laboratoire utilisent pour la greffe de cellules stromales un pré-conditionnement à l'hydroxyurée (traitement chimique). Nous avons donc comparé l'absence de pré-conditionnement avec un pré-conditionnement à l'hydroxyurée ou à l'irradiation de faible intensité (1,5G) en appliquant les paramètres validés précédemment (5.10^6 cellules à J7).

Nous n'avons pas observé de différence majeure entre ces trois conditions, bien qu'un léger avantage soit donné aux xénogreffes réalisées dans des souris préconditionnées par une irradiation (**Figure 22**). En accord avec les autres projets de l'équipe impliquant ce modèle BRGS, nous avons fait le choix de conserver le pré-conditionnement par irradiation de nos souris qui, *a priori* n'entraîne aucun effet secondaire délétère.

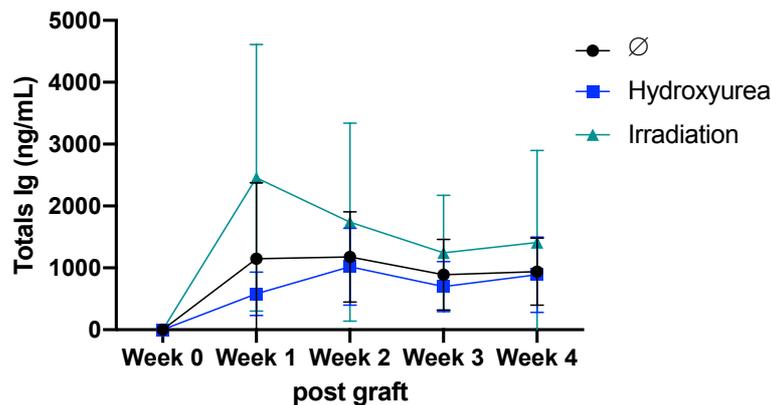


Figure 22 : Comparaison de pré-conditionnement des souris avec xénogreffes de cellules B humaines.

Suivi de la production d'anticorps humain à l'aide d'un ELISA anti-kappa et anti-lambda humain dans le sérum de souris ayant reçu une xénogreffe de cellules B humaines en présence ou non d'un pré-conditionnement (rien, 2 injections à 8h d'intervalle d'hydroxyurée, irradiation à 1,5G).

Malgré ces optimisations du conditionnement, l'implantation des cellules B ne semblait pas optimale, avec des taux sériques avoisinant les 1-2 μ g/mL dans le meilleur des cas. Après avoir parcouru la littérature et discuté avec d'autres chercheurs, nous avons décidé de tester la xénogreffe de cellules B humaines en conjonction avec celle de cellules T autologues^{270,271}. Les cellules T étant connues pour être en étroite collaboration avec les cellules B, nous avons l'espoir qu'elles seraient en mesure de fournir les signaux suffisants pour permettre la survie à long terme et un soutien à la différenciation plasmocytaire des cellules B humaines *in vivo*. Toujours en suivant les conditions de xénogreffe de cellules B humaines établies précédemment nous avons co-injecté la même quantité de cellules T humaines stimulées également durant 7 jours *in vitro* selon un protocole adapté (stimulation par anti-CD3). Cette co-injection a donné d'excellents résultats avec un taux sérique de l'ordre 100 μ g/mL d'immunoglobulines humaines soit 100 fois plus que dans les conditions précédentes (**Figure 23**). De plus, ce taux semble se maintenir plus d'un mois après la xénogreffe nous indiquant une implantation des cellules B réussie avec, semble-t-il, une favorisation de la différenciation de ces cellules en plasmocytes ou

de la survie de ces plasmocytes. Cette étude du meilleur modèle « souris » dans lequel pouvoir tester *in vivo* et valider la fonctionnalité de nos cellules B humaines éditées reste en cours, notamment pour apprécier les conditions dans lesquelles les cellules B pourraient bénéficier du meilleur environnement cytokinique possible (IL6 en particulier).

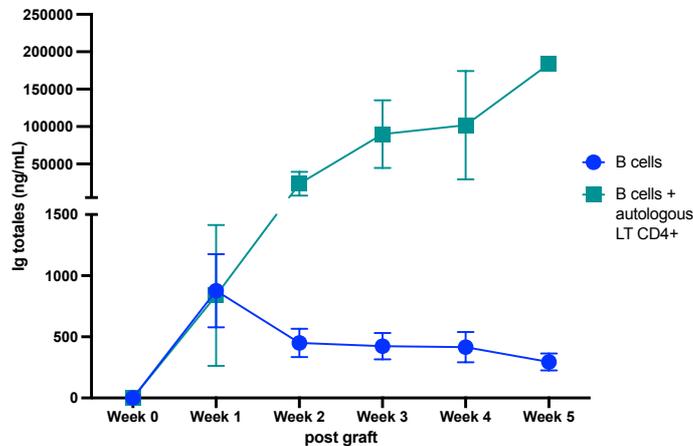


Figure 23 : La co-injection de cellules B humaines et de cellules T humaines autologues favorise l'implantation des cellules B humaines *in vivo*

Suivi de la production d'anticorps humain à l'aide d'un ELISA anti-kappa et anti-lambda humain dans le sérum de souris ayant reçu une xéno greffe de cellules B humaines en présence ou non de cellules T humaines autologues.

2. Mise au point de modèle tumoraux *in vivo*

Le but de notre projet est de pouvoir obtenir une immunothérapie cellulaire adoptive médiée par des cellules B humaines génétiquement modifiées pour exprimer des molécules recombinantes thérapeutiques. Ainsi, pour déterminer si nos « cellules médicaments » sont en capacité de fournir une protection contre des cellules tumorales, il nous est nécessaire de les confronter *in vivo* à une greffe de cellules tumorales portant la cible (CD20 humain ou HER2) de nos différents formats d'anticorps.

La lignée cellulaire murine EL4 ayant été modifiée dans le but d'exprimer le CD20 humain nous a semblé un modèle facile et rapide à mettre au point. En effet, déjà mis au point dans un autre modèle immunodéficient au sein de notre laboratoire, nous n'avions qu'à nous assurer que les paramètres définis soient identiques chez les souris BRGS²⁷². De plus, cette lignée présentait également l'avantage d'exprimer la luciférase qui, lorsqu'elle dégrade la luciférine, produit un composé pouvant être observé par bio-imagerie. Autrement dit, le développement de cette lignée peut aisément être suivi au cours du temps *in vivo* sans la nécessité d'euthanasier les souris. Les souris BRGS étant immunodéficientes, nous avons testé sur de petites cohortes (2 x 5 souris) la greffe de ces cellules à deux quantités différentes, l'une étant le nombre estimé

dans le modèle immunocompétent (25000 cellules) et l'autre plus faible (10000 cellules) dans l'hypothèse où la progression tumorale serait trop rapide dans ce modèle. Nous avons observé qu'une greffe de 10000 cellules ne permettait pas une prise de greffe à coup sûr chez l'ensemble des animaux. *A contrario*, la greffe de 25000 cellules induisait dans 100% des cas un développement tumoral rapide, conduisant à la mort des souris (**Figure 24**). Nous avons fixé notre protocole expérimental sur ce type de greffe tumorale de 25000 cellules EL4. Même si les cohortes étudiées sont de taille limitée, ce protocole de greffe tumorale se trouve en totale similitude avec celui validé par ailleurs dans l'unité pour la greffe d'EL4 à des souris RAG-déficientes. Ces tests préliminaires nous encouragent donc à conserver dans nos expérimentations futures ces mêmes conditions d'induction tumorale « à coup sûr ». Nous pourrions ainsi imputer à notre immunothérapie les absences ou retards de prise tumorale.

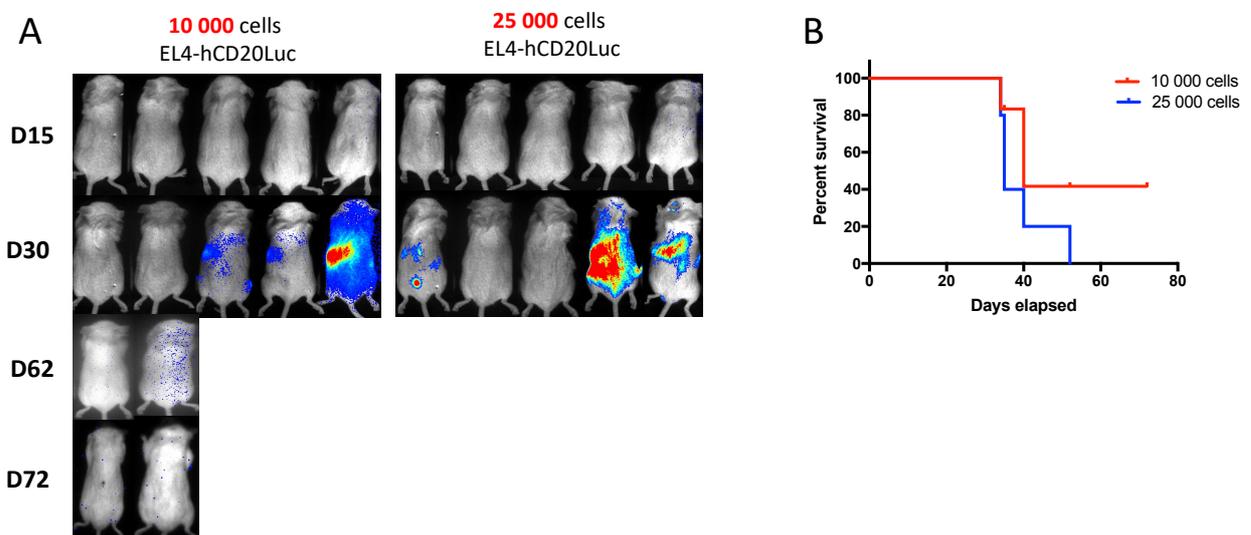


Figure 24 : Mise au point du développement tumoral des cellules EL4-hCD20 dans le modèle murin BRGS

A. Suivi par bio-imagerie de la croissance tumorale au cours du temps de souris ayant reçu par intraveineuse 10000 ou 25000 cellules EL4-hCD20. B. Courbe de survie de ces animaux en fonction du temps.

La mise au point d'un modèle HER2 s'est avérée plus compliquée car nous avons choisi dans un premier temps la lignée tumorale MCF-7 qui est une lignée de cancer du sein. Nous avons testé plusieurs doses allant jusqu'à $10 \cdot 10^6$ cellules par souris sans jamais observer le moindre développement tumoral *in vivo*. De plus, cette lignée étant adhérente et à croissance très lente, la logistique nécessaire pour l'amplifier suffisamment *in vitro* était très contraignante. Nous avons donc dans un second temps choisi de construire nous-mêmes un modèle plus adapté à un monitoring efficace de sa prise et de sa vitesse de croissance tumorale. Nous avons opté pour la lignée de mélanome murin B16F10 largement décrite dans la littérature. Les cellules B16F10

produisent un pigment brun foncé appelé mélanine visible à l'œil nu lorsqu'un nombre de cellules suffisant a entamé sa prolifération. Ainsi, après injection en sous-cutané, le suivi de la croissance tumorale *in vivo* (et de métastases éventuelles) est d'autant plus facile que l'on visualise, sous l'épiderme des animaux, l'apparition de taches noires.

Nous avons modifié ces cellules à l'aide d'un plasmide capable d'induire l'expression à la surface de la protéine HER2. Le gène codant pour HER2 étant associé au gène de résistance à la puromycine, il nous a été possible de sélectionner les cellules ayant intégré de façon stable le gène HER2 à leur génome (**Figure 25**).

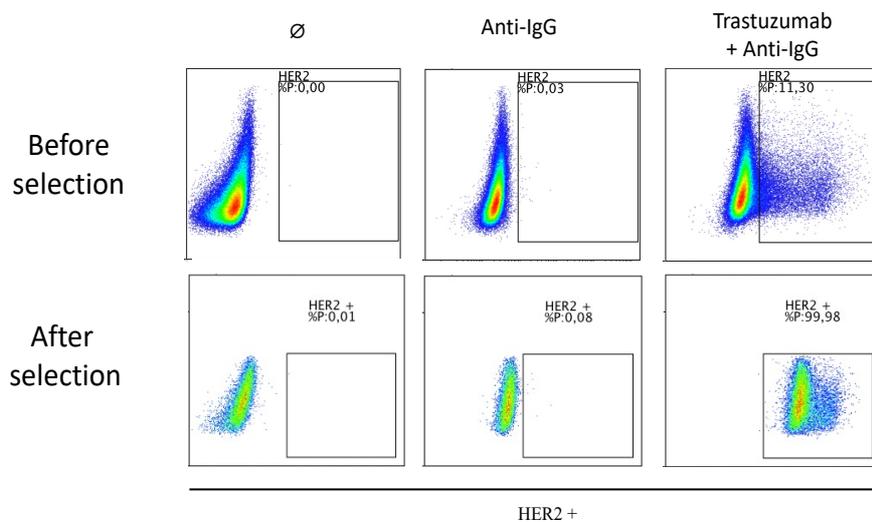


Figure 25 : Modification de la lignée B16F10 dans le but d'induire l'expression de la protéine HER2

Détection par cytométrie de l'expression de la protéine HER2 par les cellules B16F10, sélectionnées ou non avec 2µg/mL de puromycine, à l'aide d'un marquage indirect par le mAb Trastuzumab et d'un Ac anti-IgG humain couplé à un fluorochrome.

Nous avons donc établi directement nos conditions de greffe selon les données de la littérature²⁷³. Afin de vérifier que notre sélection d'un variant HER2+ puro^R n'avait pas d'impact sur les conditions classiques pour B16F10 quant à la prise de greffe *in vivo*, nous avons comparé la progression tumorale de cellules B16F10 non modifiées avec des cellules B16F10 HER2⁺. Nous avons observé, d'une part une prise de greffe relativement similaire entre les deux lignées et, d'autre part une certaine homogénéité dans leur progression tumorale au fil du suivi. De plus, les souris ont toutes sans exception développé une tumeur, démontrant ainsi le caractère robuste de ce modèle tumoral (**Figure 26**).

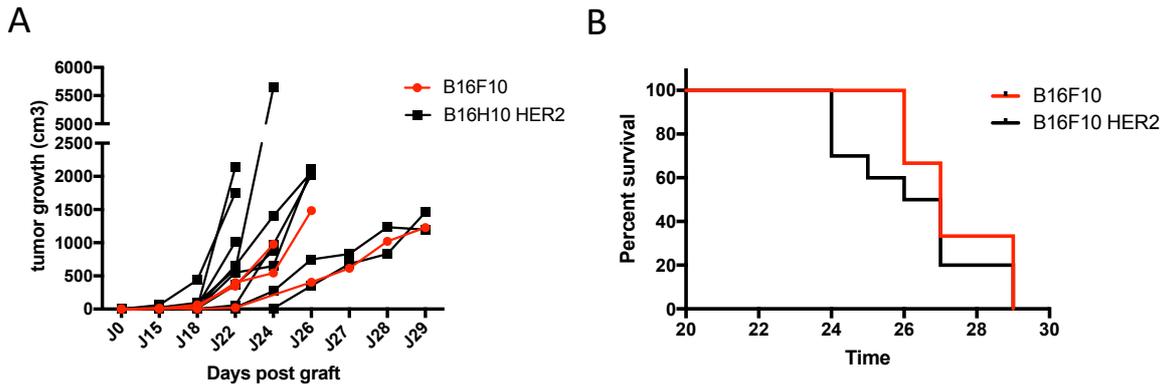


Figure 26 : Mise au point du développement tumoral des cellules B16F10 HER2⁺ dans le modèle murin BRGS

A. Suivi de la croissance tumorale au cours du temps de souris ayant reçu en sous-cutané des cellules B16F10 ou des cellules B16F10 HER2⁺ B. Courbe de survie de ces animaux en fonction du temps.

En conclusion, nous disposons à présent de deux modèles de tumeurs *in vivo* pouvant servir à l'étude de la fonctionnalité de nos différents anticorps produits par des cellules B humaines ingénierées.

IV. Discussion et perspectives

A. Remise en contexte

Les mAb sont de formidables outils thérapeutiques ayant connu un essor tel, qu'ils constituent à ce jour la classe de biomédicaments la plus importante. Malgré les nombreux bénéfices qu'ils ont déjà pu apporter aux stratégies d'immunothérapie, il reste des besoins auxquels ils ne répondent pas (ou imparfaitement). La pharmacocinétique des mAb en est un premier aspect et la demi-vie souvent limitée de ces médicaments implique des administrations répétées tout au long de certaines pathologies chroniques. La compréhension de mécanismes comme le recyclage pH-dépendant des Ig par le FcRn a permis l'élaboration de stratégie capable d'augmenter significativement la durée de vie des mAbs^{274,275}. Ces améliorations ont notamment été appliquées aux deux mAb tixagévimab et cilgavimab composant la biothérapie nommée EVUSHELD, donnée en prophylaxie contre la COVID-19 chez des patients à très haut risque de développement de forme sévère²⁷⁶. Malgré tout, dans le cas de pathologies chroniques des injections répétées demeurent nécessaires (bien que plus espacées dans le temps), c'est pourquoi le développement d'immunothérapie alternative et d'effet durable constituerait un immense progrès.

Les CAR-T ont ouvert la voie à une nouvelle forme de thérapie cellulaire, combinant transfert adoptif et ingénierie génétique. Ils ont su se faire une place dans le paysage des thérapies conventionnelles en raison de leurs remarquables prouesses en termes de rémission obtenue pour certains types de cancers réfractaires (lymphome diffus à grandes cellules B, leucémie aiguë lymphoblastique) que l'on pensait incurables jusqu'alors. Néanmoins les thérapies CAR-T comportent certains revers, comme le risque de déclenchement d'effets toxiques sévères voire létaux dont fait partie le CRS²⁰⁵. Même si l'on retient surtout les cas de rémission complète, les traitements CAR-T aboutissent aussi très souvent à des rémissions seulement partielles, dans un contexte où la lourdeur et le coût du traitement ne permettent pas d'imaginer qu'il soit répété. En pratique, même si les cellules CAR-T peuvent persister pendant des années chez les patients, elles sont souvent alors victimes du phénomène « d'épuisement T », qui par extension s'applique également aux CAR-T²⁷⁷ et qui bien sûr compromet alors le rôle des CAR-T dans la prévention de rechute. L'épuisement conduit à la perte des fonctions effectrices des cellules T annihilant ainsi l'effet thérapeutique des CAR-T.

Dans l'objectif d'améliorer la sécurité ainsi que les fonctions effectrices en réduisant l'épuisement des CAR-T, un mécanisme astucieux d'expression de CAR inducible médié par

la doxycycline dans les cellules a par exemple été élaboré²¹⁶²¹⁵. Une autre alternative est apparue avec le développement des traitements par les anticorps bi-spécifiques (Bispecific T cell engagers ou « BiTE »), pour lesquels cette fois les cliniciens prescrivent volontiers des traitements par cures répétées pendant des périodes éventuellement très prolongées voire indéfinies, constitue aussi une alternative aux traitements CAR-T, en permettant de mobiliser des lymphocytes T polyclonaux (ou NK engagers).

B. Ingénierie des cellules B

1. Pertinence de cette approche

Il y a encore peu, l'ingénierie précise du génome semblait de l'ordre de la science-fiction ou restait très laborieuse. Les méthodes permettant d'insérer des gènes ont considérablement évolué au fil des 20 dernières années et se sont progressivement affranchies du caractère aléatoire qu'avait au départ les premières mutations ou insertions créées de façon biotechnologique. D'abord chez des êtres unicellulaires (bactéries, levures...) puis dans des cellules eucaryotes, les méthodes de recombinaison homologue ont ouvert la possibilité de mutations ciblées sur un gène choisi. Au cours de la dernière décennie, la disponibilité croissante d'outils très efficaces et rapides à mettre en œuvre pour induire des cassures précises au niveau de gènes cibles (« ciseaux génétiques ») grâce aux approches de recombinaison homologue, a progressivement permis de cibler pratiquement n'importe quelle région du génome, y compris dans les cellules de mammifères. Parmi ces nouveaux outils capables de cliver les gènes figurent les « zinc-finger nucleases » (ZFNs) ou encore les « transcription activator-like effector nuclease » (TALENs), qui ont permis de rendre la fiction réalité. Ces deux approches bien que prometteuses se sont avérées très chronophages ou complexes à mettre en œuvre. Très vite, elles ont été supplantées par l'émergence d'une nouvelle approche (basée sur le système « immunitaire adaptatif » des bactéries et des archées contre les virus à ADN). Ces microorganismes, pour se défendre à la suite d'une infection virale, intègrent une partie de l'ADN viral au sein de leur génome dans un locus nommé « *clustered regularly interspaced short palindromic repeat* » (CRISPR). Ces séquences ADN étrangères appelées « Spacer » sont intercalées dans ce locus entre de courtes séquences répétées qui se situent en aval des gènes codant pour les endonucléases Cas (pour CRISPR-associated). Ce mécanisme confère aux bactéries et aux archées une sorte de « mémoire immunitaire ». Lors d'une nouvelle infection, elles sont ainsi en mesure de reconnaître et d'inactiver l'ADN viral en ciblant en son sein la

courte séquence homologue à celle gardée en mémoire au sein du locus CRISPR grâce à l'association d'une protéine Cas (activité endonucléase) et d'ARN guide non codant (contenant une séquence complémentaire de cet ADN étranger) issu de la transcription du locus CRISPR. En exploitant ce système bactérien comme un outil, deux chercheuses (les Dr. Charpentier et Dr. Doudna) ont mis au point en 2012 la méthode CRISPR/Cas 9, simple et très précise, qui permet notamment l'édition du génome de cellules eucaryotes²⁷⁸. Ce nouveau mode d'édition du génome est probablement la rupture technologique la plus importante dans le domaine de la génétique. Depuis sa découverte cette méthode a été déclinée en de multiples applications. Elle permet notamment la délétion d'un gène ou encore l'intégration précise d'ADN au sein d'un gène. Récemment, elle a prouvé son intérêt dans le cadre d'une thérapie génique *in vivo* chez des patients atteints d'amylose héréditaire à transthyrétine par le « knockout » du gène de la transthyrétine (TTR), responsable de la production de la protéine transthyrétine (dont l'anomalie de structure cause la pathologie)²⁷⁹.

Les cellules B, une fois différenciées en plasmocytes à longue durée de vie, peuvent survivre durant des décennies au sein de leur niche (de la moelle osseuse ou du « mucosae associated lymphoid tissue » (MALT)). Cette survie s'accompagne de la production forte et constante d'anticorps hautement spécifiques. Exploiter ces différentes propriétés par le remaniement des gènes des cellules B à l'aide de l'outil CRISPR/Cas 9 peut permettre d'envisager non seulement la production d'anticorps thérapeutiques de type « classique » mais également celle de molécules moins stables dans le milieu intérieur comme les « nanobodies », les Ac bi-spécifiques ou encore les cytokines. Malgré leurs bienfaits anti-tumoraux, certaines thérapies impliquant l'IL-2 (seule ou en soutien de l'implantation des TIL) ont par exemple dû être mises en suspens en raison de leurs effets indésirables liés aux fortes doses unitaires injectées, et à doses cumulatives égales, les effets secondaires s'y sont révélés plus sévères lorsque les doses unitaires étaient plus élevées^{178,280}. Ainsi, pour beaucoup de biothérapies s'accompagnant d'un relargage de cytokines, une infusion continue sans pics consécutifs à des injections discontinues serait sans doute idéal. Sur ce registre, il y aurait donc un intérêt pharmacodynamique à la production d'une biothérapie par des cellules B éditées à façon pour jouer le rôle de « micro-pharmacie » endogène. Ce procédé possède en plus l'avantage de se prêter à de toutes les améliorations établies à l'aide de l'ingénierie génétique afin de rendre une biothérapie plus spécifique et d'en diminuer la toxicité, comme cela a pu être obtenu pour des cytokines modifiées¹⁸⁰.

Les cellules B ayant rencontré l'antigène peuvent également demeurer sous une forme quiescente que l'on nomme cellules B mémoires. En cas de stimulation par la détection de l'antigène préalablement rencontré, elles se réactivent pour induire une nouvelle réponse immunitaire spécifique. Tant au stade plasmocytaire qu'au stade B mémoire, le lignage B participe à la mémoire des réponses immunes humorales, et à une certaine surveillance immunitaire visant à prévenir ou contrôler la réapparition d'un antigène. Modifier génétiquement la lignée B donnerait l'opportunité de conférer une forme de mémoire immune humorale artificielle, construite à façon, en l'absence de toute vaccination. Ceci pourrait donc constituer un moyen efficace supplémentaire d'avoir un contrôle permanent d'une diversité d'antigènes contre lesquels il n'est pas possible de vacciner (ou d'utiliser ce type de méthodes chez des sujets ayant un déficit immunitaire combiné et ne répondant pas aux vaccinations) et de protéger ainsi contre diverses maladies chroniques auto-immunes ou infectieuses, qu'elles soient bactériennes, parasitaires (comme le paludisme) ou virales (comme le « virus de l'immunodéficience humaine » (VIH)).

Dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse, la production en continu d'un mAb dirigé spécifiquement contre un antigène tumoral pourrait limiter le risque de rechute. Comme pour toute thérapie par mAb, ce type de stratégie ne serait bien sûr pas à l'abri de la survenue de résistances, les cellules tumorales possédant la capacité de « masquer » ou muter leur antigène de surface et d'échapper ainsi aux immunothérapies. On a cependant des arguments pour penser que les résistances aux biothérapies se développent surtout lors des traitements discontinus, et que là-aussi, un traitement par infusion permanente au long cours pourrait diminuer la fréquence de développement de résistance, mais ce point restera à étudier.

2. Difficultés associées à l'ingénierie des cellules B

Dans l'ensemble de nos travaux, nous nous sommes confrontés à la difficulté de modifier génétiquement les cellules B et tout particulièrement des cellules primaires humaines. Indépendamment du site choisi, nos efficacités d'insertion n'ont que très rarement atteint 5% d'expression. Ces résultats bien que significatifs sont très inférieurs à ceux obtenus avec des lignées B immortalisées et nécessitent encore d'être optimisés au niveau méthodologique. Les moyens technologiques ne manquant pas (plasmide/ARN/protéine), nous avons, sur la base de nos expériences et de la littérature, validé le choix de complexes RNP. Ces derniers sont formés d'un single-guide ARN (sgRNA) tels que proposés par Synthego (<https://www.synthego.com/>), associant en une seule chaîne d'ARN les 2 séquences d'ARN nécessaires au clivage (sgRNA=

crRNA +tracrRNA), associé ensuite extemporanément en RNP par association avec l'enzyme Cas 9, originaire de la bactérie *Streptococcus pyogenes*. Il pourrait être intéressant dans l'avenir de tester aussi ce système avec plusieurs types de protéines Cas, décrits dans la littérature, comme étant plus petites et parfois plus efficaces, notamment les orthologues de la SpCas 9 (SaCas9, SjCas9, CasX ...) ou encore la Cas12f^{281,282,283}. Cependant, par souci de temps nous nous sommes concentrés uniquement sur la Cas 9, la plus utilisée à ce jour dans l'ensemble des publications. Le choix des sites de coupure de nos guides ARN a reposé sur une liste générée *in silico* à l'aide de logiciels spécialisés comme « CRISPOR » (<http://crispor.tefor.net/>). En fonction du site de clivage, nous avons testé les guides prédits comme ayant à la fois la meilleure efficacité et le plus faible taux de « off-target ». Il a par ailleurs été plus laborieux d'identifier un guide correspondant à ces critères dans le cas du gène IGHA2, puisqu'il présente une forte homologie de séquence avec le gène IGHA1. Cela s'est traduit par une moins bonne efficacité de coupure (environ 12%) en comparaison du site situé en amont de S μ (40-50%). Bien que le format RNP semble efficace, nous étudions la possibilité de recourir à de l'ARN pour traduire temporairement la Cas 9 et son guide immédiatement dans la cellule cible. Les ARN étant plus petits que ce complexe hybride (ARN-protéine), les chances qu'ils parviennent à s'introduire efficacement dans les cellules sont plus élevées.

Dans le but de limiter les effets secondaires relatifs aux vecteurs viraux (intégration aléatoire pouvant conduire au développement de cancer), nous leur avons préféré la méthode d'électroporation. Cette technique non virale a l'avantage de la simplicité, mais elle peut s'associer à une forte mortalité immédiate due au choc électrique, venant s'ajouter à la toxicité intracellulaire du matériel transfecté (en particulier pour l'ADN double brin), parfois très délétère pour certaines cellules primaires, et en particulier pour la lignée B. La quasi-totalité de nos expériences réalisées avec l'appareil Nucleofector 4D de chez Lonza ont en effet pâti de cette mortalité induite. Actuellement, nous testons un nouvel appareil d'électroporation de chez « Maxcyte » conçu pour causer moins de mortalité. Nos premiers tests réalisés sur plusieurs types cellulaires, et en particulier les B primaires, nous confortent dans l'idée que cet appareil protège idéalement les cellules transfectées.

Demeure la question de l'intégration réussie, au locus ciblé, de nos ADN donneurs pour permettre l'expression de molécules recombinantes thérapeutiques. Nos pistes d'amélioration portent sur le format de nos « templates », la vectorisation de ces dernières ou encore l'ajout à la culture des cellules primaires après transfection de « petites molécules » inhibitrices des mécanismes de réparation de l'ADN de type NHEJ, dans le but de promouvoir plutôt une réparation par HDR.

Les ADN simples brins (sb) sont décrits comme étant au moins aussi efficaces que les ADN doubles brins (db) pour modifier l'ADN génomique avec une moindre toxicité et un meilleur *ratio* d'intégration « on target » *versus* « off-target »^{284,285}. Le problème majeur de l'ADN db nu réside dans sa toxicité. Il n'est donc pas envisageable d'augmenter la concentration de l'ADN db puisqu'il ne provoquerait que plus de toxicité conduisant à la mort de nos cellules. Mais si, l'ADN sb est quant à lui moins toxique, sa fabrication est toutefois bien plus complexe que l'ADN db surtout lorsqu'il s'agit d'ADN sb long. De plus, la qualité de ce type d'ADN est difficile à vérifier. Dans nos mains, en nous basant sur une protection de simple brin à l'aide du kit dédié « guide-it » de Takara (<https://www.takarabio.com/products/gene-function/gene-editing/crispr-cas9/long-ssdna-for-knockins>), nous n'avons observé aucune différence notable entre ces deux formats dans les conditions dans lesquelles nous les avons testés, c'est pourquoi nous avons poursuivi nos expérimentations avec de l'ADN db. Nous avons par contre apporté des modifications à chaque extrémité de nos ADN (ajouts de sites CRISPR tronqués, tCTs capables de recruter gRNA + Cas9 sans pour autant être clivés) afin qu'ils puissent être guidés avec le complexe RNP au site de clivage dans le noyau sans qu'ils ne soient eux-mêmes clivés²⁸⁶. De cette façon, nous avons réussi à légèrement augmenter l'efficacité d'insertion sans pour autant qu'elle soit significative. Des travaux plus récents de la même équipe démontrent que cette technologie combinée à un format ADN sb donnent de meilleurs résultats d'insertion par CRISPR/Cas 9²⁸⁷. Cette alternative est donc l'une des seules que nous puissions tester rapidement malgré toutes les difficultés énoncées plus haut. Nous travaillons actuellement à tester d'autres stratégies de préparation d'ADN simple brin et un recours comparatif pourrait aussi être fait en utilisant une société prestataire capable de livrer de l'ADN simple brin sous une forme standardisée (Genscript).

L'ARN est un formidable outil qui se transfecte plus facilement que l'ADN au sein des cellules puisqu'il est sous forme sb et est moins toxique. Il peut être utilisé pour produire de manière transitoire la protéine Cas 9, alors qu'un guide ARN est introduit en parallèle.

Nous avons aussi testé le bénéfice donné par l'ajout de « petites molécules » inhibitrices du système de réparation de l'ADN NHEJ. La combinaison de petites molécules comme le TSA et M1438 avait déjà été rapportée dans la littérature pour son effet « enhancer HDR » *via* le blocage des autres voies de réparation de l'ADN (NHEJ, «Microhomology-mediated end joining») (MMEJ)²⁶⁰. Nous avons testé ces petites molécules dans la culture de nos cellules B primaires après électroporation de nos RNP et de l'ADN donneur. Malheureusement, dans nos expériences elles n'ont apporté qu'un bénéfice mineur.

Notre piste actuelle d'amélioration de nos efficacités d'insertion ciblerait plutôt une action sur l'accès de nos ADN aux noyaux des cellules B transfectées. Outre l'électroporation, des transporteurs comme des nanoparticules ou des liposomes complexes innovants pourraient constituer une voie alternative de convoyage des acides nucléiques au noyau. Notre équipe a démarré plusieurs collaborations dans ce sens, notamment avec l'équipe de biophysique de Chantal Pichon à Orléans qui travaille sur ces aspects de vectorisation des acides nucléiques. Côté nanoparticules, il en existe une variété de composition et structure variées (lipidique/polymère/d'or/...) mais aucune à ma connaissance n'a encore démontré d'intérêt pour l'intégration CRISPR/Cas9-dépendante d'ADN dans les cellules B humaines²⁸⁸.

C. Exploitation des propriétés intrinsèques aux cellules B

1. *Cassettes d'expression d'un mAb adéquat*

Dans tous les cas, l'ingénierie génétique de la lignée B reste aujourd'hui un véritable défi. Les cellules B sont très fragiles et entrent en apoptose au moindre stress. En outre, il est difficile de les conserver et de les expandre en culture au-delà de quelques jours, ce qui limite la fenêtre de temps disponible pour réussir la modification de leurs gènes. Un autre point non négligeable est la complexité des gènes d'immunoglobulines (situé sur deux chromosomes) pour obtenir aussi bien des anticorps membranaires que sécrétés. En dépit de tous ces aspects, plusieurs équipes ont démontré la faisabilité de cette approche à l'aide du système CRISPR/ Cas 9 pour obtenir la production d'anticorps thérapeutiques^{289,234,290,291,232,235,292,293}. Ces preuves de concept ont été effectuées aussi bien chez la souris que chez l'humain. La plupart des stratégies d'ingénierie se sont focalisées sur l'expression d'un mAb par intégration au locus IgH en perturbant l'expression de la chaîne lourde endogène des cellules B. Théoriquement, l'anticorps intégré à cet emplacement pourrait bénéficier des mécanismes sous-tendant la maturation d'affinité des cellules B comme celui de la SHM. Cependant, de façon non optimale, les constructions publiées jusqu'ici avec des cassettes d'expression associées (des chaînes H+L) débutent par la chaîne légère (VJ) plutôt que par la chaîne lourde (VDJ). Dans ce cas de figure, la SHM ne peut améliorer que l'affinité de la chaîne légère, alors que celle-ci n'est pas l'élément central impliqué dans la reconnaissance de l'antigène. L'apposition de l'exon constant Ck immédiatement en aval de la région variable l'expose en outre à des mutations potentiellement délétères. Nous avons récemment mis au point une approche concurrente pour permettre l'expression d'un anticorps complet par l'intégration au locus IgH d'une cassette d'expression

codant une simple chaîne, mais plus apte à bénéficier d'une potentielle SHM des cellules ayant intégré la construction. Cette construction codant pour une Ig « single-chain » garantit la stœchiométrie de ces deux chaînes H et L et nous affranchit du risque de mésappariement des chaînes lourdes et légères, c'est-à-dire d'association hétérologue entre une chaîne endogène et une chaîne issue de notre construction.

Ce nouveau format que nous avons nommé ScFull-Ig code d'abord pour la partie variable de la chaîne lourde (VDJ), ensuite associée par un linker à une chaîne complète kappa ($V\kappa-C\kappa$), enfin suivie d'un deuxième linker se terminant par un site donneur capable de s'épissier sur les gènes constants de la chaîne endogène. De cette manière, tout comme pour un anticorps produit physiologiquement, le VDJ et le $V\kappa J\kappa$ sont exposés à l'activité de la SHM (le domaine normal de la SHM couvrant environ 1 kb en aval du promoteur), tandis que les exons constants en sont protégés. Non contents de bénéficier de cette maturation d'affinité, nous proposons en plus un format qui puisse s'épissier sur les gènes constants endogènes. De ce fait, il nous est possible d'obtenir notre anticorps d'intérêt sous différentes classes isotypiques grâce au mécanisme de la CSR prenant place spécifiquement dans les cellules B. La présence d'un Fc endogène signifie également que notre anticorps conserve des fonctions effectrices. Le changement de classe étant soumis aux différents signaux que reçoit la cellule, cela signifie que notre anticorps a la capacité d'adopter différentes fonctions effectrices selon le microenvironnement où seront stimulées les cellules éditées. En outre, l'insertion précise entre $J\delta$ et $E\mu$ au locus IgH peut permettre l'expression de ce ScFull-Ig, aussi bien sous une forme membranaire de BCR que sous une forme sécrétée, puisque ces deux formes sont codées par les régions constantes endogènes. La combinaison de ces propriétés démontre l'avantage de ce format en comparaison de ceux proposés jusqu'ici dans la littérature. Pour valider ce nouveau format, nous avons construit deux ScFull-Ig capables de reconnaître d'une part le CD20 humain et d'autre part le HER2. Nous avons choisi ces deux cibles thérapeutiques car ce sont les mieux caractérisées dans la littérature dans le domaine de la cancérologie mais aussi, parce qu'il existe des mAbs de référence comme le rituximab (CD20 humain) ou le trastuzumab/pertuzumab (HER2) pour nous servir de contrôle. Dans notre premier article nous nous sommes focalisés sur la validation de ce nouveau format et son expression en tant que BCR. Les deux ScFull-IgG recombinants, obtenus après purification du surnageant de la lignée HEK293T ayant intégré par transfection transitoire nos constructions, ont été validés structurellement et fonctionnellement. Ainsi nous avons mis en évidence que ce nouveau format d'Ac (ScFull-Ig) conserve son aptitude à reconnaître sa cible et porte également des propriétés effectrices puissantes comme l'induction de l'ADCC. Pour finir nous avons apporté la preuve de concept qui vise à introduire nos différentes cassettes

expression (ScFull anti-hCD20 ou ScFull anti-HER2 contenant un site d'épissage) dans le locus IgH en bloquant l'expression de la chaîne endogène d'une lignée cellulaire B et de cellules B primaires toutes deux humaines. De manière intéressante, nous avons validé l'épissage de notre cassette sur les gènes constants endogènes à l'aide de transcrit ARN sous forme d'IgM mais également sous forme switchée IgA. L'ensemble de ces premiers résultats démontre la validité de ce nouveau format et apporte la confirmation de la faisabilité d'une insertion au locus IgH par la méthode CRISPR/Cas 9 dans les cellules B humaines.

2. *Multiplication des méthodes d'édition*

Un autre avantage potentiel très intéressant de l'ingénierie des cellules B est leur capacité à produire des Ac appartenant à différentes classes. Comme énoncé dans l'introduction de cette thèse, le Fc des Ac peut se lier préférentiellement aux différents FcR présents à la surface des cellules immunitaires. Cette liaison permet de recruter efficacement et spécifiquement les différents effecteurs immunitaires pour répondre aux signaux déclenchés par la fixation d'anticorps sur une cible ou la formation de complexes immuns. Dans la perspective d'exploiter au mieux les différentes propriétés des cellules B, nous avons cherché à diversifier nos stratégies d'ingénierie génétique par l'intermédiaire d'un nouveau site de coupure. Le choix de ce nouveau site s'est basé sur notre intérêt pour les IgA thérapeutiques.

Nous avons donc déterminé un nouveau site de clivage qui puisse soit servir à l'intégration d'un transgène « passager », soit permettre l'induction du switch vers la sous-classe IgA2 dans les cellules B. Ce site de coupure se situe entre le S α 2 et C α 2 sur le locus IgH. En plus d'être adapté aux deux stratégies, il présente l'avantage d'être proche de la deuxième région régulatrice 3' du locus IgH (3' RR2), ce qui laisse prédire qu'à cet emplacement nos cassettes d'expression pourraient éventuellement bénéficier du rôle de « superenhancer » de cette région²⁹⁴. A partir de ce site nous avons pu élaborer trois stratégies d'édition (développées plus loin) qui puissent exploiter les différentes facettes des cellules B.

De manière inexpiquée à ce jour, nous n'avons malheureusement pas été en mesure d'obtenir l'expression de nos cassettes d'expression lorsque nous les avons insérées pourtant avec succès au locus de la chaîne J. C'est un mystère qui reste pour nous à clarifier. Le fait d'avoir réorienté nos stratégies vers le site IGHA2 du locus IgH nous a permis de retrouver des capacités

normales d'expression d'un transgène passager, et de travailler en outre sur les modalités d'utilisation en immunothérapie des fonctions spécifiques du switch IgA.

D. IgA thérapeutiques, une idée qui a de l'avenir !

1. Rationnel

Les IgA sont impliquées dans l'élimination, à la surface des muqueuses, d'antigènes divers et notamment d'agents pathogènes bactériens ou viraux. Lors d'une infection, des plasmocytes spécifiques sont générés parmi lesquels certains auront commuté vers la classe IgA. Ces plasmocytes à IgA vont alors (en partie) migrer vers leur niche du MALT pour y sécréter localement des IgA capables de traverser la barrière intestinale par transcytose.

La dualité des IgA et leur rôle potentiel dans la tolérance ou dans un effet anti-inflammatoire, ne doivent cependant pas être omis. En réponse vaccinale, certaines études ont ainsi observé des effets néfastes de certaines réponses IgA, inhibitrices des réponses IgG²⁹⁵. Une éventuelle thérapie future *via* la production d'IgA devra donc toujours bien apprécier quels types d'effecteurs elle recrute, et quelle protection elle développe. Le versant opposé de la tolérance et des potentiels effets anti-inflammatoires face à une réponse parallèle innée ou IgG-médiée devra alors être pris en compte et évalué. En revanche, en thérapie de pathologies inflammatoires, auto-immunes ou immunoallergiques, il pourrait s'avérer très pertinent de déterminer les circonstances dans lesquelles un mAb de classe IgA peut induire le maximum d'effets anti-inflammatoires. On notera que cet effet anti-inflammatoire des IgA a été montré comme particulièrement salutaire dans différents modèles d'infections bactériennes muqueuses où une inflammation exacerbée participe au développement des lésions ²⁹⁶.

Quoi qu'il en soit, les IgA sont depuis longtemps et restent des molécules très attractives pour de potentielles applications d'immunothérapie du fait de leur modes d'actions originaux, différents de ceux des IgG et donc potentiellement synergiques^{297,298,299}. Malheureusement les IgA sont particulièrement difficiles à produire de façon stable. Elles présentent des modifications post-transcriptionnelles (glycosylation complexe avec galactosylation et sialylation étroitement contrôlée) qu'il est presque impossible de reproduire. Ces problématiques ont jusqu'ici réfréné toute tentative de production industrielle en vue d'une application thérapeutique systémique. Plus simplement, un certain nombre de publications récentes proposent d'utiliser des IgA sans administration parentérale mais simplement pour obtenir un effet local au niveau des muqueuses *via* des applications topiques d'IgA (alors même éventuellement produites hors de cellules de mammifères ³⁰⁰). Pour ce qui concerne l'usage

systémique, diverses études préliminaires ont tenté de faciliter la mise en œuvre d'une biothérapie IgA en modifiant la séquence des chaînes lourdes de façon à supprimer certains sites de N-glycosylation³⁰¹. La demi-vie des IgA normales est en effet volontiers écourtée par leur glycosylation incomplète et leur liaison au récepteur des asialoglycoprotéines, alors suivie d'un catabolisme rapide. Agir sur la polymérisation des IgA ou leur associer un domaine d'IgG pourrait aussi être de nature à moduler leur fonction et leur demi-vie.

2. Les cellules B peuvent-elle être la solution ?

Récemment, la preuve de concept de l'induction de la commutation de classe des cellules B par CRISPR/Cas 9 a été apportée par Cheong *et al*²³³. Ces auteurs ont montré la possibilité d'induire la commutation de classe vers les IgA et plus particulièrement les IgA1. Cependant nous savions que les IgA1 sont souvent associés au déclenchement de certaines pathologies comme la néphropathie ou encore la maladie de Crohn^{302,303}. Dans le cas de la néphropathie par exemple, l'émergence d'IgA1 dégalactosylée semblerait conduire à l'apparition d'autoanticorps dirigés contre ces IgA1 à la glycosylation altérée. Les IgA2 semblent à l'inverse non impliquées dans l'immunopathologie de la néphropathie à IgA. Une hypothèse proposée serait que les immun-complexes nouvellement formés et incluant des IgA1 hypo-galactosylées puissent se déposer dans les reins et que ces dépôts soient à l'origine des lésions rénales associées à cette pathologie³⁰⁴. Ces interprétations restent cependant l'objet de controverses, notre propre équipe ayant pu montrer dans le passé que les régions variables des IgA1 jouaient aussi un rôle dans le processus de dépôt et il est en outre connu que les IgA murines, qui sont des équivalents des IgA2, peuvent elles-aussi conduire à des dépôts rénaux chez la souris²³⁸. Globalement chez l'Homme, les IgA2 semblent en tout cas peu impliquées dans l'immunopathologie IgA-dépendante. Ces différents éléments associés aux propriétés spécifiques des IgA2, comme l'induction de réponse immune pro-inflammatoire ou encore leur aptitude à effectuer la transcytose inverse, nous ont laissé penser qu'un usage thérapeutique des IgA serait plus à propos si l'on exploitait préférentiellement la sous-classe IgA2. Il existe cependant une controverse qui attribue un meilleur pouvoir neutralisant aux IgA1³⁰⁵. Il est possible que le rôle et l'implication de chaque sous-classe d'IgA soit différent selon l'agent pathogène en cause. A plus long terme il sera donc important de déterminer le bien-fondé du choix de l'utilisation de l'une ou de l'autre sous-classe d'IgA dans différentes approches d'immunothérapie.

Dans le but d'exploiter plus largement les différentes fonctionnalités des cellules B, nous avons développé trois nouvelles stratégies d'édition de leur génome au site IGHA2.

La première approche se base sur les deux plus grandes caractéristiques des plasmocytes, à savoir la sécrétion massive de protéines et leur longévité au sein de leur niche. Luo *et al* ont dans le passé proposé d'exploiter ces deux qualités des plasmocytes en modifiant génétiquement des cellules B en dehors des gènes d'Ig, *via* le ciblage du gène GAPDH pour le KI d'un ADN codant un mAb anti-PD1, puis en les différenciant en plasmocytes à longue durée de vie²⁹¹. Nous avons également cherché à intégrer un gène passager qui code pour une molécule thérapeutique (« minibody »), mais pour notre part, nous avons choisi de cibler le locus IgH au site $\alpha 2$, une position qui peut donc ne pas compromettre l'expression endogène du BCR, tant que le gène endogène exprimé est l'un des 8 gènes constants localisés en amont de IgA2 (qu'il s'agisse donc des BCR IgM, IgD, IgG ou IgA1...). Il nous a semblé pertinent d'appliquer cette stratégie sur ce locus spécifiquement, car c'est le plus exprimé dans les cellules B. Cette approche a d'abord été confirmée par intégration d'un gène rapporteur (tdTomato) dont l'expression a pu être suivie par cytométrie en flux. Parallèlement, nous avons pu de la même manière que pour les ScFull-Ig valider la fonctionnalité de notre construction « minibody ». Par la suite nous avons démontré la possibilité d'obtenir la sécrétion de notre « minibody » par une lignée plasmocytaire après intégration précise au site $\alpha 2$ par CRISPR/Cas 9 de notre ADN donneur (vérifié au niveau génomique).

Dans la seconde approche, nous nous sommes appropriés la méthode d'induction du switch à l'aide de l'outil CRISPR/ Cas 9 pour obtenir des cellules productrices IgA2²³³. Par le biais d'une double coupure double brin simultanée au sein du locus IgH, d'une part en amont de $\Sigma \mu$ et d'autre part au site $\alpha 2$, nous avons réussi à induire la commutation de classe isotypique aussi bien dans des lignées cellulaire B lymphoïdes ou plasmocytaires, que dans des cellules B primaires humaines.

Afin de valider cette preuve de concept non seulement au niveau du BCR mais aussi niveau de l'Ig sécrétée nous avons choisi de réaliser ce switch CRISPR-induit sur un hybridome anti-SARS-CoV-2 sécrétant des IgG. En effet les IgA présentes dans les fluides de patients atteints de la COVID-19 ont été mises en évidence pour leur plus grande capacité de neutralisation du SARS-CoV-2 en comparaison des IgG³⁰⁶. Il semblerait que la forme dimérique soit celle sous laquelle les IgA sont les plus actives pour une neutralisation efficace contre le SARS-CoV-2³⁰⁷. La détection précoce d'IgA neutralisantes après l'apparition de symptômes suggère leur potentiel protecteur. De manière intéressante, nous sommes parvenus par cette méthode simple

à obtenir la production constante d'IgA anti-SARS-CoV-2 par un hybridome sécrétant initialement des IgG. De plus, ces IgA spécifiques présentent le même potentiel neutralisant que leur homologues IgG. Cette approche *in vitro* ne résout bien sûr pas le problème de conservation des IgA mais permet tout au moins une production facilitée à partir d'hybridomes humains (même si d'autres méthodes biotechnologiques peuvent bien sûr permettre de produire des IgA). Un travail de caractérisation de ces IgA produites par un hybridome humain reste à faire pour déterminer si cette méthode permet d'obtenir des IgA de structure relativement physiologiques (modifications post-transcriptionnelles présentes / multimériques / monomériques).

Hors contexte infectieux, les IgA ont également démontré des effets protecteurs vis-à-vis de certains cancers^{50,308}. Plusieurs modèles murins ont notamment appuyé l'hypothèse que des IgA2 thérapeutiques telles qu'un anti-CD20 ou anti-EGFR, peuvent induire de puissants effets anti-tumoraux^{309,310}. Ces derniers résultent de l'activation des neutrophiles et des macrophages médiés par la fixation des IgA2 à leur Fc α RI présent à leur surface^{309,311}. Malgré ces résultats encourageants, les IgA n'ont jamais fait l'objet d'une immunothérapie anticancéreuse en raison de leur faible demi-vie (6 jours) et de leur conservation difficile. Pour faire sauter les verrous technologiques qui compromettent l'administration d'IgA en immunothérapie, nous avons donc développé une stratégie qui permettrait de produire de façon endogène une IgA thérapeutique. Notre troisième approche d'édition du locus IGHA2 combine ainsi l'intégration précise d'un ADN donneur codant pour un scFvC κ L au génome de cellules B avec l'induction du switch vers IgA2. De cette manière, nous avons obtenu des cellules B humaines exprimant à leur surface un BCR de classe IgA2, spécifique anti-CD20 humain ou anti-HER2. Cette approche de remplacement de la région variable IgH par un scFvC κ L, associée à un switch IgA2, conduit à des scFull-IgA2 dont la chaîne lourde est liée à la chaîne légère, mais dont les domaines constants ont une structure normale et glycosylée. En termes d'immunothérapie, la production endogène de ces IgA2, avec une synthèse continue similaire à celle d'un anticorps naturel, devrait alors palier le problème de la brève demi-vie de cette classe d'Ig. Par ailleurs, le locus IGHA2 que nous décrivons comme propice à des insertions et au sein duquel nous avons exprimé un « minibody IgG-like » pourrait parfaitement se prêter à l'expression d'autres formes d'anticorps sécrétés, et notamment d'IgA bio-ingénierées, en by-passant alors l'utilisation des exons constants normaux du locus IGHA2.

Bien sûr nous ne minimisons pas le chemin qui reste à parcourir. L'obtention de cellules B ingénierées demande un environnement et un coût considérable qui avoisine certainement celui

des cellules CAR-T. Ces méthodes ne pourront donc se développer que si leur intérêt compétitif par rapport aux autres thérapies est démontré, et si leurs coûts sont maîtrisés.

E. Modèle murin adapté à l'étude de la fonctionnalité des mAb produits par des cellules B humaines *in vivo*

Le but ultime de nos projets est de fournir une immunothérapie grâce aux molécules thérapeutiques produites par des cellules B ingénierées. Il est donc essentiel de démontrer une efficacité de ces thérapies *in vivo*. Moffett *et al* ont démontré la capacité de cellules B murines modifiées génétiquement pour exprimer un mAb contre le virus « respiratory syncytial virus » (RSV) protecteur contre cette infection. Cette preuve de concept concernant les B murins ayant été publiée (quasiment au début de ma thèse), nous avons alors pris la décision de réorienter notre projet sur la seule ingénierie des cellules B humaines. S'est alors posée la question du modèle de test d'efficacité *in vivo* le plus adapté au cadre de nos expériences futures. Ce modèle ne pouvait clairement être qu'un animal immunodéficient, et propre à permettre l'implantation optimale de cellules humaines. Après avoir obtenu l'accord du Dr Di Santo, nous avons choisi d'utiliser le modèle murin mis au point par lui et son équipe afin de constituer une plate-forme de réalisation de « souris humanisées, Hu-SCID ». Ces animaux sont BALB/c, Rag2^{-/-}, IL-2Rγc^{-/-}, SIRPα.^{NOD} (BRGS)³¹². Ces souris sont donc déficientes en cellules T, B, NK grâce aux mutations Rag2^{-/-} IL-2Rγc^{-/-} et l'action phagocytaire des macrophages est inhibée face aux cellules humaines (signal « don't eat me ») de par l'expression d'un récepteur muté SIRPα.^{NOD} par les phagocytes. A l'aide de ce modèle nous avons pu définir les conditions optimales d'implantation des cellules B humaines. Une stimulation préalable *ex vivo* de 7 jours induisant une différenciation des cellules B en plasmablastes est nécessaire. L'injection doit se faire dans des souris pré-conditionnées par une faible irradiation. Elle est réalisée, à raison de 5 millions de cellules par souris, par voie intraveineuse pour nous permettre de limiter le nombre de cellules à injecter. Le suivi de la production d'anticorps humains au cours du temps dans le sérum de ces souris nous a permis de déterminer que l'implantation n'était que temporaire. La concentration d'Ac humains diminuait drastiquement après 2 mois, pour devenir indétectable. Cette sécrétion, en moyenne relativement basse, n'atteignait qu'environ 1μg/mL. De plus les cellules B humaines (différenciées ou non) dans les organes des souris (moelle osseuse et rate) étaient impossibles à détecter après deux mois d'expérimentation. Ainsi, ce modèle murin, bien qu'adapté à la greffe des cellules humaines, ne fournit pas tous les signaux nécessaires à la survie de cellules B obtenues à partir de buffy coat. Ce manque de signaux peut être compensé

par la co-injection de cellules T autologues²⁷⁰. En effet cette coopération bien connue entre les cellules B et T fournit suffisamment de signaux aux cellules B pour leur permettre de continuer leur différenciation en plasmocytes à longue durée de vie avec un « homing » au sein de leur niche (moelle osseuse) *in vivo*. Nous avons pu confirmer ces résultats récemment en injectant simultanément des cellules B avec des cellules T autologues dans les souris BRGS selon les mêmes conditions que décrites précédemment. Ce modèle murin a l'avantage d'être facile à mettre en place et ne nécessite pas de gestion complexe d'animaux. Il sera donc idéal pour détecter l'implantation de nos cellules B modifiées grâce au suivi de la production de nos molécules thérapeutiques dans le sérum de ces souris. Toutefois, étant donné l'absence de la plupart des effecteurs immunitaires humains dans ce modèle murin, nous ne savons pas si celui-ci est adapté au développement d'une réponse immunitaire suffisamment puissante pour éliminer une tumeur ou même limiter sa progression.

Dans ce but et parce que nous souhaitons créer un modèle Hu-SCID qui se rapprochera au plus de la réalité, un chercheur de notre équipe développe actuellement un modèle de souris humanisées reconstituées à l'aide d'une greffe de CSH humaines CD34. Ce modèle permet la reconstitution d'un système immunitaire humain au sein d'une souris immunodéficiente. Notre ambition dans un futur que nous espérons proche serait de mimer les thérapies cellulaires/géniques en modifiant génétiquement des cellules B humaines issues de souris donneuses afin de les réimplanter dans des souris receveuses, puis de tester leur fonctionnalité par l'observation d'un ralentissement de la croissance tumorale.

La mise en place de ce modèle au laboratoire, nous a fait élargir nos ambitions d'ingénierie hors du cadre des lymphocytes. En effet nous avons observé *in vivo* que les CSH humaines en très grande majorité se différencient en cellules B humaines qui colonisent les différents organes lymphoïdes. Nous étant pendant plusieurs années confrontés à la difficulté d'implanter des cellules B humaines dans un modèle murin, nous avons donc tenté (avec les mêmes constructions et stratégies CRISPR) d'ingénierer non pas des cellules B directement mais plutôt de leurs précurseurs CSH. Nos résultats préliminaires avec un gène rapporteur semblent démontrer la faisabilité de cette approche. N'étant qu'aux prémices du développement de cette stratégie, un travail d'optimisation reste nécessaire pour obtenir une édition optimale de ces cellules CSH primaires sans impacter leur pouvoir différenciant et prolifératif.

En conclusion, il n'existe malheureusement pas encore de modèle animal parfait dans lequel modéliser des approches d'immunothérapie adoptive utilisant des cellules humaines, mais il existe un large besoin de tels modèles et les progrès vis-à-vis de ce type d'outils sont constants.

De même que les souris humanisées pour les récepteurs $Fc\gamma$ ont constitué un progrès énorme pour tester de façon pré-clinique des monoclonaux thérapeutiques, aujourd'hui les animaux mimant au mieux les interactions cellulaires qui se déroulent lors de nos réponses immunes ne cessent de progresser (nouvelles souris BRGS avec SIRP α humain, CMH humanisé, ou encore production de cytokines utiles à la survie des cellules immunes comme l'IL6 ou à la mise en place du stroma lymphoïde comme le « Thymic Stromal Lymphopoietin » (TSLP)...). Clairement, la disponibilité de modèles fiables sera un gros atout pour poursuivre le développement de stratégies innovantes d'immunothérapie adoptive basées sur des cellules primaires humaines.

Au-delà des modèles rongeurs, tout essai clinique devra passer lorsque les méthodologies d'édition seront mûres, par un second modèle « non-rongeur ». En matière de lymphocytes édités, ce sont les modèles primates non humains qui seront la dernière étape avant de pouvoir envisager des essais cliniques chez l'Homme.

V. Références

1. Glass MC, Glass DR, Oliveria J-P, et al. Human IL-10-producing B cells have diverse states that are induced from multiple B cell subsets. *Cell Rep.* 2022;39(3):110728.
2. Glass DR, Tsai AG, Oliveria JP, et al. An Integrated Multi-omic Single-Cell Atlas of Human B Cell Identity. *Immunity.* 2020;53(1):217-232.e5.
3. Jenks SA, Cashman KS, Zumaquero E, et al. Distinct Effector B Cells Induced by Unregulated Toll-like Receptor 7 Contribute to Pathogenic Responses in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity.* 2018;49(4):725-739.e6.
4. Woodruff MC, Ramonell RP, Nguyen DC, et al. Extrafollicular B cell responses correlate with neutralizing antibodies and morbidity in COVID-19. *Nat. Immunol.* 2020;21(12):1506–1516.
5. Sachinidis A, Garyfallos A. Double Negative (DN) B cells: A connecting bridge between rheumatic diseases and COVID-19? *Mediterr. J. Rheumatol.* 2021;32(3):192–199.
6. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94(10):5320–5325.
7. Kikushige Y, Yoshimoto G, Miyamoto T, et al. Human Flt3 Is Expressed at the Hematopoietic Stem Cell and the Granulocyte/Macrophage Progenitor Stages to Maintain Cell Survival. *J. Immunol.* 2008;180(11):7358–7367.
8. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity.* 1995;3(4):459–473.
9. Hughes AM, Kuek V, Kotecha RS, Cheung LC. The Bone Marrow Microenvironment in B-Cell Development and Malignancy. *Cancers.* 2022;14(9):2089.
10. Boller S, Grosschedl R. The regulatory network of B-cell differentiation: a focused view of early B-cell factor 1 function. *Immunol. Rev.* 2014;261(1):102–115.
11. Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T, Choi B-I, Nagasawa T. Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity.* 2004;20(6):707–718.
12. Mourcin F, Breton C, Tellier J, et al. Galectin-1-expressing stromal cells constitute a specific niche for pre-BII cell development in mouse bone marrow. *Blood.* 2011;117(24):6552–6561.
13. Espeli M, Mancini SJC, Breton C, Poirier F, Schiff C. Impaired B-cell development at

the pre-BII-cell stage in galectin-1-deficient mice due to inefficient pre-BII/stromal cell interactions. *Blood*. 2009;113(23):5878–5886.

14. Pappu R, Schwab SR, Cornelissen I, et al. Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science*. 2007;316(5822):295–298.
15. Cariappa A, Mazo IB, Chase C, et al. Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes. *Immunity*. 2005;23(4):397–407.
16. Schur PH. IgG subclasses. A historical perspective. *Monogr. Allergy*. 1988;23:1–11.
17. de Taeye SW, Bentlage AEH, Mebius MM, et al. FcγR Binding and ADCC Activity of Human IgG Allotypes. *Front. Immunol*. 2020;11:740.
18. Andrew SM, Titus JA. Fragmentation of immunoglobulin G. *Curr. Protoc. Cell Biol*. 2003;Chapter 16:Unit 16.4.
19. Bruhns P, Jönsson F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol. Rev*. 2015;268(1):25–51.
20. Wilson TJ, Fuchs A, Colonna M. Cutting edge: human FcRL4 and FcRL5 are receptors for IgA and IgG. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2012;188(10):4741–4745.
21. Bruhns P, Iannascoli B, England P, et al. Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood*. 2009;113(16):3716–3725.
22. Bournazos S, Ravetch JV. Diversification of IgG effector functions. *Int. Immunol*. 2017;29(7):303–310.
23. Anderson CL, Chaudhury C, Kim J, et al. Perspective-- FcRn transports albumin: relevance to immunology and medicine. *Trends Immunol*. 2006;27(7):343–348.
24. Aleyd E, Heineke MH, van Egmond M. The era of the immunoglobulin A Fc receptor FcαRI; its function and potential as target in disease. *Immunol. Rev*. 2015;268(1):123–138.
25. van Egmond M, van Garderen E, van Spriël AB, et al. FcαRI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat. Med*. 2000;6(6):680–685.
26. Wines BD, Sardjono CT, Trist HH, Lay CS, Hogarth PM. The interaction of Fc alpha RI with IgA and its implications for ligand binding by immunoreceptors of the leukocyte receptor cluster. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2001;166(3):1781–1789.
27. Xue J, Zhao Q, Zhu L, Zhang W. Deglycosylation of FcαRI at N58 increases its binding to IgA. *Glycobiology*. 2010;20(7):905–915.
28. Mkaddem SB, Murua A, Flament H, et al. Lyn and Fyn function as molecular switches

that control immunoreceptors to direct homeostasis or inflammation. *Nat. Commun.* 2017;8(1):246.

29. Yoo EM, Trinh KR, Lim H, Wims LA, Morrison SL. Characterization of IgA and IgM binding and internalization by surface-expressed human Fc α / μ receptor. *Mol. Immunol.* 2011;48(15–16):1818–1826.
30. Baumann J, Park CG, Mantis NJ. Recognition of secretory IgA by DC-SIGN: implications for immune surveillance in the intestine. *Immunol. Lett.* 2010;131(1):59–66.
31. Gayet R, Michaud E, Nicoli F, et al. Impact of IgA isoforms on their ability to activate dendritic cells and to prime T cells. *Eur. J. Immunol.* 2020;50(9):1295–1306.
32. Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, et al. Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol.* 2013;11(9):e1001658.
33. Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, et al. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J. Exp. Med.* 2001;194(4):417–425.
34. Klimovich VB. IgM and its receptors: structural and functional aspects. *Biochem. Biokhimiia.* 2011;76(5):534–549.
35. Aalberse RC, van der Gaag R, van Leeuwen J. Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 1983;130(2):722–726.
36. Jones EA, Waldmann TA. The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat. *J. Clin. Invest.* 1972;51(11):2916–2927.
37. Borvak J, Richardson J, Medesan C, et al. Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice. *Int. Immunol.* 1998;10(9):1289–1298.
38. Kawamura S, Saitou N, Ueda S. Concerted evolution of the primate immunoglobulin alpha-gene through gene conversion. *J. Biol. Chem.* 1992;267(11):7359–7367.
39. Brandtzaeg P, Johansen F-E. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol. Rev.* 2005;206(1):32–63.
40. Sterlin D, Fadlallah J, Adams O, et al. Human IgA binds a diverse array of commensal bacteria. *J. Exp. Med.* 2020;217(3):.
41. Steffen U, Koeleman CA, Sokolova MV, et al. IgA subclasses have different effector functions associated with distinct glycosylation profiles. *Nat. Commun.* 2020;11(1):120.
42. Noailly B, Yaugel-Novoa M, Werquin J, et al. Antiviral Activities of HIV-1-Specific Human Broadly Neutralizing Antibodies Are Isotype-Dependent. *Vaccines.* 2022;10(6):903.

43. Rochereau N, Drocourt D, Perouzel E, et al. Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol.* 2013;11(9):e1001658.
44. Michaud E, Waeckel L, Gayet R, et al. Alteration of microbiota antibody-mediated immune selection contributes to dysbiosis in inflammatory bowel diseases. *EMBO Mol. Med.* 2022;14(8):e15386.
45. Aupetit C, Drouet M, Pinaud E, et al. Alleles of the alpha1 immunoglobulin gene 3' enhancer control evolution of IgA nephropathy toward renal failure. *Kidney Int.* 2000;58(3):966–971.
46. Coppo R, Feehally J, Glassock RJ. IgA nephropathy at two score and one. *Kidney Int.* 2010;77(3):181–186.
47. Pilette C, Detry B, Guisset A, Gabriels J, Sibille Y. Induction of interleukin-10 expression through Fcalpha receptor in human monocytes and monocyte-derived dendritic cells: role of p38 MAPKinase. *Immunol. Cell Biol.* 2010;88(4):486–493.
48. Liu R, Lu Z, Gu J, et al. MicroRNAs 15A and 16-1 Activate Signaling Pathways That Mediate Chemotaxis of Immune Regulatory B cells to Colorectal Tumors. *Gastroenterology.* 2018;154(3):637-651.e7.
49. Bosisio FM, Wilmott JS, Volders N, et al. Plasma cells in primary melanoma. Prognostic significance and possible role of IgA. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 2016;29(4):347–358.
50. Biswas S, Mandal G, Payne KK, et al. IgA transcytosis and antigen recognition govern ovarian cancer immunity. *Nature.* 2021;591(7850):464–470.
51. Guo L, Tian J, Guo Z, Zheng B, Han S. The absence of immunoglobulin D B cell receptor-mediated signals promotes the production of autoantibodies and exacerbates glomerulonephritis in murine lupus. *Clin. Exp. Immunol.* 2011;164(2):227–235.
52. Rouaud P, Saintamand A, Saad F, et al. Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region. *J. Exp. Med.* 2014;211(5):975–985.
53. Xu Y, Zhou H, Post G, Zan H, Casali P. Rad52 mediates class-switch DNA recombination to IgD. *Nat. Commun.* 2022;13(1):980.
54. Shan M, Carrillo J, Yeste A, et al. Secreted IgD Amplifies Humoral T Helper 2 Cell Responses by Binding Basophils via Galectin-9 and CD44. *Immunity.* 2018;49(4):709-724.e8.
55. Collins AM, Watson CT. Immunoglobulin Light Chain Gene Rearrangements, Receptor Editing and the Development of a Self-Tolerant Antibody Repertoire. *Front. Immunol.*

2018;9:2249.

56. Khatri I, Berkowska MA, van den Akker EB, et al. Population matched (pm) germline allelic variants of immunoglobulin (IG) loci: Relevance in infectious diseases and vaccination studies in human populations. *Genes Immun.* 2021;22(3):172–186.
57. McBlane JF, van Gent DC, Ramsden DA, et al. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell.* 1995;83(3):387–395.
58. Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, et al. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell.* 2001;105(2):177–186.
59. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell.* 2002;108(6):781–794.
60. Panchakshari RA, Zhang X, Kumar V, et al. DNA double-strand break response factors influence end-joining features of IgH class switch and general translocation junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2018;115(4):762–767.
61. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell.* 2002;108(6):781–794.
62. Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell.* 2002;109 Suppl:S45-55.
63. Desiderio SV, Yancopoulos GD, Paskind M, et al. Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature.* 1984;311(5988):752–755.
64. Chemin G, Tinguely A, Sirac C, et al. Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2010;184(9):5009–5017.
65. Mostoslavsky R, Alt FW, Rajewsky K. The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell.* 2004;118(5):539–544.
66. Kim M-S, Lapkouski M, Yang W, Gellert M. Crystal structure of the V(D)J recombinase RAG1-RAG2. *Nature.* 2015;518(7540):507–511.
67. van Zelm MC, van der Burg M, de Ridder D, et al. Ig gene rearrangement steps are initiated in early human precursor B cell subsets and correlate with specific transcription factor expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2005;175(9):5912–5922.

68. Jhunjhunwala S, van Zelm MC, Peak M, Murre C. Chromatin Architecture and the Generation of Antigen Receptor Diversity. *Cell*. 2009;138(3):435–448.
69. Yancopoulos GD, Alt FW. Regulation of the Assembly and Expression of Variable-Region Genes. *Annu. Rev. Immunol.* 1986;4(1):339–368.
70. Lassoued K, Nuñez CA, Billips L, et al. Expression of surrogate light chain receptors is restricted to a late stage in pre-B cell differentiation. *Cell*. 1993;73(1):73–86.
71. Winkler TH, Mårtensson I-L. The Role of the Pre-B Cell Receptor in B Cell Development, Repertoire Selection, and Tolerance. *Front. Immunol.* 2018;9:2423.
72. Retter MW, Nemazee D. Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J. Exp. Med.* 1998;188(7):1231–1238.
73. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* 1993;177(4):999–1008.
74. Novobrantseva T, Xu S, Tan JE-L, et al. Stochastic pairing of Ig heavy and light chains frequently generates B cell antigen receptors that are subject to editing in vivo. *Int. Immunol.* 2005;17(4):343–350.
75. Brink R, Goodnow CC, Crosbie J, et al. Immunoglobulin M and D antigen receptors are both capable of mediating B lymphocyte activation, deletion, or anergy after interaction with specific antigen. *J. Exp. Med.* 1992;176(4):991–1005.
76. Hartley SB, Crosbie J, Brink R, et al. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature*. 1991;353(6346):765–769.
77. Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, et al. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 2000;102(5):553–563.
78. Cattoretti G, Büttner M, Shaknovich R, et al. Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood*. 2006;107(10):3967–3975.
79. Xu Z, Pone EJ, Al-Qahtani A, et al. Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Crit. Rev. Immunol.* 2007;27(4):367–397.
80. Peters A, Storb U. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity*. 1996;4(1):57–65.
81. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, et al. 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*. 2010;116(11):1895–1898.

82. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, et al. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 2011;110:27–70.
83. Laffleur B, Lim J, Zhang W, et al. Noncoding RNA processing by DIS3 regulates chromosomal architecture and somatic hypermutation in B cells. *Nat. Genet.* 2021;53(2):230–242.
84. Zhang X, Zhang Y, Ba Z, et al. Fundamental roles of chromatin loop extrusion in antibody class switching. *Nature.* 2019;
85. McKean D, Huppi K, Bell M, et al. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1984;81(10):3180–3184.
86. Chi X, Li Y, Qiu X. V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation. *Immunology.* 2020;160(3):233–247.
87. Chan TD, Gatto D, Wood K, et al. Antigen affinity controls rapid T-dependent antibody production by driving the expansion rather than the differentiation or extrafollicular migration of early plasmablasts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2009;183(5):3139–3149.
88. Pape KA, Kouskoff V, Nemazee D, et al. Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response. *J. Exp. Med.* 2003;197(12):1677–1687.
89. Roco JA, Mesin L, Binder SC, et al. Class-Switch Recombination Occurs Infrequently in Germinal Centers. *Immunity.* 2019;51(2):337-350.e7.
90. Zan H, Casali P. Regulation of Aicda expression and AID activity. *Autoimmunity.* 2013;46(2):83–101.
91. Matthews AJ, Zheng S, DiMenna LJ, Chaudhuri J. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv. Immunol.* 2014;122:1–57.
92. Boboila C, Alt FW, Schwer B. Chapter One - Classical and Alternative End-Joining Pathways for Repair of Lymphocyte-Specific and General DNA Double-Strand Breaks. *Adv. Immunol.* 2012;116:1–49.
93. Reynaud S, Delpy L, Fleury L, et al. Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2005;174(10):6176–6183.
94. Laffleur B, Bardet SM, Garot A, et al. Immunoglobulin genes undergo legitimate repair in human B cells not only after cis- but also frequent trans-class switch recombination. *Genes*

Immun. 2014;15(5):341–346.

95. Kawabe T, Naka T, Yoshida K, et al. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity.* 1994;1(3):167–178.
96. Xu L, Rothman P. IFN-gamma represses epsilon germline transcription and subsequently down-regulates switch recombination to epsilon. *Int. Immunol.* 1994;6(4):515–521.
97. Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 2012;12(7):517–531.
98. Simon Q, Pers J-O, Cornec D, et al. In-depth characterization of CD24(high)CD38(high) transitional human B cells reveals different regulatory profiles. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016;137(5):1577-1584.e10.
99. Agrawal S, Smith S a. BC, Tangye SG, Sewell WA. Transitional B cell subsets in human bone marrow. *Clin. Exp. Immunol.* 2013;174(1):53–59.
100. Vossenkämper A, Blair PA, Safinia N, et al. A role for gut-associated lymphoid tissue in shaping the human B cell repertoire. *J. Exp. Med.* 2013;210(9):1665–1674.
101. van Zelm MC, Szczepanski T, van der Burg M, van Dongen JJM. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J. Exp. Med.* 2007;204(3):645–655.
102. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity.* 2010;32(1):129–140.
103. Cherukuri A, Rothstein DM, Clark B, et al. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- α expression ratio in regulatory B cells. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 2014;25(7):1575–1585.
104. Spencer J, Finn T, Pulford KA, Mason DY, Isaacson PG. The human gut contains a novel population of B lymphocytes which resemble marginal zone cells. *Clin. Exp. Immunol.* 1985;62(3):607–612.
105. Dono M, Zupo S, Leanza N, et al. Heterogeneity of tonsillar subepithelial B lymphocytes, the splenic marginal zone equivalents. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2000;164(11):5596–5604.
106. He B, Santamaria R, Xu W, et al. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88. *Nat. Immunol.* 2010;11(9):836–845.

107. Weller S, Braun MC, Tan BK, et al. Human blood IgM “memory” B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 2004;104(12):3647–3654.
108. Weller S, Mamani-Matsuda M, Picard C, et al. Somatic diversification in the absence of antigen-driven responses is the hallmark of the IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ B cell repertoire in infants. *J. Exp. Med.* 2008;205(6):1331–1342.
109. Weller S, Bonnet M, Delagrèverie H, et al. IgM⁺IgD⁺CD27⁺ B cells are markedly reduced in IRAK-4⁻, MyD88⁻, and TIRAP⁻ but not UNC-93B-deficient patients. *Blood*. 2012;120(25):4992–5001.
110. Descatoire M, Weller S, Irtan S, et al. Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties. *J. Exp. Med.* 2014;211(5):987–1000.
111. Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*. 2001;14(5):617–629.
112. Paus D, Phan TG, Chan TD, et al. Antigen recognition strength regulates the choice between extrafollicular plasma cell and germinal center B cell differentiation. *J. Exp. Med.* 2006;203(4):1081–1091.
113. Okada T, Miller MJ, Parker I, et al. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. *PLoS Biol.* 2005;3(6):e150.
114. Garside P, Ingulli E, Merica RR, et al. Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node. *Science*. 1998;281(5373):96–99.
115. Takemori T, Kaji T, Takahashi Y, Shimoda M, Rajewsky K. Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *Eur. J. Immunol.* 2014;44(5):1258–1264.
116. Gitlin AD, Mayer CT, Oliveira TY, et al. T cell help controls the speed of the cell cycle in germinal center B cells. *Science*. 2015;349(6248):643–646.
117. Leong YA, Chen Y, Ong HS, et al. CXCR5(+) follicular cytotoxic T cells control viral infection in B cell follicles. *Nat. Immunol.* 2016;17(10):1187–1196.
118. Afshar-Sterle S, Zotos D, Bernard NJ, et al. Fas ligand-mediated immune surveillance by T cells is essential for the control of spontaneous B cell lymphomas. *Nat. Med.* 2014;20(3):283–290.
119. Rahman ZSM, Shao W-H, Khan TN, Zhen Y, Cohen PL. Impaired apoptotic cell clearance in the germinal center by Mer-deficient tingible body macrophages leads to enhanced antibody-forming cell and germinal center responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*.

2010;185(10):5859–5868.

120. Lau AWY, Turner VM, Bourne K, et al. BAFFR controls early memory B cell responses but is dispensable for germinal center function. *J. Exp. Med.* 2021;218(2):e20191167.

121. Pikor NB, Mörbe U, Lütge M, et al. Remodeling of light and dark zone follicular dendritic cells governs germinal center responses. *Nat. Immunol.* 2020;21(6):649–659.

122. Zotos D, Coquet JM, Zhang Y, et al. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* 2010;207(2):365–378.

123. Linterman MA, Beaton L, Yu D, et al. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* 2010;207(2):353–363.

124. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature.* 1996;381(6585):751–758.

125. Crotty S, Felgner P, Davies H, et al. Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2003;171(10):4969–4973.

126. Tangye SG, Liu YJ, Aversa G, Phillips JH, de Vries JE. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J. Exp. Med.* 1998;188(9):1691–1703.

127. Klein U, Küppers R, Rajewsky K. Evidence for a large compartment of IgM-expressing memory B cells in humans. *Blood.* 1997;89(4):1288–1298.

128. Berkowska MA, Driessen GJA, Bikos V, et al. Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood.* 2011;118(8):2150–2158.

129. Yu X, Tsibane T, McGraw PA, et al. Neutralizing antibodies derived from the B cells of 1918 influenza pandemic survivors. *Nature.* 2008;455(7212):532–536.

130. Schwickert TA, Victora GD, Fooksman DR, et al. A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *J. Exp. Med.* 2011;208(6):1243–1252.

131. Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 2009;10(12):1292–1299.

132. Duchez S, Amin R, Cogné N, et al. 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.* 2010;107(7):3064–3069.

133. Brinkmann V, Heusser CH. T cell-dependent differentiation of human B cells into IgM, IgG, IgA, or IgE plasma cells: high rate of antibody production by IgE plasma cells, but limited

- clonal expansion of IgE precursors. *Cell. Immunol.* 1993;152(2):323–332.
134. Hibi T, Dosch HM. Lymphocyte function in human bone marrow. III. Isotype commitment, metabolic and secretory characteristics of immunoglobulin producing cells. *Cell. Immunol.* 1986;98(1):34–45.
135. Canales-Herrerias P, Crickx E, Broketa M, et al. High-affinity autoreactive plasma cells disseminate through multiple organs in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J. Clin. Invest.* 2022;132(12):e153580.
136. Eyer K, Doineau RCL, Castrillon CE, et al. Single-cell deep phenotyping of IgG-secreting cells for high-resolution immune monitoring. *Nat. Biotechnol.* 2017;35(10):977–982.
137. Caraux A, Klein B, Paiva B, et al. Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138- and CD138+ plasma cells. *Haematologica.* 2010;95(6):1016–1020.
138. Jourdan M, de Boussac H, Viziteu E, Kassambara A, Moreaux J. In Vitro Differentiation Model of Human Normal Memory B Cells to Long-lived Plasma Cells. *J. Vis. Exp. JoVE.* 2019;(143):.
139. Sanderson RD, Lalor P, Bernfield M. B lymphocytes express and lose syndecan at specific stages of differentiation. *Cell Regul.* 1989;1(1):27–35.
140. Sanderson RD, Hinkes MT, Bernfield M. Syndecan-1, a cell-surface proteoglycan, changes in size and abundance when keratinocytes stratify. *J. Invest. Dermatol.* 1992;99(4):390–396.
141. Minnich M, Tagoh H, Bönelt P, et al. Multifunctional role of the transcription factor Blimp-1 in coordinating plasma cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2016;17(3):331–343.
142. Fagarasan S, Kawamoto S, Kanagawa O, Suzuki K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu. Rev. Immunol.* 2010;28:243–273.
143. Corrado A, Ramonell RP, Woodruff MC, et al. Extrafollicular IgD+ B cells generate IgE antibody secreting cells in the nasal mucosa. *Mucosal Immunol.* 2021;14(5):1144–1159.
144. Kwon D-I, Park ES, Kim M, et al. Homeostatic serum IgE is secreted by plasma cells in the thymus and enhances mast cell survival. *Nat. Commun.* 2022;13(1):1418.
145. Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J. Exp. Med.* 2001;194(1):45–56.
146. Belnoue E, Tougne C, Rochat A-F, et al. Homing and adhesion patterns determine the cellular composition of the bone marrow plasma cell niche. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2012;188(3):1283–1291.

147. Lazarus NH, Kunkel EJ, Johnston B, et al. A common mucosal chemokine (mucosae-associated epithelial chemokine/CCL28) selectively attracts IgA plasmablasts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2003;170(7):3799–3805.
148. Landsverk OJB, Snir O, Casado RB, et al. Antibody-secreting plasma cells persist for decades in human intestine. *J. Exp. Med.* 2017;214(2):309–317.
149. Goyffon M. L’immunothérapie passive aujourd’hui : bref historique. *Biol. Aujourd’hui.* 2010;204(1):51–54.
150. Casadevall A, Scharff MD. Serum therapy revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994;38(8):1695–1702.
151. Reiner M, Shwartzman G. Concentration and Purification of Antityphoid Horse Serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1930;27(9):1063–1066.
152. Hifumi T, Yamamoto A, Ato M, et al. Clinical Serum Therapy: Benefits, Cautions, and Potential Applications. *Keio J. Med.* 2017;66(4):57–64.
153. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495–497.
154. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood.* 2012;119(24):5640–5649.
155. Sterlin D, Gorochov G. When Therapeutic IgA Antibodies Might Come of Age. *Pharmacology.* 2021;106(1–2):9–19.
156. Hwang WYK, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods San Diego Calif.* 2005;36(1):3–10.
157. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1984;81(21):6851–6855.
158. Mullard A. FDA approves 100th monoclonal antibody product. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2021;20(7):491–495.
159. Kaplon H, Chenoweth A, Crescioli S, Reichert JM. Antibodies to watch in 2022. *mAbs.* 2022;14(1):2014296.
160. Rothenberg ME, Klion AD, Roufosse FE, et al. Treatment of patients with the hypereosinophilic syndrome with mepolizumab. *N. Engl. J. Med.* 2008;358(12):1215–1228.
161. Locatelli F, Jordan MB, Allen C, et al. Emapalumab in Children with Primary Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(19):1811–1822.
162. Scott LJ. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs.* 2017;77(17):1865–

1879.

163. Le RQ, Li L, Yuan W, et al. FDA Approval Summary: Tocilizumab for Treatment of Chimeric Antigen Receptor T Cell-Induced Severe or Life-Threatening Cytokine Release Syndrome. *The Oncologist*. 2018;23(8):943–947.

164. Salama C, Han J, Yau L, et al. Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2021;384(1):20–30.

165. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(8):711–723.

166. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet Lond. Engl.* 2014;384(9948):1109–1117.

167. Patsoukis N, Wang Q, Strauss L, Boussiotis VA. Revisiting the PD-1 pathway. *Sci. Adv.* 2020;6(38):eabd2712.

168. Kosaka A, Ishibashi K, Nagato T, et al. CD47 blockade enhances the efficacy of intratumoral STING-targeting therapy by activating phagocytes. *J. Exp. Med.* 2021;218(11):e20200792.

169. Willingham SB, Volkmer J-P, Gentles AJ, et al. The CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPa) interaction is a therapeutic target for human solid tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012;109(17):6662–6667.

170. Tseng D, Volkmer J-P, Willingham SB, et al. Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110(27):11103–11108.

171. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr. Dir. Autoimmun.* 2005;8:140–174.

172. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood.* 1994;83(2):435–445.

173. Cragg MS, Morgan SM, Chan HTC, et al. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood.* 2003;101(3):1045–1052.

174. Lambour J, Naranjo-Gomez M, Piechaczyk M, Pelegrin M. Converting monoclonal antibody-based immunotherapies from passive to active: bringing immune complexes into play. *Emerg. Microbes Infect.* 2016;5(8):e92–e92.

175. Deligne C, Milcent B, Josseume N, Teillaud J-L, Sibénil S. Impact of Depleting Therapeutic Monoclonal Antibodies on the Host Adaptive Immunity: A Bonus or a Malus? *Front. Immunol.* 2017;8:950.

176. Quesada JR, Hersh EM, Manning J, et al. Treatment of hairy cell leukemia with recombinant alpha-interferon. *Blood*. 1986;68(2):493–497.
177. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 2014;192(12):5451–5458.
178. Alwan LM, Grossmann K, Sageser D, et al. Comparison of acute toxicity and mortality after two different dosing regimens of high-dose interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. *Target. Oncol*. 2014;9(1):63–71.
179. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med*. 1987;316(15):889–897.
180. Zheng X, Wu Y, Bi J, et al. The use of supercytokines, immunocytokines, engager cytokines, and other synthetic cytokines in immunotherapy. *Cell. Mol. Immunol*. 2022;19(2):192–209.
181. Bazin H. Vaccination: a history : from Lady Montagu and genetic engineering. Montrouge, France: John Libbey Eurotext; 2011.
182. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae: a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox - Digital Collections - National Library of Medicine.
183. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol*. 2011;12(6):509–517.
184. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Ann. Med*. 2018;50(2):110–120.
185. Sternberg A, Naujokat C. Structural features of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein: Targets for vaccination. *Life Sci*. 2020;257:118056.
186. kim wooseob, Zhou JQ, Horvath SC, et al. Germinal centre-driven maturation of B cell response to mRNA vaccination. *Nature*. 2022;604(7904):141–145.
187. Mathe G, Jammet H, Pendic B, et al. [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol*. 1959;4(3):226–238.
188. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect*. 1966;62:21–78.
189. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol*. 1958;20(1–4):156–166.
190. Storb R, Epstein RB, Graham TC, Thomas ED. Methotrexate regimens for control of graft-versus-host disease in dogs with allogeneic marrow grafts. *Transplantation*.

1970;9(3):240–246.

191. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415–421.

192. Duan Q, Zhang H, Zheng J, Zhang L. Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer*. 2020;6(7):605–618.

193. Petitprez F, de Reyniès A, Keung EZ, et al. B cells are associated with survival and immunotherapy response in sarcoma. *Nature*. 2020;577(7791):556–560.

194. Meylan M, Petitprez F, Becht E, et al. Tertiary lymphoid structures generate and propagate anti-tumor antibody-producing plasma cells in renal cell cancer. *Immunity*. 2022;55(3):527–541.e5.

195. Italiano A, Bessedé A, Pulido M, et al. Pembrolizumab in soft-tissue sarcomas with tertiary lymphoid structures: a phase 2 PEMBROSARC trial cohort. *Nat. Med.* 2022;28(6):1199–1206.

196. Fridman WH, Meylan M, Petitprez F, et al. B cells and tertiary lymphoid structures as determinants of tumour immune contexture and clinical outcome. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2022;19(7):441–457.

197. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2011;17(13):4550–4557.

198. Stevanović S, Draper LM, Langhan MM, et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2015;33(14):1543–1550.

199. Zhang Q, Ping J, Huang Z, et al. CAR-T Cell Therapy in Cancer: Tribulations and Road Ahead. *J. Immunol. Res.* 2020;2020:1924379.

200. Schuster SJ, Bishop MR, Tam CS, et al. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2019;380(1):45–56.

201. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 2017;377(26):2531–2544.

202. Mian A, Hill BT. Brexucabtagene autoleucel for the treatment of relapsed/refractory mantle cell lymphoma. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2021;21(4):435–441.

203. Iragavarapu C, Hildebrandt G. Lisocabtagene Maraleucel for the treatment of B-cell lymphoma. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2021;21(9):1151–1156.

204. Anderson LD. Idecabtagene vicleucel (ide-cel) CAR T-cell therapy for relapsed and refractory multiple myeloma. *Future Oncol. Lond. Engl.* 2022;18(3):277–289.

205. Brudno JN, Kochenderfer JN. Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Rev.* 2019;34:45–55.
206. Drent E, Themeli M, Poels R, et al. A Rational Strategy for Reducing On-Target Off-Tumor Effects of CD38-Chimeric Antigen Receptors by Affinity Optimization. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2017;25(8):1946–1958.
207. Maus MV, Haas AR, Beatty GL, et al. T cells expressing chimeric antigen receptors can cause anaphylaxis in humans. *Cancer Immunol. Res.* 2013;1:26–31.
208. Norelli M, Camisa B, Barbiera G, et al. Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells. *Nat. Med.* 2018;24(6):739–748.
209. Jung S, Greiner J, von Harsdorf S, et al. Fatal late-onset CAR T-cell-mediated encephalitis after axicabtagene-ciloleucel in a patient with large B-cell lymphoma. *Blood Adv.* 2021;5(19):3789–3793.
210. Mei H, Li C, Jiang H, et al. A bispecific CAR-T cell therapy targeting BCMA and CD38 in relapsed or refractory multiple myeloma. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 2021;14:161.
211. Irvine DJ. A Receptor for All Occasions. *Cell.* 2016;164(4):599–600.
212. Choe JH, Watchmaker PB, Simic MS, et al. SynNotch-CAR T cells overcome challenges of specificity, heterogeneity, and persistence in treating glioblastoma. *Sci. Transl. Med.* 2021;13(591):eabe7378.
213. Gargett T, Brown MP. The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front. Pharmacol.* 2014;5:235.
214. Guercio M, Manni S, Boffa I, et al. Inclusion of the Inducible Caspase 9 Suicide Gene in CAR Construct Increases Safety of CAR.CD19 T Cell Therapy in B-Cell Malignancies. *Front. Immunol.* 2021;12:755639.
215. Gu X, He D, Li C, Wang H, Yang G. Development of Inducible CD19-CAR T Cells with a Tet-On System for Controlled Activity and Enhanced Clinical Safety. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(11):3455.
216. Drent E, Poels R, Mulders MJ, et al. Feasibility of controlling CD38-CAR T cell activity with a Tet-on inducible CAR design. *PLoS One.* 2018;13(5):e0197349.
217. Hotblack A, Kokalaki EK, Palton MJ, et al. Tunable control of CAR T cell activity through tetracycline mediated disruption of protein-protein interaction. *Sci. Rep.* 2021;11(1):21902.
218. Eyquem J, Mansilla-Soto J, Giavridis T, et al. Targeting a CAR to the TRAC locus with

- CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*. 2017;543(7643):113–117.
219. MacLeod DT, Antony J, Martin AJ, et al. Integration of a CD19 CAR into the TCR Alpha Chain Locus Streamlines Production of Allogeneic Gene-Edited CAR T Cells. *Mol. Ther.* 2017;25(4):949–961.
220. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* 2018;9:1869.
221. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol. Rev.* 2006;214:73–91.
222. Boyiadzis M, Agha M, Redner RL, et al. Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using “off-the-shelf” activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Cytotherapy*. 2017;19(10):1225–1232.
223. Liu E, Marin D, Banerjee P, et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(6):545–553.
224. Strati P, Bachanova V, Goodman A, et al. Preliminary results of a phase I trial of FT516, an off-the-shelf natural killer (NK) cell therapy derived from a clonal master induced pluripotent stem cell (iPSC) line expressing high-affinity, non-cleavable CD16 (hnCD16), in patients (pts) with relapsed/refractory (R/R) B-cell lymphoma (BCL). *J. Clin. Oncol.* 2021;39(15_suppl):7541–7541.
225. Liu E, Tong Y, Dotti G, et al. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia*. 2018;32(2):520–531.
226. Chmielewski M, Abken H. TRUCKs: the fourth generation of CARs. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015;15(8):1145–1154.
227. Luo XM, Maarschalk E, O’Connell RM, et al. Engineering human hematopoietic stem/progenitor cells to produce a broadly neutralizing anti-HIV antibody after in vitro maturation to human B lymphocytes. *Blood*. 2009;113(7):1422–1431.
228. Fusil F, Calattini S, Amirache F, et al. A Lentiviral Vector Allowing Physiologically Regulated Membrane-anchored and Secreted Antibody Expression Depending on B-cell Maturation Status. *Mol. Ther.* 2015;23(11):1734–1747.
229. Kuhlmann A-S, Haworth KG, Barber-Axthelm IM, et al. Long-Term Persistence of Anti-HIV Broadly Neutralizing Antibody-Secreting Hematopoietic Cells in Humanized Mice. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2019;27(1):164–177.
230. Barrangou R, Doudna JA. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat. Biotechnol.* 2016;34(9):933–941.

231. Johnson MJ, Laoharawee K, Lahr WS, Webber BR, Moriarity BS. Engineering of Primary Human B cells with CRISPR/Cas9 Targeted Nuclease. *Sci. Rep.* 2018;8(1):12144.
232. Greiner V, Bou Puerto R, Liu S, et al. CRISPR-Mediated Editing of the B Cell Receptor in Primary Human B Cells. *iScience.* 2019;12:369–378.
233. Cheong T-C, Compagno M, Chiarle R. Editing of mouse and human immunoglobulin genes by CRISPR-Cas9 system. *Nat. Commun.* 2016;7:10934.
234. Moffett HF, Harms CK, Fitzpatrick KS, et al. B cells engineered to express pathogen-specific antibodies protect against infection. *Sci. Immunol.* 2019;4(35):.
235. Hartweger H, McGuire AT, Horning M, et al. HIV-specific humoral immune responses by CRISPR/Cas9-edited B cells. *J. Exp. Med.* 2019;216(6):1301–1310.
236. Cattaneo A, Neuberger MS. Polymeric immunoglobulin M is secreted by transfectants of non-lymphoid cells in the absence of immunoglobulin J chain. *EMBO J.* 1987;6(9):2753–2758.
237. Lycke N, Erlandsson L, Ekman L, Schön K, Leanderson T. Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 1999;163(2):913–919.
238. Oruc Z, Oblat C, Boumediene A, et al. IgA Structure Variations Associate with Immune Stimulations and IgA Mesangial Deposition. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 2016;27(9):2748–2761.
239. Brandtzaeg P, Prydz H. Direct evidence for an integrated function of J chain and secretory component in epithelial transport of immunoglobulins. *Nature.* 1984;311(5981):71–73.
240. Vaerman JP, Langendries A, Giffroy D, Brandtzaeg P, Kobayashi K. Lack of SC/pIgR-mediated epithelial transport of a human polymeric IgA devoid of J chain: in vitro and in vivo studies. *Immunology.* 1998;95(1):90–96.
241. Max EE, McBride OW, Morton CC, Robinson MA. Human J chain gene: chromosomal localization and associated restriction fragment length polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1986;83(15):5592–5596.
242. Lomov NA, Viushkov VS, Petrenko AP, Syrkina MS, Rubtsov MA. [Methods of Evaluating the Efficiency of CRISPR/Cas Genome Editing]. *Mol. Biol. (Mosk.).* 2019;53(6):982–997.
243. Fusil F, Calattini S, Amirache F, et al. A Lentiviral Vector Allowing Physiologically Regulated Membrane-anchored and Secreted Antibody Expression Depending on B-cell Maturation Status. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2015;23(11):1734–1747.

244. Levy C, Fusil F, Amirache F, et al. Baboon envelope pseudotyped lentiviral vectors efficiently transduce human B cells and allow active factor IX B cell secretion in vivo in NOD/SCID γ c^{-/-} mice. *J. Thromb. Haemost. JTH*. 2016;14(12):2478–2492.
245. Hartweger H, McGuire AT, Horning M, et al. HIV-specific humoral immune responses by CRISPR/Cas9-edited B cells. *J. Exp. Med.* 2019;216(6):1301–1310.
246. Luo B, Zhan Y, Luo M, et al. Engineering of α -PD-1 antibody-expressing long-lived plasma cells by CRISPR/Cas9-mediated targeted gene integration. *Cell Death Dis.* 2020;11(11):973.
247. Moffett HF, Harms CK, Fitzpatrick KS, et al. B cells engineered to express pathogen-specific antibodies protect against infection. *Sci. Immunol.* 2019;4(35):.
248. Nahmad AD, Raviv Y, Horovitz-Fried M, et al. Engineered B cells expressing an anti-HIV antibody enable memory retention, isotype switching and clonal expansion. *Nat. Commun.* 2020;11(1):5851.
249. Nahmad AD, Lazzarotto CR, Zelikson N, et al. In vivo engineered B cells secrete high titers of broadly neutralizing anti-HIV antibodies in mice. *Nat. Biotechnol.* 2022;40(8):1241–1249.
250. Luo XM, Maarschalk E, O’Connell RM, et al. Engineering human hematopoietic stem/progenitor cells to produce a broadly neutralizing anti-HIV antibody after in vitro maturation to human B lymphocytes. *Blood.* 2009;113(7):1422–1431.
251. Fröberg J, Gillard J, Philipsen R, et al. SARS-CoV-2 mucosal antibody development and persistence and their relation to viral load and COVID-19 symptoms. *Nat. Commun.* 2021;12(1):5621.
252. Russell MW, Mestecky J. Mucosal immunity: The missing link in comprehending SARS-CoV-2 infection and transmission. *Front. Immunol.* 2022;13:957107.
253. Bunker JJ, Erickson SA, Flynn TM, et al. Natural polyreactive IgA antibodies coat the intestinal microbiota. *Science.* 2017;358(6361):.
254. Planer JD, Peng Y, Kau AL, et al. Development of the gut microbiota and mucosal IgA responses in twins and gnotobiotic mice. *Nature.* 2016;534(7606):263–266.
255. Watkins JD, Sholukh AM, Mukhtar MM, et al. Anti-HIV IgA isotypes: differential virion capture and inhibition of transcytosis are linked to prevention of mucosal R5 SHIV transmission. *AIDS Lond. Engl.* 2013;27(9):F13-20.
256. Cheong T-C, Compagno M, Chiarle R. Editing of mouse and human immunoglobulin genes by CRISPR-Cas9 system. *Nat. Commun.* 2016;7:10934.
257. Steffen U, Koeleman CA, Sokolova MV, et al. IgA subclasses have different effector

- functions associated with distinct glycosylation profiles. *Nat. Commun.* 2020;11(1):120.
258. Ueda N, Cahen M, Sirac C, et al. Single-hit genome edition for expression of single-chain immunoglobulins by edited B cells. 2022;2022.06.02.494471.
259. Nguyen DN, Roth TL, Li PJ, et al. Polymer-stabilized Cas9 nanoparticles and modified repair templates increase genome editing efficiency. *Nat. Biotechnol.* 2020;38(1):44–49.
260. Fu Y-W, Dai X-Y, Wang W-T, et al. Dynamics and competition of CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins and AAV donor-mediated NHEJ, MMEJ and HDR editing. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(2):969–985.
261. Pascal V, Laffleur B, Debin A, et al. Anti-CD20 IgA can protect mice against lymphoma development: evaluation of the direct impact of IgA and cytotoxic effector recruitment on CD20 target cells. *Haematologica.* 2012;97(11):1686–1694.
262. Greiner V, Bou Puerto R, Liu S, et al. CRISPR-Mediated Editing of the B Cell Receptor in Primary Human B Cells. *iScience.* 2019;12:369–378.
263. Nguyen DC, Duan M, Ali M, et al. Plasma cell survival: The intrinsic drivers, migratory signals, and extrinsic regulators. *Immunol. Rev.* 2021;303(1):138–153.
264. Hung KL, Meitlis I, Hale M, et al. Engineering Protein-Secreting Plasma Cells by Homology-Directed Repair in Primary Human B Cells. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2018;26(2):456–467.
265. Patel M, Glass RI, Jiang B, et al. A systematic review of anti-rotavirus serum IgA antibody titer as a potential correlate of rotavirus vaccine efficacy. *J. Infect. Dis.* 2013;208(2):284–294.
266. Agarwal S, Mayer L. Pathogenesis and treatment of gastrointestinal disease in antibody deficiency syndromes. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009;124(4):658–664.
267. Breedveld A, van Egmond M. IgA and Fc α RI: Pathological Roles and Therapeutic Opportunities. *Front. Immunol.* 2019;10:553.
268. Sterlin D, Gorochov G. When Therapeutic IgA Antibodies Might Come of Age. *Pharmacology.* 2021;106(1–2):9–19.
269. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci. Transl. Med.* 2021;13(577):eabd2223.
270. Depraetere S, Verhoye L, Leclercq G, Leroux-Roels G. Human B cell growth and differentiation in the spleen of immunodeficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2001;166(5):2929–2936.
271. Levy C, Fusil F, Amirache F, et al. Baboon envelope pseudotyped lentiviral vectors efficiently transduce human B cells and allow active factor IX B cell secretion *in vivo* in

- NOD/SCID γ c^{-/-} mice. *J. Thromb. Haemost.* 2016;14(12):2478–2492.
272. Durand-Panteix S, Monteil J, Sage M, et al. Preclinical study of ²¹²Pb alpha-radioimmunotherapy targeting CD20 in non-Hodgkin lymphoma. *Br. J. Cancer.* 2021;125(12):1657–1665.
273. They L, Michaud H-A, Becquart O, et al. PD-1 blockade at the time of tumor escape potentiates the immune-mediated antitumor effects of a melanoma-targeting monoclonal antibody. *Oncoimmunology.* 2017;6(10):e1353857.
274. Lee C-H, Kang TH, Godon O, et al. An engineered human Fc domain that behaves like a pH-toggle switch for ultra-long circulation persistence. *Nat. Commun.* 2019;10(1):5031.
275. Robbie GJ, Criste R, Dall'acqua WF, et al. A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57(12):6147–6153.
276. Nguyen Y, Flahault A, Chavarot N, et al. Pre-exposure prophylaxis with tixagevimab and cilgavimab (Evusheld) for COVID-19 among 1112 severely immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2022;S1198-743X(22)00383–4.
277. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol.* 2015;36(4):265–276.
278. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816–821.
279. Gillmore JD, Gane E, Taubel J, et al. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. *N. Engl. J. Med.* 2021;385(6):493–502.
280. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 2014;192(12):5451–5458.
281. Burstein D, Harrington LB, Strutt SC, et al. New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature.* 2017;542(7640):237–241.
282. Kim E, Koo T, Park SW, et al. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nat. Commun.* 2017;8:14500.
283. T K, G B, Jk Y, et al. PAM recognition by miniature CRISPR-Cas12f nucleases triggers programmable double-stranded DNA target cleavage. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(9):.
284. Roth TL, Puig-Saus C, Yu R, et al. Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature.* 2018;559(7714):405–409.
285. Yoshimi K, Kunihiro Y, Kaneko T, et al. ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. *Nat. Commun.* 2016;7:10431.

286. Nguyen DN, Roth TL, Li PJ, et al. Polymer-stabilized Cas9 nanoparticles and modified repair templates increase genome editing efficiency. *Nat. Biotechnol.* 2020;38(1):44–49.
287. Shy BR, Vykunta VS, Ha A, et al. High-yield genome engineering in primary cells using a hybrid ssDNA repair template and small-molecule cocktails. *Nat. Biotechnol.* 2022;
288. Zhang S, Shen J, Li D, Cheng Y. Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics.* 2021;11(2):614–648.
289. Hung KL, Meitlis I, Hale M, et al. Engineering Protein-Secreting Plasma Cells by Homology-Directed Repair in Primary Human B Cells. *Mol. Ther.* 2018;26(2):456–467.
290. Wu C-AM, Roth TL, Baglaenko Y, et al. Genetic engineering in primary human B cells with CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *J. Immunol. Methods.* 2018;457:33–40.
291. B L, Y Z, M L, et al. Engineering of α -PD-1 antibody-expressing long-lived plasma cells by CRISPR/Cas9-mediated targeted gene integration. *Cell Death Dis.* 2020;11(11):.
292. Huang D, Tran JT, Olson A, et al. Vaccine elicitation of HIV broadly neutralizing antibodies from engineered B cells. *Nat. Commun.* 2020;11(1):5850.
293. Nahmad AD, Raviv Y, Horovitz-Fried M, et al. Engineered B cells expressing an anti-HIV antibody enable memory retention, isotype switching and clonal expansion. *Nat. Commun.* 2020;11(1):5851.
294. Chauveau C, Pinaud E, Cogne M. Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur. J. Immunol.* 1998;28(10):3048–3056.
295. Tomaras GD, Ferrari G, Shen X, et al. Vaccine-induced plasma IgA specific for the C1 region of the HIV-1 envelope blocks binding and effector function of IgG. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110(22):9019–9024.
296. Fernandez MI, Pedron T, Tournebize R, et al. Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin a by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. *Immunity.* 2003;18(6):739–749.
297. Bakema JE, van Egmond M. Immunoglobulin A: A next generation of therapeutic antibodies? *mAbs.* 2011;3(4):352–361.
298. Wallace AL, Schneider MI, Toomey JR, et al. IgA as a potential candidate for enteric monoclonal antibody therapeutics with improved gastrointestinal stability. *Vaccine.* 2020;38(47):7490–7497.
299. Ejemel M, Li Q, Hou S, et al. A cross-reactive human IgA monoclonal antibody blocks SARS-CoV-2 spike-ACE2 interaction. *Nat. Commun.* 2020;11(1):4198.
300. Nakanishi K, Matsuda M, Ida R, et al. Lettuce-derived secretory IgA specifically

- neutralizes the Shiga toxin 1 activity. *Planta*. 2019;250(4):1255–1264.
301. Lohse S, Meyer S, Meulenbroek LAPM, et al. An Anti-EGFR IgA That Displays Improved Pharmacokinetics and Myeloid Effector Cell Engagement In Vivo. *Cancer Res*. 2016;76(2):403–417.
302. Michaud E, Waeckel L, Gayet R, et al. Alteration of microbiota antibody-mediated immune selection contributes to dysbiosis in inflammatory bowel diseases. *EMBO Mol. Med*. 2022;14(8):e15386.
303. Maixnerova D, Ling C, Hall S, et al. Galactose-deficient IgA1 and the corresponding IgG autoantibodies predict IgA nephropathy progression. *PloS One*. 2019;14(2):e0212254.
304. Gharavi AG, Moldoveanu Z, Wyatt RJ, et al. Aberrant IgA1 glycosylation is inherited in familial and sporadic IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*. 2008;19(5):1008–1014.
305. Watkins JD, Sholukh AM, Mukhtar MM, et al. Anti-HIV IgA isotypes: differential virion capture and inhibition of transcytosis are linked to prevention of mucosal R5 SHIV transmission. *AIDS Lond. Engl*. 2013;27(9):F13-20.
306. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci. Transl. Med*. 2021;13(577):eabd2223.
307. Wang Z, Lorenzi JCC, Muecksch F, et al. Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA. *Sci. Transl. Med*. 2021;13(577):eabf1555.
308. Mandal G, Biswas S, Anadon CM, et al. IgA-Dominated Humoral Immune Responses Govern Patients' Outcome in Endometrial Cancer. *Cancer Res*. 2022;82(5):859–871.
309. Pascal V, Laffleur B, Debin A, et al. Anti-CD20 IgA can protect mice against lymphoma development: evaluation of the direct impact of IgA and cytotoxic effector recruitment on CD20 target cells. *Haematologica*. 2012;97(11):1686–1694.
310. Boross P, Lohse S, Nederend M, et al. IgA EGFR antibodies mediate tumour killing in vivo. *EMBO Mol. Med*. 2013;5(8):1213–1226.
311. Brandsma AM, Bondza S, Evers M, et al. Potent Fc Receptor Signaling by IgA Leads to Superior Killing of Cancer Cells by Neutrophils Compared to IgG. *Front. Immunol*. 2019;10:704.
312. Legrand N, Huntington ND, Nagasawa M, et al. Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP(alpha)) interaction is required for optimal human T- and natural killer (NK) cell homeostasis in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2011;108(32):13224–13229.

Annexe

Du *self-control* lymphocytaire B aux abords thérapeutiques, quelles voies « B-intrinsèques » pour tempérer les réponses et la mémoire IgE ?

Michel Cogné^{1,2}, Zeinab Dalloul¹, Ophélie Dézé², Maéva Le Goff², Simon Thomas², Marine Cahen², Natsuko Ueda², Brice Laffleur²

1. CNRS UMR 7276, Inserm U1262, Université de Limoges, 2, rue Marcland, Limoges, France

2. Inserm U1236, Etablissement Français du Sang, Université de Rennes 1, Rennes, France

Revue française d'allergologie (2021). DOI : 10.1016/j.reval.2021.10.012



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



Revue générale

Du *self-control* lymphocytaire B aux abords thérapeutiques, quelles voies « B-intrinsèques » pour tempérer les réponses et la mémoire IgE ?

From B-cell self-control to therapeutic approaches, could B-cell intrinsic strategies temper IgE responses and IgE memory?

M. Cogné^{a,*,b}, Z. Dalloul^a, O. Dézé^b, M. Le Goff^b, S. Thomas^b, M. Cahen^b, N. Ueda^b, B. Laffleur^b

^a CNRS UMR 7276, Inserm U1262, université de Limoges, 2, rue Marcland, Limoges, France

^b Inserm U1236, établissement français du sang, université de Rennes 1, Rennes, France

INFO ARTICLE

Historique de l'article :
Reçu le 7 juillet 2021
Accepté le 12 octobre 2021
Disponible sur Internet le xxx

Mots clés :
BCR IgE
Lymphocytes B
Réponse humorale IgE
Apoptose
Mémoire IgE
Allergie

Keywords:
IgE BCR
B lymphocytes
IgE response
Cell death
IgE memory
Allergy

RÉSUMÉ

La persistance de l'immunité humorale adaptative repose particulièrement sur 2 acteurs clés : les lymphocytes B mémoires et les plasmocytes à longue durée de vie. Indépendamment de la classe d'immunoglobuline produite, ces cellules peuvent maintenir tant la protection contre des pathogènes que des manifestations d'hypersensibilité ou d'immunopathologie. Elles requièrent donc une régulation stricte de leur génération comme de leur survie. Parmi toutes les classes d'immunoglobuline produites, l'IgE constitue l'anticorps aux propriétés les plus puissantes, pouvant déclencher des réactions inflammatoires majeures même à doses infimes. Les réponses et la mémoire de classe IgE, au rôle protecteur contre les parasites et certains venins ou toxines, sont conservées par l'évolution chez la quasi-totalité des mammifères. Cependant, les réponses anaphylactiques aux venins peuvent à l'inverse être dramatiques et la mémoire à long terme des sensibilisations et des réactions anaphylactiques contre les allergènes constitue le côté obscur des IgE, responsable de pathologies chroniques ponctuées d'évènements aigus parfois fatals. Face à leur utilité mêlée de dangerosité, l'évolution du système immunitaire a entouré les réponses IgE des cellules B de multiples et stricts garde-fous, un *self-control* naturel en renfort duquel s'ouvrent aujourd'hui de nouvelles voies thérapeutiques.

© 2021 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

ABSTRACT

Persisting adaptive humoral immunity relies on two key cell types: memory B lymphocytes and long-lived plasma cells. Independently from the specific Ig class they produce, those cells can on one side maintain immunity but on the other side account for dysimmune conditions or hypersensitivity. Stringent control is thus required for both their generation and their survival. Among Ig classes, IgE carries the most powerful pro-inflammatory properties, even at minimal concentration. IgE responses and memory, although protecting against parasites and certain venoms, can inversely mediate devastating effects. The long-term memory of anaphylactic responses against allergens thus stands as the black side of IgE responses, accounting for chronic conditions punctuated with dramatic acute adverse events, some eventually lethal. To manage both their value and their danger, the immune system has evolved with multiple and drastic safeguards around IgE responses, notably ensuring a "B-cell self control" which could now be exploited and reinforced by new specific therapeutic strategies.

© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Auteur correspondant.
Adresse e-mail : michel.cogne@inserm.fr (M. Cogné).

<https://doi.org/10.1016/j.reval.2021.10.012>
1877-0320/© 2021 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Pour citer cet article : Cogné M, et al, Du *self-control* lymphocytaire B aux abords thérapeutiques, quelles voies « B-intrinsèques » pour tempérer les réponses et la mémoire IgE ? Rev Fr Allergol, <https://doi.org/10.1016/j.reval.2021.10.012>

1. Introduction

La principale propriété des lymphocytes B est la sélection et la production d'immunoglobulines (Ig). Ceci nécessite une première étape indépendante de l'antigène, avec des réarrangements V(D)J assemblant les gènes d'un récepteur fonctionnel des cellules B (« BCR »). Une fois ces cellules matures, le contact avec un antigène peut induire l'expression de l'enzyme « activation-induced deaminase » (AID) [1]. La déamination des cytidines par AID crée des lésions sur l'ADN et peut soit initier la phase de diversification des régions variables des Igs par hypermutation somatique, soit promouvoir des cassures au niveau des gènes constants de chaînes lourdes d'Ig (IgH) permettant ensuite les recombinaisons de commutation de classe (« switch »), afin de substituer à l'expression du gène C μ celle des gènes C γ , C α ou C ϵ , et remplacer la synthèse d'IgM par celle d'IgG, IgA ou IgE. Ces cellules activées peuvent en outre se différencier en lymphocytes B mémoires ou en plasmablastes puis en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, eux-mêmes répartis en cellules à courte ou longue durée de vie. L'IgE, classe la moins abondante *in vivo* au plan de la concentration pondérale, et l'IgG, classe prédominante, partagent un modèle ancestral « reptilien », l'IgY [2]. La structure très conservée de l'IgE, notamment pour son site de glycosylation, permet sa reconnaissance par le récepteur de haute affinité Fc ϵ RI et conditionne de puissantes fonctions pro-inflammatoires dont les effets cliniques peuvent être majeurs même pour des concentrations pondérales d'anticorps IgE 100 à 1000 inférieurs à ceux d'autres classes. Dans toutes les espèces, un autre élément conservé est la rareté des cellules productrices d'IgE *in vivo*, contrastant avec leur abondance *in vitro* après stimulation B. Ce contrôle *in vivo* strict semble logiquement lié à la puissance des propriétés effectrices des IgE et à la dangerosité potentielle de l'anaphylaxie.

Une hyperproduction d'IgE, au rôle antiparasitaire, est observée durant les réponses contre les helminthes, accompagnés par une hyper-éosinophilie et une polarisation Th2 de l'immunité [3]. L'action effectrice des IgE contre les parasites comme celle contre certains venins et toxines, implique leur liaison avec le Fc ϵ RI [4]. Une autre propriété des IgE est leur rôle d'adjuvant des réponses IgG, cette fois selon un mécanisme dépendant du récepteur de faible affinité Fc ϵ R2/CD23 [5], par la participation des IgE à l'endocytose des antigènes et à leur présentation aux cellules T. Les modalités d'une immunisation, et l'utilisation de certains adjuvants peuvent favoriser une polarisation Th2 et la production d'IgE lors d'une réponse immune [6]. Il a également été démontré que l'IgE, d'une manière Fc ϵ RI-dépendante, peut enfin agir contre les tumeurs [7].

Malgré ces effets bénéfiques, ce sont surtout les effets néfastes des IgE que l'on mentionne généralement aujourd'hui en santé humaine, du fait de la fréquence des allergies. Outre les allergies, la participation des IgE à des manifestations d'auto-immunité a aussi été montrée [8] et dans des situations de défaut d'apoptose FAS-dépendante, on a pu montrer la production d'IgE par des cellules B « dévoyées » (« rogue B-cells ») hors de leur contrôle homéostatique normal [9]. Le switch vers IgE est stimulé par les cytokines Th2, interleukine 4 (IL4) et IL13, mais aussi par les cellules Th9 et les mastocytes producteurs d'IL9 [10]. À l'inverse, d'autres cytokines (IFN γ , TGF β , IL10, etc.), mais aussi les cellules TREG et dendritiques, tempèrent les réponses IgE [11]. Ces contrôles extrinsèques [12] sont consolidés par des freins intrinsèques propres aux cellules B [13], qui assurent de l'intérieur une régulation rigoureuse du switch vers IgE : celui-ci ne génère en effet pas de lymphocytes B mémoires exprimant l'IgE membranaire (mIgE) mais seulement des lymphocytes mIgE⁺ à brève durée de vie [14], en parallèle d'une différenciation en plasmocytes sécréteurs d'IgE (dont une fraction à longue durée de vie). Cette revue récapitule les résultats récents montrant comment la production d'IgE est autocontrôlée dans la lignée B.

2. Régulation moléculaire du switch IgE en physiologie

Le switch résulte de la jonction ADN de 2 régions « switch » (S) du locus IgH : l'une donneuse (S μ , en amont du gène C μ), et l'autre receveuse, précédant un autre gène constant (C) (Fig. 1A). Les régions S, répétitives, riches en GC et en structures G-quadruplex (G4), ne sont accessibles au switch que si elles sont transcrites et forment des hybrides ADN:ARN (R-loops), dont les ARN portent des marques spécifiques (m6A) et sont dégradés par le « RNA exosome » [15,16]. Elles sont précédées d'exons I non codants et de promoteurs (dits « germinaux ») que régulent divers facteurs (interactions cellulaires et diverses cytokines), le promoteur des transcrits germinaux I ϵ -S ϵ -C ϵ étant notamment réactif à l'IL4 et inhibé par le TGF β . Pour subir le switch, les régions S transcrites doivent se situer au sein d'introns et leur transcription germinale est enfin contrôlée par un « super-enhancer », la région régulatrice de l'extrémité 3' du locus (3'RR). Cette 3'RR contrôle ainsi le switch vers IgG, IgA et IgE, mais peut aussi induire un événement terminant la réponse B : la recombinaison suicide du locus IgH [17-21]. La transcription germinale des régions I-S et la formation de R-loops favorise le recrutement d'AID (enzyme spécifiquement exprimé dans les lymphocytes B activés) qui, via la déamination des cytosines, initie les cassures d'ADN [22]. Avant la recombinaison, une « synapse » associe les régions S ciblées et la 3'RR, orchestrant le repliement des boucles d'ADN à éliminer lors des jonctions S μ -S ϵ et substituer finalement à C μ un nouveau gène constant (C ϵ pour le switch IgE) [23,24] (Fig. 1A).

La régulation du switch vers chaque classe d'Ig tient donc à la richesse des promoteurs I en sites de facteurs de transcription spécifiques. Le promoteur I ϵ fixant les facteurs AP-1 [25], C/EBP, STAT6, PU.1, Pax5 et NF- κ B [10], sa transcription est induite par la phosphorylation et dimérisation de STAT6, stabilisée par SWAP-70 [26]. L'IL4 induit l'activation de STAT6 et de NFIL3/E4BP4, et la stimulation CD40 active de manière synergique NF- κ B [27]. Le lecteur de chromatine ZMYND8 participe également à l'induction de la transcription germinale en facilitant le recrutement de l'ARN polymérase II au niveau du promoteur I ϵ [28]. Des régulateurs négatifs agissent aussi, tel BCL6, qui inhibe le switch IgE par compétition avec STAT6 sur ses sites de liaison, ou qu'ID2, qui séquestre PAX5 [29]. Le TGF- β , l'IFN γ et l'IL10 contribuent à ces régulations négatives chez l'homme par inhibition de la liaison de HoxC4 et Oct-1 sur le promoteur I ϵ [30] (Fig. 2).

La structure de la région S ϵ contribue à elle-même à la régulation et la limitation du switch vers IgE, puisqu'elle est la plus courte et la moins répétitive des régions S [31]. Ainsi, le remplacement de S ϵ par S μ ou l'insertion de C ϵ en aval de S γ 1 accroît le switch IgE [32,33]. Des changements épigénétiques IL4-dépendants affectent aussi S ϵ [34,35]. Son ciblage épigénétique varie selon la maturité des cellules B, et les cellules immatures montrent une propension accrue à switcher vers IgE [36].

Le switch vers IgE peut être direct (S μ vers S ϵ) ou séquentiel (d'abord vers S γ puis S ϵ) avec donc un stade intermédiaire de cellule IgG⁺ [37]. Le switch direct ne semble permettre la production que d'IgE à faible affinité pour l'antigène, qui en saturant les récepteurs Fc ϵ R pourraient jouer plutôt un rôle inhibiteur des réponses anaphylactiques, qui sont surtout générées par switch séquentiel [38]. Un modèle suggère qu'une faible activation induit le switch direct tandis qu'un niveau plus élevé favorise le switch séquentiel vers IgG puis IgE [39]. Cette dualité n'est cependant pas absolue : on a ainsi discerné parmi les cellules IgG1⁺ murines, des cellules mémoire CD80⁺ à l'origine de cellules IgE⁺ de haute affinité, et des CD80⁻ menant (comme dans le cas d'un switch direct) à des IgE non pathogènes de faible affinité [40]. Outre la classe du précurseur, d'autres aspects interviennent donc, tels que le phénotype mémoire du précurseur, la cinétique, et la localisation. Dans le modèle murin d'hyper-IgE induite par *Nippostrongylus*

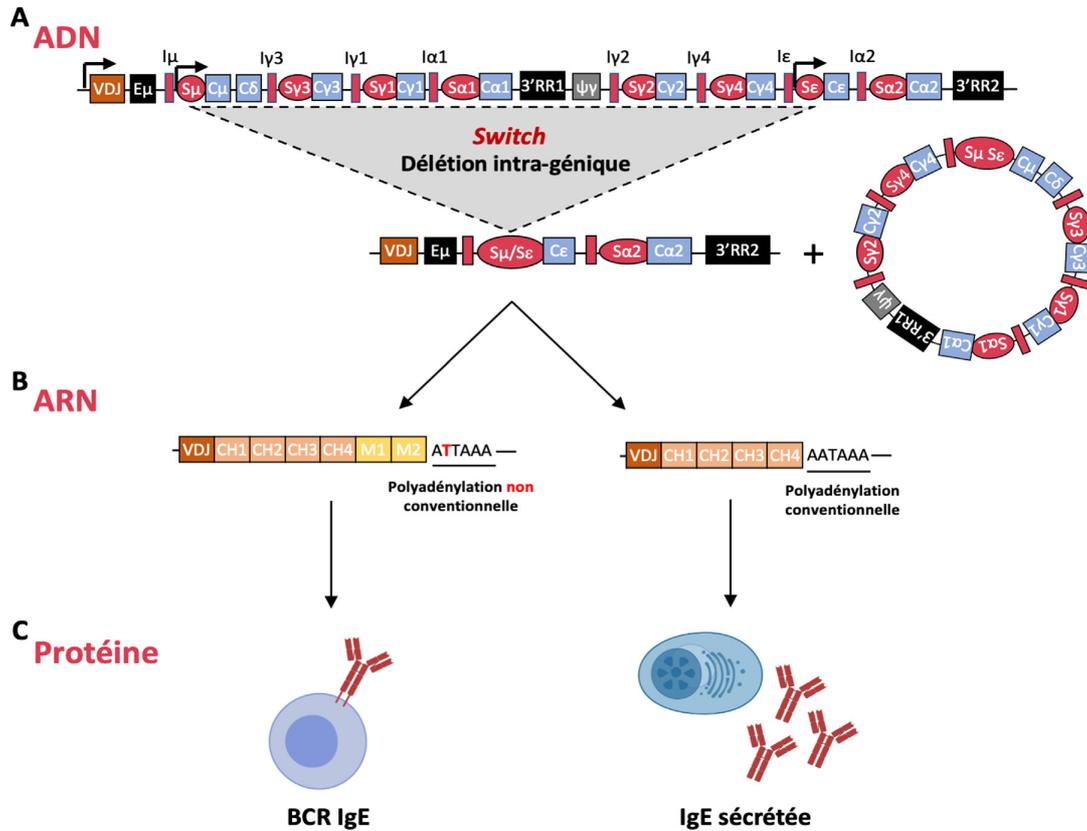


Fig. 1. Commutation de classe, transcrits et protéines IgE. A. Représentation schématique du locus de chaîne lourde d'immunoglobuline (IgH) chez l'homme. En haut le locus est représenté avant le *switch*, avec la transcription germinale induite au niveau des régions $S\mu$ et $S\epsilon$ permettant un accès à l'enzyme AID et l'initiation de cassure ADN double brin. Le *switch* induit une déletion intrachromosomique, avec la portion d'ADN intermédiaire éliminée sous forme d'épisome. B. Transcrits des IgE membranaires et sécrétés. Après recombinaison de l'ADN vers $C\epsilon$, la transcription permet la production de type d'ARNm principaux : une forme membranaire incluant les deux exons de membrane M1 et M2, et une forme sécrétée dépourvue de ces exons. Les ARNm membranaires de l'IgE contiennent des sites de polyadénylation non-conventionnels. C. Expression membranaire du BCR IgE dans les lymphocytes B et sécrétion d'IgE par les plasmocytes. Au niveau protéique la forme membranaire du BCR IgE permet un ancrage et une expression membranaire dans les lymphocytes B (et les plasmocytes à courte durée de vie), alors que la forme sécrétée permet une production d'IgE soluble par les plasmablastes et plasmocytes.

brasiliensis, le *switch* initial vers IgG1 survient au sein du centre germinatif, mais les plasmocytes IgE⁺ né d'un *switch* séquentiel apparaissent en dehors [41]. L'étude cinétique de l'affinité des Ig après immunisation montre une production rapide d'IgG1 spécifiques contrastant avec la production retardée d'IgE spécifiques, issues du *switch* séquentiel IgG1 vers IgE [41]. Les souris déficientes en IgG1 présentent un défaut de production d'IgE spécifiques n'affectant pas les IgE totales et le *switch* séquentiel semble donc la voie majeure de production des IgE de haute affinité, alors que le *switch* vers des IgE de faible affinité impliquerait surtout (mais pas seulement) des précurseurs IgM [38]. La production « naturelle » d'IgE par des cellules B T-indépendantes, ou encore celle résultant de l'activation des B immatures, pourrait aussi contribuer aux IgE de faible affinité (une hypothèse étant que celles-ci tempèrent par compétition l'effet des IgE de l'allergie) [36,42]. Outre les centres germinatifs, le *switch* IgE a aussi été décrit chez l'homme au niveau muqueux chez les patients allergiques, impliquant tant la voie directe, sur un modèle extra-folliculaire, que le *switch* séquentiel à partir de précurseurs IgG⁺, sans doute au niveau de centres germinatifs ectopiques (tertiaires) [43,44]. La production d'IgE peu mutées et de type extra-folliculaire a en particulier été récemment démontrée au plan moléculaire au niveau muqueux [45]. Enfin, la situation humaine est à l'évidence plus complexe que les modèles expérimentaux, et une étude des cellules B Ara h2-spécifiques

chez des patients allergiques à l'arachide a montré au niveau des muqueuses digestives des relations clonales entre IgM, IgD, IgG, IgA1, IgE et IgA2 de même spécificité Ara h2, indiquant un *switch* local et suggérant comme particularité des patients allergiques la présence d'IgE parmi cette filiation de variants multiples des classes d'Ig caractérisant les tissus lymphoïdes muqueux [46].

Le rôle spécifique des cellules mémoires à BCR non-IgE (en particulier IgG1 chez la souris) dans la mémoire IgE suggère en outre l'absence de lymphocytes B mémoire mIgE⁺ [47], en accord avec des caractères fonctionnels du BCR IgE que nous détaillerons plus loin.

3. Transcrits multiples d'IgE membranaire et sécrétoire

Après recombinaison vers IgE, les lymphocytes B expriment des transcrits des chaînes lourdes ϵ de forme membranaire (mIgE), contenant quatre exons constants (CH) et deux exons M1/M2 codant un domaine d'ancrage membranaire, tandis que les transcrits des plasmocytes sont dépourvus d'exons M1/M2 et codent l'IgE sécrétée (Fig. 1B et C). Il existe en fait une variété de transcrits alternativement épissés tant pour les formes sécrétés et membranaires, incluant notamment (ou pas) une séquence supplémentaire espaceur éloignant le BCR IgE de la membrane ([48] ; F. D. [49-53]). Coexisteraient ainsi chez l'homme un BCR IgE court

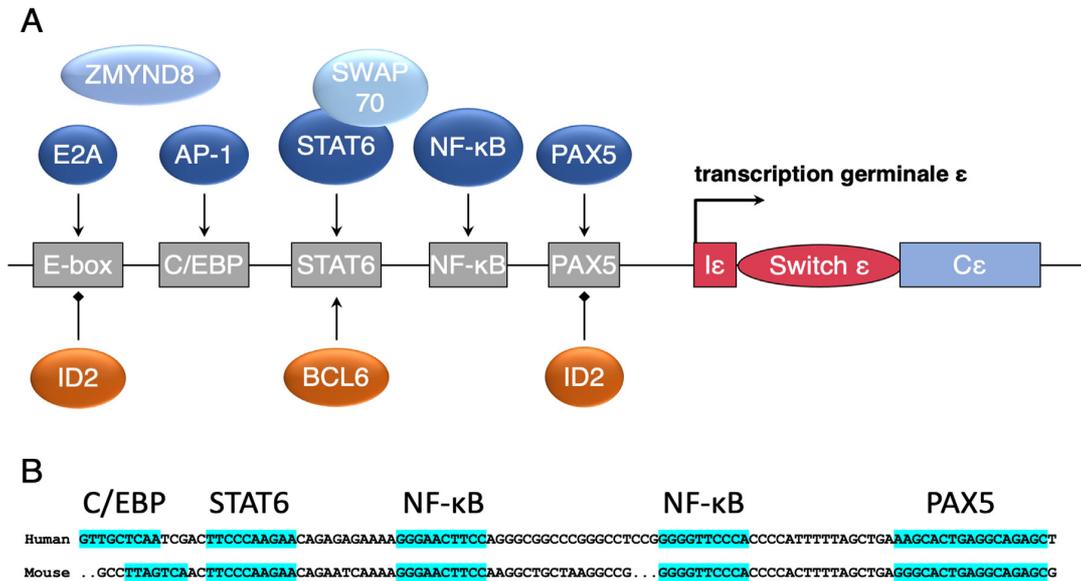


Fig. 2. Régulation positive et négative de la transcription germinale initiatrice du *switch* IgE. A. La structure schématique d'un promoteur I_{ϵ} est représentée, avec les principaux sites de liaison aux facteurs de transcription (en gris). Les facteurs permettant une activation de la transcription germinale sont représentés en bleu, et ceux inhibant (directement ou par séquestration de facteurs de transcription) cette transcription en orange. B. L'alignement des séquences humaines et murines montre la forte conservation des éléments de régulation transcriptionnelle du *switch* IgE.

et long (Facundo D. [49,50]). On notera cependant qu'il n'existe pas de données claires aujourd'hui sur la structure du BCR IgE *in vivo* chez l'homme et l'essentiel de ces données provient de l'étude de lignées cellulaires établies en culture.

Contrairement aux autres gènes d'Ig, les exons M1/M2 du gène C_{ϵ} ne sont pas suivis de sites canoniques de polyadénylation, et cette absence réduit l'efficacité de maturation des ARN messagers (ARNm) et donc le taux d'expression des mIgE, avec un rapport ARNm membranaire/ARNm sécrétoire plus faible que pour les gènes codant les IgG [54]. Cette absence particulière d'un site optimal de polyadénylation (polyA) des ARNm d'IgE membranaire est observée chez tous les mammifères pour lesquels des séquences sont disponibles [55]. Cette maturation alternative des ARNm contribue vraisemblablement à la faible expression du BCR mIgE, conférant des propriétés spécifiques aux cellules mIgE⁺. L'expression faible du BCR pourrait aussi favoriser la différenciation vers le stade plasmocytaire [56].

4. Les lymphocytes IgE⁺ sont enclins à se différencier en plasmocytes, majoritairement à vie courte

L'activation antigène-dépendante des lymphocytes B conduit classiquement une fraction des cellules concernées, vers la différenciation B mémoire [57], tandis que d'autres se différencient en plasmocytes à courte ou longue durée de vie (Fig. 3), assurant ainsi concomitamment une mémoire cellulaire, une réponse sécrétoire immédiate forte et la persistance à long terme d'une certaine production d'Ig spécifiques dans les fluides corporels.

Il a été suggéré que dans un organisme sain, l'apparition de lymphocytes B IgE⁺ survient *in vivo* de manière transitoire, à l'extérieur des centres germinatifs, avec une transformation rapide en plasmocytes [41]. Cela a également été observé dans un modèle murin transgénique où les cellules IgE⁺ sur-exprimaient Blimp-2 et devenaient des plasmocytes à courte durée de vie [58]. De même *in vitro*, les cellules B à BCR IgE deviennent rapidement des plasmocytes, que ce BCR soit endogène ou transfecté [59,60]. Une différenciation exacerbée en plasmocytes survient

aussi *in vivo* dans un modèle de souris hyper-Th2 avec un ratio plasmablastes/lymphocytes B 10 à 100 fois supérieur pour le compartiment IgE⁺ que pour les cellules IgM⁺ ou IgG1⁺ [14]. Les expériences de transfert dans des souris immunodéficientes ont montré un effondrement rapide de ces cellules IgE⁺ (à la fois des lymphocytes et des plasmocytes), sans doute lié à leur courte durée de vie.

La différenciation et l'activation normale des cellules B reposent notamment sur leur mobilité dans les centres germinatifs. Les essais de migration *in vitro* révèlent que les cellules à BCR mIgE migrent peu ou pas, en réponse aux chimiokines [61]. Dans des conditions physiologiques, cette particularité est de nature à compromettre leur entrée dans les zones optimales de survie à long terme. Il a été démontré en utilisant des BCR chimériques IgE/IgG1 (modèle murin avec exons de membrane $C_{\gamma}1$ insérés dans C_{ϵ}), que les plasmablastes à IgE ont une probabilité réduite d'atteindre les niches des plasmocytes à longue durée de vie [61]. Cependant, l'allergie à long terme implique évidemment une infusion continue d'IgE spécifique dans le sang par des plasmocytes à longue durée de vie, qui peuvent alors constituer le seul compartiment cellulaire survivant après le *switch* vers IgE. De tels plasmocytes peuvent en effet être observés *in vivo* dans la rate et la moelle osseuse [62]. Dans un modèle de *switch* forcé vers IgE, les cellules exprimant le BCR mIgE disparaissent en quelques jours après induction, alors que la sécrétion d'IgE persiste pendant des mois chez des souris humanisées [14]. Chez l'homme, la greffe de moelle osseuse peut transmettre la production d'IgE spécifique pour un allergène, probablement en transférant des plasmocytes à longue durée de vie [63]. La demi-vie de l'IgE sérique inférieure à 2 jours, assure sa disparition rapide si la sécrétion cesse. Bien que cette demi-vie soit plus élevée si l'IgE est captée par les récepteurs FcεRI, seule sa production permanente par des plasmocytes à IgE de longue durée de vie rend compte de la persistance de certaines conditions d'allergie immédiate tout au long de la vie. En outre, mais avec un certain retard après le rappel antigénique, les cellules B mémoire IgG⁺, peuvent également générer de nouvelles cellules sécrétant des IgE après *switch* séquentiel.

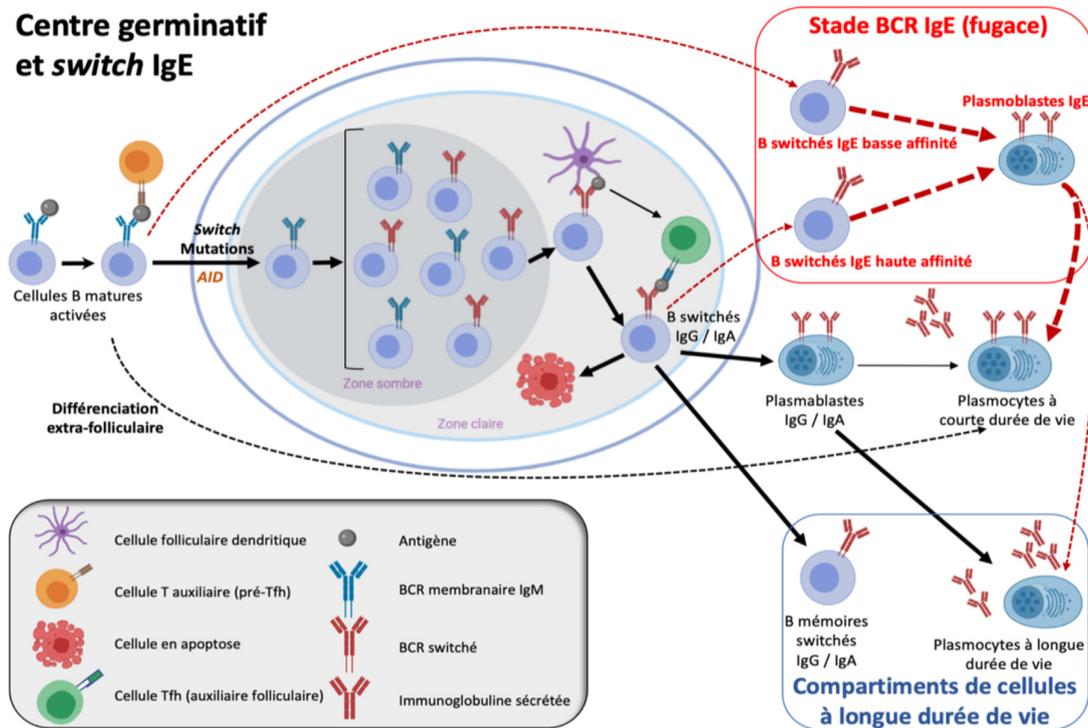


Fig. 3. Production d'IgE *in vivo*. L'activation des lymphocytes B, par les cellules folliculaires dendritiques (CFD) puis par les lymphocytes T folliculaires auxiliaires, entraîne leur prolifération au sein du centre germinatif. Dans la zone sombre les lymphocytes B augmentent leur affinité pour l'antigène par le phénomène d'hypermutation somatique, et diversifient leurs fonctions effectrices par changement de classe ou *switch*. Ils migrent ensuite dans la zone claire où les BCR les plus affins pour l'antigène sont sélectionnés, alors qu'une large fraction des cellules meurt par apoptose. Des cellules B mémoires sont alors générées pour les classes IgM, IgG et IgA, mais leur persistance reste sujette à controverse pour les IgE. En revanche, le BCR IgE induit une forte différenciation plasmocytaire, surtout à courte durée de vie.

Les acteurs principaux des réponses de type IgE à long terme semblent donc être les plasmocytes. Comme le *switch* vers IgE est très efficace *in vitro* et que de nombreuses études ont montré que les cellules switchées à IgE se différencient plus efficacement en plasmocytes qu'en lymphocytes, il reste à comprendre pourquoi les plasmocytes à IgE sont si rares *in vivo*, rendant la production d'IgE si faible (environ 1 000 fois inférieure aux IgG). La limitation de la génération de plasmocytes à IgE découle très vraisemblablement de la brève survie et de la faible mobilité du stade précurseur des lymphocytes B IgE⁺, qui constituent ainsi un goulet d'étranglement dans la génération des plasmocytes à IgE.

5. L'expression d'IgE membranaire influe fortement le devenir des lymphocytes

En conditions physiologiques, les lymphocytes à BCR IgE sont virtuellement indétectables *in vivo*, chez l'homme comme chez la souris. Ce BCR IgE est pourtant clairement indispensable aux réponses IgE et le *knock-out* (KO) murin des exons membranaires diminue de 95 % la production d'IgE sérique totale, annulant même la production d'IgE spécifique après immunisation [64]. Le remplacement de la partie intracellulaire d'IgE par celle de l'IgM diminue également la production d'IgE, ce qui suggère que cette queue intracellulaire contribue positivement à la réponse humorale IgE [64]. Dans le même registre, il a été observé que des anticorps ciblant la partie extracellulaire de l'IgE membranaire diminuent la production de l'IgE sécrétée, montrant l'importance des cellules mIgE⁺ en tant que précurseurs des plasmocytes à IgE. Une première étude *in vitro* a montré l'induction d'apoptose dans les cellules mIgE⁺ et l'inhibition de réponses IgE spécifiques chez les souris allergiques,

en utilisant un anticorps monoclonal contre le domaine extramembranaire proximal (EMPD) du BCR IgE [65]. Ces anticorps se sont avérés efficaces *in vivo*, en favorisant l'apoptose des lymphocytes mIgE⁺, en diminuant le nombre de plasmocytes à IgE et en réduisant la production d'IgE dans des modèles murins d'induction de l'asthme et d'infection par l'helminthe [66]. La baisse de la production d'IgE sécrétée et la diminution des cellules IgE⁺ ont également été obtenues en utilisant un anticorps contre l'IgE totale, ou encore un anticorps ciblant l'IgE totale et optimisé pour sa liaison au récepteur inhibiteur FcγRIIb, co-engageant donc le BCR IgE et le FcγRIIb à la surface des lymphocytes [67]. Il reste à explorer si les BCR IgE ne sont exprimés que par les lymphocytes B, comme les IgG, ou aussi sur certains plasmocytes à longue durée de vie, comme dans le cas de certains plasmocytes producteurs d'IgA ou IgM [68,69]. Dans l'ensemble, les cellules mIgE⁺ constituent donc une étape obligatoire pour les réponses IgE, mais leur très grande rareté *in vivo* complique leur étude qui nécessite des stratégies dédiées.

Au plan moléculaire, la partie intra-cytoplasmique des mIgE lie spécifiquement deux protéines intra-cytoplasmiques : HPK1 qui lie mIgE et d'autres isotopes [70] tandis que HAX1 ne lie que l'IgE [71]. La production d'IgE reste cependant inchangée dans les modèles KO correspondants [72-74]. Les deux formes de mIgE humaines ont été testées par transfection dans une lignée cellulaire, et leur pontage peut alors inhiber la croissance cellulaire (Facundo D. [49,50]). Le pontage de récepteurs mIgE chimériques exprimés dans une lignée cellulaire B mature, induit par ailleurs l'apoptose de façon caspase-dépendant en cas d'absence du domaine EMPD [75]. Il a été montré que les constructions chimériques courtes exprimées dans la lignée mature humaine Ramos recrutent l'adaptateur Grb2 vers les parties intra-cytoplasmiques de mIgE et mIgG, améliorant ainsi

la signalisation de BCR et la prolifération [76]. À elle-seule, mais plus encore en présence d'un ligand, l'expression de mIgE induit l'apoptose de la lignée cellulaire mature *Daudi* de façon caspase-dépendante [66].

Les études des cellules primaires nécessitent des protocoles à la fois sensibles et rigoureux pour bien identifier les vraies cellules mIgE⁺, dont le BCR est faiblement exprimé, sans le confondre avec la liaison passive d'IgE solubles aux récepteurs FcεR. *In vitro*, l'IL21 induit l'apoptose des cellules B IgE⁺ mais pas des cellules IgG⁺ [77]. Une forte densité des cellules IgE⁺ favorise également leur apoptose d'une façon caspase-dépendante [78]. La génération *in vitro* de structures de type « centre germinatif », où n'apparaissent que des cellules IgM⁺, IgD⁺ ou IgG⁺ suggère également que les cellules mIgE⁺ ne peuvent survivre dans ces conditions [79].

L'apoptose spontanée induite par l'expression de mIgE survient après transfection de lignées lymphoïdes B matures. De même, une tendance à l'apoptose caractérise les cellules B primaires mIgE⁺ stimulées *in vitro*, impliquant la voie mitochondriale et les caspases, elle peut être inhibée chimiquement ou par surexpression de l'anti-apoptotique BCL2. L'altération de la survie de ces cellules, résulte de plusieurs changements phénotypiques : leur mobilité est réduite, leur cytosquelette est réorganisé, l'inhibiteur d'apoptose HAX1 est délocalisé des mitochondries, le BCR IgE est constitutivement associé aux radeaux lipidiques, le programme de transcription contrôlant la mort cellulaire, le métabolisme, la signalisation et la mobilité est aussi affecté [14]. Une autre étude valide l'apoptose spontanée *in vitro* de cellules B primaires exprimant un BCR IgE de façon ectopique, confirmant que ce BCR induit la mort cellulaire activement et non par défaut de signalisation [59].

Au-delà des aspects intrinsèques, des facteurs extra-cellulaires tels que les interactions cellule-cellule, la présentation de l'antigène par les lymphocytes B aux cellules T et divers facteurs solubles pourraient influencer fortement le devenir des cellules B IgE⁺. Des méthodes et des modèles de souris ont été développées par différents laboratoires pour mieux comprendre les réponses à l'IgE.

6. Ce que nous apprennent les modèles murins sur les cellules B IgE⁺ *in vivo*

Avec les réserves qui s'imposent pour toute transposition à l'homme, de nombreux modèles « souris » concourent à donner une représentation de la physiologie des réponses IgE dans cette espèce. Un premier modèle murin de transgène (codant des IgE sécrétées) a montré l'effet d'augmentation sur les IgE sériques, sans informer sur les cellules mIgE⁺ [80]. Le remplacement de Cγ1 murin par Cε au locus IgH n'a aussi montré d'impact que sur la sécrétion d'IgE sans générer de cellules B mIgE⁺ *in vivo* [32]. Le remplacement des exons membranaires de Cε par ceux de Cγ1 augmente globalement la production d'IgE et suggère que la partie transmembranaire et intra-cellulaire d'IgE contribue à l'homéostasie des IgE *in vivo* [61]. Trois autres modèles de souris ont utilisé des rapporteurs fluorescents pour marquer les cellules IgE⁺. Le premier (M1⁺GFP) comprend un domaine EMPD IgE humain inséré dans le domaine Cε et une cassette en aval des exons membranaires, exprimée lors de la transcription de Cε dans les centres germinatifs [81]. Un deuxième modèle couple l'expression et la traduction des mIgE avec celle de la protéine fluorescente « Venus », confirmant la présence de cellules IgE⁺ dans le centre germinatif et leur biais vers la différenciation plasmocytaire à courte durée de vie [58]. Une cassette IRES-GFP insérée dans Cε a enfin montré que les cellules IgE⁺ subissaient plus d'apoptose *in vivo* et étaient moins mobiles que les cellules IgG1⁺, se cantonnant à la zone sombre du centre germinatif et limitant ainsi leur contribution à la mémoire [82].

Ces modèles suggèrent que la réponse IgE diffère des autres classes, en générant des lymphocytes à courte durée de vie, peu

mobiles. La signalisation constitutive et les modifications du programme transcriptionnel ont été montrées comme consécutives à l'expression du BCR IgE [14], rendant cruciale la question de savoir si ce BCR aux capacités autorégulatrices pourrait être aussi exprimé et agir à l'identique dans les plasmocytes de longue durée de vie. Les plasmocytes IgM⁺ ou IgA⁺ peuvent exprimer un BCR fonctionnel, et son pontage fort abrège leur survie [69]. Par analogie avec les lymphocytes B mIgE⁺, on peut supposer que pour les plasmocytes également, le BCR IgE puisse avoir un effet « toxique » même en absence d'antigène.

D'autres modèles murins exprimant mIgE indépendamment du *switch* et des facteurs environnementaux ont été développés. Ce a été inséré dans Sμ (εKI) pour forcer l'expression de BCR à IgE à la place du mIgM. Un blocage du développement des cellules B précoces en résulte, ce qui suggère un défaut dans la signalisation du pré-BCR ε ou un signal pro-apoptotique. Un modèle similaire a inséré au niveau de Sμ un Cμ humain « floxé » (c'est-à-dire pouvant être secondairement éliminé par la recombinaison *cre*) précédant un gène Cε (μεKI), permettant donc d'exprimer d'abord une IgM, qui soutient le développement B, puis une IgE après délétion de Cμ [14]. Après perte de Cμ, ces souris sécrètent de l'IgE humaine et hébergent des lymphocytes B mIgE⁺. Le taux d'IgE culmine une semaine après l'induction puis se maintient pendant des mois (indiquant la survie de plasmocytes IgE⁺), tandis que les lymphocytes B à IgE⁺ n'apparaissent que transitoirement après induction puis disparaissent rapidement après quelques jours, indépendamment de tout pontage du BCR [14]. Un autre modèle humanisé remplaçant Cγ1 par Cε, mais conservant Sγ1 et le site polyA de Cγ1 a été créé. Le niveau d'IgE humaine est plus élevé que l'IgE de souris, mais beaucoup plus faible que l'IgG1, suggérant à nouveau une sous-représentation des cellules mIgE⁺ [83].

Une étude récente a également confirmé l'apoptose spontanée des lymphocytes IgE⁺, induite par l'expression de mIgE de manière dépendante de BLNK, tandis que les mêmes cellules sont induites simultanément pour quitter le stade de la cellule B, avec un biais vers la différenciation plasmocytaire attribué aux voies de signalisation CD19 et BLNK, et dépendant des domaines extracellulaires de mIgE [60]. L'apoptose *Fas*-dépendante pourrait également amortir les réponses IgE puisque son inactivation accroît l'abondance des plasmocytes IgE et des autoanticorps IgG et IgE [84].

Enfin, une étude récente a montré que l'expression de mIgE favorise la différenciation en plasmocyte plutôt que la survie des lymphocytes mIgE⁺ même en l'absence d'antigène, en raison de l'activation constitutive des voies de signalisation Syk, CD19, BLNK, Btk et IRF4. Ce modèle a démontré un défaut prolifératif et une réponse exagérée du centre germinatif aux cellules B IgE⁺ après la perturbation de la signalisation du BCR. Les cellules B IgE⁺ ont également mal présenté l'antigène *in vivo*, ce qui pourrait expliquer une faible participation aux réponses immunitaires [60].

Pour conclure, les cellules B IgE⁺ sont très rares *in vivo*, elles peuvent être générées à court terme mais disparaissent rapidement, ne survivant éventuellement que sous la condition de plasmocytes.

7. Le « réseau IgE »

Les réponses IgE sont aussi sous le contrôle des récepteurs pour le Fcε, qui peuvent exister sous forme soluble ou ancrée aux membranes. À la surface des mastocytes, qu'elle active, la forme membranaire du FcεRI est aussi stabilisée et son expression est renforcée par la liaison avec l'IgE, en une boucle amplificatrice [84,85]. Le FcεRI participe aussi à l'élimination des IgE solubles par les cellules dendritiques et les monocytes [86]. Exprimé sur une surface cellulaire, ce récepteur peut aussi, au cours d'interactions intercellulaires, lier le BCR IgE exprimé par des lymphocytes B [87], ce qui

pourrait favoriser l'apoptose des rares cellules mIgE⁺. Ce BCR est en outre aussi reconnu par la forme soluble de FcεRII/CD23 [85]. Le KO de FcεRII augmente d'ailleurs la réponse IgE [88]. D'autres facteurs solubles comme les galectines 3 et 9 lient également l'IgE, respectivement avec faible ou forte affinité [89,90].

Il existe donc de multiples récepteurs pour les IgE, membranaires ou sécrétés, exprimés par des cellules variées (y compris les lymphocytes B eux-mêmes), qui constituent un réseau complexe d'interactions en liant à des degrés variés les complexes immuns IgE/antigène, les IgE solubles libres, de haute ou basse affinité, et éventuellement le BCR IgE, contribuant ainsi à l'homéostasie du compartiment B IgE⁺.

8. La question de la mémoire IgE

Après une immunisation primaire, plusieurs types de cellules B mémoires sont générées, y compris des cellules IgM⁺ et IgG⁺. Les réponses secondaires sont caractérisées par une différenciation plasmocytaire rapide des cellules mémoires IgG⁺, et par une réentrée de cellules mémoires IgM⁺ dans le centre germinatif pour y bénéficier d'un nouveau cycle de maturation de l'affinité [91]. Les plasmocytes à longue durée de vie établissent une mémoire soluble d'Ig en parallèle de la mémoire B, assurant deux niveaux de protection [92]. Plusieurs études ont montré que les BCR switchés, IgG, comme IgA et IgE, favorisent la différenciation plasmocytaire [56,93,94] et modulent le pool de cellules B mémoires. Comme discuté préalablement, il existe des études contradictoires sur la mémoire IgE, mais les données en faveur d'une survie persistante de cellules mémoires mIgE⁺ sont rares. À l'inverse, de nombreuses études corroborent la thèse de leur différenciation plasmocytaire accélérée. Celle-ci semble de courte durée et subit de multiples processus de contre-sélection, y compris l'apoptose. Ces contradictions pourraient résulter d'artefacts (e.g. marquages faussement positifs des cellules mIgE⁺), ou une prise en compte insuffisante des aspects cinétiques et spatiaux des réponses IgE qui sont essentiellement éphémères et limitées à des compartiments ou tissus spécifiques, éventuellement peu accessibles aux investigations.

De nombreuses preuves indirectes suggèrent donc l'absence d'accumulation de cellules mIgE⁺ dans le compartiment des lymphocytes mémoires. Le *switch* séquentiel IgE après rappel antigénique, reconstruit donc à façon un compartiment mémoire IgE, caractérisé par sa capacité de production d'IgE à haute affinité, avec une réponse IgE cellulaire à nouveau transitoire.

L'expression d'IgE membranaire modifie fortement le phénotype des lymphocytes B. La queue intracellulaire IgE contribue au moins pour partie à ces modifications, via une signalisation BCR spécifique, notamment en séquestrant la protéine anti-apoptotique HAX1, et par le recrutement de l'adaptateur Grb2. Les domaines transmembranaires et extra-membranaires contribuent aussi sans doute à des interactions spécifiques avec Ig-α, Ig-β, CD19 et autres molécules associées. La partie extracellulaire de l'IgE est très flexible [95,96] et semble en capacité d'interagir avec des récepteurs spécifiques. Les domaines Cε concernent ainsi montré leur rôle dans la fonction spécifique du BCR IgE, promouvant une différenciation plasmocytaire rapide associée à une faible prolifération, une internalisation spontanée après inclusion aux radeaux lipidiques de mIgE, le tout étant susceptible d'affecter la présentation de l'antigène et la survie cellulaire. Ces effets, bien documentés dans les lymphocytes mIgE⁺, pourraient en outre impacter les plasmocytes maintenant l'expression d'un BCR IgE.

9. Contrôle thérapeutique du *switch* IgE des lymphocytes B

Les biothérapies ont aujourd'hui pris une place importante dans le domaine de l'allergie en particulier avec l'utilisation des anticorps

monoclonaux [97]. Un anticorps comme l'omalizumab, anti-IgE, permet ainsi d'agir directement sur le produit issu du *switch*, l'IgE. Des moyens thérapeutiques d'agir en amont, sur les événements de *switch*, sont disponibles contre des cibles extrinsèques au lymphocyte B, s'appuyant sur la dépendance T du *switch* IgE, et agissant sur la polarisation des réponses T antigène-spécifiques. Alors que les signaux qui favorisent une polarisation Th2 ou encore Th9 peuvent augmenter la production d'IgE, une polarisation Th1 ou TREG aura en règle générale l'effet contraire. On peut en particulier cibler l'IL13 (avec le lebrikizumab ou le tralokinumab), l'IL5 (par le mepolizumab ou le reslizumab) ou son récepteur (par le benralizumab), ou encore à la fois les IL4 et IL13 (par le dupilumab), et d'autres biothérapies sont en cours de validation, notamment contre l'IL31 (nemolizumab) ou la lymphopoiétine lymphoïde stromale (TSLP). Des petites molécules actives sur la polarisation T en ciblant la voie JAK/STAT sont aussi en essai clinique [98]. Plus classiquement lors des désensibilisations réalisées chez les malades allergiques, la dose d'antigène utilisée et la voie d'administration visent aussi à cette modulation de la polarisation des réponses T. Un traitement au dupilumab, inhibant les signaux IL4/IL13 dans l'asthme, entraîne aussi indirectement un effet sur les réponses B et une diminution de la production d'IgE [99] en agissant de façon extrinsèque pour bloquer la promotion T-dépendante des réponses IgE.

Quant à une action directe sur la lignée B, des options non sélectives de déplétion globale des lymphocytes B (par le rituximab) ou des plasmocytes (par le daratumumab) peuvent constituer une option thérapeutique vis-à-vis d'allergies sévères, mais leur absence de sélectivité expose bien sûr à de nombreux effets secondaires [100]. En dehors d'une déplétion non sélective, il n'existe pas aujourd'hui de moyen thérapeutique validé pour agir de façon directe sur la cellule B et moduler le *switch* vers la classe IgE de manière B intrinsèque. On notera cependant que dans des modèles expérimentaux, la mécanistique du *switch* elle-même a pu être bloquée en utilisant un ligand de l'ADN G4 (le RHP54), diminuant fortement le *switch* IgE *in vitro* et les manifestations d'inflammation respiratoire associées [101]. Le super-enhancer 3'RR peut aussi être ciblé par des petites molécules comme les BET-inhibiteurs avec une excellente inhibition du *switch* IgE des lymphocytes B *in vitro*, mais l'action globale d'une telle thérapie sur d'autres super-enhancers les disqualifie pour l'utilisation *in vivo* dans cette application, car ils révèlent aussi alors un effet pro-Th2 [102]. Ces données récentes ouvrent donc de nouvelles pistes thérapeutiques à explorer.

Au-delà du *switch* on peut envisager de cibler directement les plasmocytes producteurs d'IgE. Une stratégie innovante basée sur l'utilisation d'oligonucléotide antisens vient ainsi de démontrer la possibilité de forcer l'expression du BCR IgE dans les plasmocytes en ciblant le site de polyadénylation l'ARNm IgE sécrété, favorisant l'expression de l'ARNm membranaire et *in fine* induisant l'apoptose de ces cellules [103].

10. Conclusion

La production d'IgE est étroitement régulée, du *switch* à la différenciation plasmocytaire. Les nombreux modèles élaborés pour l'étude de ces cellules mIgE⁺ *in vivo*, convergent vers la démonstration de la rareté de ces cellules, générées en faible fréquence, pendant de courts intervalles et pour un temps de survie compté, même si les anomalies de polarisation du microenvironnement cytokinique peuvent stimuler cet influx de cellules chez les sujets allergiques [104]. Les restrictions de l'entrée dans la production des IgE existent tant au niveau du gène Cε lui-même (région Sε suboptimale, absence de site canonique de polyadénylation), que des signaux auto-inhibiteurs liés à l'expression du BCR IgE, agissant sur la survie cellulaire, ou encore la mobilité et constitutivement transmis par la forme membranaire IgE. Ces mécanismes multiples,

présents même en l'absence d'antigène, placent le lymphocyte B mIgE⁺ comme un acteur furtif, dont seule la production répétée, liée au contexte cytokinique et au microenvironnement de la réponse immune, peut sans doute être responsable d'excès d'initiation ou de répétition des réponses IgE, notamment par *switch* séquentiel de lymphocytes B mémoires portant un BCR IgG. Le maintien d'un taux sérique conséquent d'IgE à haute affinité (seules capables de provoquer des réponses d'hypersensibilité) repose ensuite sur la taille du réservoir de plasmocytes IgE ayant survécu à l'issue des réponses antigéniques, et porteurs d'une réelle mémoire IgE immédiatement disponible et maintenue à long terme.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 2000;102:553-63.
- [2] Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 1995;16:392-8, [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5).
- [3] Capron M, Capron A. Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science* 1994;264:1876-7, <http://dx.doi.org/10.1126/SCIENCE.8009216>.
- [4] Palm NW, Rosenstein RK, Yu S, Schenten DD, Florsheim E, Medzhitov R. Bee venom phospholipase A2 induces a primary type 2 response that is dependent on the receptor ST2 and confers protective immunity. *Immunity* 2013;39:976-85, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.006>.
- [5] Heyman B. Antibodies as natural adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol* 2014;382:201-19, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-07911-0_9.
- [6] Cogné M, Ballet JJ, Schmitt C, Bizzini B. Total and IgE antibody levels following booster immunization with aluminum adsorbed and nonadsorbed tetanus toxoid in humans. *Ann Allergy* 1985;54:148-51.
- [7] Nigro EA, Brini AT, Yenagi VA, Ferreira LM, Achatz-Straussberger G, Ambrosi A, et al. Cutting edge: IgE plays an active role in tumor immunosurveillance in mice. *J Immunol* 2016;197:2583-8, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1601026>.
- [8] Sanjuan MA, Sagar D, Kolbeck R. Role of IgE in autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:1651-61, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.04.007>.
- [9] Butt D, Chan TD, Bourne K, Hermes JR, Nguyen A, Statham A, et al. FAS Inactivation Releases Unconventional Germinal Center B Cells that Escape Antigen Control and Drive IgE and Autoantibody Production. *Immunity* 2015;42:890-902, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.010>.
- [10] Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* 2003;3:721-32, <http://dx.doi.org/10.1038/nri1181>.
- [11] Curotto de Lafaille MA, Muriglan S, Sunshine MJ, Lei Y, Kutchukhidze N, Furtado GC, et al. Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J Exp Med* 2001;194:1349-59, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.194.9.1349>.
- [12] Wade-Vallance AK, Allen CDC. Intrinsic and extrinsic regulation of IgE B cell responses. *Curr Opin Immunol* 2021;72:221-9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2021.06.005>.
- [13] Laffleur B, Debeaupuis O, Dalloul Z, Cogné M. B cell intrinsic mechanisms constraining IgE memory. *Front Immunol* 2017;8:1277, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.01277>.
- [14] Laffleur B, Duchez S, Tarte K, Denis-Lagache N, Péron S, Carrion C, et al. Self-restrained B cells arise following membrane IgE expression. *Cell Rep* 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.023>.
- [15] Laffleur B, Lim J, Zhang W, Chen Y, Pefanis E, Bizarro J, et al. Noncoding RNA processing by DIS3 regulates chromosomal architecture and somatic hypermutation in B cells. *Nat Genet* 2021;53:230-42, <http://dx.doi.org/10.1038/s41588-020-00772-0>.
- [16] Nair L, Zhang W, Laffleur B, Jha MK, Lim J, Lee H, et al. Mechanism of noncoding RNA-associated N6-methyladenosine recognition by an RNA processing complex during IgH DNA recombination. *Mol Cell* 2021, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.037> [S1097-2765(21)00615-8].
- [17] Dalloul I, Boyer F, Dalloul Z, Pignarre A, Caron G, Fest T, et al. Locus suicide recombination actively occurs on the functionally rearranged IgH allele in B cells from inflamed human lymphoid tissues. *PLoS Genet* 2019;15:e1007721, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1007721>.
- [18] Le Noir S, Boyer F, Lecardeur S, Brousse M, Oruc Z, Cook-Moreau J, et al. Functional anatomy of the immunoglobulin heavy chain 3' super-enhancer needs not only core enhancer elements but also their unique DNA context. *Nucleic Acids Res* 2017;45:5829-37, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkx203>.
- [19] Péron S, Laffleur B, Denis-Lagache N, Cook-Moreau J, Tinguely A, Delpy L, et al. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 2012;336:931-4, <http://dx.doi.org/10.1126/science.1218692>.
- [20] Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, et al. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol* 2011;110:27-70, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8>.
- [21] Rouaud P, Saintamand A, Saad F, Carrion C, Lecardeur S, Cogné M, et al. Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germ-line deletion of the IgH 3' regulatory region. *J Exp Med* 2014;211:975-85, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20131385>.
- [22] Laffleur B, Basu U, Lim J. RNA exosome and non-coding RNA-coupled mechanisms in AID-mediated genomic alterations. *J Mol Biol* 2017;429:3230-41, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.12.021>.
- [23] Wuerffel R, Wang L, Grigera F, Manis J, Selsing E, Perlot T, et al. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* 2007;27:711-22, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.007>.
- [24] Zhang X, Zhang Y, Ba Z, Kyritsis N, Casellas R, Alt FW. Fundamental roles of chromatin loop extrusion in antibody class switching. *Nature* 2019, <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1723-0>.
- [25] Shen C-H, Stavnezer J. Activation of the mouse Ig Germline ϵ promoter by IL-4 is dependent on AP-1 transcription factors. *J Immunol* 2001;166:411-23, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.411>.
- [26] Audzevich T, Pearce G, Breucha M, Günal G, Jessberger R. Control of the STAT6-BCL6 Antagonism by SWAP-70 Determines IgE Production. *J Immunol* 2013;190:4946-55, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1203014>.
- [27] Kashiwada M, Levy DM, McKeag L, Murray K, Schröder AJ, Canfield SM, et al. IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *PNAS* 2010;107:821-6.
- [28] Delgado-Benito V, Rosen DB, Wang Q, Gazumyan A, Pai JA, Oliveira TY, et al. The chromatin reader ZMYND8 regulates igh enhancers to promote immunoglobulin class switch recombination. *Mol Cell* 2018;72, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.042> [636-649.e8].
- [29] Tong P, Wesemann DR. Molecular mechanisms of IgE class switch recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015;388:21-37, http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-13725-4_2.
- [30] Schaffer A, Kim EC, Wu X, Zan H, Testoni L, Salamon S, et al. Selective inhibition of class switching to IgG and IgE by recruitment of the HoxC4 and Oct-1 homeodomain proteins and Ku70/Ku86 to newly identified ATTT cis-elements. *J Biol Chem* 2003;278:23141-50, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M212952200>.
- [31] Hackney JA, Misaghi S, Senger K, Garris C, Sun Y, Lorenzo MN, et al. DNA targets of AID evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv Immunol* 2009;101:163-89, [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)01005-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776(08)01005-5).
- [32] Lübben W, Turqueti-Neves A, Okhrimenko A, Stöberl C, Schmidt V, Pfeiffer K, et al. IgE knock-in mice suggest a role for high levels of IgE in basophil-mediated active systemic anaphylaxis. *Eur J Immunol* 2013;43:1231-42, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201242675>.
- [33] Misaghi S, Senger K, Sai T, Qu Y, Sun Y, Hamidzadeh K, et al. Polyclonal hyper-IgE mouse model reveals mechanistic insights into antibody class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:15770-5, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1221661110>.
- [34] Dayal S, Nedbal J, Hobson P, Cooper AM, Gould HJ, Gellert M, et al. High resolution analysis of the chromatin landscape of the IgE switch region in human B cells. *PLOS ONE* 2011;6:e24571, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0024571>.
- [35] Kuwabara N, Kondo N, Fukutomi O, Agata H, Orii T. Relationship between interferon-gamma, interleukin-4 and IgE production of lymphocytes from hen's egg-sensitive patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1995;5:198-204.
- [36] Wesemann DR, Magee JM, Boboila C, Calado DP, Gallagher MP, Portuguese AJ, et al. Immature B cells preferentially switch to IgE with increased direct S_{μ} to S_{ϵ} recombination. *J Exp Med* 2011;208:2733-46, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20111155>.
- [37] Yoshida K, Matsuoka M, Usuda S, Mori A, Ishizaka K, Sakano H. 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* 1990;87:7829-33, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.20.7829>.
- [38] Xiong H, Dolpady J, Wabl M, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J Exp Med* 2012;209:353-64, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20111941>.
- [39] Wu YL, Stubbington MJT, Daly M, Teichmann SA, Rada C. Intrinsic transcriptional heterogeneity in B cells controls early class switching to IgE. *J Exp Med* 2016;214:183-96, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20161056>.
- [40] He J-S, Subramaniam S, Narang V, Srinivasan K, Saunders SP, Carbajo D, et al. IgG1 memory B cells keep the memory of IgE responses. *Nat Commun* 2017;8:641, <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00723-0>.
- [41] Erazo A, Kutchukhidze N, Leung M, Christ APG, Urban JF, Curotto de Lafaille MA, et al. Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity* 2007;26:191-203, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2006.12.006>.
- [42] McCoy KD, Harris NL, Diener P, Hatak S, Odermatt B, Hangartner L, et al. Natural IgE production in the absence of MHC Class II cognate help. *Immunity* 2006;24:329-39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.013>.

- [43] Cameron L, Gounni AS, Frenkiel S, Lavigne F, Vercelli D, Hamid Q. S epsilon S mu and S epsilon S gamma switch circles in human nasal mucosa following ex vivo allergen challenge: evidence for direct as well as sequential class switch recombination. *J Immunol* 2003;171:3816–22, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.171.7.3816>.
- [44] Gould HJ, Wu Y-CB. IgE repertoire and immunological memory: compartmental regulation and antibody function. *Int Immunol* 2018;30:403–12, <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/dxy048>.
- [45] Corrado A, Ramonell RP, Woodruff MC, Tipton C, Wise S, Levy J, et al. Extrafollicular IgD+ B cells generate IgE antibody secreting cells in the nasal mucosa. *Mucosal Immunol* 2021;14:1144–59, <http://dx.doi.org/10.1038/s41385-021-00410-w>.
- [46] Hoh RA, Joshi SA, Lee J-Y, Martin BA, Varma S, Kwok S, et al. Origins and clonal convergence of gastrointestinal IgE+ B cells in human peanut allergy. *Sci Immunol* 2020;5, <http://dx.doi.org/10.1126/sciimmunol.aay4209> [eaay4209].
- [47] Turqueti-Neves A, Otte M, Schwartz C, Schmitt MER, Lindner C, Pabst O, et al. The extracellular domains of IgG1 and T Cell-Derived IL-4/IL-13 are critical for the polyclonal memory IgE response in vivo. *PLoS Biol* 2015;13:e1002290, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1002290>.
- [48] Batista FD, Efremov DG, Tkach T, Burrone OR. Characterization of the human immunoglobulin epsilon mRNAs and their polyadenylation sites. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4805–11.
- [49] Batista FD, Anand S, Presani G, Efremov DG, Burrone OR. The two membrane isoforms of human IgE assemble into functionally distinct B cell antigen receptors. *J Exp Med* 1996;184:2197–206, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.184.6.2197>.
- [50] Batista FD, Efremov DG, Burrone OR. Characterization of a second secreted IgE isoform and identification of an asymmetric pathway of IgE assembly. *PNAS* 1996;93:3939–404.
- [51] Peng C, Davis FM, Sun LK, Liou RS, Kim YW, Chang TW. A new isoform of human membrane-bound IgE. *J Immunol* 1992;148:129–36.
- [52] Zhang K, Max EE, Cheah HK, Saxon A. Complex alternative RNA splicing of epsilon-immunoglobulin transcripts produces mRNAs encoding four potential secreted protein isoforms. *J Biol Chem* 1994;269:31322.
- [53] Zhang K, Saxon A, Max EE. Two unusual forms of human immunoglobulin E encoded by alternative RNA splicing of epsilon heavy chain membrane exons. *J Exp Med* 1992;176:233–43, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.176.1.233>.
- [54] Karnowski A, Achatz-Straussberger G, Klockenbusch C, Achatz G, Lamers MC. Inefficient processing of mRNA for the membrane form of IgE is a genetic mechanism to limit recruitment of IgE-secreting cells. *Eur J Immunol* 2006;36:1917–25, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200535495>.
- [55] Wu PC, Chen J-B, Kawamura S, Roos C, Merker S, Shih C-C, et al. The IgE gene in primates exhibits extraordinary evolutionary diversity. *Immunogenetics* 2012;64:279–87, <http://dx.doi.org/10.1007/s00251-011-0586-9>.
- [56] Martin SW, Goodnow CC. Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nat Immunol* 2002;3:182–8, <http://dx.doi.org/10.1038/ni752>.
- [57] Phan TG, Tangye SG. Memory B cells: total recall. *Curr Opin Immunol* 2017;45:132–40, <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.005>.
- [58] Yang Z, Sullivan BM, Allen CDC. Fluorescent in vivo detection reveals that IgE(+) B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition. *Immunity* 2012;36:857–72, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.02.009>.
- [59] Haniuda K, Fukao S, Kodama T, Hasegawa H, Kitamura D. Autonomous membrane IgE signaling prevents IgE-memory formation. *Nat Immunol* 2016;17:1109–17, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3508>.
- [60] Yang Z, Robinson MJ, Chen X, Smith GA, Taunton J, Liu W, et al. Regulation of B cell fate by chronic activity of the IgE B cell receptor. *Elife* 2016;5:e21238, <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.21238>.
- [61] Achatz-Straussberger G, Zaborsky N, Königsberger S, Luger EO, Lamers M, Cramer R, et al. Migration of antibody secreting cells towards CXCL12 depends on the isotype that forms the BCR. *Eur J Immunol* 2008;38:3167–77, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200838456>.
- [62] Luger EO, Fokuhl V, Wegmann M, Abram M, Tillack K, Achatz G, et al. Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.06.047> [819–826.e4].
- [63] Hallstrand TS, Sprenger JD, Agosti JM, Longton GM, Witherspoon RP, Henderson Jr WR. Long-term acquisition of allergen-specific IgE and asthma following allogeneic bone marrow transplantation from allergic donors. *Blood* 2004;104:3086–90, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-05-1775>.
- [64] Achatz G, Nitschke L, Lamers MC. Effect of Transmembrane and Cytoplasmic Domains of IgE on the IgE Response. *Science* 1997;276:409–11, <http://dx.doi.org/10.1126/science.276.5311.409>.
- [65] Feichtner S, Inführ D, Achatz-Straussberger G, Schmid D, Karnowski A, Lamers M, et al. Targeting the extracellular membrane-proximal domain of membrane-bound IgE by passive immunization blocks IgE synthesis in vivo. *J Immunol* 2008;180:5499–505.
- [66] Brightbill HD, Jeet S, Lin Z, Yan D, Zhou M, Tan M, et al. Antibodies specific for a segment of human membrane IgE deplete IgE-producing B cells in humanized mice. *J Clin Invest* 2010;120:2218–29, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI40141>.
- [67] Cemerski S, Chu SY, Moore GL, Muchhal US, Desjarlais JR, Szymkowski DE. Suppression of mast cell degranulation through a dual-targeting tandem IgE-IgG Fc domain biologic engineered to bind with high affinity to FcγRIIb. *Immunol Lett* 2012;143:34–43, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2012.01.008>.
- [68] Blanc P, Moro-Sibilot L, Barthly L, Jagot F, This S, de Bernard S, et al. Mature IgM-expressing plasma cells sense antigen and develop competence for cytokine production upon antigenic challenge. *Nat Commun* 2016;7:13600, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms13600>.
- [69] Pinto D, Montani E, Bolli M, Garavaglia G, Sallusto F, Lanzavecchia A, et al. A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood* 2013;121:4110–4, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-09-459289>.
- [70] Geisberger R, Prlc M, Achatz-Straussberger G, Oberndorfer I, Luger E, Lamers M, et al. Phage display based cloning of proteins interacting with the cytoplasmic tail of membrane immunoglobulins. *Dev Immunol* 2002;9:127–34, <http://dx.doi.org/10.1080/1044667031000137584>.
- [71] Oberndorfer I, Schmid D, Geisberger R, Achatz-Straussberger G, Cramer R, Lamers M, et al. HS1-associated protein X-1 interacts with membrane-bound IgE: impact on receptor-mediated internalization. *J Immunol* 2006;177:1139–45, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.1139>.
- [72] Königsberger S, Peckl-Schmid D, Zaborsky N, Patzak I, Kiefer F, Achatz G. HPK1 associates with SKAP-HOM to negatively regulate Rap1-Mediated B-Lymphocyte adhesion. *PLOS ONE* 2010;5:e12468, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0012468>.
- [73] Peckl-Schmid D, Wolkerstorfer S, Königsberger S, Achatz-Straussberger G, Feichtner S, Schwaiger E, et al. HAX1 deficiency: impact on lymphopoiesis and B-cell development. *Eur J Immunol* 2010;40:3161–72, <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200940221>.
- [74] Shui J-W, Boomer JS, Han J, Xu J, Dement GA, Zhou G, et al. Hematopoietic progenitor kinase 1 negatively regulates T cell receptor signaling and T cell-mediated immune responses. *Nat Immunol* 2007;8:84–91, <http://dx.doi.org/10.1038/ni1416>.
- [75] Poggianella M, Bestagno M, Burrone OR. 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* 2006;177:3597–605, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3597>.
- [76] Engels N, König LM, Heemann C, Lutz J, Tsubata T, Griep S, et al. Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nat Immunol* 2009;10:1018–25, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1764>.
- [77] Harada M, Magara-Koyanagi K, Watarai H, Nagata Y, Ishii Y, Kojo S, et al. IL-21-induced Bepsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J Exp Med* 2006;203:2929–37, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20062206>.
- [78] Babah D, Conrad DH. Effect of cell density on in vitro mouse immunoglobulin E production. *Immunology* 2002;106:503–10, <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01435.x>.
- [79] Nojima T, Haniuda K, Moutai T, Matsudaira M, Mizokawa S, Shiratori I, et al. In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nat Commun* 2011;2:465, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1475>.
- [80] Matsuoka K, Taya C, Kubo S, Toyama-Sorimachi N, Kitamura F, Ra C, et al. Establishment of antigen-specific IgE transgenic mice to study pathological and immunobiological roles of IgE in vivo. *Int Immunol* 1999;11:987–94, <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/11.6.987>.
- [81] Talay O, Yan D, Brightbill HD, Straney EEM, Zhou M, Ladi E, et al. IgE+ memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nat Immunol* 2012;13:396–404, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2256>.
- [82] He J-S, Meyer-Hermann M, Xiangyang D, Zuan LY, Jones LA, Ramakrishna L, et al. The distinctive germinal center phase of IgE+ B lymphocytes limits their contribution to the classical memory response. *J Exp Med* 2013;210:2755–71, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20131539>.
- [83] Lu CS, Hung AF, Lin CJ, Chen JB, Chen C, Shiung YY, et al. Generating allergen-specific human IgEs for immunoassays by employing human ε gene knockin mice. *Allergy* 2015;70:384–90, <http://dx.doi.org/10.1111/all.12572>.
- [84] Yamaguchi M, Lantz CS, Oettgen HC, Katona IM, Fleming T, Miyajima I, et al. IgE enhances mouse mast cell FcεRI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med* 1997;185:663–72, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.185.4.663>.
- [85] Hibbert RG, Teriete P, Grundy GJ, Beavil RL, Reljic R, Holers VM, et al. The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21. *J Exp Med* 2005;202:751–60, <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20050811>.
- [86] Greer AM, Wu N, Putnam AL, Woodruff PG, Wolters P, Kinet J-P, et al. Serum IgE clearance is facilitated by human FcεRI internalization. *J Clin Invest* 2014;124:1187–98, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI68964>.
- [87] Vangelista L, Soprana E, Cesco-Gaspere M, Mandiola P, Di Lullo G, Fucci RN, et al. Membrane IgE binds and activates FcεRI in an antigen-independent manner. *J Immunol* 2005;174:5602–11, <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5602>.
- [88] Yu P, Kosco-Vilbois M, Richards M, Köhler G, Lamers MC. Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* 1994;369:753–6, <http://dx.doi.org/10.1038/369753a0>.
- [89] Niki T, Tsutsui S, Hirose S, Aradono S, Sugimoto Y, Takeshita K, et al. Galectin-9 is a high affinity IgE-binding lectin with anti-allergic effect by blocking IgE-antigen complex formation. *J Biol Chem* 2009;284:32344–52, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.035196>.
- [90] Platzer B, Rüter F, van der Mee J, Fiebigler E. Soluble IgE receptors—elements of the IgE network. *Immunol Lett* 2011;141:36–44, <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2011.08.004>.

- [91] Dogan I, Bertocci B, Vilmont V, Delbos F, Mégret J, Storck S, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* 2009;10:1292–9, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1814>.
- [92] Akkaya M, Kwak K, Pierce SK. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol* 2020;20:229–38, <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-019-0244-2>.
- [93] Duchez S, Amin R, Cogné N, Delpy L, Sirac C, Pascal V, et al. 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* 2010;107:3064–9, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0912393107>.
- [94] Gitlin AD, von Boehmer L, Gazumyan A, Shulman Z, Oliveira TY, Nussenzweig MC. Independent roles of switching and hypermutation in the development and persistence of B lymphocyte memory. *Immunity* 2016;44:769–81, <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2016.01.011>.
- [95] Drinkwater N, Cossins BP, Keeble AH, Wright M, Cain K, Hailu H, et al. Human immunoglobulin E flexes between acutely bent and extended conformations. *Nat Struct Mol Biol* 2014;21:397–404, <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2795>.
- [96] Wurzburg BA, Jardetzky TS. Conformational flexibility in immunoglobulin E-Fc 3-4 revealed in multiple crystal forms. *J Mol Biol* 2009;393:176–90, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.08.012>.
- [97] Pelaia C, Crimi C, Vatrella A, Tinello C, Terracciano R, Pelaia G. Molecular targets for biological therapies of severe asthma. *Front Immunol* 2020;11:603312, <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.603312>.
- [98] Ferreira S, Guttman-Yassky E, Torres T. Selective JAK1 inhibitors for the treatment of atopic dermatitis: focus on upadacitinib and abrocitinib. *Am J Clin Dermatol* 2020;21:783–98, <http://dx.doi.org/10.1007/s40257-020-00548-6>.
- [99] Corren J, Castro M, O'Riordan T, Hanania NA, Pavord ID, Quirce S, et al. Dupilumab efficacy in patients with uncontrolled, moderate-to-severe allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2020;8:516–26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaip.2019.08.050>.
- [100] Blankestijn MA, van de Donk NWCJ, Sasser K, Knulst AC, Otten HG. Could daratumumab be used to treat severe allergy? *J Allergy Clin Immunol* 2017;139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.955> [1677-1678.e3].
- [101] Dalloul Z, Chenuet P, Dalloul I, Boyer F, Aldigier J-C, Laffleur B, et al. G-quadruplex DNA targeting alters class-switch recombination in B cells and attenuates allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2018, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2018.06.011>.
- [102] Dalloul Z, Best M, Chenuet P, Dalloul I, Le Noir S, Togbé D, et al. Bromodomain and extraterminal (BET) protein inhibition of IgG/IgE production in murine B cells is counter-balanced by a strong Th2 bias. *Clin Transl Immunology* 2021;10:e1280, <http://dx.doi.org/10.1002/cti2.1280>.
- [103] Marchalot A, Horiot C, Lambert J-M, Carrion C, Oblet C, Pollet J, et al. Targeting IgE polyadenylation signal with antisense oligonucleotides decreases IgE secretion and plasma cell viability. *J Allergy Clin Immunol* 2021, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2021.09.039> [S0091-6749(21)01680-8. Online ahead of print].
- [104] Ober C, Yao T-C. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev* 2011;242:10–30, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01029.x>.

Édition génomique de la lignée B en vue de la sécrétion d'anticorps thérapeutiques

L'immunothérapie a connu des succès retentissants, d'abord avec la démocratisation en clinique des anticorps monoclonaux (mAb), puis plus récemment avec la mise au point de stratégies d'immunothérapie adoptive basées sur des cellules T modifiées génétiquement pour acquérir une nouvelle spécificité antigénique *via* l'expression d'un « chimeric antigen receptor » (CAR). Jusqu'à présent cette ingénierie génétique se faisait de manière aléatoire à l'aide de vecteurs viraux. De par leur simplicité et leur efficacité de ciblage, les méthodes CRISPR/Cas 9 ont complètement rebattu les cartes du jeu de l'édition du génome. Ces approches en plein essor sont de mieux en mieux maîtrisées et se diversifient ainsi quant aux méthodes, aux récepteurs exprimés, et aux lignées « éditées », permettant aujourd'hui d'envisager l'intérêt d'une production de molécules thérapeutiques recombinantes par des cellules B reformatées. Leur capacité de différenciation en plasmocytes à longue durée de vie ou en cellules B mémoires pourrait en effet assurer tant la production permanente d'une grande quantité d'anticorps, que la surveillance immunitaire de l'hôte *via* des cellules B mémoires éditées pour leur BCR. Un autre atout de cellules B porteuses d'un BCR édité tiendrait à leur capacité de remanier leurs gènes d'immunoglobulines (Ig) pour notamment induire la commutation de classe isotypique.

Dans ce travail, nous avons cherché à exploiter ces nombreuses propriétés, d'une part en validant l'expression et la fonctionnalité d'un nouveau format de mAb simple chaîne, propre à s'exprimer *via* l'insertion d'une cassette génétique unique, et d'autre part en diversifiant nos stratégies d'édition à l'aide de l'outil CRISPR/Cas9. Nous avons choisi pour ces différentes stratégies de cibler deux loci s'exprimant fortement dans les cellules B humaines (IgH et JCHAIN) afin d'obtenir la sécrétion de molécules thérapeutiques. Par ce type d'approche nous avons, par intégration de notre cassette réussi à induire l'expression d'Ig de spécificité anti-HER2 ou anti-CD20, en particulier sous forme switchée IgA2. Dans le contexte de la crise COVID, nous avons également développé une stratégie de switch induit vers la classe des IgA2 appliquée à un hybridome spike-spécifique (afin d'obtenir l'expression de cette classe d'Ig importante pour l'immunité muqueuse).

La validation *in vivo* d'une immunothérapie basée sur l'ingénierie des cellules B nécessite, pour pouvoir bénéficier de tests pré-cliniques, la mise au point d'un modèle murin adapté. Un aspect important de ce travail de thèse a donc aussi consisté en l'établissement des meilleures conditions d'implantation de cellules B humaines chez une souris immunodéficiente et en l'élaboration *in vivo* de modèles tumoraux CD20 humain⁺ ou HER2⁺.

Mots-clés : CRISPR/Cas 9, cellules B humaines, Immunoglobulines, IgA, modèle murin

Genomic editing of the B cells in order to obtain therapeutic antibody secretion

Immunotherapy has had resounding success, first with the generalization of monoclonal antibodies (mAb) in the clinic, then more recently with the development of adoptive immunotherapy strategies based on T cells genetically modified to acquire a new antigenic specificity *via* the expression of a "chimeric antigen receptor" (CAR). Until now, this genetic engineering was done randomly using viral vectors. Due to their simplicity and targeting efficiency, CRISPR/Cas9 methods have completely changed the game of genome editing. These fast-growing approaches are increasingly well mastered and are diversifying in terms of methods, expressed receptors, and "edited" cell lines, making it possible to envisage the production of recombinant therapeutic molecules by reformatted B cells. Their capacity to differentiate into long-lived plasma cells or memory B cells could ensure both the permanent production of a large quantity of antibodies and the immune surveillance of the host *via* memory B cells edited for their BCR. Another advantage of BCR-edited B cells is their ability to rearrange their immunoglobulin (Ig) genes to induce isotype class switching.

In this work, we sought to exploit these multiple properties, on the one hand by validating the expression and functionality of a new single-chain mAb format, capable of being expressed *via* the insertion of a single gene cassette, and on the other hand by diversifying our editing strategies using the CRISPR/Cas9 tool. For these different strategies, we chose to target two loci that are highly expressed in human B cells (IgH and JCHAIN) in order to obtain the secretion of therapeutic molecules. Using this type of approach, we have succeeded, by integrating our template, in inducing the expression of Ig with anti-HER2 or anti-CD20 specificity, in particular in the IgA2-switched format. In the context of COVID crisis, we have also developed a strategy of induced switch to the IgA2 class for a spike-specific hybridoma (in order to obtain the expression of this Ig class important for mucosal immunity).

The *in vivo* validation of an immunotherapy based on B-cell engineering requires the development of a suitable mouse model in order to benefit from pre-clinical testing. An important aspect of this thesis work was therefore also the establishment of the best conditions for the engraftment of human B cells in an immunodeficient mouse and the development of *in vivo* human CD20⁺ or HER2⁺ tumor models.

Keywords : CRISPR/Cas9, human B cells, Immunoglobulines, IgA, mouse model