

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologies

UMR CNRS 6239 GICC

Equipe « Immunogénomique et anticorps thérapeutiques »

THÈSE présentée par :

Julien LEJEUNE

soutenue le : **09 juin 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**
Sciences de la vie et de la Santé/Génétique

**Génétique et génomique des récepteurs de
faible affinité pour les IgG**

**Implications pour le développement et l'analyse de la
variabilité des effets des anticorps thérapeutiques**

THÈSE dirigée par :
Pr Hervé WATIER

Professeur, Université François – Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :
Pr Franck BROLY
Dr Jean-Luc TEILLAUD

Professeur, Université Lille 2, Lille
Directeur de recherche, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris

JURY :

Pr Hervé WATIER
Pr Franck BROLY
Dr Jean-Luc TEILLAUD
Dr Pierre BRUHNS
Pr Christian ANDRES
Pr Gilles THIBAUT

Professeur, Université François – Rabelais, Tours
Professeur, Université Lille 2, Lille
Directeur de recherche, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris
Docteur, Institut Pasteur, Paris
Professeur, Université François – Rabelais, Tours
Professeur, Université François – Rabelais, Tours

A Laurianne,

A ma sœur, à mes parents,

Cherchons comme cherchent ceux qui doivent trouver et trouvons comme trouvent ceux qui doivent chercher encore. Car il est écrit : celui qui est arrivé au terme ne fait que commencer

Saint Augustin

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr Broly et le Dr Teillaud d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Recevez ici la marque de ma considération et de mon profond respect.

Je remercie le Pr Hervé Watier pour m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche. Hervé, merci pour ton soutien, ta disponibilité ainsi que pour les longues heures que tu as passé à m'enseigner les fondamentaux de l'immunologie. Reçois ici la marque de ma sympathie et de mon profond respect.

Je tiens à remercier Marc Ohresser. Un grand merci pour ton aide tout au long de ma thèse et pour tes nombreux conseils techniques

Je tiens également à remercier le Pr Gilles Thibault et le Dr Guillaume Cartron pour leur aide, leur sympathie et leur disponibilité tout au long de ma thèse.

Je remercie également le Dr Baptiste Mulot et Jean-Pierre Guerry, qui m'ont tous deux fait découvrir le monde passionnant de la primatologie.

Je voudrais remercier plus particulièrement l'ensemble des équipes 4, 6 et 7 de l'UMR CNRS 6239 : Gilles Paintaud, Valérie, Fabrice, Nicolas Congy-Jolivet et Azzopardi, Kiki, Alexis, la team Be Quiz (Manu, Germain, Natacha, Raphael, Elodie, Christophe, Caloubillou) ainsi que tout les étudiants et stagiaires que j'ai pu rencontré durant toutes ces années.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel hospitalier du laboratoire d'immunologie, Audrey, Céline, Claude, Babeth Un remerciement tout particulier à ma technicienne préférée Marie-Noelle Marson pour sa gentillesse, sa disponibilité et pour toutes les discussions que l'on a pu avoir.

Un grand merci à David Ternant pour son aide son amitié et son soutien tout au long de ma thèse. David, ta bonne humeur et ton sens de l'humour vont me manquer mais tu sais que je serai toujours là si jamais te venais l'envie de faire quelques balles à l'internat.

Un grand merci à Benoît Piégu pour sa disponibilité, son aide ainsi que pour nos nombreuses discussions scientifiques. Merci pour toute l'aide en informatique que tu as su m'apporter, cela n'a pas suffi à me convertir à Linux mais j'y songe très sérieusement ...

Merci à notre « super secrétaire » Annie, pour gentillesse ainsi que pour son dévouement quotidien.

Un grand merci à ma compagne de rédaction, Charlotte Magdelaine-Beuzelin. Nicolas nous avait conseillé de partir en courant mais nous avons tenu bon. Merci pour ta gentillesse, ton écoute et pour les nombreuses discussions que nous avons pu avoir ensemble.

Un grand merci à toute ma famille : Lôlô, Patrice, Aurore, Didine, Pépère Didine, Mémère et Pépère. Merci pour votre soutien et merci d'avoir été là quand j'en avais besoin.

A tous mes amis qui n'ont cessés de me soutenir tout au long de ma thèse.

Enfin, un immense merci à ma louloute qui a su me supporter durant toute la rédaction de ce manuscrit et qui toujours été là, même dans les moments les plus difficiles.

Résumé

Génétique et génomique des récepteurs de faible affinité pour les IgG (FcγRs) : implications pour le développement et l'analyse de la variabilité des effets des anticorps thérapeutiques

Les récepteurs Fc jouent un rôle important en permettant aux cellules de l'immunité d'interagir avec les anticorps, notamment thérapeutiques. Dans cette thèse, nous montrons que des mécanismes de recombinaison homologue, de *knock-in* par insertion rétrovirale et de duplication segmentale ont permis l'acquisition chez les Primates (*FCGR2A*) puis chez les Hominiés (*FCGR2C* et *FCGR3B*) de gènes codant des récepteurs Fc ayant de nouvelles propriétés, tout en rendant instable ce cluster (variation de nombre de copies), et très complexe son analyse chez l'Homme. Grâce à une approche originale de pyroséquencage, nous sommes parvenus à étudier simultanément le polymorphisme allélique ORF/STOP du *FCGR2C*, ainsi que son nombre de copies. Nous avons ainsi révélé de nouveaux déséquilibres de liaison, s'ajoutant au déséquilibre *FCGR3A-FCGR2A* dont nous avons montré l'importance d'une prise en compte adaptée dans les études d'association avec la réponse aux anticorps thérapeutiques. Ces résultats devraient contribuer à améliorer le développement pré-clinique (pertinence des modèles animaux) et clinique (variabilité des effets) des anticorps thérapeutiques.

Mots clés : récepteurs pour la portion Fc des IgG -polymorphismes génétiques - anticorps thérapeutiques – CNV – déséquilibre de liaison.

Résumé en anglais

Genetic and Genomic of low-affinity IgG receptors (FcγRs): implications for development and variability analysis of therapeutic antibodies.

Fc receptors play an important allowing connexion between immune cells and antibody notably therapeutic. In this thesis, we have shown that homologous recombination events, knock-in by retroviral insertion and segmental duplication led to the acquisition in primates (*FCGR2A*) then in Hominids (*FCGR2C* and *FCGR3B*) of genes coding for Fc receptors with new properties, led to genomic instability of the cluster (copy number variation) and to complex analysis in human. Through a original pyrosequencing approach, we have studied simultaneously ORF/STOP polymorphism and copy number variation of *FCGR2C*. We have also revealed new linkage disequilibrium, additionnaly to *FCGR3A-FCGR2A* disequilibrium which we have shown the importance of a suitable methodology in association studies with responses to therapeutic antibodies. These results contribute to improve pre-clinical (of animal models) and clinical (variability effects) development of therapeutic antibodies.

Keywords : receptors for the Fc portion of IgG - genetic polymorphisms - therapeutic antibodies – linkage disequilibrium.

Table des matières

Remerciements.....	1
Résumé	3
Résumé en anglais.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	10
Liste des annexes.....	19
INTRODUCTION.....	20
GENERALITES.....	25
I. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques.....	25
A. Structure.....	25
B. Développement.....	27
C. Classification fonctionnelle.....	30
1. Anticorps ciblant des antigènes solubles.....	30
2. Anticorps ciblant des antigènes membranaires.....	31
2.1 Anticorps antagoniste.....	31
2.2 Anticorps agoniste.....	32
2.3 Anticorps cytolytiques.....	33
II. FcγRs et mécanismes d'action des anticorps thérapeutiques.....	34
A. Caractéristiques générales des FcγRs.....	34
1. Historique.....	34
2. Structure.....	36
3. Expression cellulaire.....	37
4. Affinité pour les IgG.....	39
4.1 Interaction FcγRs et portion Fc des IgG.....	39

4.2 Polymorphismes des domaines immunoglobuliniques des FcγRs.....	40
4.3 Différences affinité/avidité entre les FcγRs.....	41
5. Mécanisme d'action.....	43
B. Implications des FcγRs dans le mécanisme d'action des Ac thérapeutiques.....	47
1. Modèles murins, Ac monoclonaux thérapeutiques et FcγRs.....	47
2. Polymorphismes <i>FCGR</i> et réponse clinique aux Ac thérapeutiques.....	50
3. Criblage d'anticorps thérapeutiques sur leur capacité à engager <i>in vitro</i> les FcγRs.....	52
III. Caractéristiques génomiques et génétiques des gènes codant les FcγRs.....	57
A. Organisation génomique des gènes codant les FcγRs.....	57
1. Organisation chez l'homme.....	57
2. Organisation génomique chez les mammifères.....	61
B. Polymorphismes génétiques des gènes <i>FCGR2/3</i>	63
1. Polymorphisme de type SNPs.....	63
1.1 Polymorphismes des gènes <i>FCGR2</i>	63
1.1.1 Le gène <i>FCGR2A</i>	63
1.1.2 Le gène <i>FCGR2B</i>	66
1.1.3 Le gène <i>FCGR2C</i>	68
1.2 Polymorphismes des gènes <i>FCGR3</i>	70
1.2.1 Le gène <i>FCGR3A</i>	70
1.2.2 Le gène <i>FCGR3B</i>	72
2. Polymorphismes de type variation de nombre de copies.....	75
2.1 Variation du nombre de copies de gènes dans le génome humain.....	75
2.2 Mécanisme de formation des CNV.....	78
2.3 Implications fonctionnelles des CNV.....	82
2.4 Variation du nombre de copies de gènes du cluster <i>FCGR2/3</i>	84

RESULTATS.....	89
I. Evolution du cluster de gènes codant les FcγRs.....	91
A. Introduction.....	91
B. Résultats.....	98
Article N°1 : Evolution story of low-affinity Fc receptor gene cluster in mammals.....	98
C. Résultats complémentaires de l'article N°1.....	137
D. Discussion.....	140
II. Etude du polymorphisme ORF/STOP et des variations de nombre de copies du gène <i>FCGR2C</i>	144
A. Introduction.....	144
B. Matériels et méthodes.....	147
C. Résultats.....	149
D. Discussion.....	173
III. Etudes d'association entre les polymorphismes des gènes <i>FCGR</i> et la réponses aux anticorps thérapeutiques.....	176
A. Introduction.....	176
B. Résultats.....	177
Article N°2 : Evidence for linkage disequilibrium between FcγRIIIA-V158F and FcγRIIA-H131R polymorphisms in Caucasians, and for an FcγRIIIA-restricted influence on the response therapeutic anticbodie.....	177
C. Discussion.....	178
DISCUSSION.....	180
BIBLIOGRAPHIE.....	189
ANNEXES.....	214
Résumé.....	215
Résumé en anglais.....	215

Liste des tableaux

Tableau 1 : Anticorps utilisés en cancérologie et ciblant des antigènes membranaires.

DCI : Dénomination Commune Internationale.....23

Tableau 2: Caractéristiques générales des FcγRs.....38

Tableau 3: Etudes d'association entre polymorphismes des FcγRs et réponse aux anticorps thérapeutiques.

Lymphome folliculaire (FL) ; Lymphome diffus à grandes cellules B (LD) ; Lymphome du manteau (LM) ; macroglobulinémies de Waldenström (MW).....51

Tableau 4 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme *FCGR2A*-H131R dans différentes populations. Les fréquences des allèle *FCGR2A*-131 H et R apparaissent significativement différentes entre la population asiatique et les autres populations.....65

Tableau 5 : Fréquences génotypiques et alléliques dans la population asiatique du polymorphisme *FCGR2B*-I232T.....66

Tableau 6: Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme *FCGR3A*-158V/F dans différentes populations.....71

Tableau 7: Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme *FCGR3B*-NA1/NA2 dans différentes populations.....72

Tableau 8 : Variations nucléotidiques et protéiques entre les différents allèles de *FCGR3B*. (D'après Bux *et al.*, 1997).....73

Tableau 9 : Polymorphisme ORF/STOP et nombre de copies du gène *FCGR2C*. Résultats obtenus sur un échantillons de 100 individus sains d'origine caucasienne (D'après Breunis *et al.*, 2008).....85

Tableau 10 : Fréquences des CNV de *FCGR3A*, *FCGR3B* et *FCGR2C*.....88

Tableau 11 : Répétabilité des ratios T1/T2, A1/A2 et T3/T2. Chaque témoin à été analysé en triplicat un jour donné puis les différentes valeurs des ratios T1/T2 T2 (nombre de copies de *FCGR2C*), A1/A2 (nombre de *FCGR2C**STOP) et T3/T2 (nombre de *FCGR2C**ORF) ont été comparées.....160

Tableau 12 : reproductibilité (inter-expériences) des ratios T1/T2, A1/A2 et T3/T2. Chaque témoin a été analysé en triplicat puis les différentes valeurs des ratios T1/T2 (nombre de copies de *FCGR2C*), A1/A2 (nombre de *FCGR2C**STOP) et T3/T2 (nombre de *FCGR2C**ORF) ont été comparés.....160

Liste des figures

Figure 1 : Structure des immunoglobulines G. (A). Organisation en domaines d'une IgG. V : domaines variables ; C : domaine constant de la chaîne légère ; CH1,CH2,CH3 : domaines constants de la chaîne lourde **(B).** Fragments générés suite à une digestion protéolytique par la papaïne. **(C).** Fragments générés suite à une digestion protéolytique par la pepsine.....26

Figure 2 : Humanisation des anticorps thérapeutiques. Représentation schématique de l'évolution structurale des anticorps thérapeutiques qui a permis le remplacement des éléments d'origine murine (rouge) au profit de la partie humaine (bleu).....29

Figure 3: Mise en évidence des récepteurs pour la portion Fc des IgG. En présence de sérum de porcs immunisés, interaction des macrophages porcins et des érythrocytes de mouton. Cette interaction, qui prend la forme caractéristique d'une rosette (macrophage au centre, érythrocytes en périphérie) n'est possible qu'en présence de certains anticorps et s'effectue par l'intermédiaire de leur portion Fc. D'après Berken *et al.*, 1966.....35

Figure 4: Interaction FcγR/ portion Fc des IgG. La portion Fc des IgG va se fixer au niveau d'acides aminés présents sur le domaine immunoglobulinique proximal et sur la région charnière.....39

Figure 5 : Affinités des FcγRs pour les différentes sous-classes d'IgG en fonction des différents polymorphismes affectant les domaines immunoglobuliniques des IgG. Les IgG1 sont représentées par les losanges oranges, les IgG2 par des carrés rouges, les IgG3 par des triangles bleus et les IgG4 par des croix vertes.....42

Figure 6 : Mécanismes d'action enclenchés par les FcγRs.....46

Figure 7 : L'activité anti-tumorale des anticorps 4D5, trastuzumab et rituximab requière l'activation des FcγRs. Mesure du volume tumorale chez des souris nude et xénotreffées par une lignée sur-exprimant l'antigène HER2 humain (BT474 M1) (A-D) ou par une lignée exprimant le CD20 humain (cellules Raji) (E-F). Chez les souris WT, l'injection d'une IgG1 murine anti-HER2 (4D5) ou d'une IgG1 humanisé (trastuzumab) entraîne une inhibition de la croissance tumorale (A-C), non observé chez les souris FcRγ^{-/-} (B-D). Des résultats identiques sont observés lors de l'injection du rituximab (E-F). (D'après Clynes *et al.*, 2000).....49

Figure 8 : Relation entre la concentration de rituximab et la lyse de cellules Daudi par des cellules NK. Des cellules Daudi CD20⁺ ont été chargées au Cr51 et incubées pendant 4 heures à 37°C avec des cellules NK de donneurs de géotypes *FCGR3A*-158VV ou 158FF (ratio effecteur :cible = 2,5 :1) en présence de différente concentration de rituximab. La cytotoxicité envers les cellules Daudi est exprimé % de lyse et par le % prédit par un modèle Emax (ligne continue : VV / pointillée : FF). A faible concentration en rituximab, le % de lyse observé ou prédit est identique entre les VV et les FF alors qu'à forte concentration les VV montrent un meilleur % de lyse que les FF.....53

Figure 9 : Phagocytose médiée par le rituximab. Différents types de cellules lymphomateuses (FL : lymphome folliculaire ; MCL : lymphome du manteau ; SLL : lymphome à petites cellules; DLCL : lymphome diffus à grande cellule) ou des cellules B non tumorales (NT), ont été incubées pendant 2 heures avec des macrophages sans (blanc) ou avec 2µg/mL de rituximab (noir). D'après Manches *et al.*, 2003.....54

Figure 10 : Augmentation des fonctions cytolytiques du trastuzumab par mutation de certains acides aminés de la portion Fc. Test d'ADCC contre des cellules cancéreuses de sein SkBr3 en présence de variants de trastuzumab et de cellules NK de géotype *FCGR3A*-158FF. carrés gris, trastuzumab non muté ; triangles verts, mutant S239D ; triangles inversés rouges, mutant I332E ; losange bleus, mutant S239D/I332E ; cercle gris, mutant S239D/I332E/A330L. (D'après Lazar *et al.*, 2006).....55

Figure 11 : Augmentation des capacités cytolytiques du rituximab par modification de la glycosylation de la portion Fc. Des cellules NK ont été incubées avec des cellules de leucémie lymphoïde chronique (n=22) avec des concentrations d'anticorps de 0.005 à 500 ng/ml, et pour certains patients (n=11) avec 5000 ng/ml de rituximab. Les pourcentages de lyse induite par l'anticorps EMAB-6 présentant une glycosylation modifiée (barre noire) et par le rituximab (barre blanche) sont exprimé par le pourcentage moyen d'ADCC \pm l'écart-type. (*P = 0.0423, **P < 0.03, ***P \leq 0.0007). (D'après de Romeuf *et al.*, 2008).....56

Figure 12 : Scénario évolutif et première carte du cluster *FCGR2/3* publiée. Grâce aux fortes homologues existantes entre les gènes, ce cluster a pu évoluer par l'intermédiaire de duplication successives et de recombinaisons (D'après Qiu *et al.*, 1990).....58

Figure 13 : Deuxième version de la carte du cluster *FCGR2/3*. Les positions respectives des gènes au sein du chromosome 1 ont été définies de même que leur orientation. C'est ainsi que les gènes codant FcgRIIIA, FcgRIIC et FcgRIIIB se retrouvent dans la même orientation (D'après Su *et al.*, 2002).....59

Figure 14 : Organisation du cluster *FCGR2/3* selon l'assemblage 37.1 du projet de séquençage du génome humain. Contrairement à ce qui avait été publié auparavant, ce nouvel assemblage fait apparaître le gène *FCGR2C* dans la même orientation que les gènes *FCGR2A* et *FCGR2B*.....60

Figure 15 : Haplotypes du promoteur *FCGR2B* dans un test à la luciférase. Des constructions contenant 1 kb du promoteur *FCGR2B* sous forme de l'haplotype -386C-120A ou de l'haplotype -386G-120T ont été transfectées de façon transitoire dans des cellules U937 (A) et BJAB (B). L'émission de lumière a été mesurée suite en condition basale et après une stimulation par 0,5 mM de dibutyryl AMPc ou par 400U/ml d'interféron gamma. L'émission de lumière a été mesurée puis normalisée par rapport à l'émission basale de la luciférase pour enfin obtenir l'activité relative (RLA : *relative luciferase activity*). D'après Su *et al.*, 2004.....67

Figure 16 : ADCC inverse induite par le FcγRIIC exprimer sur les lymphocytes NK. Des cellules NK de 4 donneurs, ont été isolées et testées pour leur capacité à tuer des cellules P815 FcR+ en présence d'anticorps KB61 (anti-CD32) ou de 3G8 (anti-CD16). Test fondé sur la libération de Chrome 51 pour les ratio effecteur cible (E:T) indiqué. **(A)** témoin n'exprimant pas le FcγRIIC **(B,C,D)** témoins exprimant le FcγRIIC.....68

Figure 17 : Représentation de l'organisation exon-intron des gènes FCGR2 et localisation des divers polymorphismes. Les rectangles représentent les exons (en jaune et orange les régions codantes ; en violet les régions non traduites ; en pointillés les exons épissés). La taille des exons et des introns est indiquée à côté de chacun d'eux. Deux exons S1 et S2 codent le peptide signal ; l'exon EC1 code le domaine immunoglobulinique distal et l'exon EC2 codent le proximal ; un exon TM code le domaine transmembranaire ; trois exons, C1, C2 et C3 codent le domaine intra-cytoplasmique. Les flèches rouges indiquent les localisations des différents polymorphismes affectant les gènes FCGR2.....69

Figure 18 : Représentation de l'organisation exons-introns des gènes FCGR3A/FCGR3B et localisation des divers polymorphismes. Les rectangles représentent les exons (en bleu les régions codantes ; en violet les régions non traduites). La taille des exons et des introns est indiquée à côté de chacun d'eux. Deux exons S1 et S2 codent le peptide signal ; l'exon EC1 code le domaine immunoglobulinique distal et l'exon EC2 codent le proximal ; un exon TMC code le domaine transmembranaire et la région intra-cytoplasmique. Les flèches rouges indiquent les localisations des différents polymorphismes affectant les gènes FCGR3A et FCGR3B.....74

Figure 19 : CNV au sein du génome humain. **(A)** Principe des puces par hybridation comparative (CGH array) pour l'études des génomes à grande échelle. L'ADN de référence et l'ADN test sont marqués par des fluorochromes différents (Cyanine 5 et 3). Sur les puces peuvent être fixées différentes sources d'ADN comme des BAC, des produits de PCR ou encore des oligonucléotides. Après hybridation, le ratio de fluorescence (Cy3: Cy5) va permettre de révéler les différences de nombres de copies entre les échantillons d'ADN. Afin de détecter les faux positifs une seconde série d'hybridation est effectuée en échangeant les marquages entre ADN test/ de référence. **(B)** Liste non exhaustive des études rapportant, grâce à l'utilisation de CGH array, des variations de nombre de copies.....77

Figure 20 : Duplication/ délétion par recombinaison homologue non allélique (NAHR).

Les homologies existants entre deux segments d'ADN non homologues vont permettre la mise en place d'un crossing-over inégal aboutissant la duplication de certains segments d'ADN et à la délétion d'autres segments.....78

Figure 21 : Duplication d'un segment d'ADN par le mécanisme FoSTeS. (A)

Lors de la réplication de l'ADN, la fourche de réplication va permettre de générer un brin direct et un brin indirect. **(B)** le brin indirect présent au sein de la fourche de réplication va se désengager du brin parental et aller s'incorporer, grâce à des mécanismes de microhomologie, sur une autre fourche de réplication. Il pourra alors continuer sa synthèse sur le nouveau brin parental. **(C)** retour du brin indirect au sein de sa fourche de réplication originelle.....80

Figure 22 : Duplication génique par rétrotransposition.

La transcription d'un élément L1 peut aboutir à la transcription de séquences adjacentes qui seront par la suite rétro-transcrites et intégré avec l'élément à un nouveau locus chromosomique.....81

Figure 23 : Variation du nombre de copie du gène AM1 et expression de l'amylase salivaire.

(A) estimation du nombre de copies du gène AMY 1 au sein d'une population de témoins européens (n=50). **(B)** estimation de la quantité d'amylase salivaire par western blot. **(C)** relation entre le nombre de copie du gène AMY 1 et la quantité d'amylase salivaire **(D'**après Perry *et al.*, 2007).**)**.....82

Figure 24 : Adhésion des neutrophiles et variation du nombre de copie de FCGR3B.

La quantification de l'adhésion des neutrophiles sur des IgG accrochées au fond en d'une plaque met en évidence que celle-ci est proportionnelle au nombre de copies de FCGR3B. **(D'**après Willcocks *et al.*, 2008).**)**.....84

Figure 25 : Expression et fonctionnalité de FcγRIIIA en fonction du nombre de copies de FCGR3A.

(A) L'expression de FcγRIIIA (CD16, clone 3G8) à la surface des cellules NK entre individus possédant 1, 2 ou 3 copies de FCGR3A. **(B)** Les cellules NK des individus

avec 2 ou 3 copies de *FCGR3A* montrent une capacité d'ADCC supérieure aux NK des individus avec 1 copie de *FCGR3A*.....86

Figure 26 : Différents types de duplication/ délétion des gènes *FCGR3A*, *FCGR3B* et *FCGR2C*. Le profil I, retrouvé le plus fréquemment met en jeu des variations de nombre de copies des gènes *FCGR2C* et *FCGR3B*.....87

Figure 27 : Localisation des divergences entre le récepteur FcγRIIIA humain et de macaque au niveau du domaine immunoglobulinique proximal. L'interaction entre la portion Fc des IgG et le domaine immunoglobulinique proximal des FcγRs (domaine EC2) va mettre en jeu les résidus Ile⁸¹-Trp⁹⁰, Trp¹¹³-Ala¹¹⁷, His¹¹⁹-Thr¹²², Asp¹²⁹-His¹³⁵, Arg¹⁵⁵, Val¹⁵⁸-Lys¹⁶¹. Chez le macaque des divergences au niveau du domaine EC2, représentées en vert, ont été mises en évidence et pourrait intervenir dans la fixation des IgG. D'après la structure du co-cristal IgFc-FcγRIIIB (Radaev *et al.*, 2001).....93

Figure 28 : Alignements des acides aminés du domaine immunoglobulinique proximal des récepteurs FcγRs de faible affinité. (A). Alignement des acides aminés du récepteur FcγRIIA **(B).** Alignement des acides aminés du récepteur FcγRIIB et FcγRIIC **(C).** Alignement des acides aminés du récepteur FcγRIIA, FcγRIIIB et FcγRIV. Hs (*Homo sapiens*) ; Pt (*Pan troglodytes*) ; Gg (*Gorilla gorilla*) ; Pp (*Pongo pygmaeus*) ; Mf (*Macaca fascicularis*) ; Mm (*Mus musculus*). Les zones grisées représentent les acides aminés intervenant dans la fixation de la portion Fc des IgG.....139

Figure 29 : Principe du pyroséquencage. Le pyroséquencage ou mini-séquencage luminométrique en temps réel, est un système fondé sur quatre réactions enzymatiques. **(A).** Chaque nucléotide est distribué et testé individuellement pour son incorporation au niveau de l'ADN matrice par une réaction d'élongation effectuée par une polymérase. **(B).** Chaque incorporation est accompagnée par la libération de phosphate inorganique qui sera converti en ATP par l'ATP sulfurylase en présence d'adénosine 5'-phosphosulfate (APS). **(C).** L'ATP produit va permettre à la luciférase de convertir la luciférine en oxyluciférine tout en générant un signal lumineux dont l'intensité est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporé.

(D). Les nucléotides non-incorporés seront dégradés par l'apyrase permettant ainsi la ré-initialisation du système pour un nouveau cycle de pyroséquenceage.....146

Figure 30 : Alignement des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C* au niveau de l'exon 3.

L'amorce biotinylée Biot-2abci2e3-S et l'amorce 2abce3-AS ont permis la co-amplification par PCR des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C*. La purification des brins de PCR biotinylés puis l'hybridation de l'amorce pyro2-AS sur ces derniers a permis l'étude du nombre de copie de *FCGR2C* et du polymorphisme *FCGR2C**ORF/STOP (l'allèle *FCGR2C**STOP est représenté en rouge).....150

Figure 31 : Mise au point de l'ordre d'injection des nucléotides. (A).

Alignement des séquences nucléotidiques des trois gènes analysés. Les nucléotides injectés sont représentés en gris avec en caractères blancs la nature de la base et son numéro d'injection selon la nomenclature de la partie B de la figure. Cet ordre permet de générer un pic spécifique de *FCGR2C**STOP (en jaune), un pic spécifique de *FCGR2A* (en vert) et deux pics spécifiques des gènes *FCGR2B* et *FCGR2C* (en orange). Les nucléotides non-informatifs sont représentés en bleu. La portion de séquence en rose représente la localisation de l'amorce de pyroséquenceage pyro2-AS (B). Ordre d'injection des nucléotides et représentation schématique des pyrogrammes attendus avec différents génotypes.....152

Figure 32 : Détermination du nombre de copies de *FCGR2C* et du nombre d'allèle *FCGR2CSTOP sur un échantillons de 30 témoins. (A).**

Estimation du nombre de copies de *FCGR2C**STOP grâce au ratio A1/G1. (B). Estimation du nombre de copies de *FCGR2C* grâce au ratio T1/G1. (C). Corrélation entre le nombre de copies de *FCGR2C* (T1/G1) et le nombre de copies de l'allèle *FCGR2C**STOP (A1/G1).....154

Figure 33 : Ordre d'injection des nucléotides permettant de maximiser le nombre de pics spécifiques. (A).

Alignement des séquences nucléotidiques des trois gènes analysés. Les nucléotides injectés sont représentés en gris avec en caractères blancs la nature de la base et son numéro d'injection selon la nomenclature de la partie B de la figure. Cet ordre permet de générer 1 pic spécifique de *FCGR2C**STOP (en jaune), 1 pic spécifique de *FCGR2A* (en vert), 2 pics spécifiques de *FCGR2B* et *FCGR2C**ORF et 2 pics spécifiques des gènes *FCGR2B* et *FCGR2C* (en orange). Les nucléotides non-informatifs sont représentés en

bleu.(B). Ordre d'injection des nucléotides et représentation schématique des pyrogrammes attendus avec différents génotypes.....156

Figure 34 : Effet de la température sur la co-amplification des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C*. Quelle que soit la température, les hauteurs des pics correspondants au gène *FCGR2A* (carrés verts) sont toujours inférieures aux hauteurs de pics correspondants aux gènes *FCGR2B* et *FCGR2C*ORF* (triangles jaunes) ou aux pics spécifique de l'allèle *FCGR2C*STOP* (losanges oranges).....157

Figure 35 : Analyse de la proportionnalité sur les pics spécifiques. Afin de nous assurer qu les hauteurs des pics spécifiques étaient constantes tout au long du pyroséquencage, nous avons analysé les hauteurs de pics spécifiques de *FCGR2A* (A), de *FCGR2B/FCGR2C* (B) et de *FCGR2C *STOP* (C), en comparant à chaque fois les hauteurs pour l'incorporation d'un nucléotide.....158

Figure 36 : Détermination du nombre de copies de *FCGR2C* par l'intermédiaire du ratio T1/T2. (A). Distribution au sein de notre échantillon des valeurs du ratio T1/T2 en trois groupes déterminés par les intervalles [1,6 ; 2,1], [2,2 ; 2,6] et [2,7 ; 3,0]. Deux ratios supplémentaires sont situés dans l'intervalle [1,6 ; 2,1]. Chaque bâton présente une largeur correspondant à 0,1 (B). Détermination de l'équation de la droite de régression passant par les valeurs médianes correspondant aux ratios T1/T2 pour 1,2 et 3 copies de *FCGR2C*. (C). Variations du nombre de *FCGR2C* identifiées grâce au ratio T1/T2.....163

Figure 37 : Détermination du nombre de copies de *FCGR2C* par l'intermédiaire du ratio C3/C1. (A). Distribution au sein de notre échantillon des valeurs du ratio C3/C1 en trois groupes déterminés par les intervalles [1,8 ; 2,2], [2,25 ;2,9] et [2,95 ; 3,2]. Deux ratios supplémentaires sont situés dans l'intervalle [1,45 ; 1,5]. Chaque bâton présente une largeur correspondant à 0,05 (B). Détermination de l'équation de la droite de régression passant par les valeurs médianes correspondant aux ratios T1/T2 pour 1,2 et 3 copies de *FCGR2C*. (C). Variations du nombre de *FCGR2C* identifiées grâce au ratio C3/C1.....164

Figure 38 : Détermination du nombre de copies de l'allèle *FCGR2C*STOP* par l'intermédiaire du ratio A1/A2. (A). Distribution au sein de notre échantillon des valeurs du

ratio A1/A2 correspondant à 0, 1, 2 et 3 copies de *FCGR2C*STOP*. Chaque groupe est représenté par un intervalle et au sein de celui ci chaque bâton présente une largeur égale à 0,05 (B). Détermination de l'équation de la droite de régression passant par les valeurs médianes correspondante aux ratios A1/A2 pour 0,1,2 et 3 copies de *FCGR2C*STOP*. (C). Variations du nombre de *FCGR2C* identifiées dans notre échantillon grâce au ratio A1/A2.....166

Figure 40 : Détermination du nombre de copies de l'allèle *FCGR2C*STOP* par l'intermédiaire du ratio T4/T2. (A). Distribution au sein de notre échantillon des valeurs du ratio T4/T2 correspondant à 0, 1, 2 et 3 copies de *FCGR2C*STOP*. Chaque groupe est représenté par un intervalle et au sein de celui ci chaque bâton présente une largeur égale à 0,1 (B). Détermination de l'équation de la droite de régression passant par les valeurs médianes correspondant aux ratios T4/T2 pour 0,1,2 et 3 copies de *FCGR2C*STOP*. (C). Variations du nombre de *FCGR2C* identifiées dans notre échantillon grâce au ratio T4/T2.....169

Figure 41 : Corrélation entre le nombre de gène *FCGR2C* et le nombre d'allèle *FCGR2C*STOP*. Représentation du nombre de copies de *FCGR2C* (ratio T1/T2) en fonction du nombre de copies de *FCGR2C*STOP* (ratio A2/A3) chez les individus homozygotes pour cet allèle.....170

Figure 42 : Corrélation entre le nombre d'allèle *FCGR2C*STOP* et le nombre d'allèle *FCGR2C*ORF*. (A) La représentation graphique du nombre de copies de *FCGR2C*STOP* (ratio A1/A2) en fonction du nombre de copies de *FCGR2C*ORF* (ratio T3/T2) permet de distinguer clairement les différentes catégories de génotypes de *FCGR2C*. (B). Récapitulatif des proportions des différents génotypes de *FCGR2C* identifiés dans notre échantillon de témoins.....171

Figure 43 : Paralogues du CMH de classe III et gènes *HSP*. Les paralogues du CMH de classe III contiennent un certain nombre de gènes du système immunitaire et la majorité comportent à leurs côtés des gènes HS.....184

Liste des annexes

Annexe 1 : Article N°3 : Rôle des récepteurs à la portion Fc des IgG (FcγRs) dans l'activité des anticorps thérapeutiques. Lejeune J, Thibault G, Cartron G, Ohresser M, Watier H. *Bull Cancer*. 2010.....

Introduction

Depuis la fin des années 1990, les anticorps monoclonaux recombinants ont considérablement changé la prise en charge des patients atteints de cancer. Ces biomédicaments ont ainsi permis d'améliorer de manière significative la survie des patients atteints d'un lymphome non hodgkinien (Salles *et al.*, 2008 ; Coiffier *et al.*, 2002), d'un cancer du sein (Marty *et al.*, 2005) ou d'un cancer colorectal (Cunningham *et al.*, 2004). Ce progrès thérapeutique contraste cependant avec une certaine méconnaissance de leurs mécanismes d'action chez l'homme (Probst *et al.*, 2006). Pour les anticorps ciblant des antigènes solubles, les effets thérapeutiques résultent des propriétés de l'anticorps à fixer et à neutraliser l'antigène comme c'est le cas pour le bévacizumab (Avastin®) vis-à-vis du VEGF (Ellis, 2006). Les anticorps ciblant des antigènes membranaires des cellules cancéreuses (Tableau 1), font également intervenir les fonctions de reconnaissance mais posséderont en outre des effets cytolytiques liées au recrutement de mécanismes effecteurs de l'immunité. Ainsi, ces anticorps pourront induire une cytotoxicité cellulaire dépendante du complément ou CDC (*complement dependant cytotoxicity*) par recrutement du C1q, une phagocytose de la cellule opsonisée ou une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) par recrutement de cellules exprimant des récepteurs pour la portion Fc des IgG (FcγRs).

Notre équipe a été la première à rapporter qu'un polymorphisme localisé sur l'exon 4 du gène *FCGR3A* (codant le récepteur FcγRIIIA) était associé à la réponse au rituximab (IgG1-K chimérique anti-CD20, MabThera®) dans les lymphomes malins non-hodgkiniens de type folliculaire (Cartron *et al.*, 2002). Ce polymorphisme conduit à une substitution au niveau de l'acide aminé 158 (valine ou phénylalanine) et il a été observé que les patients homozygotes VV avaient une meilleure réponse clinique et moléculaire au rituximab que les patients porteurs de l'allotype F. Cette plus grande efficacité clinique est vraisemblablement liée à une meilleure affinité des IgG1 humaines pour les récepteurs V et une meilleure ADCC comme notre équipe l'a montré *in vitro* par rapport au récepteur F (Dall'ozzo *et al.*, 2004).

Les autres gènes codant les récepteurs FcγRs de faible affinité présentent également des polymorphismes de substitution de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et des études d'association ont montré, pour certains d'entre eux, une association avec la réponse clinique aux anticorps thérapeutiques. Ces gènes, au nombre de cinq, sont tous regroupés au sein d'un cluster sur le chromosome 1 et présentent par conséquent une relative proximité physique. De ce fait, lors d'études d'association avec la réponse aux anticorps thérapeutiques il convient de prendre en compte, par l'intermédiaire d'une méthodologie adaptée, le déséquilibre de liaison pouvant exister entre ces différents polymorphismes. Le premier objectif de notre travail a été d'analyser ce déséquilibre de liaison ou de le ré-analyser dans différentes populations à partir de données déjà publiées. Ce cluster est également soumis à des variations du nombre de copie de certains gènes ce qui entraîne un niveau supplémentaire de polymorphisme. Ces variations de nombre de copies de gène ou CNV (*copie number variation*) requièrent des méthodes d'études adaptées. Dans ce contexte, notre deuxième objectif a été la mise en place d'une technique permettant d'évaluer le nombre de copies du gène *FCGR2C*.

Le large succès des anticorps thérapeutiques peut être attribué en grande partie à leur humanisation qui a permis de réduire leur immunogénicité et d'améliorer leur pharmacocinétique et pharmacodynamie chez les patients (Glennie *et al.*, 2000). En devenant de plus en plus adaptés à l'homme, ces anticorps sont devenus parallèlement moins adaptés aux investigations chez l'animal. Malgré cela, le modèle primate (en particulier le singe rhésus) demeure toujours modèle de prédilection lors de la réalisation des études pharmacotoxicologiques des anticorps thérapeutiques. Le récent désastre observé lors de la phase I du développement clinique du TGN1412 (anti-CD28 développé par TeGenero), illustre parfaitement les limites des modèles animaux dans la prédictions des effets indésirables. En effet lors de la première injection chez l'homme, cet anticorps a provoqué des effets secondaires dramatiques (tempêtes cytokiniques, ...) que les essais sur les primates n'avaient pas révélés (Suntharalingam *et al.*, 2006). Le choix d'une espèce adaptée apparaît donc comme une étape cruciale lors du développement pré-clinique d'un anticorps thérapeutiques. La compréhension des interactions entre l'anticorps thérapeutique et le système immunitaire de l'animal (en particulier avec les FcγRs) est donc primordial pour pouvoir comprendre et prévoir ces effets secondaires. Les données publiées concernant le cluster de gène codant les récepteurs de faible affinité FcγRs de macaque rapportent la présence de seulement trois gènes et peu de données sont disponibles concernant le cluster d'autres primates. Dans ce

contexte, le troisième objectif de notre travail a été l'étude chez les mammifères de l'évolution du cluster de gènes codant les FcγRs.

DCI	Nom commercial	Cible	Classe	Indications
rituximab	Mabthera Rituxan	CD20	IgG1κ	Lymphomes folliculaires non hodgkiniens
alemtuzumab	MabCampath	CD52	IgG1κ	Leucémies lymphoïdes chroniques
trastuzumab	Herceptin	erbB2	IgG1κ	cancers du sein erbB2+
cétuximab	Erbitux	erbB1	IgG1κ	cancer colorectaux cancers épidermoïdes de la tête et du cou
panitumumab	Vectibix	erbB1	IgG2κ	cancer colorectaux

Tableau 1 : Anticorps utilisés en cancérologie et ciblant des antigènes membranaires.

DCI : Dénomination Commune Internationale

Généralités

I. Les anticorps monoclonaux thérapeutiques

Il n'est pas dans l'objet de cette thèse d'étudier dans le détail les anticorps thérapeutiques ou même les immunoglobulines, mais une présentation synthétique semble s'imposer pour permettre à tout lecteur d'appréhender le contexte et les enjeux de cette thèse.

A. Structure

Les anticorps monoclonaux (Acm) thérapeutiques sont tous conçus sur le format des IgG humaines. Ces molécules sont constituées de deux chaînes légères (ou chaînes L, *Light*) et de deux chaînes lourdes (ou chaînes H, *Heavy*) liées de façon covalente. Les chaînes lourdes sont constituées d'un domaine variable VL et de trois domaines constants CH1, CH2 et CH3 alors que les chaînes légères ne possèdent qu'un seul domaine variable (VL) et un domaine constant (CL) (Figure 1A). La partie située entre les domaines CH1 et CH2 des chaînes lourdes s'appelle la région charnière et autorise une grande flexibilité de l'immunoglobuline. La portion Fc, ne contenant que les domaines CH2 et CH3 des deux chaînes lourdes, est le support des fonctions effectrices de ces molécules et de leur biodistribution. Il existe quatre isotypes de chaîne lourde possibles (γ_1 , γ_2 , γ_3 et γ_4) correspondant respectivement aux IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4) et deux isotypes possibles de chaînes légères (κ et λ).

Les chaînes L et H présentent donc une partie constante, identique dans tous les anticorps de même isotype et une partie variable unique contenant le site de fixation à l'antigène. Les deux fragments Fab (*fragment antigen binding*) contenant la partie variable peuvent être séparés du fragment Fc (*fragment cristallisable*) par clivage enzymatique utilisant la papaïne (Kalmanson *et al.*, 1942) (Figure 1B) tandis que l'action de la pepsine, produit un fragment F(ab')₂ liant l'antigène de façon divalente et des fragments pFc' (Pope, 1939) (Figure 1C).

L'association des deux domaines variables VH et VL forme ce qui s'appelle parfois le Fv ("Fragment variable"). Celui-ci est constitué par des régions charpentes (framework, FR1 à FR4) et par des zones hypervariables, dénommées également CDR (*complementarity determining regions*), entrant en contact avec l'épitope et responsable de la spécificité et de l'affinité de l'anticorps pour sa cible antigénique. Ces zones hypervariables constituent des boucles plus ou moins saillantes au-dehors des domaines variables et l'agencement spatial de ces boucles va constituer la poche dans laquelle vient se fixer l'antigène (Amzel *et al.*, 1979).

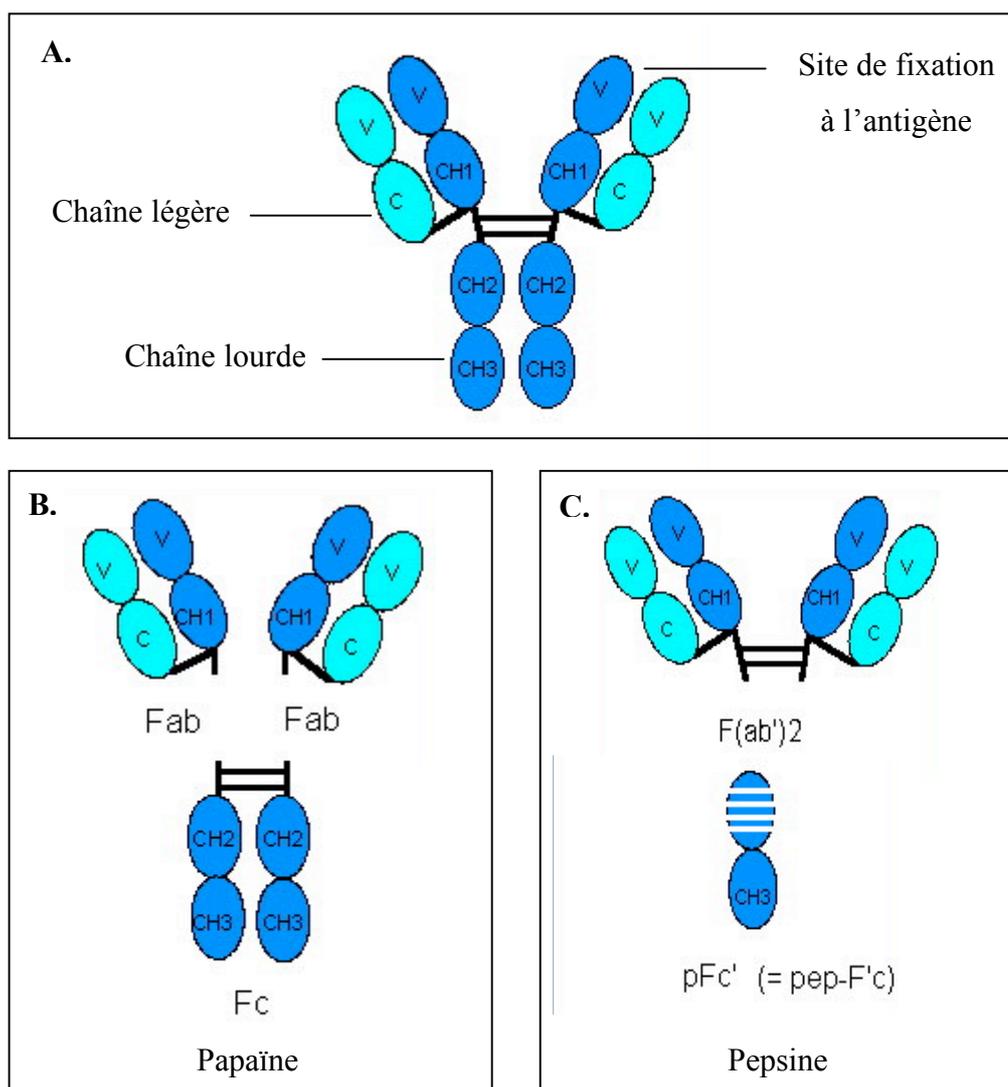


Figure 1 : Structure des immunoglobulines G. (A). Organisation en domaines d'une IgG. V : domaines variables ; C : domaine constant de la chaîne légère ; CH1,CH2,CH3 : domaines constants de la chaîne lourde **(B)**. Fragments générés suite à une digestion protéolytique par la papaine. **(C)**. Fragments générés suite à une digestion protéolytique par la pepsine.

B. Développement

Avec la découverte par Köhler et Milstein de la technologie des hybridomes (Köhler *et al.*, 1975), il devint possible de produire des anticorps monoclonaux et le concept d'une utilisation de ces AcM en clinique fut très vite développé. Dès 1980, le premier essai clinique utilisant un anticorps monoclonal d'origine murine fut réalisé chez un patient atteint de lymphome. Bien que cet anticorps se fût révélé capable de lyse tumorale *in vitro*, son utilisation chez le patient demeura un échec (Nadler *et al.*, 1980). Le premier cas de rémission complète – mais transitoire - obtenu avec un AcM fut observé chez un patient présentant un lymphome B, après traitement avec un AcM de souris dirigé contre l'immunoglobuline caractérisant l'hémopathie de ce patient (anticorps anti-idiotypique) (Miller *et al.*, 1982). Mais cette approche impliquant de créer un anticorps anti-idiotypique spécifique pour chaque patient, s'avéra trop lourde et coûteuse pour l'utilisation en routine clinique. En 1986, le premier AcM murin, dirigé contre la molécule CD3 (Orthoclone, OKT3) et indiqué dans la prévention du rejet de greffe, obtint son autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis (Goldstein *et al.*, 1986). Bien que ces anticorps soient très spécifiques de leur(s) cible(s) antigénique(s), et donc potentiellement efficaces comme le montre le cas de l'OKT3, ils restent néanmoins des anticorps de souris administrés à des hommes, ce qui les rend potentiellement immunogènes pour les patients traités. Il sont classiquement associés à l'induction d'une réponse humorale appelée HAMA (*Human Anti-Mouse Antibodies*) (Carter *et al.*, 2001). Les anticorps murins ne constituent donc pas le format idéal pour des injections répétées lors de traitements chroniques (Jakobovits *et al.*, 2007) et cela a conduit au développement de stratégies visant à diminuer leur immunogénicité.

Dans un premier temps, le développement des AcM s'est porté vers la production d'anticorps chimériques, gardant leurs domaines variables d'origine murine mais associés à des domaines constants humains (Morrison *et al.*, 1984) (Figure 2). La fréquence d'induction d'une réponse anti-anticorps a ainsi considérablement diminué, ce qui a permis d'administrer ces médicaments de façon répétée. Le rituximab (Mabthera®) et le cétuximab (Erbix®), deux anticorps chimériques, n'induisent que très rarement la formation d'anticorps. En revanche, l'incidence des anti-anticorps est très importante avec l'inflximab (Rémicade®), administré chez des patients souffrant de maladies auto-immunes, et elle est corrélée avec une

diminution de son efficacité thérapeutique et la survenue de réactions aiguës lors de la perfusion (Baert *et al.*, 2003). La formation des anti-anticorps reste par conséquent un problème potentiel significatif, même si les anticorps monoclonaux chimériques se sont aujourd'hui solidement implantés dans la pratique clinique.

La poursuite des efforts de recherche avait conduit au développement d'anticorps humanisés chez lesquels toutes les séquences d'acides aminés provenant de souris sont remplacées par des séquences humaines, à l'exception des régions hypervariables (Figure 2). Cette humanisation des anticorps ne se fait pas sans problèmes, car les séquences d'acides aminés situées entre les régions CDR contribuent de manière non négligeable à l'affinité des anticorps. Dans certains cas, il n'est donc pas possible de conserver exclusivement les régions CDR, et il faut souvent se résoudre à maintenir aussi certains résidus murins situés dans les régions charpentes. En pratique, il semble que l'incidence de l'induction des anticorps humains anti-humains (Human Anti-Human Antibodies ; HAHA) est relativement plus faible par rapport à celle observée avec les anticorps chimériques. Pour exemple, l'alemtuzumab (MabCampath ®) induit des HAHA avec une fréquence de l'ordre de 1,9 % (Rai *et al.*, 2002) et le trastuzumab (Herceptin ®) avec une fréquence inférieure à 0,1 % (Taylor *et al.*, 2007).

Enfin, des anticorps humanisés ont été développés ces dernières années (Figure 2). La plus grande partie de ces anticorps sont généralement obtenus *in vitro* par la méthode de *phage display* ou par l'intermédiaire de souris transgéniques produisant des anticorps entièrement humains. C'est ainsi qu'en 2002, l'adalimumab (Humira ®), anticorps dirigé contre le TNF- α et utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, a été mis sur le marché. Malgré tout, ces anticorps présentent encore un risque d'immunogénicité lié à leur idiotype.

Aujourd'hui plus de vingt Acm sont disponibles sur le marché pour le traitement de différentes formes de cancer, de certaines maladies inflammatoires chroniques, dans le contrôle des réactions de rejet de greffe et plusieurs centaines sont actuellement testés dans des essais cliniques.

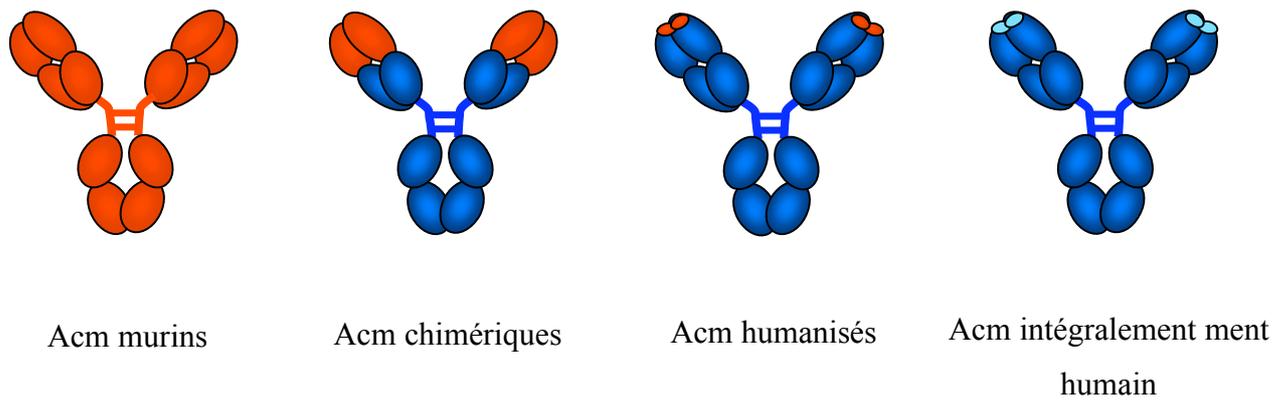


Figure 2 : Humanisation des anticorps thérapeutiques. Représentation schématique de l'évolution structurale des anticorps thérapeutiques qui a permis le remplacement des éléments d'origine murine (rouge) au profit de la partie humaine (bleu).

C. Classification fonctionnelle

En règle générale, la classification des Acm est basée sur leur(s) indication(s) et sur leur degré d'humanisation. Afin de dresser un panorama synthétique des différents types d'Acm, nous proposons ici une classification fonctionnelle qui nous permettra d'aborder les mécanismes d'action des Acm, les différents formats utilisés ainsi que la nature des différentes molécules ciblées.

1. Anticorps ciblant des antigènes solubles

La capacité d'un anticorps à neutraliser un antigène soluble dérive de sa capacité à reconnaître un épitope proche du site de liaison de cet antigène cible avec son ou ses récepteur(s) naturel(s).

Le bévacizumab (Avastin®) est un Acm humanisé anti-VEGF (vascular endothelial growth factor). Il reconnaît un épitope présent sur toutes les isoformes de ce facteur angiogénique ce qui empêche sa fixation sur le VEGFR1 (Flt-1) et le VEGFR2 (Flk1/KDR) (Muller *et al.*, 1998). Du fait du rôle reconnu du VEGF dans l'angiogénèse, notamment l'angiogénèse tumorale, la neutralisation de ce facteur conduit à un effet anti-angiogénique et anti-tumoral, validé par l'efficacité clinique.

Le ranibizumab (Lucentis®) est également un Acm anti-VEGF. Il s'agit d'un fragment Fab produit à partir du même anticorps murin que le bévacizumab mais présentant des modifications structurales de sa portion variable permettant d'améliorer son affinité pour le VEGF (Magdelaine-Beuzelin *et al.*, 2010). Le fait qu'il s'agisse d'un fragment Fab permet une administration intravitréenne et permet à cet anticorps d'être indiqué dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, où la prolifération de néo-vaisseaux derrière la rétine entraîne cécité et hémorragie.

2. Anticorps ciblant des antigènes membranaires

2..1 Anticorps antagoniste

Par analogie au mécanisme décrit pour les antigènes solubles, un récepteur membranaire peut être bloqué par un Acm, empêchant ainsi l'interaction avec son ligand.

L'abciximab (Réopro®) est un fragment Fab d'IgG1 ciblant la chaîne β_3 des intégrines, présente dans le récepteur plaquettaire $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) et le récepteur à la vitronectine $\alpha_v\beta_3$ exprimés à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales. L'abciximab inhibe ainsi l'agrégation plaquettaire et il est utilisé pour la prévention des complications cardiaques ischémiques chez les patients qui font l'objet d'une intervention coronarienne percutanée. Il réduit à court terme le risque d'infarctus du myocarde chez les patients souffrant d'angor réfractaire au traitement médical conventionnel, chez lesquels une intervention percutanée est programmée. Dans ces indications, l'effet pharmacodynamique doit être transitoire et le fait que cet Acm soit un fragment Fab permet de réduire considérablement sa durée de vie, le risque hémorragique et le risque d'interagir avec le récepteur Fc γ RIIA plaquettaire qui induirait l'effet inverse.

Le blocage d'un antigène membranaire peut s'avérer plus complexe que le simple masquage d'un site de liaison du récepteur pour son ligand. L'exemple le plus illustratif est celui du cétuximab (Erbitu®), une IgG1 chimérique anti-erbB1 (ou EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) utilisée dans les cancers du colon. Le cétuximab interagit avec l'ectodomaine III du récepteur et occulte partiellement la région où se fixe le ligand. De plus, l'encombrement stérique qu'il induit empêche le récepteur d'adopter la conformation étirée requise pour sa dimérisation (Li *et al.*, 2005). Cet anticorps fonctionne donc comme un antagoniste d'erbB1 avec une affinité 5 à 10 fois supérieure à celle de ses ligands naturels, les principaux étant l'EGF et le TGF- α (Goldstein *et al.*, 1995). Cet effet antagoniste se traduit par une réduction de l'activation des voies de signalisation opérant en aval de l'EGFR, induisant notamment l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, l'activation de molécules pro-apoptotiques, une diminution de synthèse du VEGF, une réduction de l'angiogénèse tumorale et une diminution de l'expression de métalloprotéases matricielles limitant la dissémination tumorale (Mendelsohn *et al.*, 2003).

2.2. Anticorps agoniste

A l'opposé de l'effet antagoniste provoqué par la liaison d'un Acm à un récepteur membranaire, certains anticorps ont la faculté de mimer l'action d'un ligand naturel. De telles propriétés agonistes peuvent s'avérer intéressantes en cancérologie lorsqu'il s'agit de cibler des récepteurs de mort (*death receptors*) de la famille des récepteurs du TNF, en particulier les récepteurs de TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) DR4 et DR5. Ces récepteurs se caractérisent par la présence d'un domaine intracytoplasmique appelé domaine de mort dont la trimérisation induite par leur ligand, ou la dimérisation induite par certains anticorps initie la cascade des caspases et aboutit à l'apoptose de la cellule cible. Le mapatumumab (HGS-ETR1) est un Acm recombinant ciblant le récepteur DR5 (Pukac *et al.*, 2005).

Il existe par ailleurs des anticorps capables de reconnaître des antigènes membranaires qui ne sont pas à proprement parler des récepteurs, mais néanmoins capables d'induire des signaux pro-apoptotiques lorsqu'un anticorps les agrège. Ainsi le rituximab (MabThera®), un anticorps chimérique IgG1 anti-CD20 utilisé dans le traitement des syndromes lymphoprolifératifs B, est capable d'induire seul des phénomènes d'apoptose *in vitro*, au moins sur certaines cellules et dans certaines conditions (Vega *et al.*, 2005)

2.3 Anticorps cytolytiques

La liaison de l'Acm à un antigène membranaire n'est pas toujours suffisante pour provoquer l'effet thérapeutique et dans certains cas les Acm doivent être en mesure de pouvoir exercer une activité cytolytique envers la cellule porteuse de l'antigène cible.

Pour mobiliser les fonctions cytolytiques des Acm ciblant des antigènes membranaires, les firmes pharmaceutiques choisissent le plus souvent des IgG1 (chaîne lourde γ 1), la sous-classe d'IgG combinant à la fois la meilleure demi-vie et les meilleures activités cytolytiques. C'est en effet la portion Fc qui permet à l'Acm de recruter les mécanismes cytolytiques comme le complément ou le recrutement d'effecteurs cellulaires de l'immunité. Il en résulte respectivement une cytotoxicité dépendante du complément ou CDC (*complement dependent cytotoxicity*) et une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (*antibody dependent cellular cytotoxicity*). Des expériences effectuées sur le Campath-1 (à l'origine une IgG2b de rat) ont montré que les régions constantes de l'IgG1 humaine étaient celles qui permettaient de conférer à l'anticorps la meilleure activité cytolytique *in vitro* et *in vivo* chez les patients (Greenwood *et al.*, 1993). De même, lors du développement du rituximab, une version IgG4 a été produite et, contrairement à la forme IgG1, celle-ci n'a pas été capable d'induire une lymphopénie B lors de son injection chez le macaque. Ces observations mettent donc en lumière la nécessité d'utiliser des Acm sous la forme IgG1 pour pouvoir recruter les effecteurs de l'immunité et ainsi avoir des effets cytolytiques. De nombreux travaux *in vitro* ont montré que ces effets cytolytiques étaient en particulier dû au mécanisme d'ADCC et que celui-ci nécessitait la présence de récepteurs pour la portion Fc des IgG (Fc γ Rs) à la surface des effecteurs cellulaires. *In vivo*, la seule preuve de l'implication de ces récepteurs ainsi que le rôle de l'ADCC preuve *in vivo* a été apportée grâce à l'association entre un polymorphisme du récepteur Fc γ RIIIA et la réponse clinique au rituximab (Cartron *et al.*, 2002).

II. FcγRs et mécanismes d'action des anticorps thérapeutiques

Après avoir vu certaines caractéristiques des Acm, nous allons maintenant aborder le rôle des récepteurs FcγRs dans leurs mécanismes d'action. Pour aborder ce thème, j'ai choisi de reprendre un article que j'ai écrit durant ma thèse et qui est paru dans le bulletin du Cancer.

A. Caractéristiques générales des FcγRs

1. Historique

A la fin du XIX^{ème} siècle sont apparues les premières hypothèses suggérant que certains constituants du sérum pouvaient interagir avec les cellules du système immunitaire. Pour Jules Héricourt, l'un des pères de la sérothérapie anti-cancéreuse, « le secours dont l'organisme a besoin, le sérum le lui apporte ; et les phagocytes y trouvent le stimulant nécessaire à leur insuffisante activité. C'est l'appoint qui décide la victoire en leur faveur » (Héricourt, 1899). Le principe actif de la sérothérapie, dénommé quelques années plus tard par Paul Ehrlich par le terme d'anticorps, ne commença à être réellement connu sur le plan de sa structure moléculaire qu'à partir de 1959, grâce notamment aux travaux sur la fragmentation des immunoglobulines G (IgG) et l'identification d'une portion cristallisable, la région Fc (Porter, 1959).

En 1966, Berken *et al.* observent que du sérum de porcs immunisés avec des érythrocytes de mouton contient des anticorps capables de faire adhérer ces érythrocytes à des macrophages péritonéaux de porc, donnant l'allure de rosettes en microscopie (Berken *et al.*, 1966) (Figure 3). Ils mirent également en évidence que seuls certains anticorps (les IgG) possédaient cette propriété et que la liaison aux macrophages se faisait par l'intermédiaire de la portion Fc. Les premiers, ils évoquèrent un probable récepteur pour le Fc des IgG à la surface des macrophages. Les tentatives ultérieures de purification de ces récepteurs révélèrent qu'il en existait de plusieurs sortes. L'un d'entre eux, exprimé à la surface des

monocytes, était le seul à pouvoir lier les IgG monomériques avec une forte affinité (Anderson *et al.*, 1982).

Avec l'arrivée des anticorps monoclonaux à la fin des années 1970, il devint possible de détecter ces récepteurs et de commencer leur dénombrement. Trois classes de récepteurs furent alors identifiées et dénommées Fc γ RI, Fc γ RII et Fc γ RIII par l'Union Internationale des Sociétés d'Immunologie (IUIS) (Unkeless *et al.*, 1988). La lettre grecque γ désigne la spécificité pour l'isotype γ de chaîne lourde, caractéristique de la classe des IgG et le chiffre romain la classe de récepteur (IUIS/WHO, 1994). Dans la numérotation des classes de différenciation (CD), ils correspondent respectivement aux CD64, CD32 et CD16. Le clonage moléculaire des Fc γ Rs réserva quelques surprises, et permit de faire la relation entre structure et fonction de ces récepteurs. En effet, différentes formes de récepteurs Fc γ RII (Fc γ RIIA, Fc γ RIIB et Fc γ RIIC) et Fc γ RIII (Fc γ RIIIA et Fc γ RIIIB) se distinguant par leur ancrage membranaire et/ou leur motif de signalisation furent alors caractérisés (Brooks *et al.*, 1989 ; Peltz *et al.*, 1989).

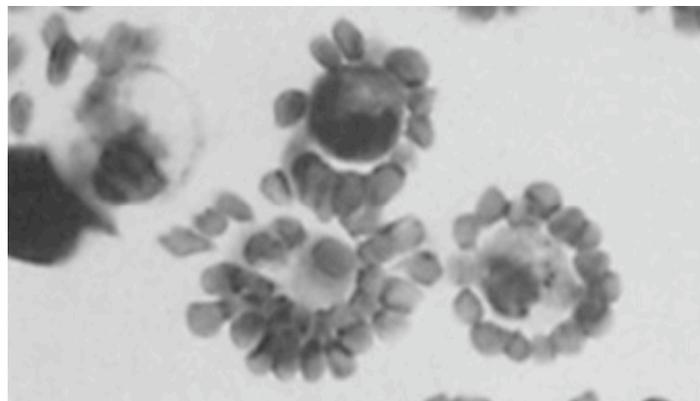


Figure 3: Mise en évidence des récepteurs pour la portion Fc des IgG. En présence de sérum de porcs immunisés, interaction des macrophages porcins et des érythrocytes de mouton. Cette interaction, qui prend la forme caractéristique d'une rosette (macrophage au centre, érythrocytes en périphérie) n'est possible qu'en présence de certains anticorps et s'effectue par l'intermédiaire de leur portion Fc. D'après Berken *et al.*, 1966.

2. Structure

Les récepteurs Fc γ Rs sont des glycoprotéines membranaires de la superfamille des immunoglobulines, dont la portion extracellulaire comprend 2 à 3 domaines immunoglobuliniques. D'un récepteur à l'autre, le degré d'identité de ces domaines est important, en lien avec leur fonction commune de liaison aux IgG.

Les récepteurs activateurs Fc γ RI et Fc γ RIIIA comportent une région transmembranaire comprenant un résidu chargé et une courte région intracytoplasmique. Le résidu chargé permet au récepteur de s'associer à des dimères d'une chaîne transductrice FcR- γ (Kim *et al.*, 2003). Cette chaîne possède une très courte région extracellulaire, une région transmembranaire et une région intracytoplasmique comportant un motif de transduction ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) impliqué dans l'activation cellulaire, qui se produit suite à l'agrégation des récepteurs Fc γ RI et Fc γ RIIIA par des complexes immuns formés d'antigènes et d'IgG. L'association du récepteur Fc γ RIIIA avec la chaîne FcR- γ est indispensable pour qu'il soit exprimé en surface. En effet Fc γ RIIIA contient dans son domaine intracellulaire, une séquence de rétention dans le réticulum endoplasmique qui va entraîner sa destruction en l'absence d'association avec la chaîne FcR- γ (Cosson *et al.*, 1991).

Les récepteurs Fc γ RIIA et Fc γ RIIC sont également des récepteurs activateurs se distinguant des précédents par le fait qu'ils possèdent leur propre motif de transduction ITAM dans leur portion intracytoplasmique et qu'ils n'ont donc pas besoin de chaînes accessoires pour entraîner l'activation cellulaire. Comme eux, le récepteur Fc γ RIIB contient son propre motif de transduction de type ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) ce qui fait de lui l'unique Fc γ R inhibiteur (Coggeshall, 1998). Enfin le récepteur Fc γ RIIIB est un récepteur atypique du fait qu'il s'agisse d'une protéine glypiée, c'est-à-dire reliée au feuillet externe de la membrane par une liaison glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui la localise

principalement dans les radeaux lipidiques. Sa structure ne lui confère aucune capacité intrinsèque de transduction du signal mais il peut coopérer avec d'autres récepteurs comme Fc γ RIIA, amenant à proximité de ces derniers des éléments de signalisation associés aux radeaux lipidiques. Cette hétérogénéité des Fc γ Rs est accentuée par la présence de variants d'épissage, permettant la synthèse de formes solubles de récepteurs, ou de récepteurs différant par la longueur de leur portion intracytoplasmique (Rappaport *et al.*, 1993 ; Moldovan *et al.*, 1999) (Tableau 2).

3. Expression cellulaire

Les Fc γ Rs sont exprimés sur la majorité des cellules myéloïdes et sur certaines cellules lymphoïdes (Tableau 2). Chaque récepteur présente un profil d'expression particulier tandis que chaque type cellulaire exprime le plus souvent plusieurs classes de Fc γ Rs. Ceux-ci seront donc engagés ensemble par des complexes immuns, les amenant à coopérer positivement comme par exemple Fc γ RIIA et Fc γ RIIIB sur les neutrophiles, ou négativement lorsque Fc γ RIIIB est co-exprimé avec Fc γ RI et parfois Fc γ RIIIA à la surface des monocytes et des macrophages. En conditions physiologiques et après engagement d'une faible quantité de complexes immuns, la balance entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs conduit la cellule à ne pas s'activer (Sánchez-Mejorada *et al.*, 1998). Certaines cytokines comme l'IFN- γ , ou des anaphylatoxines pourraient modifier cette balance en modifiant le rapport entre récepteurs activateurs et inhibiteurs, conduisant alors à l'activation de la cellule (Hartnell *et al.*, 1992 ; Werfel *et al.*, 1991).

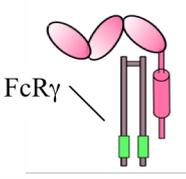
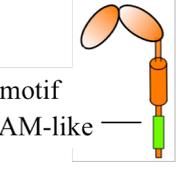
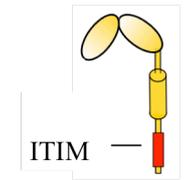
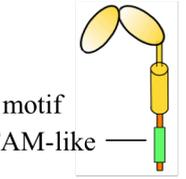
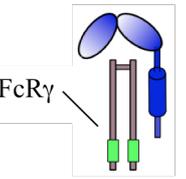
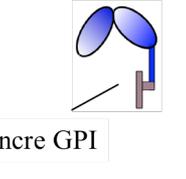
	Structure	Polymorphisme(s)	Expression	Transcrit(s)	Régulation
CD64	FcγRI 	—	Macrophages Monocytes Dendritiques Eosinophiles Neutrophiles	a1,a2	+ : IFN-γ ; IL-10 G-CSF - : IL-4
	FcγRIIA 	FcγRIIA-H131R	Macrophages Monocytes Eosinophiles Dendritiques Neutrophiles Mastocytes Plaquettes	a1,a2	+ : IFN-γ ; IL-3 - : IL-4
CD32	FcγRIIB 	—	Macrophages Monocytes Eosinophiles Dendritiques Neutrophiles Mastocytes Plaquettes	b1,b2,b3	—
	FcγRIIC 	FcγRIIC-ORF/STOP	Lymphocytes NK	c1, c2, c3, c4	—
CD16	FcγRIIIA 	FcγRIIIA-48 L/R/H FcγRIIIA-V158F	Macrophages Monocytes Dendritiques Mastocytes Lymphocytes NK Lymphocytes T γδ	a1-a6	+ : IFN-γ ; TGF-β - : IL-4
	FcγRIIIB 	FcγRIIIB-NA1/NA2/SH	Neutrophiles Eosinophiles	b	+ : IFN-γ ; GM-CSF - : TNF-α

Tableau 2: Caractéristiques générales des FcγRs.

4. Affinité pour les IgG

4.1 Interaction FcγRs et portion Fc des IgG

La cristallographie a permis de déterminer la structure des domaines extra-cellulaires de plusieurs FcγRs (FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIB) et de comprendre précisément comment s'effectue l'interaction entre ces récepteurs et la portion Fc des IgG (Sondermann *et al.*, 2000 ; Sondermann *et al.*, 2001). La structure générale de ces récepteurs est apparentée, avec des domaines immunoglobuliniques reliés par un peptide connecteur. L'étude du cocrystal FcγRIIIB-IgG1 a montré que la portion Fc se fixait au domaine extra-cellulaire proximal ainsi qu'à la région de connexion entre les deux domaines (Figure 4). Un récepteur ne pouvant fixer qu'une seule IgG, l'activation cellulaire ne peut avoir lieu que lorsque les récepteurs sont engagés par des ligands multivalents.

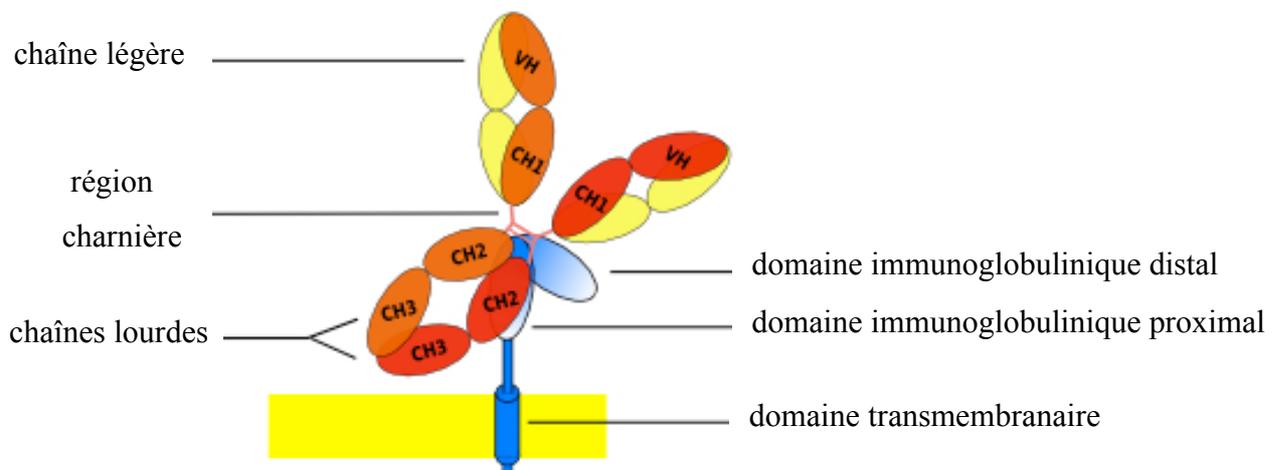


Figure 4: Interaction FcγR/ portion Fc des IgG. La portion Fc des IgG va se fixer au niveau d'acides aminés présents sur le domaine immunoglobulinique proximal et sur la région charnière.

4.2 Polymorphismes des domaines immunoglobuliniques des FcγRs

Comme nous le verrons dans la deuxième partie de cette introduction, de nombreux polymorphismes affectent les gènes codant les récepteurs FcγRII et FcγRIII. Ces polymorphismes peuvent avoir des répercussions fonctionnelles notamment lorsqu'ils se situent dans les régions d'interaction avec la portion Fc des IgG.

Le plus connu des polymorphismes affectant les domaines immunoglobuliniques des FcγRs est sans doute le polymorphisme V158F du récepteur FcγRIIIA, initialement décrit en 1989 (Ravetch *et al.*, 1989). Une substitution nucléotidique au niveau de l'exon 4 du gène *FCGR3A* conduit au codage d'une valine (V) ou d'une phénylalanine (F) au niveau du domaine proximal (acide aminé 158) du récepteur FcγRIIIA. Il n'est dès lors pas surprenant que ce polymorphisme influence la liaison de ces dernières (cf *infra*). Le récepteur FcγRIIIA présente également un polymorphisme tri-allélique en position 48 (domaine distal) entraînant la présence d'une leucine (L), d'une arginine (R) ou d'une histidine (H) (Koene *et al.*, 1997).

Un polymorphisme du récepteur FcγRIIA, codé par le gène *FCGR2A*, se traduit par la présence en position 131 du domaine immunoglobulinique distal d'une arginine (R) ou d'une histidine (H). Cette substitution, connue sur le plan moléculaire depuis 1991, affecte fortement l'affinité du récepteur FcγRIIA pour les IgG1 de souris. Les deux variants alléliques *FCGR2A*-131H (appelé LR pour « *low responder* ») et *FCGR2A*-131R (appelé HR pour « *high responder* ») lient les IgG2a et IgG2b de souris mais seul l'allèle *FCGR2A*-131R lie fortement les IgG1 de souris (Tax *et al.*, 1983).

Le gène *FCGR2C*, codant le récepteur FcγRIIC, présente un polymorphisme au niveau de l'exon codant le domaine immunoglobulinique distal. Une substitution nucléotidique aura pour conséquence, soit le codage d'une glutamine (Q) en position 57 de l'ADNc soit l'apparition d'un codon stop (X) et donc l'absence de récepteur à la surface cellulaire (Metes *et al.*, 1998).

Le récepteur FcγRIIIB existe sous deux formes alléliques sérologiquement définies par les alloantigènes NA1 et NA2 (Huizinga *et al.*, 1990). Ces deux formes alléliques diffèrent de quatre acides aminés (36, 65, 82 et 106) tous situés dans le domaine immunoglobulinique distal. Une substitution nucléotidique supplémentaire, retrouvée exclusivement au niveau de la forme allélique NA2, entraîne l'apparition d'une nouvelle forme nommée SH qui se caractérise par la présence soit d'une alanine (A) ou d'une asparagine au niveau de l'acide aminé 78 (Bux *et al.*, 1997).

4.3 Différences affinité/ avidité entre les FcγRs

Comme mentionné plus haut, FcγRI a été historiquement identifié à la surface des monocytes par sa capacité à lier les IgG monomériques, d'où une forte affinité pour ces dernières. Les autres FcγR présentent une affinité moindre pour les IgG monomériques mais fixent avec avidité les IgG engagées dans des complexes immuns. Ces différences d'affinité/avidité ont été longuement explorées pour tenter d'établir une hiérarchie des FcγRs. Il a notamment été montré que le polymorphisme V158F de FcγRIIIA influençait la fixation des IgG indépendamment du polymorphisme en position 48 (Koene *et al.*, 1997). Le récepteur FcγRIIA présente une affinité pour les IgG1 et les IgG3 mais il semble que l'alloforme FcγRIIA-131H soit la seule capable de lier les IgG2 humaines (Warmerdam *et al.*, 1991).

Très récemment, par des analyses combinées de cytométrie en flux et de résonance plasmonique de surface, une équipe de l'Institut Pasteur de Paris a permis d'avoir une vue d'ensemble de l'affinité des différents FcγR pour chaque sous-classe d'IgG (Bruhns *et al.*, 2009) (Figure 5). Contrairement à ce qui a longtemps été écrit, il n'y a pas de restriction de fixation des FcγRs pour une ou des sous-classes d'IgG en dehors des IgG2 qui ne sont fixées ni par FcγRI ni par FcγRIIIB. Par comparaison avec les autres récepteurs, qui présentent une affinité moyenne/faible pour les IgG, le récepteur FcγRI apparaît comme un récepteur de forte affinité, probablement à cause de son domaine immunoglobulinique supplémentaire. A l'inverse, FcγRIIIB lie très faiblement toutes les sous-classes d'IgG. Comme il avait été

rapporté précédemment (Koene *et al.*, 1997), l'alloforme FcγRIIA-158V présente une affinité pour les IgG1, IgG2 et IgG3 supérieure à celle de l'alloforme FcγRIIA-158F. Les variants FcγRIIA-131H et FcγRIIA-131R présentent des différences d'affinité concernant les IgG1, les IgG2 et les IgG4 mais fixent les IgG3 de la même façon.

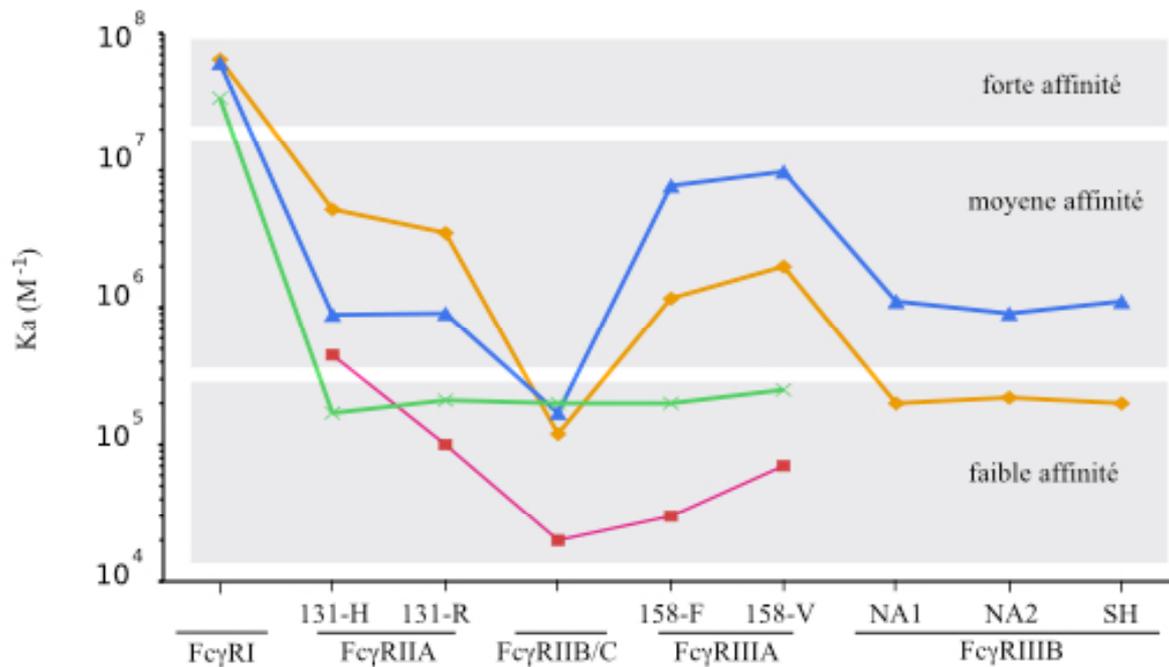


Figure 5 : Affinités des FcγRs pour les différentes sous-classes d'IgG en fonction des différents polymorphismes affectant les domaines immunoglobuliniques des IgG. Les IgG1 sont représentées par les losanges oranges, les IgG2 par des carrés rouges, les IgG3 par des triangles bleus et les IgG4 par des croix vertes (D'après Bruhns *et al.*, 2009).

5. Mécanisme d'action

Le déclenchement d'une réponse cellulaire via les FcγRs va être conditionné, pour les récepteurs de faible affinité, par l'agrégation de ces récepteurs grâce à l'interaction avec des complexes immuns solubles ou avec des cellules opsonisées/sensibilisées par des IgG. Pour le récepteur de forte affinité FcγRI, elle se fera lors de la reconnaissance d'un antigène multivalent. L'agrégation de ces récepteurs conduira à leur migration au sein de radeaux lipidiques. Cette étape est indispensable pour la transduction des signaux (Bournazos *et al.*, 2009). La phosphorylation des tyrosines des motifs ITAM ainsi que le recrutement de protéine-kinases de la famille Src (lck, lyn, hck) et Syk (Syk, ZAP-70...) vont être les premières étapes de l'activation cellulaire induite par les FcγRs. Ces kinases activées vont catalyser la phosphorylation et l'activation d'un certain nombre de substrats comme la phospholipase C (PLC), la PI3-kinase ou encore des protéines de la famille des MAP kinases (Sánchez-Mejorada *et al.*, 1998). Ces différents substrats dépendront du type de cellule, de la fonction cellulaire concernée et également du type de récepteur engagé. La transduction du signal s'opérant par le motif ITAM-like des récepteurs FcγRIIA et FcγRIIC sera à l'origine d'une activité cellulaire différente de celle observée via le motif ITAM classique des dimères FcR-γ (Van den Herik-Oudijk *et al.*, 1995). En fonction du type cellulaire et de son équipement en récepteur FcγR, on distingue quatre grands types de fonctions cellulaires pouvant découler de ces voies d'activation.

La première est la phagocytose, exercée par les phagocytes « professionnels » que sont les macrophages et les neutrophiles (Figure 6). En présence d'agents pathogènes, de cellules ou de débris cellulaires opsonisés par des IgG, les phagocytes vont émettre des pseudopodes autour des complexes immuns pour former un phagosome. Celui-ci va fusionner avec des lysosomes ou différents granules pour former un phagolysosome contenant diverses enzymes hydrolytiques voire des protéines cationiques. Ce processus s'accompagne aussi d'une explosion oxydative par mise en jeu de la NADPH-oxydase, aboutissant à la génération de radicaux libres de l'oxygène, de peroxyde d'hydrogène ou H₂O₂ (myéloperoxydase du neutrophile) et d'oxyde nitrique ou NO (synthétase de l'oxyde nitrique du macrophage) (Indik *et al.*, 1995).

La présentation antigénique constitue une deuxième voie de réponse enclenchée par les Fc γ Rs et permettra d'activer une réponse immunitaire adaptative. Ainsi les cellules dendritiques vont pouvoir endocyter les particules antigéniques *via* leurs Fc γ Rs, les dégrader et les présenter sous forme de peptides apprêtés dans des molécules du CMH (Fanger *et al.*, 1996) (Figure 6). En règle générale, ces peptides issus de protéines exogènes sont présentés par des molécules de CMH de classe II, induisant l'activation de lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ mais la capture par les Fc γ Rs semble également favoriser la présentation de ces peptides exogènes *via* le CMH de classe I (cross-présentation), permettant l'initiation de réponses T CD8⁺ cytotoxiques (Regnault *et al.*, 1999).

Le troisième type de réponse enclenché par l'activation des Fc γ Rs est la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps ou ADCC. Il s'agit de la plus connue dans le contexte d'une action anti-tumorale et les cellules NK et les monocytes/macrophages en sont les principaux acteurs (Figure 6). Après la liaison à la cellule cible par les Fc γ Rs, les granules contenus dans le cytoplasme des cellules NK sont acheminés jusqu'à la membrane plasmique et déversés dans l'espace intercellulaire séparant l'effecteur et la cible. En se polymérisant à la surface des cibles, la perforine va créer des pores conduisant à une déstabilisation de la bicouche lipidique. La perméabilité ainsi obtenue va favoriser l'entrée de granzymes, autres constituants cytotoxiques des granules NK. Parmi eux, la granzyme B va agir sur la cascade des caspases et entraîner l'apoptose des cibles ; d'autres granzymes vont coopérer et provoquer la mort des cellules cibles (Chowdhury *et al.*, 2008). Au niveau des macrophages, cette cytotoxicité cellulaire va prendre la forme d'une « phagocytose extériorisée ». Les granules normalement déversés dans les phagosomes sont exocytés au niveau de l'espace intercellulaire, permettant ainsi la lyse de la cellule cible grâce à leur contenu particulièrement riche en enzymes protéolytiques, en radicaux libres et en NO (Connor *et al.*, 1990). Il est vraisemblable qu'un tel phénomène existe aussi avec les polynucléaires neutrophiles (Valerius *et al.*, 1993).

Le quatrième mécanisme activé par les Fc γ Rs est la sécrétion de facteurs solubles comme des cytokines ou des substances vasoactives. Suite à l'activation par les Fc γ Rs ce mécanisme va pouvoir jouer des rôles variés comme par exemple la modulation de la réponse immunitaire mise en jeu avec des cytokines comme l'IFN- γ ou l'IL-10 (te Velde *et al.*, 1990). Il pourra également jouer un rôle dans la cytotoxicité des cellules NK avec l'intervention de cytokines membranaires que sont les ligands de récepteurs de mort comme le ligand de FAS ou TRAIL (Oshimi *et al.*, 1996).

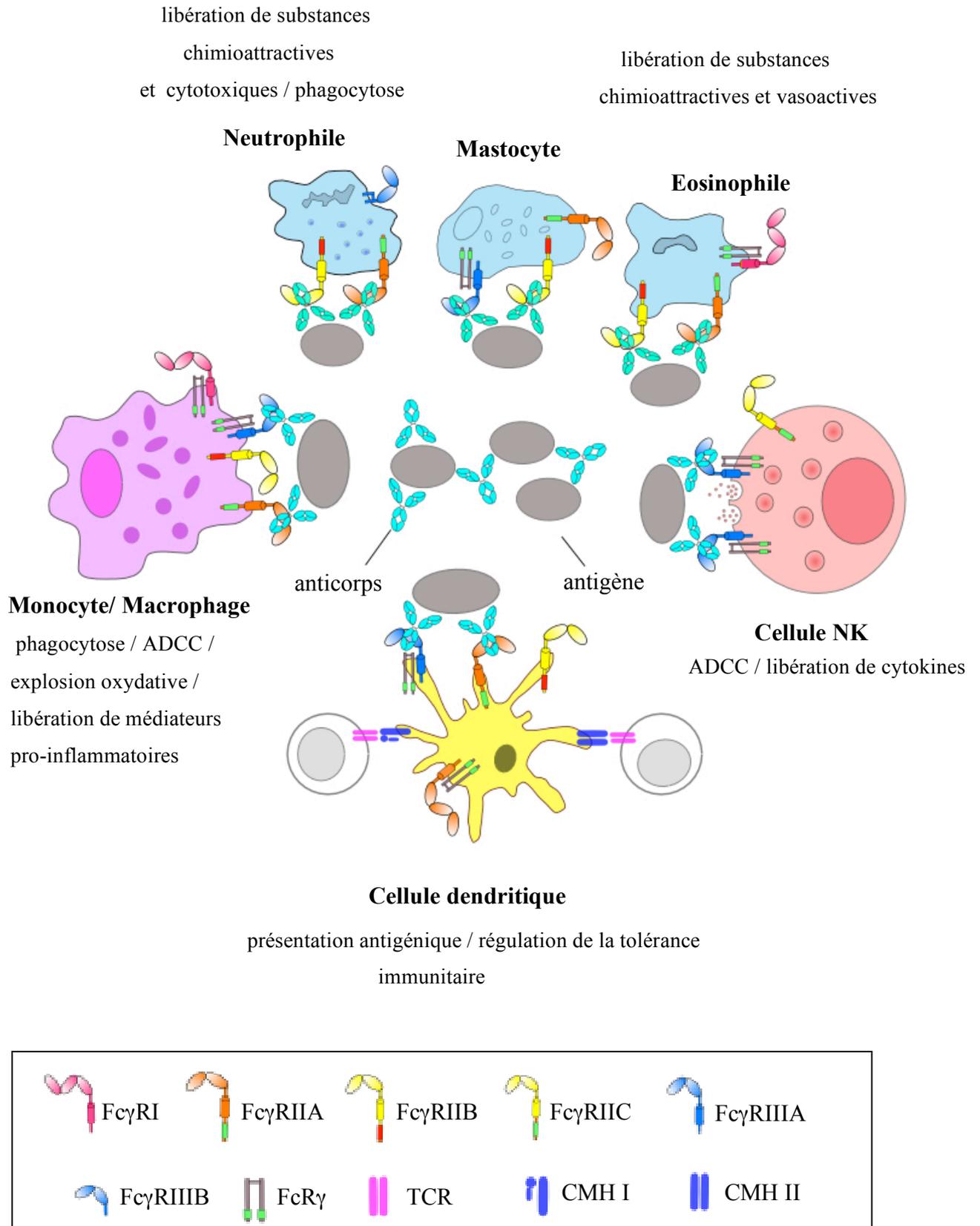


Figure 6 : Mécanismes d'action enclenchés par les FcγRs.

B. Implications des FcγRs dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques

1. Modèles murins, anticorps monoclonaux thérapeutiques et FcγRs

L'étude des souris dont les gènes des récepteurs Fc ont été invalidés permet une évaluation de l'implication de ces récepteurs dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques. Malgré la relative proximité phylogénétique entre les deux espèces, il existe de nombreuses différences entre les FcγRs humains et murins. La souris, contrairement à l'homme, ne possède que trois récepteurs activateurs, le FcγRI, le FcγRIII et le FcγRIV plus récemment décrit (Nimmerjahn *et al.*, 2005), et un seul récepteur inhibiteur (FcγRII), avec des profils d'expression différents des récepteurs FcγRs humains (Nimmerjahn *et al.*, 2008).

Bien qu'il existe un risque d'immunogénicité chez les souris immunocompétentes quand une IgG1 humaine est administrée, l'utilisation d'anticorps thérapeutiques chez la souris est possible et présente une certaine pertinence du fait que les IgG1 humaines présentent de l'affinité pour les FcγRs murins alors que l'inverse n'est pas vrai (Loisel *et al.*, 2007). En revanche, du fait que les anticorps thérapeutiques ne présentent pratiquement jamais de réaction croisée avec l'antigène cible murin, il est nécessaire d'avoir recours soit à des greffes de cellules tumorales humaines exprimant l'antigène cible humain (modèles xénogéniques reposant sur des souris immunodéficientes), soit à des modèles où l'antigène cible humain est exprimé par transfection ou transduction dans des cellules murines (modèles syngéniques chez des souris immunocompétentes).

Des souris nude et FcR-γ^{-/-} (n'exprimant donc pas FcγRI, FcγRII et FcγRIV) se révèlent partiellement incapables de contrôler des xénogreffes de cellules humaines exprimant le CD20 ou le HER2 humain, en présence de rituximab ou de trastuzumab respectivement (Clynes *et al.*, 2000) (Figure 7). Toujours dans le cas de xénogreffe, des souris nude et FcγRII^{-/-} (orthologue du récepteur humain FcγRIIb) présentent une augmentation de la capacité à éliminer les cellules tumorales en présence de rituximab (Wernersson *et al.*, 1999). Les cellules NK

murines n'exprimant pas Fc γ RII, ces résultats pourraient être dûs aux macrophages qui seraient recrutés et activés plus efficacement chez les souris Fc γ RII^{-/-}. Enfin, l'ensemble des données disponibles concernant ces souris invalidées tend à démontrer que les neutrophiles (Hernandez-Ilizaliturri *et al.*, 2003) ou les macrophages (Uchida *et al.*, 2004) seraient les principales populations cellulaires impliquées dans le mécanisme d'action de ces deux anticorps thérapeutiques chez la souris.

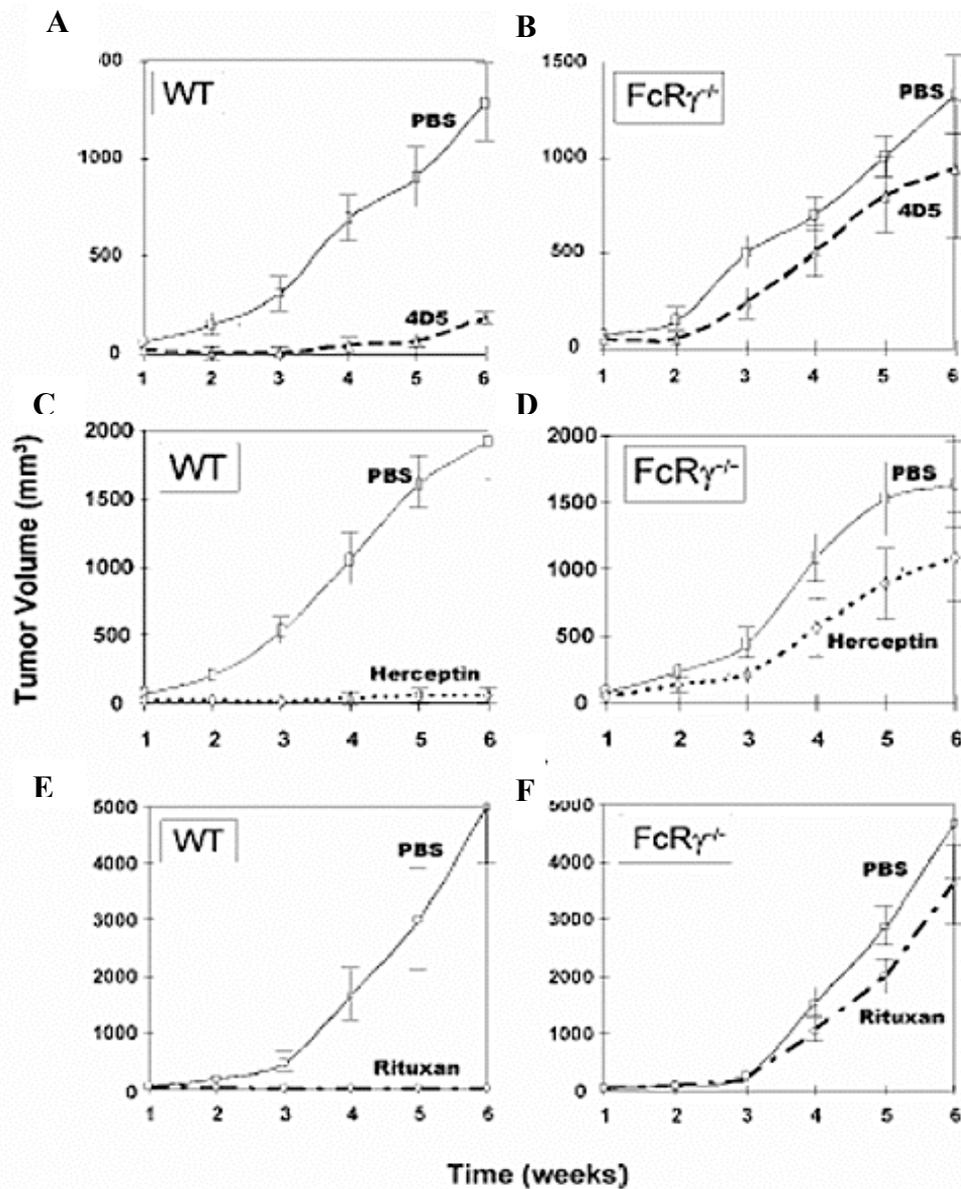


Figure 7 : L'activité anti-tumorale des anticorps 4D5, trastuzumab et rituximab requière l'activation des Fc γ Rs. Mesure du volume tumorale chez des souris nude et xénotreffées par une lignée sur-exprimant l'antigène HER2 humain (BT474 M1) (A-D) ou par une lignée exprimant le CD20 humain (cellules Raji) (E-F). Chez les souris WT, l'injection d'une IgG1 murine anti-HER2 (4D5) ou d'une IgG1 humanisé (trastuzumab) entraîne une inhibition de la croissance tumorale (A-C), non observé chez les souris FcR $\gamma^{-/-}$ (B-D). Des résultats identiques sont observés lors de l'injection du rituximab (E-F). (D'après Clynes *et al.*, 2000).

2. Polymorphismes *FCGR* et réponse clinique aux anticorps thérapeutiques

Les études d'associations des polymorphismes des gènes *FCGR* avec la réponse thérapeutique constituent, bien qu'elle soit indirecte, la seule preuve fondée sur l'expérience clinique de l'implication des FcγRs dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques (Tableau 3).

Du fait de leur positionnement dans une région d'interaction directe avec les IgG, les polymorphismes V158F de FcγRIIIA et H131R de FcγRIIA sont ceux sur lesquels porte la quasi-totalité de ces études d'association. La plupart s'accordent sur le fait que le génotype *FCGR3A-158VV* est associé à une meilleure réponse clinique, que ce soit pour le rituximab (Cartron *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2006 ; Ghielmini *et al.*, 2005 ; Treon *et al.*, 2005 ; Weng *et al.*, 2003) , le cétuximab (Zhang *et al.*, 2007 ; Bibeau *et al.*, 2009 ; Etienne-Grimaldi *et al.*, 2009) ou le trastuzumab (Musolino *et al.*, 2008) (Tableau 3). En revanche l'association du polymorphisme H131R avec la réponse clinique porte à débat. Des études ont en effet montré l'association de ce dernier, soit indépendamment, soit combiné avec le polymorphisme V158F, avec la réponse clinique au rituximab ou au trastuzumab. Les autres polymorphismes des FcγRs n'ont révélé quant à eux aucune association (Cartron *et al.*, 2008 ; Weng *et al.*, 2009), ce qui signifie que le polymorphisme V158F de FcγRIIIA reste à ce jour le seul qui soit réellement associé à la réponse aux anticorps thérapeutiques.

RITUXIMAB					
Auteurs	polymorphisme(s) étudié (s)			Cancer(s)	Association(s)
	<i>FCGR3A</i> 158V/F	<i>FCGR3A</i> 48L/R/H	<i>FCGR2A</i> 131H/R		
Cartron <i>et al.</i> (n=49)	✓		✓	LF	
Kim <i>et al.</i> (n=85)	✓		✓	LD	<i>FCGR3A</i> 158 VV associé à une meilleure réponse
Ghielmini <i>et al.</i> (n=113)	✓			LF / LM	
Treon <i>et al.</i> (n=58)	✓	✓		MW	
Weng <i>et al.</i> (n=171)	✓		✓	LF	<i>FCGR3A</i> 158 VV et <i>FCGR2A</i> 131 H/H indépendamment associés avec une meilleure réponse
CETUXIMAB					
Zhang <i>et al.</i> (n=39)	✓		✓		<i>FCGR3A</i> 158 FF et <i>FCGR2A</i> 131 H/H indépendamment associés avec une meilleure réponse
Bibeau <i>et al.</i> (n=69)	✓		✓	cancers colo-rectaux	<i>FCGR3A</i> 158 VV et <i>FCGR2A</i> 131 H/H indépendamment associés avec une meilleure réponse
Grimaldi <i>et al.</i> (n=52)	✓		✓		<i>FCGR3A</i> 158 VV associé à une meilleure réponse
TRASTUZUMAB					
Musolino <i>et al.</i> (n=54)	✓		✓	cancer du sein	

Tableau 3: Etudes d'association entre polymorphismes des FcγRs et réponse aux anticorps thérapeutiques. Lymphome folliculaire (FL) ; Lymphome diffus à grandes cellules B (LD) ; Lymphome du manteau (LM) ; macroglobulinémies de Waldenström (MW).

3. Criblage d'anticorps thérapeutiques sur leur capacité à engager *in-vitro* les FcγRs

Des modèles d'études *in vitro* ont été développés afin de cribler les anticorps thérapeutiques sur leurs capacités à engager les FcγRs, et pour étudier les fonctions effectrices qui leur sont associées. Chacun de ces modèles apporte des éléments sur l'implication des FcγRs dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques et ouvre la porte à de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Les études *in vitro* concernant l'implication de l'ADCC dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques sont sans aucun doute les plus documentées et elles ont permis de mettre en évidence que des anticorps comme le rituximab (Manches *et al.*, 2003), le trastuzumab (Beano *et al.*, 2008), le cétuximab (Roda *et al.*, 2007) ou encore l'alemtuzumab (Golay *et al.*, 2004) étaient capable de lyser des cellules cibles tumorales en présence d'effecteurs cytotoxiques. Parmi ces effecteurs, les NK s'avèrent être presque toujours les acteurs de cette ADCC même si, dans certaines conditions expérimentales, il a été montré que les neutrophiles (van der Kolk *et al.*, 2002), les monocytes ou des macrophages (Richards *et al.*, 2008 ; Lopes de Menezes *et al.*, 2007) étaient également capables d'ADCC à l'encontre de cellules tumorales sensibilisées par du rituximab ou d'autres anticorps. Il a également été montré qu'en présence de rituximab (Dall'ozzo *et al.*, 2004 ; Hatjiharissi *et al.*, 2007), de trastuzumab (Musolino *et al.*, 2008) ou de cétuximab (Lopez-Albateiro *et al.*, 2009) les NK issus de donneurs de génotypes *FCGR3A*-158VV exercent une ADCC « supérieure » à celle qu'exercent les NK issus de donneurs des deux autres génotypes. Pour analyser plus finement ce phénomène, notre équipe a quantifié la sensibilité des cellules NK au rituximab en recherchant la concentration en rituximab induisant 50 % de la lyse totale (EC50) de cellules Daudi (cellules exprimant le CD20). Notre équipe a montré que l'EC50 des cellules NK de génotype VV est significativement inférieure à celle requise par les cellules NK de génotype FF, ce qui est parfaitement accord avec la plus faible affinité pour les IgG1 de l'alloforme 158F du FcγRIIIA (Figure 8). En revanche, le pourcentage de lyse maximale n'est pas significativement différent entre les deux génotypes (Dall'ozzo *et al.*, 2004). Ces observations permettent de mieux appréhender l'importance des concentrations en anticorps et donc de l'exposition au médicament dans la relation génotype/phénotype observée cliniquement. Elles

suggèrent également qu'une activité maximale *in vivo* pourrait être obtenue pour chaque patient, pourvu que la concentration en rituximab chez les individus de génotype 158FF soit plus importante que chez les 158VV. Un modèle obtenu *in silico* a utilisé les résultats d'essais cliniques pour simuler la relation dose - survie sans progression chez les sujets VV et chez les porteurs de l'allèle F. Cette étude indique en réalité qu'un ajustement des doses en fonction du génotype *FCGR3A* ne serait pas réalisable, car même après une augmentation massive de la dose de rituximab (jusqu'à 2250 mg/m²) la survie sans progression des sujets porteurs de F serait toujours inférieure à celles des sujets VV (Ternant *et al.*, 2009).

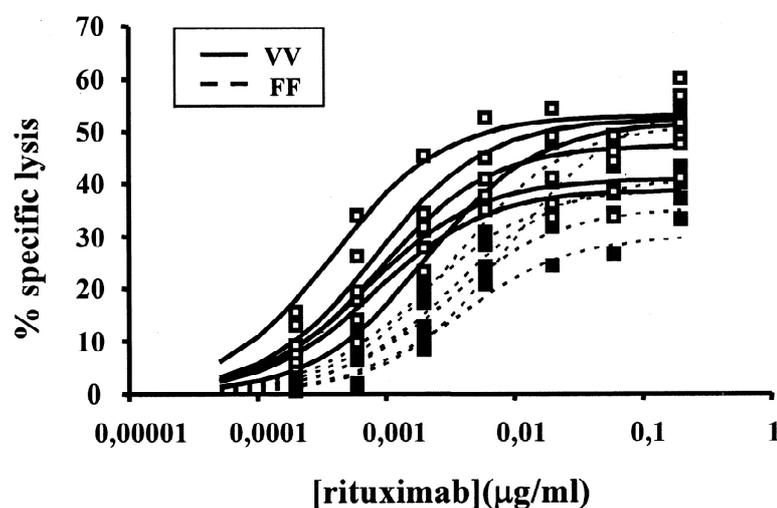


Figure 8 : Relation entre la concentration de rituximab et la lyse de cellules Daudi par des cellules NK. Des cellules Daudi CD20+ ont été chargées au Cr51 et incubées pendant 4 heures à 37°C avec des cellules NK de donneurs de génotypes *FCGR3A*-158VV ou 158FF (ratio effecteur :cible = 2,5 :1) en présence de différente concentration de rituximab. La cytotoxicité envers les cellules Daudi est exprimé en % de lyse et par le % prédit par un modèle Emax (ligne continue : VV / pointillée : FF). A faible concentration en rituximab, le % de lyse observé ou prédit est identique entre les VV et les FF alors qu'à forte concentration les VV montrent un meilleur % de lyse que les FF.

Outre l'ADCC, l'opsonisation de cellules tumorales par un anticorps thérapeutique peut conduire à sa phagocytose par les macrophages (Manches *et al.*, 2003) ou les neutrophiles (Shibata-Koyama *et al.*, 2009) (Figure 9). La phagocytose exercée par les macrophages semble dépendre du Fc γ RIIa et n'est donc pas affectée par le polymorphisme V158F. La sensibilisation par le rituximab peut aussi provoquer la capture des cellules tumorales par des cellules dendritiques, la présentation de peptides antigéniques dérivés de la tumeur et la génération de lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques (Selenko *et al.*, 2002). Cette effet « vaccinal » du rituximab a été confirmé très récemment par la démonstration que des lymphocytes T de patients ayant été traités par cet anticorps sont capables de s'activer lorsqu'ils sont mis en présence de cellules dendritiques chargées avec des peptides issus de l'idiotype de l'immunoglobuline de membrane du clone lymphomateux (Hilchey *et al.*, 2009).

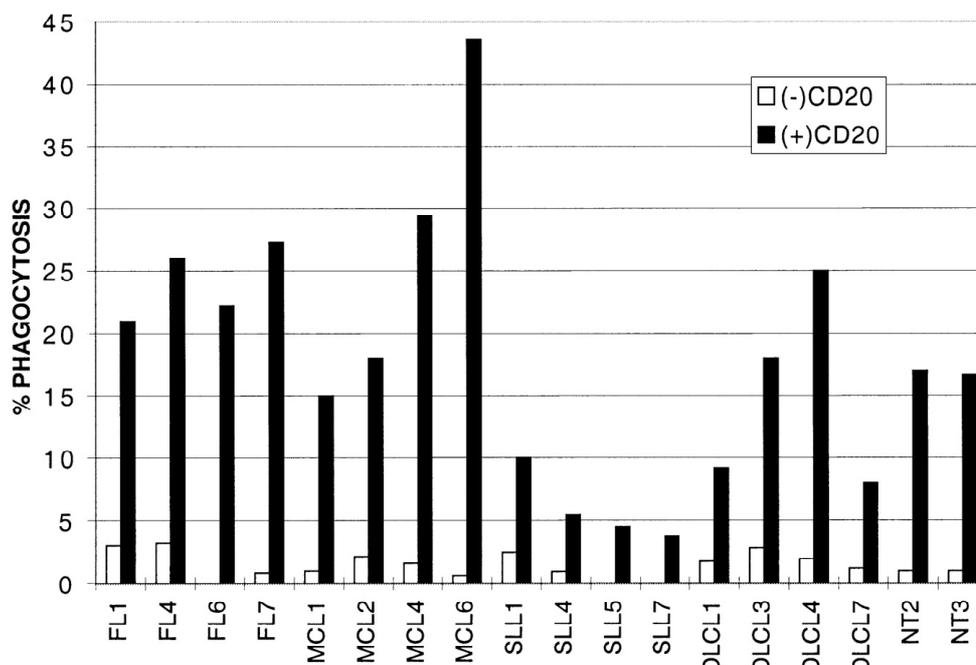


Figure 9 : Phagocytose médiée par le rituximab. Différents types de cellules lymphomateuses (FL : lymphome folliculaire ; MCL : lymphome du manteau ; SLL : lymphome à petites cellules ; DLCL : lymphome diffus à grande cellule) ou des cellules B non tumorales (NT), ont été incubées pendant 2 heures avec des macrophages sans (blanc) ou avec 2 μ g/mL de rituximab (noir). D'après Manches *et al.*, 2003.

Au vu des différentes fonctions pouvant être enclenchées par les anticorps thérapeutiques via les Fc γ Rs, il est légitime de chercher à potentialiser les interactions entre ces deux partenaires. Pour que les anticorps thérapeutiques aient une meilleure affinité pour les Fc γ Rs, la première approche consiste à muter la séquence codante de l'anticorps dans la région interagissant avec les Fc γ Rs pour accroître les interactions moléculaires, ce qu'on fait par exemple Genentech, Applied Molecular Evolution ou Xencor pour produire des mutants du trastuzumab ou du rituximab (Lazar *et al.*, 2006 ; Shields *et al.*, 2001). De tels anticorps mutés présentent de fait une phagocytose augmentée (Richards *et al.*, 2008) ainsi qu'une augmentation de leurs capacités cytolytiques *in vitro* et *in vivo* (Stavenhagen *et al.*, 2007 ; Lazar *et al.*, 2006) (Figure 10). Le développement clinique de tels anticorps pourrait toutefois, du fait de l'introduction des mutations dans la séquence peptidique, se heurter à des problèmes d'immunogénicité accrue.

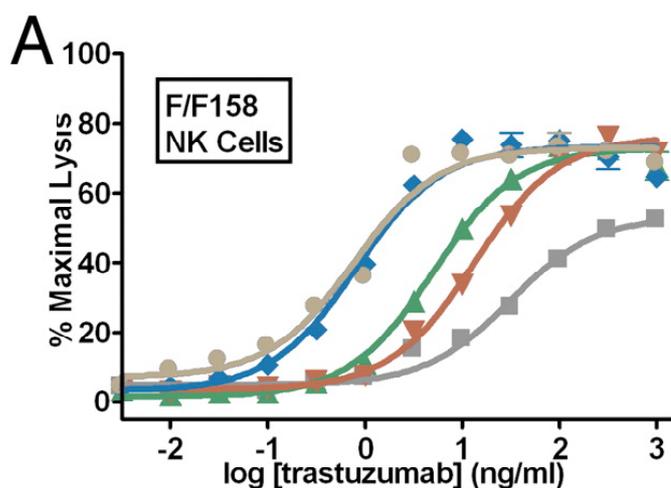


Figure 10 : Augmentation des fonctions cytolytiques du trastuzumab par mutation de certains acides aminés de la portion Fc. Test d'ADCC contre des cellules cancéreuses de sein SkBr3 en présence de variants de trastuzumab et de cellules NK de génotype FCGR3A-158FF. carrés gris, trastuzumab non muté ; triangles verts, mutant S239D ; triangles inversés rouges, mutant I332E ; losange bleus, mutant S239D/I332E ; cercle gris, mutant S239D/I332E/A330L. (D'après Lazar *et al.*, 2006).

La deuxième approche permettant de potentialiser l'interaction entre FcγRs et anticorps thérapeutiques repose sur la glyco-ingénierie des anticorps. En effet, la modification du N-glycane situé dans la portion Fc des IgG1 (sur l'Asn297 du domaine CH2) modifie la liaison aux FcγRs. Il a été montré que l'absence de fucose à la racine de l'oligosaccharide était le facteur favorisant le plus la liaison au FcγRs (Jefferis *et al.*, 2002 ; Shields *et al.*, 2002). Plusieurs firmes pharmaceutiques se sont lancées dans la génération d'anticorps à glycosylation modifiée (afucosylation principalement) : GlycoMAb[®] chez Roche-GlycArt, EMABling[®] au LFB, Potelligent[®] chez Kyowa/Biowa. *In vitro*, les anticorps afucosylés anti-CD20 développés présentent une phagocytose augmentée médiée par les neutrophiles (van der Kolk *et al.*, 2002) ainsi qu'une ADCC médiée par les NK supérieure à celle observée pour le rituximab (de Romeuf *et al.*, 2008) (Figure 11). Plusieurs essais de phase I/II du GA101/RO5072759, un nouvel anti-CD20 humanisé afucosylé, ont été lancés par Roche et montrent d'après les premiers résultats une toxicité similaire à celle du rituximab et une efficacité sensiblement supérieure (Morschhauser *et al.*, 2009).

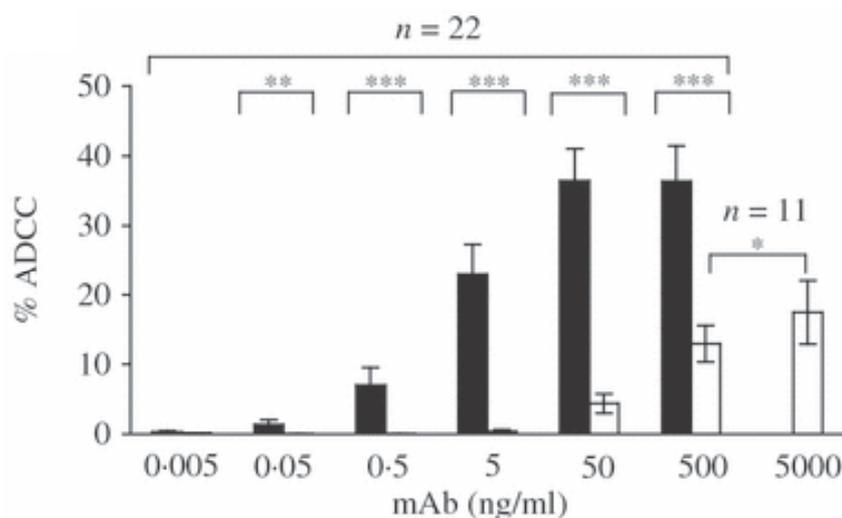


Figure 11 : Augmentation des capacités cytolytiques du rituximab par modification de la glycosylation de la portion Fc. Des cellules NK ont été incubées avec des cellules de leucémie lymphoïde chronique (n=22) avec des concentrations d'anticorps de 0.005 à 500 ng/ml, et pour certains patients (n=11) avec 5000 ng/ml de rituximab. Les pourcentages de lyse induite par l'anticorps EMAB-6 présentant une glycosylation modifiée (barre noire) et par le rituximab (barre blanche) sont exprimé par le pourcentage moyen d'ADCC ± l'écart-type. (*P = 0.0423, **P < 0.03, ***P ≤ 0.0007). (D'après de Romeuf *et al.*, 2008).

III. Caractéristiques génomiques et génétiques des gènes codant les Fc γ Rs

A. Organisation génomique des gènes codant les Fc γ Rs

1. Organisation chez l'homme

L'établissement des cartes physiques des différentes régions génomiques contenant les gènes *FCGR* a été particulièrement compliqué notamment du fait de la forte homologie existant entre ces différents gènes.

Le récepteur de forte affinité pour les IgG, Fc γ RI, et ses proches parents, sont codés par une famille de trois gènes présentant environ 95% d'identité nucléotidique et localisés sur le chromosome 1. Des expériences d'hybridation *in situ*, ont révélé que ces trois gènes se répartissent de part et d'autres du centromère du chromosome 1. Du fait d'une probable inversion péricentromérique, le gène *FCGR1B* est retrouvé en position 1p12 alors que les gènes *FCGR1A* et *FCGR1C* en position 1q21 (Maresco *et al.*, 1996). On sait malgré tout très peu de choses de l'histoire évolutive de ce cluster, qui ne sera pas abordé dans cette thèse.

En utilisant la même méthodologie, Grundy *et al.* ont mis en évidence que les gènes codant le récepteur Fc γ RII (*FCGR2*) et Fc γ RIII (*FCGR3*) se localisent également sur le chromosome 1 et plus particulièrement au niveau du bras long (bande q23-24) (Grundy *et al.*, 1989). L'identification, grâce au clonage de différent type de gènes *FCGR2* (Brooks *et al.*, 1989) et de type *FCGR3* (Peltz *et al.*, 1989) entraîna la nécessité d'établir de façon précise l'organisation de ce cluster de gène.

La première tentative d'établissement d'une carte physique eut lieu grâce au criblage d'une librairie de YAC (*Yeast Artificial Chromosome*) sur laquelle furent réalisées des séries de Southern blots avec des sondes spécifiques des gènes codant Fc γ RII et Fc γ RIII. Sur un des

YAC isolés il fut mis en évidence que le gène III-1 (codant ce qui s'appelle désormais Fc γ RIIB) était flanqué de deux gènes, Fc γ RIIC et Fc γ RIIB. Sur un autre YAC, fut identifié le gène Fc γ RIIA qui lui se trouvait à proximité du gène Fc γ RIIA. Ces travaux permettent également d'avancer les premières hypothèses sur la formation de ce cluster de gènes ayant fait intervenir des phénomènes de duplication. De plus les auteurs de ces travaux suggèrent que le gène IIa' qui présente de forte homologie avec les gènes IIb et III, semble être le résultat d'un processus évolutif faisant intervenir des mécanismes de recombinaison ou de conversion génique (Qiu *et al.*, 1990) (Figure 12).

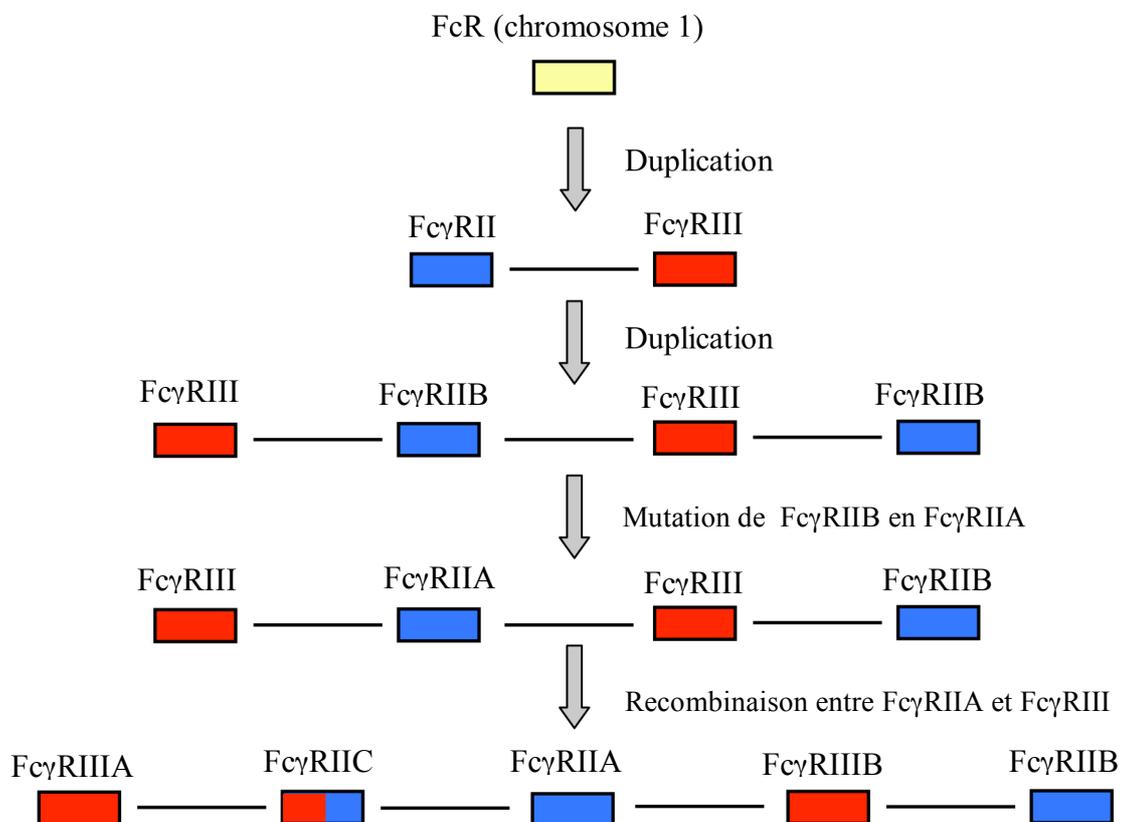


Figure 12 : Scénario évolutif et première carte du cluster *FCGR2/3* publiée. Grâce aux fortes homologies existantes entre les gènes, ce cluster a pu évoluer par l'intermédiaire de duplication successives et de recombinaisons (D'après Qiu *et al.*, 1990).

Une deuxième carte fut établie grâce au criblage d'une banque de BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) grâce à des PCR spécifiques de gène réalisées au niveau de l'exon EC1 (domaine extra cellulaire distal) de chacun de des gènes *FCGR2/3*. Une approche spécifique fut développée pour discriminer les gènes *FCGR2B* et *FCGR2C* (Su *et al.*, 2002). En effet, le gène *FCGR2C* est un gène chimérique issu d'un crossing-over inégal entre les gènes *FCGR2A* et *FCGR2B*. Il en résulte que sa partie 5' (du promoteur jusqu'à l'intron 6) est identique à *FCGR2B* et que sa partie 3' (de l'intron 6 à jusqu'à la partie 3'UTR) est quant à elle identique à *FCGR2A* (Warmerdam *et al.*, 1993). Du fait de l'homologie entre *FCGR2B* et *FCGR2C*, les PCR effectuées au niveau de l'exon 3 permirent donc une co-amplification de ces deux gènes. Une mutation non-sens de *FCGR2C* (ORF/STOP) retrouvé chez la plupart des individus, permit de faire dans un deuxième temps la distinction entre *FCGR2B* et *FCGR2C*. Grâce à cette approche, il fut montré une organisation du cluster *FCGR2/3* différente de celle initialement publiée en particulier concernant les gènes *FCGR2A*, *FCGR2C* et *FCGR3A*. L'orientation des gènes a également été précisée. De plus ces travaux montrèrent que *FCGR2B* occupe une position télomérique au sein du chromosome 1 alors que *FCGR2A* se trouve en position centromérique (Figure 13).

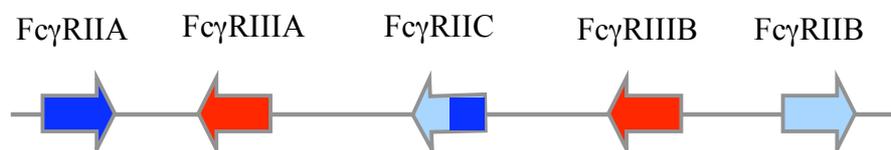


Figure 13 : Deuxième version de la carte du cluster *FCGR2/3*. Les positions respectives des gènes au sein du chromosome 1 ont été définies de même que leur orientation. C'est ainsi que les gènes codant *FcγRIIA*, *FcγRIIC* et *FcγRIIB* se retrouvent dans la même orientation (D'après Su *et al.*, 2002).

Parallèlement à ces données publiées, les premières cartes issues du projet de séquençage du génome humain apparaissent. Les premiers assemblages et les premières annotations firent apparaître un cluster composé uniquement des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR3A* où *FCGR2C* et *FCGR3B* n'étaient que des allèles des gènes *FCGR2A* et *FCGR3A* (version 35.1 NCBI genome project). La version actuelle du réassemblage du génome humain (version 37.1 NCBI genome project) fait apparaître une organisation similaire à celle publiée par Su *et al.*, même si l'orientation de certains gènes a été modifiée. De plus, grâce à ce nouvel assemblage, deux gènes codant des protéines Hsp (*HSPA6* et *HSPA7*) ont été précisément localisés au sein de ce cluster (Figure 14).

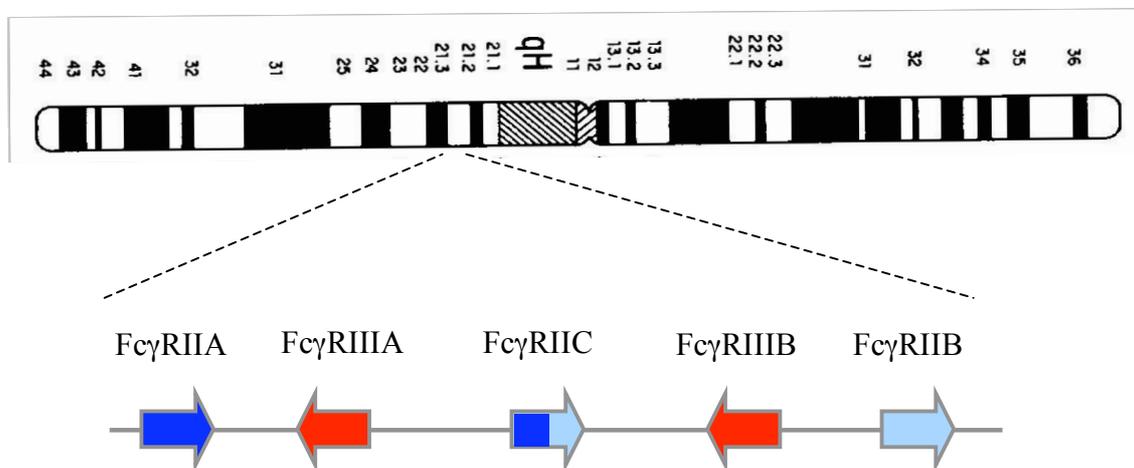


Figure 14 : Organisation du cluster *FCGR2/3* selon l'assemblage 37.1 du projet de séquençage du génome humain. Contrairement à ce qui avait été publié auparavant, ce nouvel assemblage fait apparaître le gène *FCGR2C* dans la même orientation que les gènes *FCGR2A* et *FCGR2B*.

2. Organisation génomique chez les mammifères

D'une façon générale, peu d'informations sont disponibles concernant les gènes codant les récepteurs FcγRs chez les mammifères autres que l'homme. Des homologues de récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines ont été mis en évidence chez de nombreux invertébrés comme le poisson chat (*Ictalurus punctatus*) (Stafford *et al.*, 2006), le requin (Haynes *et al.*, 1988) ou encore le xénope (*Xenopus laevis*) (Coosemans *et al.*, 1986) sans certitude que ces récepteurs soient les véritables orthologues des récepteurs Fc humains.

Chez les mammifères, le récepteur FcγRI murin est codé par un unique gène localisé sur le chromosome 3 (Osman *et al.*, 1992). Même si leur localisation génomique n'a jamais été précisée, des récepteurs de forte affinité pour les IgG ont également été identifiés et caractérisés chez le porc (Zhang *et al.*, 2006) et chez la vache (Yan *et al.*, 2000). Pour le macaque rhésus (*Macaca mulatta*) et le babouin (*Papio papio*), des expériences d'hybridation *in-situ* ont montré que le gène *FCGR1* était adjacent au centromère avec une forte homologie pour la région contenant le gène *FCGR1* humain situé en 1p12. Les mêmes types d'expériences effectuées chez le chimpanzé (*Pan troglodytes*) ont révélé une hybridation avec la région synténique la région 1q21 humaine (Maresco *et al.*, 1998).

Les gènes codant les FcγRs de faible affinité sont clustérisés au sein de régions synténiques, sur le chromosome 1 pour le chimpanzé et la souris, sur le chromosome 13 pour le rat et sur le chromosome 38 pour le chien. Malgré cette synténie, il existe une hétérogénéité au niveau de l'organisation génomique du cluster avec globalement deux types d'organisation. Tout d'abord une organisation à trois gènes, comparable au cluster murin composé des gènes *Fcgr2-Fcgr3-Fcgr4*. Pour le macaque, le chien et le rat, il semble que l'organisation génomique de ce cluster soit de type « murin » même si chez le chien la présence du gène *FCGR3* n'a jamais été clairement établie (Nimmerjahn *et al.*, 2006). Le deuxième type d'organisation est de type « humaine » avec la présence de 5 gènes (*FCGR2A-FCGR3A-FCGR2C-FCGR3B-FCGR2B*) codant des FcγRs de faible affinité. Même si la présence du gène *FCGR2C* n'est pas clairement démontrée, il semble que le chimpanzé est la seule espèce chez qui ce genre d'organisation à 5 gènes ait été rapporté (Nimmerjahn *et al.*, 2006).

Chez d'autres espèces, l'organisation génomique du cluster n'est pas ou peu précisée mais quelques informations sont disponibles concernant certains gènes codant les FcγRs de faible affinité.

Chez la vache, Klunland *et al.*, ont montré que les gènes *FCGR2/3* étaient localisés sur le chromosome 3 sans pour autant déterminé de façon précise leur nombre exact (Klunland *et al.*, 1997). Grâce à des expériences de clonage d'ADNc, on sait par ailleurs que la vache possède le gène codant le récepteur FcγRIIB (Zhang *et al.*, 1994) et le gène codant le récepteur FcγRIIA (Collins *et al.*, 1997 ; Yan *et al.*, 2000).

Chez le porc, des récepteurs correspondant aux FcγRIIA et FcγRIIB ont été clonés et caractérisés (Halloran *et al.*, 1994 ; Qiao *et al.*, 2006). Des études fonctionnelles ont montré que, contrairement à son homologue humain, le récepteur FcγRIIA porcin n'a pas besoin d'être associé avec la chaîne transductrice FcRγ pour être exprimé à la surface des macrophages (Isashi *et al.*, 1996)

Enfin chez les primates, des expériences de clonage d'ADNc du CD16 ont montré que le macaque (*Macaca mulatta* ; *Macaca fascicularis*), le babouin (*Papio anubis*) et le sooty mangabey (*Cercocebus torquatus*) possèdent uniquement le gène codant le récepteur FcγRIIA (Rogers *et al.*, 2006).

B. Polymorphismes génétiques des gènes *FCGR2/3*

L'hétérogénéité structurale des récepteurs FcγRs se reflète dans la grande diversité des réponses biologiques, dans les différences d'expression cellulaire mais aussi par la génétique à travers des polymorphismes qui ont été décrits pour plusieurs gènes codant les FcγRs. Certains des gènes *FCGR* présentent en effet des substitutions nucléotidiques affectant une ou des bases de la séquence d'ADN. Ces polymorphismes, également appelés SNP (*single nucleotide polymorphism*), pourront avoir dans certains cas des répercussions fonctionnelles. Comme nous l'avons vu dans la première partie de cette introduction, ils peuvent être localisé au niveau des régions d'interaction avec la portion Fc et entraîner des différences d'affinité. Ils peuvent être également être situé dans d'autres régions et avoir des répercussions sur l'activité du récepteur ou sur son expression. Les fréquences de ces polymorphismes au sein des populations peuvent être variables et il sera important de les estimer avant toute étude génétique. Comme nous le verrons, les gènes *FCGR* sont également soumis à un autre type de polymorphismes qui va entraîner des variations de nombre de copies de certains de ces gènes.

1. Polymorphismes de type SNPs

1.1 Polymorphismes des gènes *FCGR2*

1.1.1 Le gène *FCGR2A*

Deux principaux sites polymorphes ont été décrits sur ce gène :

Le premier polymorphisme, une guanine à la place d'une adénine, est responsable de la présence soit d'une arginine (allotype FcγRIIA-131R) soit d'une histidine (allotype FcγRIIA-131R) en position 131 de la séquence protéique mature, c'est à dire au niveau du domaine immunoglobulinique proximal EC2 (Figure 17) (Clark *et al.*, 1989 ; Tate *et al.*, 1992).

Plusieurs études ont montré que les fréquences de ces différents allèles diffèrent de façon significative en fonction des populations étudiées, avec notamment une différence entre la population asiatique et la population caucasienne (Tableau 4). Comme nous l'avons vu précédemment, ce polymorphisme va affecter l'affinité et la spécificité du récepteur FcγRIIA pour les IgG humaines et murines. Sa conséquence fonctionnelle est une capacité de phagocytose des particules opsonisées par des IgG2 plus efficace par des polynucléaires exprimant l'allotype FcγRIIA-131H que par ceux exprimant l'allotype FcγRIIA-131R (Parren *et al.* 1992). De plus, ce polymorphisme du récepteur FcγRIIa va affecter la capacité d'interaction des plaquettes avec les complexes immuns (Carlsson *et al.*, 1998).

Le deuxième polymorphisme va entraîner le changement au niveau de la séquence d'ADN d'un CA en TG avec pour conséquence la présence soit d'une glutamine soit d'un tryptophane en position 27 de la séquence protéique (au niveau du domaine immunoglobulinique distal EC1). Ce polymorphisme n'est pas lié au polymorphisme en position 131 et ne semble pas affecter l'affinité du récepteur pour les IgG (Warmerdam *et al.*, 1990 ; Warmerdam *et al.*, 1991).

Auteurs	Nombre de sujets	Génotypes <i>FCGR2A-131</i>		
		H/H	H/R	R/R
Caucasiens				
Carlsson <i>et al.</i> , 1998	256	71 (28%)	134 (52%)	51 (20%)
		f (H): 54% f (R): 46%		
Manger <i>et al.</i> , 1998	187	53 (28%)	84 (45%)	50 (21%)
		f (H): 51% f (R): 49%		
Sanders <i>et al.</i> , 1994	123	36 (29%)	59 (48%)	28 (23%)
		f (H): 53% f (R): 47%		
Afro-américains				
Salmon <i>et al.</i> , 1996	100	27 (27%)	50 (50%)	23 (23%)
		f (H): 52% f (R): 48%		
Asiatiques				
Kobayashi <i>et al.</i> , 2000	105	63 (60%)	38 (36%)	4 (4%)
		f (H): 78% f (R): 22%		
Matsumoto <i>et al.</i> , 2005	158	113 (71,5%)	45 (28,5%)	0 (0%)
		f (H): 85,7% f (R): 14,3%		

Tableau 4 : Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme *FCGR2A-H131R* dans différentes populations. Les fréquences des allèle *FCGR2A-131* H et R apparaissent significativement différentes entre la population asiatique et les autres populations.

1.1.2 Le gène *FCGR2B*

Un certain nombre de polymorphismes affectant les séquences codantes de *FCGR2B* ont été mis en évidence. La plupart sont des substitutions synonymes aboutissant à la conservation de l'acide aminé considéré (Li *et al.*, 2003).

Une substitution T>C en position 695 de l'ADNc de *FCGR2B* a été décrit mais uniquement dans la population asiatique (Tableau 5). Ce polymorphisme entraîne, au niveau de l'acide aminé 232 du domaine transmembranaire, la substitution d'une isoleucine (I) en thréonine (T) (Figure 17) (Li *et al.*, 2003). Des études ont mis en évidence que cette substitution de *FCGR2B* entraînait à une mauvaise association de Fc γ RIIB avec les radeaux lipidiques associée à une altération de son effet inhibiteur (Kono *et al.*, 2005).

Auteurs	Nombre de sujets	Génotypes <i>FCGR2B-232</i>		
		I/I	I/T	T/T
Asiatiques				
Kyogoku <i>et al.</i> , 2002	303	183 (60,4%)	104 (34,3 %)	16 (5,3%)
		f (I): 77,5%	f (T): 22,5%	
Siriboonrit <i>et al.</i> , 2003	165	97 (58,8%)	56 (33,9%)	12 (7,3%)
		f (I): 75,7%	f (T): 24,3%	

Tableau 5 : Fréquences génotypiques et alléliques dans la population asiatique du polymorphisme *FCGR2B-I232T*.

Une substitution non synonyme à aussi été décrite au niveau de l'exon codant le premier domaine intra-cellulaire (C1) de Fc γ RIIB. Elle va entraîner la présence soit d'une tyrosine (Y) soit d'un acide aspartique (D) en position 258 (Warmerdam *et al.*, 1993 ; van den Herik-Oudijk *et al.*, 1994). Aucun phénotype particulier n'a jamais été associé à ce polymorphisme.

Enfin, de nombreux polymorphismes ont également été mis en évidence au niveau du promoteur de *FCGR2B* (Su *et al.*, 2004). Les polymorphismes localisés en position, -386 et en position -120 ont fait l'objet d'investigations plus poussées. En effet, Su *et al.*, ont montré que ces deux polymorphismes ne s'associent pas de façon aléatoire et qu'on les retrouve sous la forme de deux haplotypes -386C-120A et -386G-120T (Figure 17). Des analyses supplémentaires ont mis en évidence que l'haplotype -386C-120A présentait une meilleure fixation des facteurs de transcription GATA4 et Yin-Yang1 associée à une plus forte expression du récepteur FcγRIIB (Su *et al.*, 2004). Cette augmentation d'expression a également été associée à une augmentation de l'influx de calcium induit par le BCR ainsi qu'à une augmentation de la viabilité des cellules B (Su *et al.*, 2004).

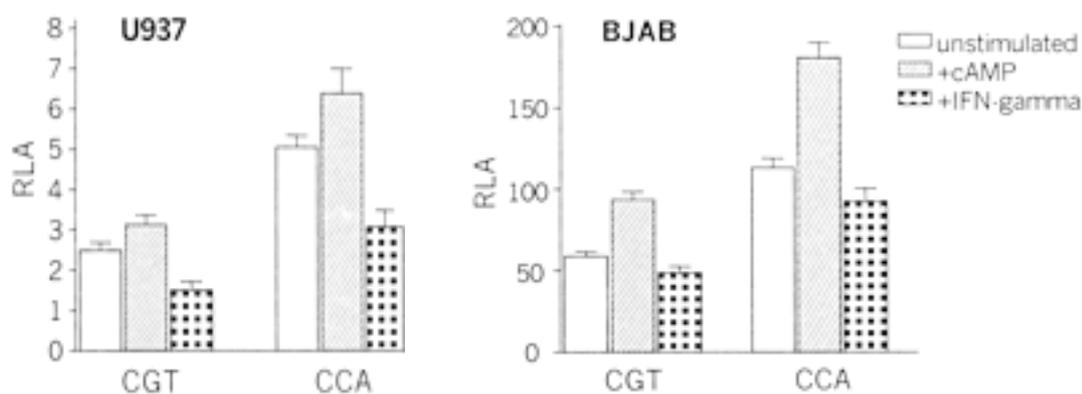


Figure 15 : Haplotypes du promoteur *FCGR2B* dans un test à la luciférase. Des constructions contenant 1 kb du promoteur *FCGR2B* sous forme de l'haplotype -386C-120A ou de l'haplotype -386G-120T ont été transfectées de façon transitoire dans des cellules U937 (A) et BJAB (B). L'émission de lumière a été mesurée suite en condition basale et après une stimulation par 0,5 mM de dibutyryl AMPc ou par 400U/ml d'interféron gamma. L'émission de lumière a été mesurée puis normalisée par rapport à l'émission basale de la luciférase pour enfin obtenir l'activité relative (RLA : *relative luciferase activity*). D'après Su *et al.*, 2004.

1.1.3 Le gène *FCGR2C*

Le polymorphisme Q13STP du gène *FCGR2C* va avoir pour conséquence la présence soit d'un codon CAG (glutamine Q), soit d'un codon TAG (codon Stop) au niveau du domaine immunoglobulinique distal (Figure 17). Ainsi, un allèle pourra être traduit (allèle ORF) alors que l'autre ne le sera pas (allèle STOP), ce dernier sera dénommé « allèle nul » (Metes *et al.*, 1998 ; Morel *et al.*, 1999). Il a été mis en évidence que l'expression du récepteur FcγRIIC sur les cellules NK était variable d'un individu à l'autre et qu'elle était corrélée au polymorphisme allélique ORF/STOP (Ernst *et al.*, 2002). En fonction de ce polymorphisme, certains individus n'expriment à la surface de leur NK que le récepteur FcγRIIA alors que d'autres co-expriment FcγRIIA avec le récepteur FcγRIIC. Peu de données fonctionnelles sont actuellement disponibles concernant le récepteur FcγRIIC, mais il semble que lorsqu'il est exprimé à la surface des NK il joue un rôle dans l'ADCC en synergie avec le récepteur FcγRIIA (Metes *et al.*, 1999 ; Ernst *et al.*, 2002) (Figure 16).

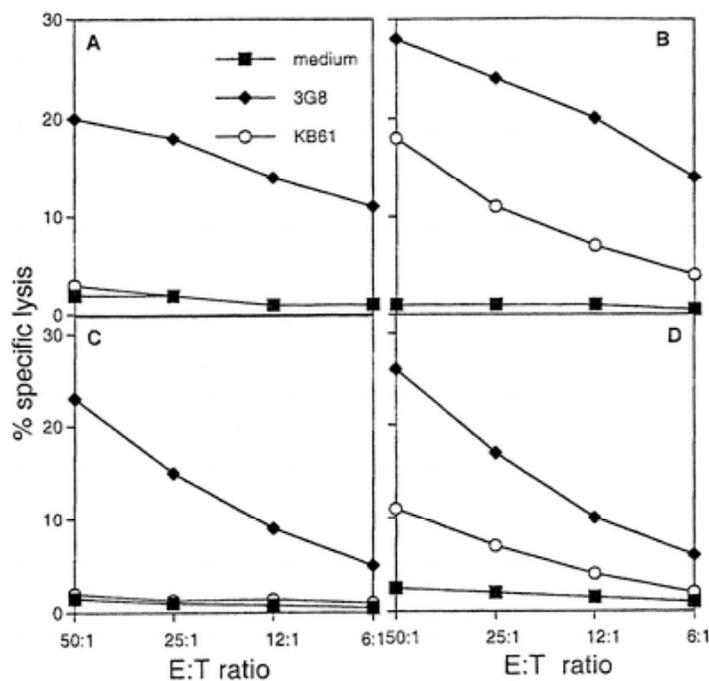


Figure 16 : ADCC inverse induite par le FcγRIIC exprimé sur les lymphocytes NK. Des cellules NK de 4 donneurs, ont été isolées et testées pour leur capacité à tuer des cellules P815 FcR+ en présence d'anticorps KB61 (anti-CD32) ou de 3G8 (anti-CD16). Test fondé sur la libération de Chrome 51 pour les ratio effecteur cible (E:T) indiqué. (A) témoin n'exprimant pas le FcγRIIC (B,C,D) témoins exprimant le FcγRIIC.

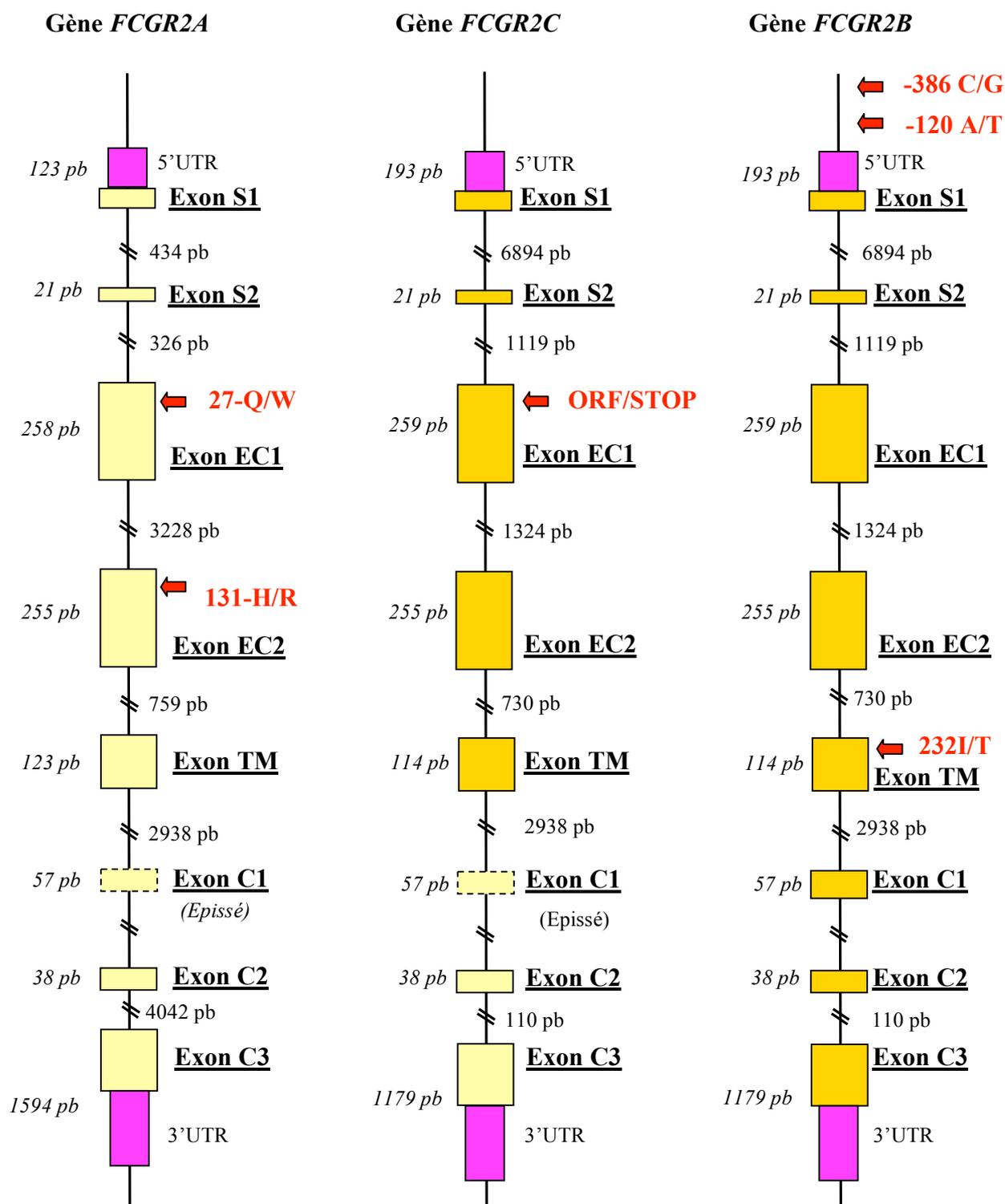


Figure 17 : Représentation de l'organisation exon-intron des gènes *FCGR2* et localisation des divers polymorphismes. Les rectangles représentent les exons (en jaune et orange les régions codantes ; en violet les régions non traduites ; en pointillés les exons épissés). La taille des exons et des introns est indiquée à côté de chacun d'eux. Deux exons S1 et S2 codent le peptide signal ; l'exon EC1 code le domaine immunoglobulinique distal et l'exon EC2 codent le proximal ; un exon TM code le domaine transmembranaire ; trois exons, C1, C2 et C3 codent le domaine intra-cytoplasmique. Les flèches rouges indiquent les localisations des différents polymorphismes affectant les gènes *FCGR2*.

1.2 Polymorphismes des gènes *FCGR3*

1.2.1 Le gène *FCGR3A*

Le polymorphisme V158F du gène *FCGR3A* est localisé dans au niveau de l'exon EC2 codant le domaine immunoglobulinique proximal (Figure 18). Une substitution du nucléotide à la position 559 (G/T) de l'ADNc de *FCGR3A* entraîne l'apparition d'une valine (V) ou d'une phénylalanine (F) au niveau de l'acide aminé 158 (Ravetch *et al.*, 1989). Les fréquence alléliques des ces deux allèles ne présentent pas de différence significative entre la population caucasienne et asiatique (Tableau 6). Comme nous l'avons vu précédemment, ce polymorphisme a des répercussions sur la fixation des IgG, en particulier un meilleur binding de l'allotype FcγRIIIA-158V pour les IgG1 et IgG3 (Wu *et al.*, 1997). D'un point de vue fonctionnel, des cellules NK incubées avec des IgG et provenant de donneurs homozygotes pour l'allèle *FCGR3A*-158V, montrent un flux calcique intracellulaire plus important et une induction de l'apoptose plus rapide qu'avec des cellules NK provenant de donneurs homozygotes pour l'allèle *FCGR3A*-158F (Wu *et al.*, 1997). Ce binding supérieur de l'allotype FcγRIIIA-158V se traduit également par une ADCC plus efficace vis à vis de cellules cibles sensibilisées par des IgG1 et en présence d'effecteurs NK provenant d'individus homozygotes pour l'allèle *FCGR3A*-158V (Dall'Ozzo *et al.*, 2004). Des études effectuées par notre équipe ont montré également que, contrairement à ce qui avait été publié (Hatjiharissi *et al.*, 2007), cette différence de binding n'est pas le résultat d'une différence d'expression entre l'allotype FcγRIIIA-158V et FcγRIIIA-158F (Congy *et al.*, 2008).

De Haas et ses collègues ont mis en évidence un polymorphisme triallélique au niveau du nucléotide 230 de l'ADNc de *FCGR3A*. Cette substitution nucléotidique, localisée dans l'exon EC1 codant le domaine immunoglobulinique distal (Figure 18), entraîne un changement d'acide aminé en position 48 qui sera soit une leucine (L), soit une arginine (R) soit une histidine (H) (de Haas *et al.*, 1996). Initialement ce polymorphisme à été décrit comme affectant la liaison des IgG au récepteur FcγRIIIA des cellules NK, les deux formes FcγRIIIA-48H et FcγRIIIA-48R présentant une affinité pour les IgG1, IgG3 et dans une moindre mesure les IgG4 supérieure à celle de la forme FcγRIIIA-48L (de Haas *et al.*, 1996).

En réalité, ce polymorphisme est en déséquilibre de liaison complet avec le polymorphisme 158-V/F qui est, *in fine*, le seul responsable de la variation d'affinité observée pour les IgG (Koene *et al.*, 1997). Tous les individus de génotype FF sont homozygotes pour l'allèle 48L alors que tous les individus hétérozygotes 48LR ou 48LH sont au moins porteurs de l'allèle 158V. On obtient ainsi quatre haplotypes, 48L158F, 48L158V, 48H158V et 48R158V sur les 6 possibles (Koene *et al.*, 1997).

Auteurs	Nombre de sujets	Génotypes <i>FCGR3A-158</i>		
		V/V	V/F	F/F
Caucasiens				
Wu <i>et al.</i> , 1990	200	21 (11%) f (V): 33,5%	92 (46%) f (F): 66,5%	87 (43%)
Koene <i>et al.</i> , 1997	87	15 (17%) f (V): 42,5%	44 (51%) f (F): 57,5%	28 (32%)
Asiatiques				
Kyogoku <i>et al.</i> , 2002	303	26 (8,6%) f (V): 30,3%	132 (43,6%) f (F): 69,7%	145 (47,8%)
Siriboonrit <i>et al.</i> , 2003	187	27 (14,4%) f (V): 40,1%	96 (51,3%) f (F): 59,9%	64 (34,2%)
Matsumoto <i>et al.</i> , 2005	158	8 (5%) f (V): 23,4%	58 (36,7%) f (F): 76,6%	83 (58,3%)

Tableau 6: Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme *FCGR3A-158V/F* dans différentes populations

1.2.2 Le gène *FCGR3B*

Le gène *FCGR3B* présente cinq nucléotides polymorphes tous localisé au niveau de l'exon EC1 et présents sous la forme de deux haplotypes. Les deux formes alléliques NA1 et NA2 résultantes vont entraîner une différence de quatre acide aminé au niveau du domaine immunoglobulinique distal (Figure 18) (Huizinga *et al.*, 1990). Des études ont montré que l'allèle NA1 semble être plus fréquent que l'allèle NA2 dans les populations asiatiques par rapport aux populations caucasiennes et afro-américaines (Tableau 7).

Auteurs	Nombre de sujets	Génotypes <i>FCGR3B</i> -NA1/NA2		
		NA1/NA1	NA1/NA2	NA2/NA2
Caucasiens				
Gonzales <i>et al.</i> , 2002	194	20 (10%) f(NA1): 29,6%	75 (39%) f(NA2): 70,4 %	99 (51%)
Hessner <i>et al.</i> , 1996	90	10 (11%) f(NA1): 36,6 %	46 (51%) f(NA2): 63,4%	34 (38%)
Koene <i>et al.</i> , 1998	87	11 (12%) f(NA1): 35%	39 (49%) f(NA2): 65%	37 (39%)
Asiatiques				
Kobayashi <i>et al.</i> , 1997	105	38 (36%) f(NA1): 62 %	55 (22%) f(NA2): 38%	12 (11%)
Afro-américains				
Hessner <i>et al.</i> , 1996	99	16 (16%) f(NA1): 31%	30 (30%) f(NA2): 69%	54 (54%)

Tableau 7: Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme *FCGR3B*-NA1/NA2 dans différentes populations.

Cette différence entre les deux allèles se traduit par la présence de deux sites de glycosylation supplémentaires sur le domaine distal pour la forme Fc γ RIIB-NA2 (six au lieu de quatre) (Ravetch *et al.*, 1989 ; de Haas *et al.*, 1995). Une variation supplémentaire d'une cytosine en adénine au niveau du nucléotide 266 entraîne l'apparition d'un acide aspartique au lieu d'une alanine en position 78 de la séquence protéique avec pour conséquence l'apparition d'un nouvel allotype nommé SH (Bux *et al.*, 1997) (Tableau 8).

Les polynucléaires neutrophiles des individus homozygotes pour l'allèle NA2 présentent une capacité de phagocytose de particules opsonisées par des IgG1 et IgG3 moindre comparée à ceux des individus porteurs de la forme NA1 (Salmon *et al.*, 1990). Cet effet est dû, au moins en partie, à la capacité de l'allèle NA1 à produire une explosion oxydative et une dégranulation plus importantes. Les bases moléculaires de cette différence d'activité entre les deux allèles restent inconnues mais les modifications post-traductionnelles liées à des variations de glycosylation entre les deux formes sembleraient jouer un rôle (Zhou *et al.*, 1993).

nt / aa	Allèle NA1	Allèle NA2	Allèle SH
141 / 36	G / Arg	C / Ser	C / Ser
147 / 38	C / Leu	T / Leu	T / Leu
227 / 65	A / Asn	G / Ser	G / Ser
266 / 78	C / Ala	C / Ala	A / Asp
277 / 82	G / Asp	A / Asn	A / Asn
349 / 106	G / Va:	A / Ile	A / Ile

Tableau 8 : Variations nucléotidiques et protéiques entre les différents allèles de FCGR3B. (D'après Bux *et al.*, 1997).

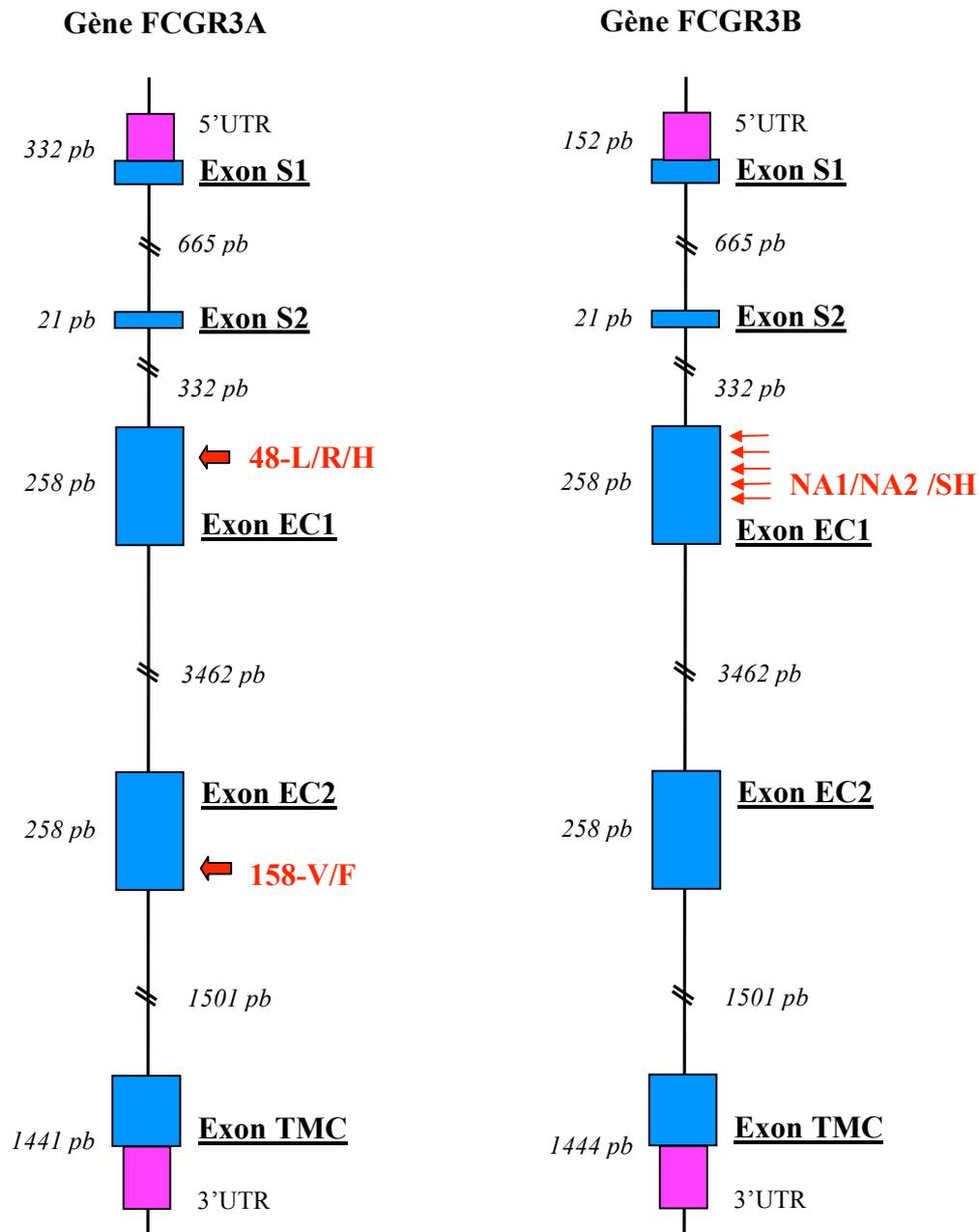


Figure 18 : Représentation de l'organisation exons-introns des gènes FCGR3A/FCGR3B et localisation des divers polymorphismes. Les rectangles représentent les exons (en bleu les régions codantes ; en violet les régions non traduites). La taille des exons et des introns est indiquée à côté de chacun d'eux. Deux exons S1 et S2 codent le peptide signal ; l'exon EC1 code le domaine immunoglobulinique distal et l'exon EC2 codent le proximal ; un exon TMC code le domaine transmembranaire et la région intra-cytoplasmique. Les flèches rouges indiquent les localisations des différents polymorphismes affectant les gènes *FCGR3A* et *FCGR3B*.

2. Polymorphismes de type variation de nombre de copies

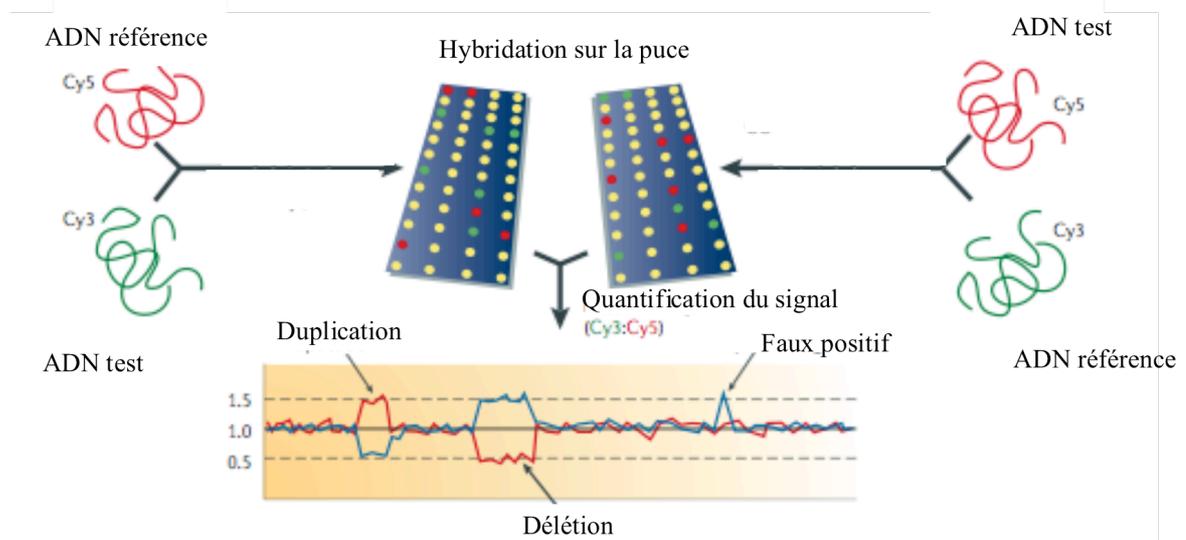
2.1 Variation du nombre de copies de gènes dans le génome humain

La variabilité génomique peut être présente au sein du génome humain sous de multiples formes, incluant les polymorphismes de types SNPs, les répétitions en tandem (micro et mini-satellites), la présence ou l'absence d'éléments transposables (séquences Alu) ou encore la présence d'altérations structurales (délétions, duplications, inversions).

Grâce à des observations de cytogénétiques, on sait depuis longtemps que de larges duplications ou délétions peuvent avoir lieu au sein du génome humain (Seabright *et al.*, 1971 ; Jacobs, 1977). De nombreuses études ont mis en évidence que ces altérations structurales sont fréquentes et qu'elles ne sont pas systématiquement détectables par cytogénétique du fait de la faible taille du segment d'ADN mis en jeu (Sharp *et al.*, 2006 ; Feuk *et al.*, 2006). Le terme de variation de nombre de copies ou CNV (*copy number variation*), a été récemment donné à ce phénomène et il est maintenant communément admis qu'un CNV représente un changement de nombre de copie d'un segment d'ADN d'une taille égale ou supérieure à 1kb (Feuk *et al.*, 2006). En 2004, avec l'apparition de technique d'hybridation génomique comparative sur puce d'ADN (*Comparative Genomic Hybridization* ou *CGH array*), deux études pionnières révélèrent que les CNV sont présents en grand nombre au sein du génome humain et qu'ils représentent une source de variations génétiques importantes (Figure 19A). Sebat *et al.* employèrent une technologie appelé ROMA (*Representational Oligonucleotide Microarray Analysis*) utilisant 85000 sondes espacées de 35kb pour étudier à grande échelle les CNV entre 30 individus. Ils mirent en évidence 221 CNV détectés en 76 loci différents (Sebat *et al.*, 2004) (Figure 19B). En utilisant une banque de BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), Iafrate *et al.* ont réalisé également une étude à grande échelle avec laquelle ils identifèrent chez 55 individus, 255 clones présentant des duplications ou des délétions. Ils observèrent également que 41% de ces changements étaient présents chez plus d'un individu suggérant que ces variations génomique ne sont pas rares (Iafrate *et al.*, 2004) (Figure 19B).

L'examen du contenu génomique de ces CNV a révélé que ces régions génomiques incluent de nombreux gènes dont un grand nombre impliqués dans diverses fonctions comme la multiplication cellulaire ou le métabolisme (Korbel *et al.*, 2008 ; Goidts *et al.*, 2006). Dans les deux études initiales, la taille des CNV fut souvent surestimée du fait de la faible résolution des techniques utilisées pour le criblage. Avec l'aide de techniques plus résolutive, des études récentes ont montré d'une manière plus précise que les CNV étaient répartis sur environ 5 % du génome humain et que la taille des régions dupliquées/ délétées variait pour la plupart de 1 à 1000 kb (Conrad *et al.*, 2009) (Figure 19B).

A



B

Auteurs	Couverture	Technique	Effectif	Nombre loci avec CNV	Taille moyenne loci en pb (étendue)
Iafate <i>et al.</i> 2004	5264 BACs	BAC-CGH array	55	246	146 189 (19 597-337 967)
Sebat <i>et al.</i> 2004	85 000 oligonucléotides	ROMA-CGH array	20	76	350 670 (754-1 698 859)
Redon <i>et al.</i> 2006	26 574 BACs	BAC-CGH array	269 individus issus du projet HapMap	913	349 880 (2639- 7 378 760)
Perry <i>et al.</i> 2008	470 163 oligonucléotides	oligonucléotide-CGH array	30 individus issus du projet HapMap	1153	35 672 (55-20 925 437)
Conrad <i>et al.</i> 2009	42 000 000 oligonucléotides	oligonucléotide-CGH array	450	11 700	2900 (443-1 280 000)

Figure 19 : CNV au sein du génome humain. (A) Principe des puces par hybridation comparative (CGH array) pour l'étude des génomes à grande échelle. L'ADN de référence et l'ADN test sont marqués par des fluorochromes différents (Cyanine 5 et 3). Sur les puces peuvent être fixées différentes sources d'ADN comme des BAC, des produits de PCR ou encore des oligonucléotides. Après hybridation, le ratio de fluorescence (Cy3: Cy5) va permettre de révéler les différences de nombres de copies entre les échantillons d'ADN. Afin de détecter les faux positifs une seconde série d'hybridation est effectuée en échangeant les marquages entre ADN test/ de référence. (B) Liste non exhaustive des études rapportant, grâce à l'utilisation de CGH array, des variations de nombre de copies.

2.2 Mécanisme de formation des CNV

Plusieurs mécanismes permettant la duplication/ délétion de portions d'ADN ont été mis en évidence, mais seul un certain nombre sont capables de mettre en jeu des segments suffisamment grand pour contenir un ou des gènes (Hastings *et al.*, 2009). Le premier de ces mécanismes est la recombinaison homologue non-allélique ou NAHR (*Non Allelic Homologous Recombination*) qui peut se produire lors de l'alignement de deux séquences d'ADN non homologues présentant un fort degré élevé de similitude (Figure 20) (Stankiewicz *et al.*, 2002).

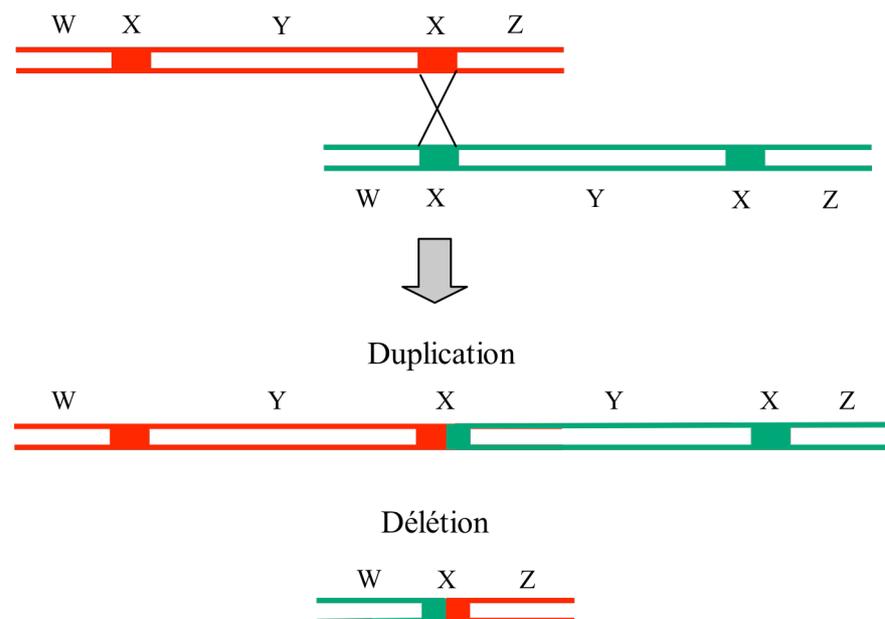


Figure 20 : Duplication/ délétion par recombinaison homologue non allélique (NAHR). Les homologies existants entre deux segments d'ADN non homologues vont permettre la mise en place d'un crossing-over inégal aboutissant la duplication de certains segments d'ADN et à la délétion d'autres segments.

La plupart du temps, cet événement de recombinaison implique des segments d'ADN dupliqués présentant une taille supérieure à 10 kb et un degré d'homologie compris entre 95-97% (Shaw *et al.*, 2004). Ces segments d'ADN répétés dupliqués, aussi connus sous le nom de LCR (*Low Copy Repeat*) ou de duplication segmentale, peuvent contenir des gènes, des fragments de gènes, des pseudogènes ou des séquences rétrovirales endogènes (Lupski *et al.*, 1998). Un taux d'homologie supérieure à 95% entre deux LCR permettra la mise en place d'un événement de NAHR avec comme résultat une duplication, une délétion ou une inversion d'un des segments d'ADN mis en jeu (Lupski *et al.*, 1998 ; Stankiewicz *et al.*, 2002). Il peut avoir lieu durant la méiose où il pourra donner lieu à des réarrangements chromosomiques sans conséquence ou, comme nous le verrons, dans certains cas pouvant être à l'origine de pathologies sporadiques ou de désordres génomiques héréditaires (Lupski *et al.*, 2005 ; Turner *et al.*, 2008). Il pourra également avoir lieu durant la mitose et il en résultera alors une mosaïque de cellules somatiques porteuses de CNV (Lam *et al.*, 2006).

Le mécanisme FoSTeS (*Fork Stalling and Template Switching*) peut également permettre la survenue de CNV au sein du génome. Celui-ci est fondé sur le fait que, lors de la réplication de l'ADN, le brin indirect se trouvant au sein d'une fourche de réplication peut se désengager du brin parental sur lequel il est apparié et aller envahir une autre fourche de réplication (Lee *et al.*, 2007). Grâce à un mécanisme de micro homologie, le brin indirect va pouvoir s'apparier sur un des deux brin parentaux au sein de la nouvelle fourche de réplication. Suite à cet appariement, le brin transféré va continuer sa synthèse avec comme matrice le nouveau brin parental, puis après une période plus ou moins longue, il va reprendre sa place au sein de sa fourche d'origine (Figure 21). En fonction de la direction de la fourche de réplication et du brin matrice que choisit le brin transféré pour continuer la synthèse d'ADN, le fragment incorporé pourra être dans une direction inversée par rapport à son orientation initiale. De plus, en fonction des localisations respectives entre les deux fourches de réplication, ce mécanisme pourra aboutir soit à une délétion, soit à une duplication d'un fragment d'ADN de plusieurs mégabases (Lee *et al.*, 2007 ; Bi *et al.*, 2009). Il pourra également générer des triplifications et ainsi que des réarrangements génomiques aboutissant à la capture d'exons (*exon shuffling*) (Zhang *et al.*, 2009). Enfin ce mécanisme peut être à l'origine de LCR qui permettront par la suite de fournir les homologies nécessaires à des événements de recombinaison de type NAHR (Hastings *et al.*, 2009).

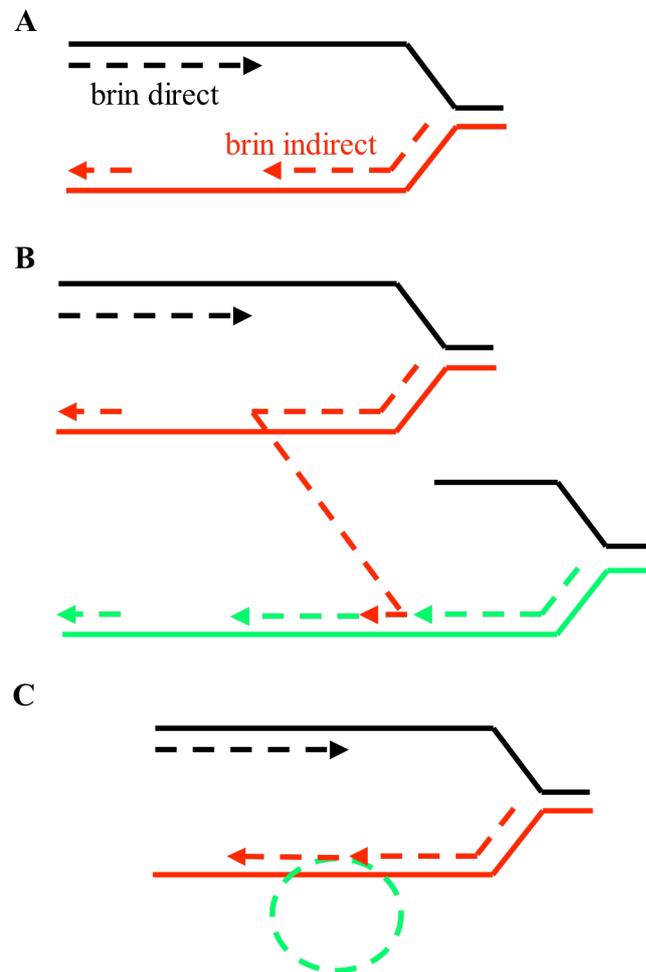


Figure 21 : Duplication d'un segment d'ADN par le mécanisme FoSTeS. (A) Lors de la réplication de l'ADN, la fourche de réplication va permettre de générer un brin direct et un brin indirect. (B) le brin indirect présent au sein de la fourche de réplication va se désengager du brin parental et aller s'incorporer, grâce à des mécanismes de microhomologie, sur une autre fourche de réplication. Il pourra alors continuer sa synthèse sur le nouveau brin parental. (C) retour du brin indirect au sein de sa fourche de réplication originelle.

Le dernier mécanisme permettant de générer des CNV fait intervenir des rétro-transposons, comme les éléments L1. Ces éléments présents en grand nombre au sein du génome humain sont les seuls des transposons à être actifs d'une façon autonome (Kazazian *et al.*, 1998). En effet, un certain nombre d'entre eux présentent une séquence intacte notamment au niveau des deux cadres de lecture permettant la synthèse d'une protéine de liaison à l'ARN et d'une protéine à activité de transcriptase inverse et d'endonucléase. Lors de la réplication de ces éléments, il peut y avoir transcription d'une partie de la région chromosomique adjacente à l'élément transposable comprenant éventuellement un ou plusieurs gènes. Lorsque l'ARN est rétrotranscrit au sein du génome humain, le ou les gènes transcrits par accident sont alors copiés dans une autre région du génome (Figure 22).

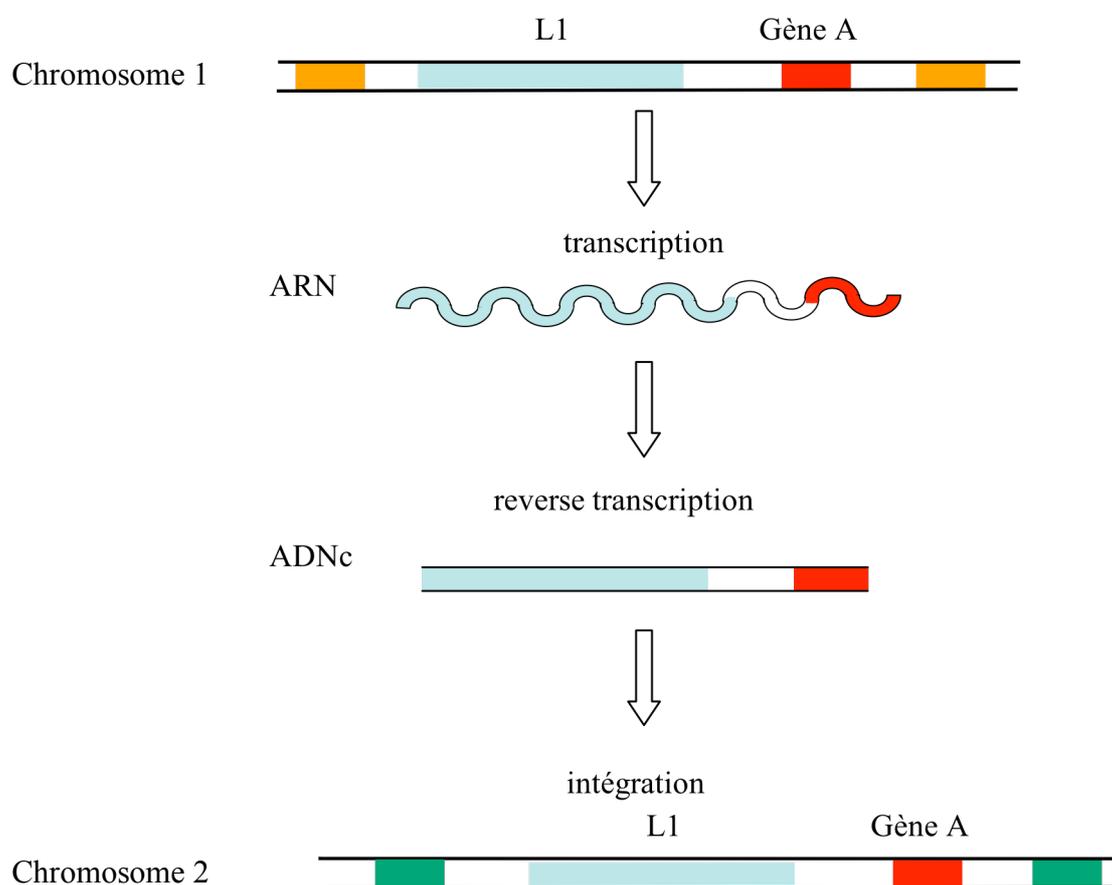


Figure 22 : Duplication génique par rétrotransposition. La transcription d'un élément L1 peut aboutir à la transcription de séquences adjacentes qui seront par la suite rétro-transcrites et intégrées avec l'élément à un nouveau locus chromosomique.

2.3 Implications fonctionnelles des CNV

En fonction de l'échelle de temps à laquelle on se situe, les implications fonctionnelles des CNV vont être variables. A l'échelle d'un individu, l'une des conséquences des CNV est la survenue de phénomène « d'effet-dose ». Dans ce cas de figure, plusieurs études ont montré une corrélation entre le nombre de CNV, le niveau d'ARN messenger présent et le niveau de protéine produite. L'exemple du gène *AMY1*, codant l'amylase salivaire humaine, illustre parfaitement ce phénomène. En effet, il existe des variations du nombre de copie du gène *AMY1* pouvant aller de 2 à 15 copies et on peut observer une corrélation positive entre le niveau d'expression de la protéine amylase et le nombre de copie du gène *AMY1* (Perry *et al.*, 2007) (Figure 23).

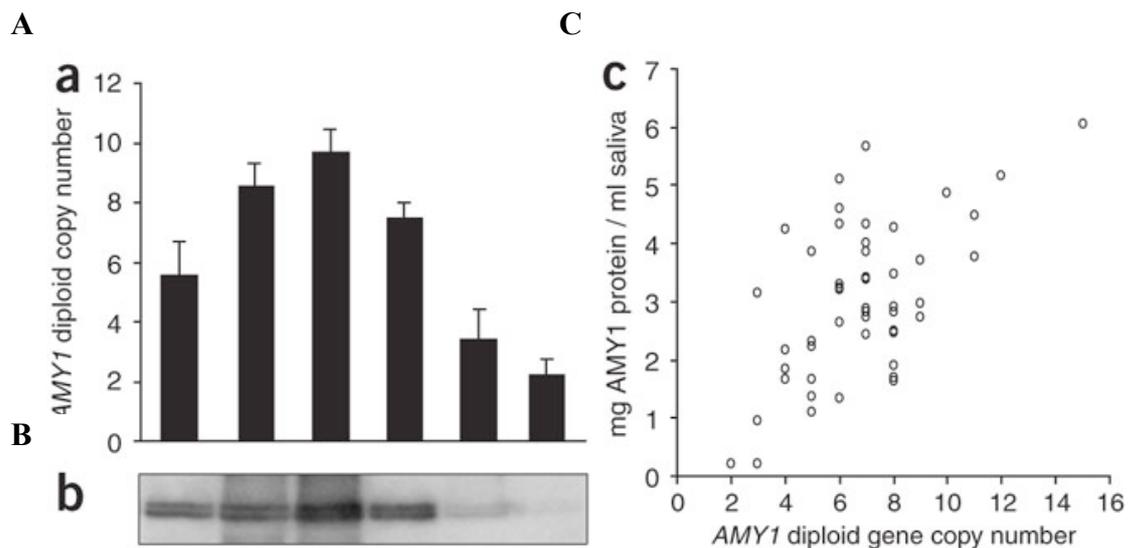


Figure 23 : Variation du nombre de copie du gène *AMY1* et expression de l'amylase salivaire. (A) estimation du nombre de copies du gène *AMY1* au sein d'une population de témoins européens (n=50). (B) estimation de la quantité d'amylase salivaire par western blot. (C) relation entre le nombre de copie du gène *AMY1* et la quantité d'amylase salivaire (D'après Perry *et al.*, 2007).

Du fait de leur implication dans des phénomènes « effet-dose », les CNV peuvent conférer des phénotypes pathologiques. Un certain nombre de CNV affectant des locus particuliers ont été associés à des maladies génétiques à transmission mendéliennes comme la maladie de Charcot-Marie (Huang *et al.*, 2009). Des études génomiques ont également montré leur implication, par le biais de gènes intervenant dans le développement neuronal, dans des pathologies comme l'autisme (Sebat *et al.*, 2007) ou la schizophrénie (Walsh *et al.*, 2008). Les CNV peuvent également influencer la susceptibilité à certaines maladies comme l'asthme (Brasch-Andersen *et al.*, 2004), les maladies auto-immunes (Mc Kinney *et al.*, 2007 ; Yang *et al.*, 2007) ou encore comme facteurs de susceptibilité aux infections par le virus HIV (Gonzales *et al.*, 2005).

A l'échelle de l'évolution d'un génome, les CNV se présentant sous la forme de duplications peuvent aboutir à un certain nombre de scénarios. Tout d'abord, l'un des gènes dupliqués peut perdre sa fonction et ne plus être exprimé, se transformant ainsi en pseudogène. Un phénomène d'adaptation cellulaire ou tissulaire peut être également envisagé. Dans ce cas, les deux gènes gardent leur fonction initiale mais une des copies acquiert une expression spécifique d'un tissu. Si le gène originel présentait deux fonctions distinctes, il est possible que survienne aussi un mécanisme de subfonctionnalisation dans lequel l'un des gènes dupliqués perd une fonction et l'autre gène perd la fonction complémentaire. Les deux fonctions sont toujours assurées mais par deux protéines différentes. Enfin, les duplications de gènes peuvent aboutir à des phénomènes de néo-fonctionnalisation où la copie dupliquée va évoluer et acquérir de nouvelles fonctions par rapport au gène initial.

2.4 Variation du nombre de copies de gènes du cluster *FCGR2/3*

Les gènes du cluster *FCGR2/3* sont également soumis à des variations du nombre de copies. Des délétions du gène *FCGR3B* ont été tout d'abord identifiées par l'intermédiaire de patients atteints de lupus systémique érythémateux chez lesquels on a observé une perte de l'expression du CD16 (FcγRIIIB) à la surface des neutrophiles (de Haas *et al.*, 1995). Parallèlement, des duplications du gène *FCGR3B* ont été mises en évidence grâce à des individus chez lesquels on a observé la présence simultanée des trois allèles *FCGR3B*-NA1, NA2 et SH (Koene *et al.*, 1998 ; de Haas *et al.*, 1995). Des études ont montré une association entre des délétions du gène *FCGR3B* (0 ou 1 copie) et un certain nombre de maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé (Willcoks *et al.*, 2008 ; Fanciulli *et al.*, 2007). Chez les patients et chez les individus sains présentant une délétion de *FCGR3B*, une diminution de l'expression de l'ARN messager de *FCGR3B* ainsi qu'une diminution du nombre de récepteurs FcγRIIIB à la surface cellulaire a été mise en évidence (Willcoks *et al.*, 2008). D'un point de vue fonctionnel, cette diminution du nombre de copie a été associée d'une part à une perte d'adhérence des neutrophiles et d'une autre part à une diminution de l'élimination des complexes immuns (Figure 24) (Willcoks *et al.*, 2008). L'un des mécanismes supposés du lupus érythémateux disséminé étant une diminution de la clairance des complexes immuns, ces observations constituent donc une voie d'explication concernant la susceptibilité des individus porteurs de délétion de *FCGR3B* à développer cette maladie.

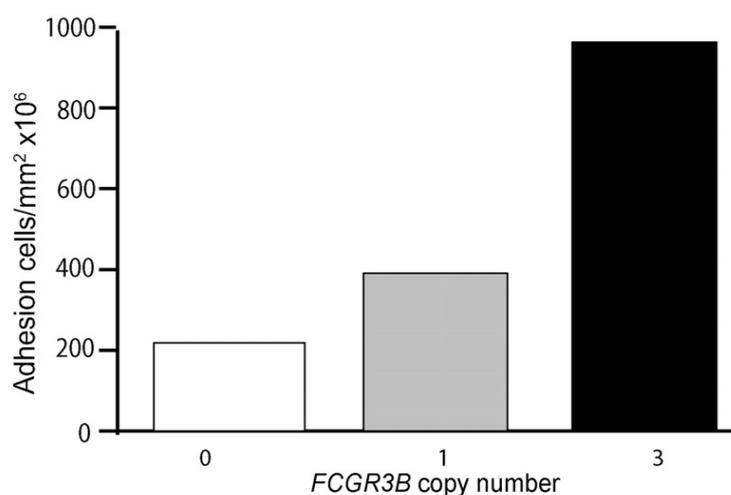


Figure 24 : Adhésion des neutrophiles et variation du nombre de copie de *FCGR3B*. La quantification de l'adhésion des neutrophiles sur des IgG accrochées au fond en d'une plaque met en évidence que celle-ci est proportionnelle au nombre de copies de *FCGR3B*. (D'après Willcoks *et al.*, 2008).

Des études ont montré que le gène *FCGR2C* pouvait également présenter des variations de nombre de copies. Grâce à des expériences de Southern blot, Reilly *et al.*, ont démontré que certains individus présentaient une perte totale du gène *FCGR2C* (Reilly *et al.*, 1994). Une étude récente a montré que le gène *FCGR2C* pouvait également subir des duplications et qu'au sein de la population générale, la fréquence de l'allèle *FCGR2C*-STOP (91,2%) est largement majoritaire par rapport à la fréquence de l'allèle *FCGR2C*-ORF (8,8%) (Breunis *et al.*, 2008) (Tableau 9). Du fait de la rareté des individus porteurs de plusieurs copies de *FCGR2C*-ORF, aucune corrélation entre le niveau d'ARN messager de *FCGR2C*, le niveau d'expression du récepteur Fc γ RIIC à la surface des cellules NK et le nombre d'allèles *FCGR2C*-ORF n'a jamais été mis en évidence. En revanche, l'allèle *FCGR2C*-ORF a été associé avec la prédisposition au purpura thrombopénique idiopathique (Reilly *et al.*, 2008).

FCGR2C-ORF/STOP	
FCGR2C-STOP	6%
FCGR2C-STOP/STOP	66%
FCGR2C-STOP/STOP/STOP	10%
FCGR2C-ORF	1%
FCGR2C-ORF/ORF	0%
FCGR2C-ORF/STOP	16%
FCGR2C-ORF/STOP/STOP	1%

Tableau 9 : Polymorphisme ORF/STOP et nombre de copies du gène *FCGR2C*. Résultats obtenus sur un échantillon de 100 individus sains d'origine caucasienne (D'après Breunis *et al.*, 2008).

Le gène *FCGR3A* est également soumis à des variations de nombre de copies mais il semble que la fréquence des CNV de *FCGR3A* soit nettement plus faible que les fréquences des CNV de *FCGR2C* et *FCGR3B* (Tableau 10). Breunis *et al.*, ont mis en évidence que, par rapport aux individus ayant deux ou trois copies, les individus n'ayant qu'une seule copie de *FCGR3A* présentent une expression plus faible de Fc γ RIIIA à la surface de leurs cellules NK. D'un point de vue fonctionnelle, les cellules NK des individus n'ayant qu'une seule

copie de *FCGR3A* semblent avoir une capacité cytolytique plus faible que les individus possédant deux ou trois copies de *FCGR3A*. Malheureusement ces différences d'expression et de fonctionnalité ne sont pas significatives, probablement à cause du faible nombre d'individus utilisés (Breunis *et al.*, 2009) (Figure 25).

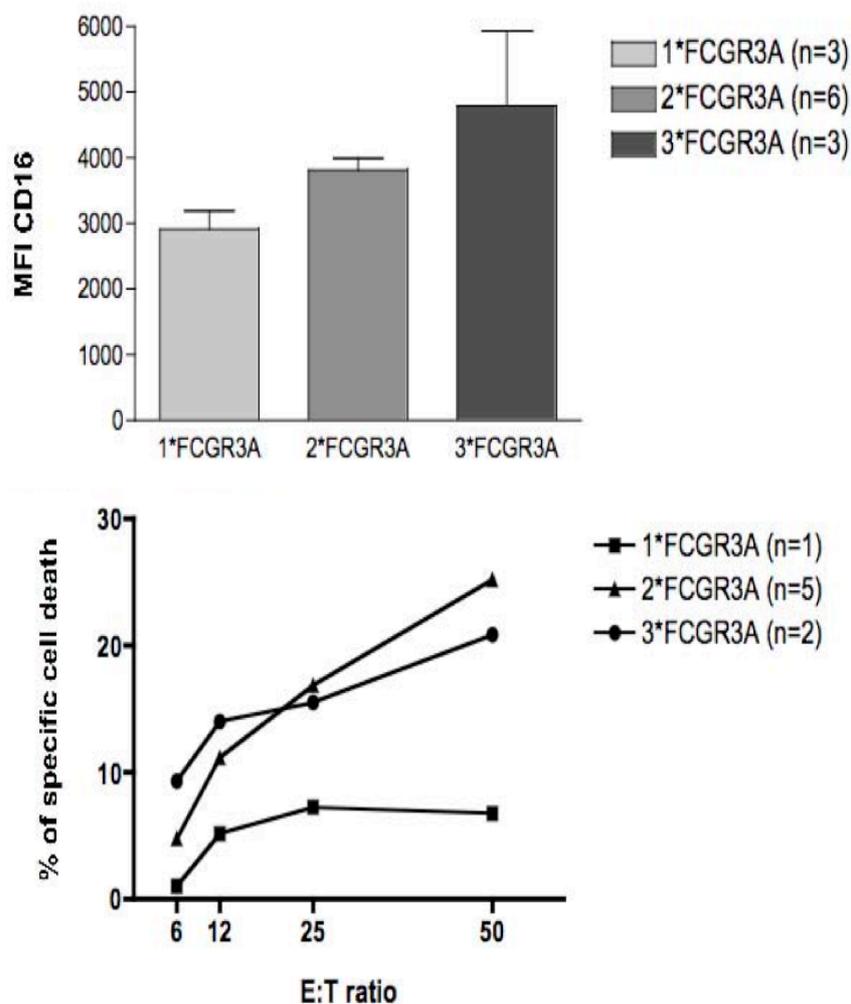


Figure 25 : Expression et fonctionnalité de FcγRIIIA en fonction du nombre de copies de *FCGR3A*. (A) L'expression de FcγRIIIA (CD16, clone 3G8) à la surface des cellules NK entre individus possédant 1, 2 ou 3 copies de *FCGR3A*. (B) Les cellules NK des individus avec 2 ou 3 copies de *FCGR3A* montrent une capacité d'ADCC supérieure aux NK des individus avec 1 copie de *FCGR3A*.

Du fait de la complexité d'étude des CNV peu d'études sont actuellement disponibles concernant les fréquences des CNV des gènes *FCGR2/3*. Grâce à une approche par PCR quantitative, Aitman *et al.*, ont été les premiers à tenter d'établir les fréquences de duplication et de délétion du gène *FCGR3B*. Dans leur population d'étude, ils ont ainsi pu mettre en évidence des variations allant de 0 à 4 copies de *FCGR3B* et également une forte proportion d'individus présentant une délétion de *FCGR3B* (Aitman *et al.*, 2006) (Tableau 10). Grâce à l'intégration de trois méthodes différentes, Hollox *et al.* ont estimé les variations de copies des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* dans des populations différentes. Leurs résultats montrent notamment qu'au sein de la population européenne les duplications des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* sont plus fréquentes que les délétions (Hollox *et al.*, 2008).

La connaissance plus précise des CNV du cluster *FCGR2/3* à enfin été possible grâce aux travaux réalisés par Breunis *et al.*, publiés pendant ma thèse. Grâce à une technique d'amplification multiplex de sonde nucléique ou MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification), ils ont pu étudier de façon précise le cluster *FCGR2/3* et montré que seuls les gènes *FCGR2A* et *FCGR2B* ne présentaient pas de variation du nombre de copie (Breunis *et al.*, 2009). Ils ont aussi pu déterminer de façon précise la fréquence des différents CNV des gènes *FCGR3A*, *FCGR3B* et *FCGR2C* (Tableau 10) ainsi que des différents patterns de duplication /délétion pouvant exister (Figure 26). Leurs résultats montrent en particulier que le pattern de CNV le plus fréquemment retrouvé implique une co-variation des gènes *FCGR2C* et *FCGR3B* ainsi que du gène *HSPA7*. D'autres profils de CNV retrouvés moins fréquemment ont également été mis en évidence (Figure 26).

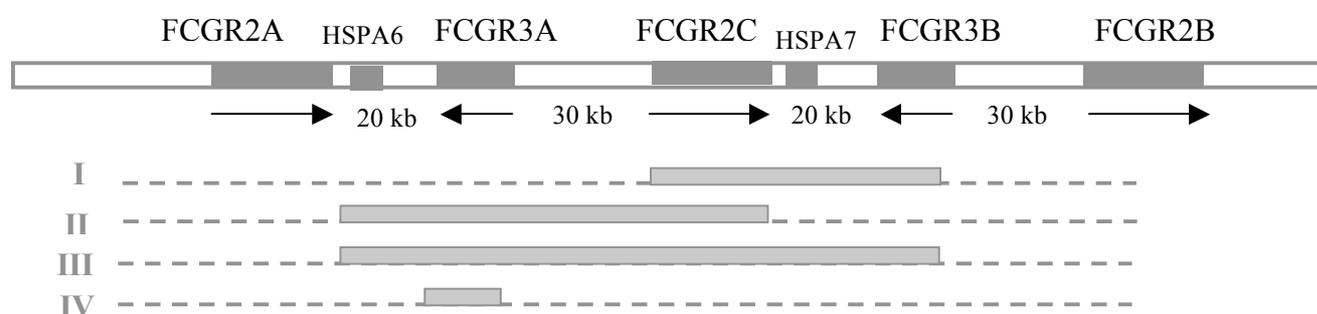


Figure 26 : Différents types de duplication/ délétion des gènes *FCGR3A*, *FCGR3B* et *FCGR2C*. Le profil I, retrouvé le plus fréquemment met en jeu des variations de nombre de copies des gènes *FCGR2C* et *FCGR3B*.

FCGR3B					
	0 copie	1 copie	2 copies	3 copies	4 copies
Breunis <i>et al.</i>	0%	7%	82,2%	10,8%	0%
Aitman <i>et al.</i>	3%	37%	46%	12%	2%
Hollox <i>et al.</i>	0%	4,54%	88,2%	5,45%	1,81%
FCGR2C					
Breunis <i>et al.</i>	0%	3,1%	83,7%	13,3%	0%
FCGR3A					
Breunis <i>et al.</i>	0%	1,6%	94,6%	3,9%	0%
Hollox <i>et al.</i>	0%	2,72%	89,1%	8,18%	0%

Tableau 10 : Fréquences des CNV de *FCGR3A*, *FCGR3B* et *FCGR2C*.

Résultats

Rappel des objectifs généraux

Cette thèse comprend 3 objectifs :

- I. L'étude de l'évolution chez les mammifères du cluster de gènes codant les récepteurs de faible/ moyenne affinité pour les IgG (Fc γ Rs).
- II. L'étude du polymorphisme ORF/STOP et des variations du nombre de copies du gène *FCGR2C* par une technique de pyroséquencage.
- III. L'étude du déséquilibre de liaison entre les polymorphismes *FCGR3A-V158F* et *FCGR2A-H131R*.

I. Evolution du cluster de gènes codant les FcγRs

A. Introduction

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction de cette thèse, les gènes codant les FcγRs humains sont soumis à de nombreuses variations et celles-ci peuvent avoir des répercussions plus ou moins importantes sur la réponse clinique aux anticorps thérapeutiques. Un tel questionnement peut aussi être transposé aux espèces animales utilisées au cours du développement pré-clinique des anticorps thérapeutiques. De fait, dès 2004, notre équipe était sollicitée par une société pharmaceutique pour connaître la situation du polymorphisme *FCGR3A-V158F* chez le macaque.

Lors des premières investigations de notre équipe, peu de données étaient disponibles concernant les FcγRs de primates non humains. L'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD16 humain (Leu-11b, 3G8), chez le macaque et le babouin, permettait de phénotyper leurs cellules NK, leurs monocytes et leurs macrophages (Munn *et al.*, 1996 ; Carter *et al.*, 1999 ; Malyguine *et al.*, 1996), suggérant donc la présence d'un récepteur proche du récepteur FcγRIIIA humain et exprimé sur les mêmes populations cellulaires. L'étude des banques de données permit à notre équipe d'identifier la séquence nucléotidique de l'ADNc du FcγRIIIA de macaque (*Macaca fascicularis*), déposée par Genentech (Presta *et al.*, 2002). L'analyse de cette séquence révéla effectivement de nombreuses similitudes avec la séquence codant le récepteur FcγRIIIA humain. La déduction de la séquence en acides aminés permit de mettre en évidence qu'en position 158, la phénylalanine ou la valine retrouvées chez l'homme étaient remplacées chez le macaque par une isoleucine, acide aminé hydrophobe comme la valine. Des divergences supplémentaires furent également identifiées, la plupart localisées dans les boucles des domaines immunoglobuliniques et pour certaines affectant des résidus des régions d'interaction avec la portion Fc des IgG (Figure 27). On sait maintenant grâce aux travaux de Rogers *et al.*, que les monocytes et les cellules NK de macaque (*Macaca mullata* ; *Macaca fascicularis*), de babouin (*Papio anubis*) et de mangabey (*Sooty mangabey*)

expriment FcγRIIIA et qu'elles sont reconnues par l'anticorps anti-CD16 3G8 (Rogers *et al.*, 2006). Grâce à des expériences de transfection dans des cellules HeLa, ils mirent en évidence que le récepteur FcγRIIIA de mangabey était capable de lier les IgG1 et les IgG2 humaines, qu'il liait faiblement les IgG3 et qu'il ne liait pas les IgG4. Des expériences de clonage, réalisées avec des amorces conçues à partir des séquences des gènes *FCGR3A* et *FCGR3B* humains, permirent également à Rogers *et al.* de cloner l'ADNc du CD16 exprimé chez ces différentes espèces. L'analyse détaillée des séquences, montra qu'elles présentaient un degré d'homologie plus élevé avec le gène *FCGR3A* humain plutôt qu'avec le gène *FCGR3B*. L'étude plus précise des résidus codés par les séquences clonées, confirma que celles-ci présentaient les résidus permettant de distinguer le récepteur FcγRIIIA du récepteur FcγRIIIB (Rogers *et al.*, 2006). De plus, les résidus Ala¹¹⁷, Phe/Val¹⁵⁸, His¹³⁵ observé sur le FcγRIIIA humain sont remplacés chez tous les singes respectivement par les résidus Leu¹¹⁷, Ile¹⁵⁸, Gln¹³⁵. Aucune autre investigation ne fut menée par Roger *et al.* concernant la présence et l'expression d'un éventuel récepteur FcγRIIIB chez ces primates.

De notre côté, le questionnement au sujet du FcγRIIIA de macaque nous amena à nous interroger sur la présence du récepteur FcγRIIIB chez le macaque. Dès 1986, des expériences effectuées chez les primates avaient montré que des polynucléaires neutrophiles de gibbon, de macaque ou de babouin n'étaient pas marqués par l'anticorps 3G8 et qu'en revanche les neutrophiles de chimpanzé l'étaient (Clarkson *et al.*, 1986). Compte tenu des connaissances de l'époque sur le FcγRIII, il était impossible de dire si ce marquage provient de l'expression de FcγRIIIB ou de l'expression neutrophilique du récepteur FcγRIIIA. Parallèlement, la recherche dans les banques de données permit à notre équipe d'identifier une séquence nucléotidique correspondant au gène *FCGR3B* de chimpanzé (ID 745350). Cette séquence présente un degré d'homologie plus élevé avec le gène *FCGR3A* de chimpanzé plutôt qu'avec le gène *FCGR3B* humain, en particulier au niveau des exons codant les domaines extracellulaires, ce qui est peu logique si on considère les gènes *FCGR3B* comme orthologues et suggérant l'existence de mécanismes de conversion génique entre les gènes *FCGR3A* et *FCGR3B*. La présence avérée du *FCGR3B* chez le chimpanzé et l'homme, joint au fait que le CD16 n'est pas exprimé sur les neutrophiles de gibbon (Clarkson *et al.*, 1986) laisse aussi penser que ce gène est une acquisition récente chez les grands singes.

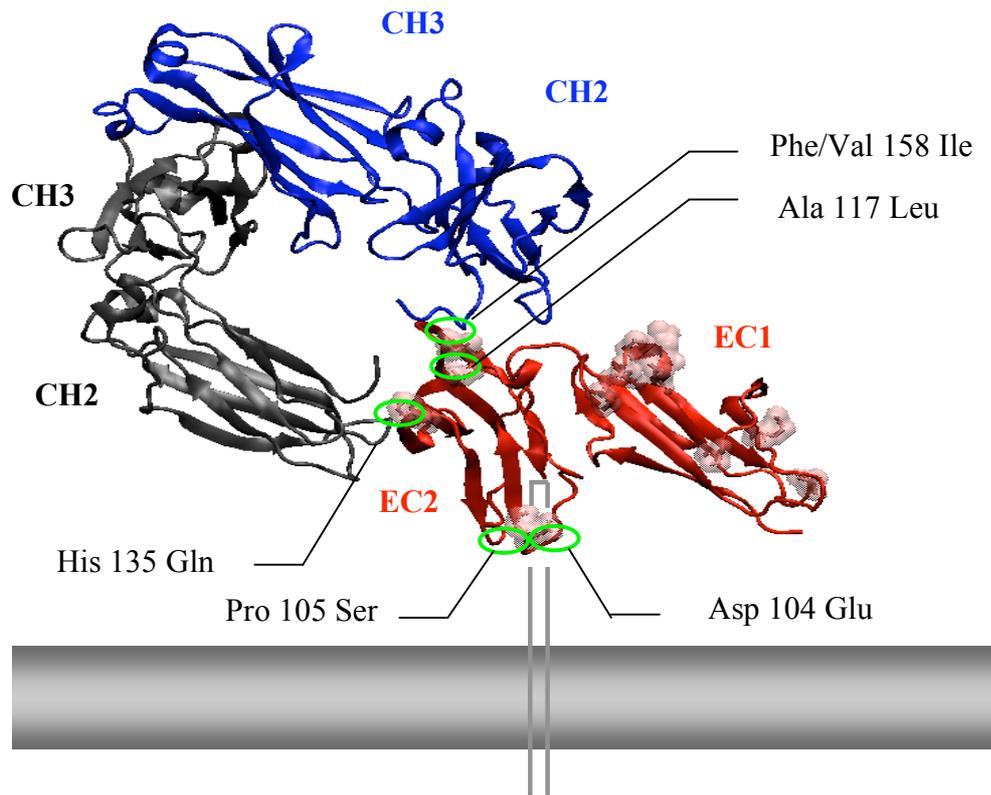


Figure 27 : Localisation des divergences entre le récepteur FcγRIIIA humain et de macaque au niveau du domaine immunoglobulinique proximal. L'interaction entre la portion Fc des IgG et le domaine immunoglobulinique proximal de FcγRIIIA (domaine EC2) va mettre en jeu les résidus Ile⁸¹-Trp⁹⁰, Trp¹¹³-Ala¹¹⁷, His¹¹⁹-Thr¹²², Asp¹²⁹-His¹³⁵, Arg¹⁵⁵, Val¹⁵⁸-Lys¹⁶¹. Chez le macaque des divergences au niveau du domaine EC2, représentées en vert, ont été mises en évidence et pourrait intervenir dans la fixation des IgG. D'après la structure du co-cristal IgFc-FcγRIIIB (Radaev *et al.*, 2001).

A côté des gènes *FCGR3* de primates, notre équipe à aussi commencé à s'intéresser à la situation des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C* chez les primates et plus généralement chez les mammifères. Les travaux menés dans les banques de données par notre équipe, permit à nouveau de retrouver deux séquences, déposées également par Genentech, correspondant aux gènes *FCGR2A* et *FCGR2B* (Presta *et al.*, 2002). Ces travaux de Genentech étaient donc les premiers à rapporter l'existence d'un gène type *FCGR2A* dans une autre espèce que l'homme. Concernant le gène *FCGR2C*, excepté la séquence humaine, aucune autre séquence correspondant à ce gène ne fut trouvée chez d'autres espèces lors des investigations dans les banques de données.

L'ensemble de ces observations amena donc notre équipe à se poser la question de savoir quel étaient les mécanismes ayant permis l'acquisition du gène *FCGR3B* chez les grands singes et s'il existait réellement des différences significatives entre les primates concernant les gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C*.

L'intérêt pour l'étude des FcγRs chez les primates fut également renforcé ces dernières années par la survenue chez l'homme d'effets indésirables suite à l'injection de certains anticorps thérapeutiques, effets qui n'avaient pas été détectés lors du développement pré-clinique. De fait, l'humanisation des anticorps thérapeutiques a fait leur succès clinique en permettant un meilleur comportement pharmacocinétique et une meilleure interaction avec les effecteurs de l'immunité, mais elle a également engendré une moindre pertinence des modèles animaux utilisés lors du développement pré-clinique (Loisel *et al.*, 2007).

L'exemple des complications observées avec le développement d'anticorps anti-ligand de CD40 (CD40L ou CD154) illustre parfaitement ce propos. La molécule CD40L, exprimée à la surface des lymphocytes T et sur les plaquettes, est le ligand de la protéine CD40 retrouvée à la surface des cellules présentatrices d'antigène et des lymphocytes B. La place centrale de l'interaction CD40/CD40 ligand dans le déclenchement des réponses immunitaires a logiquement conduit au développement d'anticorps anti-CD40L pour la prévention des rejets de greffe ou le traitement de certaines maladies auto-immunes. En 1999, la société Biogen a lancé chez le macaque les premières études pré-cliniques de l'anticorps hu5C8 (BG9588), anticorps anti-CD40L conçu sous le format d'une IgG1 humanisée. Cet anticorps injecté chez des singes rhésus (*Macaca mulatta*) ayant reçu un allogreffe vascularisé (Kirk *et al.*, 1999) ou tissulaire (Kenyon *et al.*, 1999) se révéla capable de prévenir les rejets, et aucun effet indésirable ne fut observé. En revanche, son passage en clinique chez des patients atteints de lupus entraîna la survenue de graves épisodes de thromboembolie et aboutit à l'arrêt de son développement (Boumpas *et al.*, 2003). Parallèlement, des études mirent en évidence que l'injection de l'anticorps 5C8 sous sa forme murine (IgG2a) chez des singes cynomolgus (*Macaca fascicularis*) ayant subi une allogreffe rénale (Kawai *et al.*, 2000) ou chez des babouins (*Papio anubis*) ayant subi une xéno greffe rénale (Knosalla *et al.*, 2002) aboutissait également à la survenue de complications thrombotiques. Dans la mesure où, chez l'homme, la présence simultanée du CD40 ligand et du récepteur FcγRIIA à la surface des plaquettes pourrait expliquer le déclenchement d'une activation plaquettaire et la survenue de thrombose (Mirabet *et al.*, 2007), ces observations mettent donc en avant le rôle primordial de la portion Fc des IgG et des FcγRs dans la survenue de ces effets indésirables. A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible concernant la présence de FcγRIIA sur les plaquettes de macaque. L'ensemble de ces observations nous amène donc logiquement à

étudier plus précisément les caractéristiques du gène *FCGR2A* et à chercher l'existence d'orthologues de ce gène chez différentes espèces de mammifères.

Le questionnement sur la pertinence des modèles primates utilisés lors du développement pré-clinique des anticorps thérapeutiques a été récemment re-lancé avec l'essai du TGN1412 de TeGenero. Cet anticorps monoclonal humanisé de classe IgG4 est un superagoniste de la molécule de co-stimulation CD28 des lymphocytes T (Beyersdorf *et al.*, 2005). Après des études pré-cliniques chez le singe (*Macaca fascicularis* et *Macaca mulatta*) sans observation d'effets indésirables, une phase I a été conduite chez six volontaires sains. Durant cet essai, tous les volontaires ont développé, très rapidement après la première injection de TGN1412, des complications sévères associant douleur, fièvre, défaillance multiviscérale et coagulation intravasculaire disséminée secondaires à une libération massive et rapide de cytokines pro-inflammatoires (Suntharalingam *et al.*, 2006). Suite à cet incident, de nombreuses hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer pourquoi aucun effet indésirable n'avait été détecté lors de l'injection du TGN1412 à des primates non-humains. Tout d'abord, il a été postulé que des différences entre les acides aminés extra-cellulaires du CD28 de macaque et celui de l'homme, pourraient être à l'origine d'une moins bonne affinité du TGN1412 pour le CD28 de macaque (Hansen *et al.*, 2006). Les travaux de notre équipe ont cependant montré que les domaines extra-cellulaires étaient identiques entre les deux espèces (Ohresser *et al.*, 2006). Par contre il existe des divergences sur 3 acides aminés du domaine transmembranaire pourrait altérer chez le macaque l'association de CD28 avec ses différents partenaires moléculaires et rendre l'activation cellulaire par le TGN1412 plus faible chez le macaque (Ohresser *et al.*, 2006). Quoiqu'il en soit, plusieurs arguments plaident aussi en faveur de l'implication des FcγRs dans la survenue de ces effets indésirables et posent donc le problème de la similitude fonctionnelle des FcγRs de macaque. Tout d'abord, il a été montré *in vitro* que la production de cytokines par des lymphocytes T humains sensibilisés par du TGN1412 n'était possible qu'à condition qu'il y ait pontage entre les différentes molécules d'anticorps présent à la surface cellulaire (Waibler *et al.*, 2008). Comme nous l'avons vu précédemment, seuls les récepteurs FcγRIIA et FcγRIIA-158V sont capables de fixer les IgG4 et ce pontage pourrait donc avoir lieu par l'intermédiaire de cellules porteuses de ces récepteurs comme des macrophages ou des neutrophiles. Le fait que les IgG4 humaines ne soient pas reconnues par les FcγRs de macaque (Mourad *et al.*, 1998) et de mangabey (Rogers *et al.*, 2006) pourrait avoir expliqué l'absence d'effets indésirables lors de

l'administration pré-clinique du TGN1412. Pour pouvoir analyser au mieux ce phénomène et pouvoir mieux appréhender les modèles animaux utilisés dans le développement des anticorps thérapeutiques, il convient donc de connaître de façon plus précise quels sont les différents types de FcγRs présents chez le macaque, ce que nous avons entrepris à l'échelle génomique, dans une perspective phylogénétique plus large, couvrant l'ensemble des mammifères.

B. Résultats

Article N°1 : Soumission prévue à Plos Genetics ou Plos Biology

Evolutionary story of low-affinity Fc receptor gene cluster in mammals

Julien Lejeune^{1,2}, Benoît Piégu^{1,2}, Patrick Gaudray^{1,2}, Marc Ohresser^{1,2}, Hervé Watier^{1,2,3}

¹CNRS UMR 6239 « Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer », Tours, France ;

²Université François-Rabelais de Tours, France ; ³CHRU de Tours, Laboratoire d'immunologie, France.

Article qui sera soumis après l'obtention de séquences supplémentaires et après l'établissement des profils de conversion génique des différents gènes analysés.

Introduction

Receptors for the Fc portion of IgG (FcγRs) play an important role in the immune system notably connecting innate and adaptative immunities. This is particular true for receptors of low/ intermediate affinity which are not saturated by endogenous IgG and are therefore free to recognize immune complexes and IgG-sensitized microorganisms or target cells. Very strikingly, all the genes encoding these low affinity IgG Fc receptors are clustered in every species studied so far. This cluster will be referred as *lofcgr*-complex in the present article. In mice the three genes of *lofcgr*-complex are *Fcgr2* and *Fcgr3*, coding for FcγRII and FcγRIII, respectively [Ravetch *et al.*, 1991], and the recently identified *Fcgr4* coding for FcγRIV [Mechetina *et al.*, 2002 ; Nimmerjahn *et al.*, 2005]. FcγRIII and FcγRIV, as well as the high affinity FcγRI, are associated with the FcR-γ chain which brought an Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM) required for cell activation [Ravetch *et al.*, 1991 ; Nimmerjahn *et al.*, 2005]. FcR-γ KO mice do not express these activatory receptors and are deficient in antibody-mediated responses such as antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) and macrophages phagocytosis [Takai *et al.*, 1994 ; Clynes *et al.*, 2000]. By contrast, FcγRII has an Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif (ITIM) in its own intracellular portion and can inhibit activatory receptors when both types of receptors are co-engaged [Coggeshall *et al.*, 1999]. Accordingly, mice lacking FcγRII show increased humoral responses [Takai *et al.*, 1996]

In human, the situation appears more complex notably due to the presence in the *lofcgr*-complex of additional genes coding for FcγRs with atypical properties (FcγRIIA, FcγRIIIB, FcγRIIC). Like in the mouse, only one gene, *FCGR2B*, is coding for an inhibitory FcγRs (FcγRIIB) and appears to mouse *Fcgr2* ortholog [Nimmerjahn *et al.*, 2006]. FcγRIIA is the

only human low affinity Fc γ Rs associated with a transduction subunit such as the FcR- γ chain ; based on sequence similarity in the extra-cellular portion, *FCGR3A* seems to be the mouse *FCGR4* ortholog although they have a different expression pattern [Nimmerjahn et al., 2004]. *FCGR2A*, coding for the activatory Fc γ RIIA, seems to be the ortholog of murine *Fcgr3* [Nimmerjahn *et al.*, 2005] although it has a distinct expression. Indeed, Fc γ RIIA possesses its own activation motif in its intracellular domain, which is unique among activatory Fc γ Rs. This nonclassical ITAM is characterized by the presence of 12 residues between the two YXXL boxes, instead of 7 in classical ITAMs and has been associated with differences in intracellular signalling pathways and with differences in functional activities [Dai *et al.*, 2009]. *FCGR2C* is a chimeric gene which is the result of an unequal crossing-over between *FCGR2A* and *FCGR2B*, having extracellular domains similar to Fc γ RIIB and an intracellular ITAM-like motif similar to Fc γ RIIA [Warmerdam *et al.*, 1993]. Human Fc γ RIIB, encoded by *FCGR3B*, is an atypical receptor attached to the cell membrane by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and has no triggering capability by itself but contributes to the cell activation by associating with other Fc γ Rs [Ravetch *et al.*, 1989].

Few things are known about the evolution of *FCGR2/4* cluster and notably about the mechanism(s) leading to the acquisition of *FCGR2C* and *FCGR3B* in human [Nimmerjahn *et al.*, 2006]. Moreover, despite the functional consequences of the ITAM-like motif in Fc γ RIIA and Fc γ RIIC, no hypothesis has been proposed to explain its presence. In order to appreciate the evolutive story of the *lofcgr*-complex, we have studied the genes coding for low-affinity Fc γ Rs in several mammalian species and particularly in primates. We found that all primates are characterized by a unique Fc γ RIIA receptor, replacing Fc γ RIII in other mammals, with an ITAM-like motif. Its ITAM-like motif originates from a knock-in-type retroviral element integration (KIRI), disrupting the ITIM-coding exon of an extinct inhibitory *FCGR3* gene.

We found that macaques, gibbons, orang-utans have a *lofcgr*-complex composed of three genes (*FCGR2A*, *FCGR4*, *FCGR2B*), and that a non homologous recombination led to a segmental duplication of the cluster in Hominids, responsible for a *lofcgr*-complex with 5 genes (*FCGR2A-FCGR3A-FCGR2C-FCGR3B-FCGR2B*) in gorillas, chimpanzees and humans.

Materials and Methods

See supplementary informations for details methods

Sequences analysis

Sequences were collected in divers genomic and cDNA databases by similarity searching using set of BLAST tools (Altschul *et al.*, 1990), all available on NCBI web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Multiple alignments were done using CLUSTALW (Thompson *et al.*,1994) followed by visual inspection and manual editing when necessary. The program Recco was used to detect gene conversions (Maydt *et al.*, 2006). Recco was run with default parameters and all sequences involved in a gene conversion with simulation-based P-value <0.01 were removed. For the phylogenetic analysis, phylogenetic trees were constructed using the maximum parcimony method with default parameters and 1000 bootstrap replicates using the MEGA4 package. HERV element in *FCGR2A* gene was identified by RepeatMasker (Smit *et al.*, 2004).

DNA

Genomic DNA samples were purchased at European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK) and was derived from chimpanzee (*Pan troglodytes*) EB 176 (JC) (ECACC No. 89072704), gorilla (*Gorilla gorilla*) EB(JC) (ECACC No. 89072703), orang-utan (*Pongo pygmaeus*) EB 185 JC (ECACC No. 89072705), gibbon (*Hylobates lar*) MLA144 (ECACC No. 86102901), cynomologous monkey (*Macaca fascicularis*) CYNOM-K1 (ECACC No. 90071809) cell lines. In addition, DNA from buccal swab samples from three gorillas and

four orangutans (Zoo parc de Beauval, Saint Aignan sur Cher, France) were extracted using Isohelix DNA isolation kit (Kent, UK). One additional gorilla DNA sample was extracted from blood (La vallée des singes, Romagnes, France) using QIAGEN DNA extraction kit (Courtaboeuf, France).

Amplification and sequence analysis of *FCGR2A*, *FCGR2B* and *FCGR2C* genes

Long-PCR were performed with the Elongase Amplification System (Invitrogen, Carlsbad, California) according to manufacturer instruction with 1.5 mM of MgCl₂. Primers were designed on closely similar coding sequences observed between primates in order to amplify the genes of interest. A Special care was taken in order to design primers with high gene specificity (i.e. *FCGR2A* versus *FCGR2B*) and with a sequence compatibility including non-primate mammals when possible. We referred to an alignment of the genomic sequences to ensure that primers would amplify the intended fragments in all species. For *FCGR2A* amplification, a 8kb fragment was obtained using the 2aMfe2-S forward primer localized in exon 2 (5'GCTTCTGCAGACAGTCAAAGT3') and the 2aMfe7-AS reverse primer localized in exon 7 (5'TCGGGCAGCCTTCACAGGATC3'). For *FCGR2B* amplification, a 7.5kb fragment was obtained using the 2bMfHse2-S forward primer localized in exon 2 (5'CTCCTGTTGCTGGGACACCTG3') and the 2bMfHse8-AS reverse primer localized in exon 8 (5'TGAATAGGTGATTGTGTTCTCAGC3'). For *FCGR2C*, which is a chimeric gene between *FCGR2A* and *FCGR2B*, a 7.2kb fragment was obtained using the 2bMfHse2-S forward primer and the 2aMfe7-AS reverse primer. For gibbon, due to a divergence process, 2aGibbon-S primer (5'CTTCTGCAGACAGTCAAGCTG3') was substituted to the 2aMfe2-S primer. For all species, 50ng genomic DNA samples were amplified in 20 µL final volume on a Bio-Rad MJ Mini Thermal Cycler with an initial denaturation at 94°C for 5 min,

followed by 35 cycles of : 94°C for 30 sec, 63.1°C for 30 sec, 68°C for 10 min. Amplification was verified by loading PCR products on a 0.8% agarose gel which was stained by ethidium bromide. All these PCR products were secondly sequenced using primers described in supplementary Table 1.

Amplification and sequence analysis of *FCGR3A* and *FCGR3B* genes.

PCR were performed with Taq DNA polymerase (Eurobio, Les Ulis, France) according to manufacturer procedures. We referred to an alignment of the genomic sequences to ensure that primers would amplify the intended fragments in all species. Primers were designed as described above but avoid divergences between *FCGR3A* and *FCGR3B* when available (human and chimpanzee). For co-amplification of *FCGR3A* and *FCGR3B* a 176bp PCR product was obtained with 3Mfe5-S forward primer (5' TTTGGCAGTGTCATCCATCTC3') and a3Mfe5(2)-AS reverse primer (5' ATTTGTCTTGAGGGTCCTTGCTCC3'), both localized in exon 5. PCR were conducted as above but initial denaturation was followed by 35 cycles of : 94°C for 30 sec, 55.7°C for 30 sec, 68°C for 10 min. Amplification was verified by loading PCR products on a 8% acrylamide gel stained by ethidium bromide. PCR products were then sequenced using amplification primers (Supplementary Table 1).

Results

Genesis of *FCGR2A*, a new activatory receptor gene in primates

Analysis of human and mouse *FCGR* sequences was performed and confirmed orthology between human *FCGR3A*/ mouse *Fcgr4* and human *FCGR2B*/ mouse *Fcgr2* (data not shown). When aligning the *Fcgr3-Hspa6* segment from the rat (which, unlike mouse, possess *Hspa6* gene) with the human *FCGR2A-HSPA6* segment, extensive homology could be evidenced at the level of S1 and S2 exons, at the 5' end of the second intron, from the EC1 to the EC2 exons, including the third intron, and at the level of the whole *HSPA6* gene and its upstream and downstream regions (Figure 1A). This synteny strongly argues for the orthologous nature of *Fcgr3* and *FCGR2A*. More interestingly, although there is no homology between mouse *Fcgr3* and *Fcgr2*, except at the level of the EC1 and EC2 exons (data not shown), human *FCGR2A* (*Fcgr3* ortholog) aligns with *FCGR2B* (*Fcgr2* ortholog) on a large stretch extending for the EC2 up to about 1kb downstream the IC3 exon of *FCGR2B* (Figure 1A). This alignment is interrupted by a ~5kb segment characterized by large terminal repeats (LTR) suggesting retroviral origin (Figure 1A). These LTR present high homology with the LTR from MER57F, a class I human endogenous retrovirus (HERV); between these LTR, there is no homology with the classical retrovirus genes *gag*, *pol* and *env*, but there is instead a high homology with MER34B, a non autonomous retroelement (Figure 1B) (Supplementary Table 2). To date the insertion of this retroelement in *Fcgr3*, we have searched for the presence of the MER57F LTR signature in sequences available for several mammals revealing traces of this LTR in *Otomelur garnetii* (Lemuriformes), *Callithrix jacchus*

(Callitrichidae) and in *Macaca mulatta* (Cercopithecidae) (data not shown), and highly suggesting that the acquisition of this retroelement is specific to primates. The vestigial C3 exon downstream the endogenous retrovirus in *FCGR2A*, which is homologous to *FCGR2B* C3, had never been found in *FCGR2A* (or *FCGR2C*) mRNA, even in EST databases (data not shown). Interestingly, one of the endogenous retrovirus segment homologous to MER34B codes for the *FCGR2A* C3 exon. The non-canonical ITAM unique to primate FcγRIIA (and FcγRIIC), encoded by the new C3 exon, has a DX₂YX₂LX₁₂YX₂L sequence in human and chimpanzee *FCGR2A* and *FCGR2C*, and a DX₂YX₂LX₁₁YX₂L sequence in rhesus monkey (Figure 1C). A nucleotide sequence putatively encoding DX₂YX₂LX₁₁YX₂L in another composite endogenous retrovirus is located in chromosome 11p14.3 in humans, between the *NELLI* and *TMEM16E* genes. This sequence is not associated with any known transcript.

Genomic organization of the *lofcgr*-complex in mammals

*Segmental duplication of cluster *lofcgr*-complex in primates*

Sequences drawn from the Chimpanzee Genome Project were reassembled using the human *lofcgr*-complex as reference. The chimpanzee cluster comprises orthologous of all the human *FCGR* genes as well the *HSPA6* and *HSPA7* genes (Figure 2A). However it should be noted that through this approach the *FCGR2C* gene could not be unambiguously assigned. Similarly, we analyzed the *lofcgr*-complex in macaque (*Macaca mulatta*) using sequences from Rhesus macaque Genome Ressources. We found traces of sequences suggesting that the macaque cluster is composed by only three *FCGR* genes and one *HSPA6* gene (*FCGR2A-HSPA6-FCGR4-FCGR2B*) corresponding to orthologous genes of human *FCGR2A*, *HSPA6*, *FCGR3A* and *FCGR2B*. However, based on the available sequences and reassembled contigs,

it cannot be totally excluded that *FCGR3B* and *FCGR2C* genes are lacking in this species. Sequences available for rat, cow and partially from dog revealed a genomic organization close to the mouse *lofcgr*-complex which demonstrate that *FCGR3-HSPA6-FCGR4-FCGR2* organization is the standard for all non-primate mammals (Figure 2A). Close inspection of the whole human cluster allowed to define two duplication segments of approximately ~80kb with the same architecture on either side of the breaking point region already associated with *FCGR2C* genesis (Supplementary figure 1). The upstream segment (b1), from *FCGR2A* to *FCGR2C*, encompasses *HSPA6* and *FCGR3A*, whereas the downstream segment (b2), from *FCGR2C* to *FCGR2B*, encompasses *HSPA7* and *FCGR3B* (Figure 2A). Each module start and finish at crossing over point described for *FCGR2C* genesis respectively [Warmerdam *et al.*, 1993]. The b1 and b2 segment are colinear with a remarkable identity score of about 94%, raising the hypothesis of a tandem duplication of the b segment in a former *FCGR2A-FCGR3-HSPA6-FCGR2B* cluster, which will be designed *FCGR2A-FCGR4-HSPA6-FCGR2B* with respect to the nomenclature already in use in other species. This event was simultaneously responsible for the duplication of *FCGR4* (now became *FCGR3A* and *FCGR3B*), of *HSPA6* (*HSPA6* and *HSPA7*), and for the appearance of *FCGR2C*, made of the 5' part of *FCGR2B* and of the 3' part of *FCGR2A* (Figure 2B).

PCR screening for orthologous genes of human FCGR2 and FCGR3

To know whether the intermediary species between Cercopithecinae (macaques and baboons) and Hominids (chimpanzees and humans), *i.e.* Hylobates and Pongids, have *FCGR2C* and *FCGR3B* genes, two primer pairs were first designed to specifically amplify *FCGR2A* and *FCGR2B*, whatever the primate species. In the same experimental conditions, *FCGR2C* should be amplified, if present, by using the *FCGR2B*-specific forward and the

FCGR2A-specific reverse primers (Supplementary Figure 2). Whether this could be achieved with human and also gorilla and chimpanzee DNA confirming the presence of *FCGR2C* in the latter, no amplification could be obtained with DNA from Cercopithecinae (Macaque), Hylobates (Gibbon) and even in Pongids (orang-utan), indicating the absence of *FCGR2C* in these species (Figure 3A) (Supplementary Figure 3A). For the three genes and whatever the primate species in which the amplification was successful, gene specificity of the amplification product was confirmed by sequencing.

A PCR was designed to co-amplify *FCGR3B* together with *FCGR3A*. *FCGR3B* is characterized by a serine at position 203 (Ser²⁰³ generating the glycosyl-phosphatidyl-inositol anchor of FcγRIIIB) and a stop codon at position 216. The co-amplification of *FCGR3A* and *FCGR3B* product of human genomic DNA present, on a hand both a T (Phe) and a C (Ser) at the 2^d position of codon 203 and, on the other hand, both a C (Arg) and T (stop) at the first position of codon 216 (data not shown). Both type of codons were also observed at each position in gorilla (Figure 3B) and chimpanzee (data not shown), whereas only a Phe²⁰³ and an Arg²¹⁶ or an alternative Pro²¹⁶ codon was found for macaque (data not shown), gibbon (data not shown) and orang-utan (Figure 3B). In another similar PCR experiments, but with a primer pair designed in other regions with *FCGR3B* versus *FCGR3A* divergences, the same conclusion were obtained (data not shown). Finally, two *FCGR3B* specific primers sets obtained by substitution of one of the up mentioned primer pairs by an other one anchored on *FCGR3B* specific sequences, failed to amplified product in same deficient species but are efficient in human, chimpanzee and gorilla (Figure 3C) (Supplementary Figure 3B).

Comparative sequence and phylogenetic analysis

In order to confirm the evolutionary relationships among *FCGR2/3* genes, sequences obtained from amplification product of *FCGR2* and *FCGR3* genes were used in a phylogenetic analysis. First, all sequences were aligned and alignments were used to establish evolutionary relationships by constructing phylogenetic trees with Neighbor-joining method. Using this approach, trees obtained revealed that sequences are grouped by orthologous lineages and confirming previously results obtained (Data not shown).

Secondly, we proceeded to a phylogenetic analysis with a more adapted model. Using maximum parsimony method, trees obtained from sequences of exon EC1, EC2 and TM shown deviation from the predicted evolutionary relationships. Indeed sequences were not grouped by orthologous lineages in phylogenetic but were grouped by taxa (Data not shown). This observation should indicate that recombination event or gene conversion events have occurred and they can account for the incorrect topology of trees. To test this hypothesis we have evaluated this phenomenon through adapted method and found that coding sequences of *FCGR2/3* genes display large region of gene conversion (Data not shown). In consequence, we have decided to use intronic sequences which have regions with reduce rate of gene conversion (P value >0.01) (Data not shown). For *FCGR2* genes, analysis of a 157bp region of intron 3 confirmed the paralogy between *FCGR2B* and the 5' part of *FCGR2C* in human, chimpanzee and gorilla (Figure 4A) whereas paralogy between the 3' part of *FCGR2C* and *FCGR2A* was confirmed with analysis of 210bp region of intron 6 (Figure 4B). For *FCGR3/4* family, genes analysis was carried out using a 176bp region of intron 3 and revealed the paralogous relation between *FCGR3A* and *FCGR3B* (Figure 5). However, probably due to additional gene conversion regions, all groups of orthologous genes analyzed showed relationships between species which are not consistent with the topology generally admitted.

Discussion

This study provides insights into the genomic structure and evolution of the *lofcgr*-complex cluster in mammals. The most obvious inter-species difference is the result of a duplication event which was proven from a detailed analysis of the human *FCGR* cluster. The duplication gave rise to *FCGR2C* and two *FCGR4*-type genes which diverged from each other, *FCGR3A* keeping the original *FCGR4* functionality and *FCGR3B* acquiring specific characteristics. This duplication event took place in homininaes, and was rendered possible by the former evolution of mammal *fcgr3* into primate *FCGR2A*. This latter evolution is now shown to be the result of serial processes leading to the genesis of *FCGR2A* coding for a new activatory FcγR. Altogether, it is clear that the *lofcgr*-complex has been submitted to serial accidents which have been positively selected during evolution (Figure 6).

The evolution from *FCGR3* in non-primate mammals, to *FCGR2A* in primates appears as the result of two genetic events: 1) a recombination between two genes in the same orientation, *FCGR3* coding for one of the two FcR-γ associated receptors and *FCGR2* the ITIM-containing receptor; 2) the integration of a retroviral element creating a new exon coding for an ITAM-like motif, which is a unique characteristics of primate *FCGR2A*. As a consequence, primates have a new *FCGR2A* gene, coding for FcγRIIA, and their *lofcgr*-complex display a new *FCGR2A/HSPA6/FCGR4/FCGR2B* organization, as compared to that of non-primate mammals. The most likely scenario relies on several hypotheses could be formulated to explain the *FCGR2/FCGR3* conversion and endogenous retrovirus integration. Our first hypothesis is that the inhibitory function conferred by the first recombination (tentatively called *FCGR3i*) has never been found in living species but too few of them have been studied so far to be conclusive (Figure 6 Step1). Our second hypothesis is that the

presence of two genes (*fcgr3i* and *fcgr2*) encoding inhibitory Fc γ R_s has been rapidly counter-selected unless one of them has been rescued. Indeed, a knock-in-type retroviral element integration (KIRI) disrupted the ITIM- encoding exon and brought an ITAM-like motif allowing the final transformation of *fcgr3i* into *FCGR2A*, the first activatory Fc γ R not depending on the accessory FcR- γ chain (Figure 6 Step 2). Hundreds examples of molecular domestication have been recognized where coding sequences of functional genes entirely or partially derive from mobile element sequences (Lorenc *et al.*, 2003) but, to our knowledge, this is the first case where a new transduction motif originates from a transposon. This atypical ITAM-like structure is responsible for the presence of three phosphorylation sites (Mitchell *et al.*, 1994) and is associated with specific functions (Van den Herik-Oudijk, 1995) (Powell, 2006). This illustrates once again the powerfulness of mobile elements for driving to the evolution and diversification of immune genes (Deragon *et al.*, 2000).

We have shown that the human *FCGR2/3* cluster is composed of two repetition blocks (~80 kb each with > 95 % homology) which result from a segmental duplication, in accordance with its current definition (Feuk *et al.* 2006). This recombination event, which was an unequal crossing-over favored by the high degree of homology between *FCGR2A* and *FCGR2B*, led to the appearance of two new genes in homininaes *FCGR2C* and *FCGR3B*. *FCGR2C*, which is a well-known chimeric gene (Warmerdan *et al.*, 1993), straddles the two duplication blocks and appears as a signature of this segmental duplication event. Secondly, duplication gave rise to two *FCGR4* copies but one of them rapidly evolved into *FCGR3B*, the gene coding for the only GPI-anchored Fc γ R (Figure 6 Step 3 and 4). Parallely to the evolution of *FCGR4* into *FCGR3B*, the promoter of the duplicated copie has also evolved to acquire a new expression pattern, as illustrated by the neutrophil expression of human and chimpanzee Fc γ RIIIB (Clarkson *et al.*, 1986) compare to the NK and macrophage expression

of macaque Fc γ RIV (Rogers *et al.*, 2006). These observations are illustrated by the fact that transgenic mice generated with genomic sequence of human *FCGR3A* and *FCGR3B* shown expression of Fc γ RIIA on NK cells and macrophages and expression of Fc γ RIIB on neutrophils (Li *et al.*, 1996). Interestingly, the neutrophilic expression pattern of Fc γ RIIB could be ancestral feature which was repressed in primate Fc γ RIV since mice express Fc γ RIV only in neutrophils (Nimmerjahn *et al.*, 2005) and pigs in both neutrophils, monocytes and NK cells (Isashi *et al.*, 1996). Moreover, despite the fact that Fc γ RIIB does not have any transduction motif, its co-expression with Fc γ RIIA on the surface of neutrophils suggests that it has brought synergistic properties to the unusual Fc γ RIIA (Chuang *et al.*, 2000).

Homologous recombination is a frequent phenomenon in multigene families ; it has been implicated as a major mechanism that drives evolution in numerous occasion, either in the form of unequal crossover or gene conversion (Papadakis *et al.*, 1999). In all species analyzed, we have found, between genes in the *lofcgr*-complex, a high rate of gene conversion. Gene conversion is referred to as the non-reciprocal transfer of genic information between two genes with a high degree of homology (Baltimore *et al.*, 1981). This phenomenon contributes to maintaining sequences homogeneity and had interfered with our phylogenetic analysis notably when we have used sequences coding for extra-cellular domains of Fc γ Rs. Indeed, it has been shown that one consequence of gene conversion is that paralogous gene sequences become more closely related to each other than they are to their orthologous counterparts in a closely related species (Hurles *et al.*, 2004). Consequently, gene conversion has an important role in the concerted evolution of *FCGR* genes and we could raise the hypothesis that the concerted evolution of extra-cellular domains of Fc γ Rs is concomitant with an evolution of the Fc portion of IgG. Additional consequence of gene conversion is the generation of recombination hotspots (Lindsay *et al.*, 2006) which can

contribute to recombination events and subsequently to copy number variations. In macaque, where we found gene conversion, an array-based comparative genomic hybridization has identified *FCGR* region as subject to copy number variation (Lee *et al.*, 2008). We could raise the hypothesis that recombination event, through identity brought by gene conversion, could occur and lead to CNV of *FCGR* genes in macaque.

It is also known that the presence of large duplicated segments subsequently favors recombination events (Lupski 1998; Inoue *et al.*, 2002; Sharp AJ *et al.*, 2006), resulting in gene number variations. These variations are explained by the modular structure of the *lofcgr*-complex which favors further recombination events through another unequal crossing over between “normal” clusters, involving *FCGR2C* and upstream sequence on one chromatide and *FCGR2B* related sequences on the other (Supplementary Figure 4). In human, a variable number of *FCGR2C* and *FCGR3B* was described (Fromont P, *et al.*, 92, Aitman *et al.*, 2006; Reilly *et al.*, 1994) and it seems that in major cases a co-variation number of these genes occurred. In chimpanzee, Perry *et al.*, had also observed variations of *FCGR3B* whereas no informations are available concerning copy number variation of *FCGR2C* (Perry *et al.*, 2008).

In conclusion, we have shown that cluster coding the FcγRs is the result of a complex evolutive process where each step has facilitated the occurrence of the next. The evolution story lead notably to the acquisition of primate FcγRIIA then to FcγRIIIB and FcγRIIC specific to hominids.

Acknowledgments

We wish to thank Dr Baptiste Mulot from ZooParc de Beauval (Saint Aignan sur Cher) and Pascal Guery from La vallée des singes (Romagne) for buccal/blood Gorilla and Orangutan samples. This work was supported by the Institut national du cancer and Canceropôle grand-ouest (MabImpact project) and Fondation Langlois. Julien Lejeune was supported by a grant from Région Centre.

Figure legends

Figure 1. Endogenous retrovirus and acquisition of the *FCGR2A*-ITAM-like motif.

(A). Bioinformatic analysis of the intron/exon organization of rat *Fcgr3* and human *FCGR2B* and *FCGR2A* genes. Homologous regions were indicated by background which color indicated origin of the homology. The two major insertion events are indicated by dotted lines. Names under boxes indicated exons coding for signal peptide S1 and S2, extracellular domains 1 (EC1) and 2 (EC2), transmembrane domain (TM) and intracytoplasmic regions 1 (C1), 2 (C2) and 3 (C3) of the Fc γ Rs. Exon and intron sizes are indicated above and below respectively, empty vertical boxes represent unused exons. Orange horizontal bar flanked by orange arrows shaped box indicate endogenous retroviral element with their flanking LTR. C3 exon coding for the ITAM-like motif is represented by a green box

(B). Homologous regions between internal portion of *FCGR2A* HERV and consensus sequences available in RepeatMasker database. Internal regions of the composite HERV are schematized by grey segment whereas their origin are indicated above, LTR are represented as orange arrows with their origin below and C3 exon of *FCGR2A* is represented as green box.

(C). The ITAM-like motif only found in primate species as compared to the consensus ITAM. In the upper part, deduced aminoacid sequence of human *FCGR2A* (AL45067) and *FCGR2C* (AL45067) were aligned with orthologous sequence of pigtailed (EB529141), rhesus (*Macaca mulatta*) (AF485813) and cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (NW_001108971) whereas deduced amino acid sequences of human (NM_004106.1), chimpanzee (ENSPTRT00000058618), cynomolgus (ENSPTRT000006016), dog (NM_00100317.1), cow (NM_174537.2) and mouse (NM_010185) FcR- γ , are aligned in the lower part. In both alignments, amino acid of the ITAM are indicated through a green background.

Figure 2. Genomic organization of the *lofcgr-complex* in mammals.

(A). In human, gene organisation was deduced from re-analysis and assembly of the BAC sequences indicated in blue under the map, whose GenBank accession numbers are as follows: AL590285 (RP11-5K23), AL45067.10 (RP11-25K21 contig a), AL45067 (RP11-25K21), AC021370.4 (RP11-25I17), AL451067.1 (RP11-25K21 contig b), AL359541 (RP11-247I16). In chimpanzee, similar map was obtained from contig sequences available in GenBank with the following accession numbers: AACZ01374181-8 (AACZ01374181 to AACZ01374188 for Cont2734.1 to Cont2734.8 named in figure Cont2734), AADA01327254 (ctg_327253), AACZ01050582-6 (Cont3131), AADA01001879 (ctg_1878), AADA01295462 (ctg_295461), AACZ01194036-40 (Cont7248), AADA011191348 (ctg_191347). Interrupted lines indicate partial sequences. Orthologous clusters in mammals were aligned, either from published data (mouse, Nimmerjahn *et al*, 2005, GenBank#NC_000067) or deduced from crude genomic data of dog (NW_876305), cow (NW_931054), rat (NC_005112) and rhesus (NW_001108971). Through this bioinformatic analysis, orthologous genes of human *FCGR2A*, *FCGR2B* and *FCGR3A* (blue, yellow and purple background respectively) were identified. For chimpanzee, the *lofcgr-complex* cluster is characterized by additional human orthologous *FCGR2C* and *FCGR3B* genes. Similarly, orthologous genes of human *HSPA6* (red background) was found in all studied species except mice, whereas only chimpanzee possesses a gene orthologous to human *HSPA7*. Hs: *Homo sapiens*; Pt: *Pan troglodytes*; Ml: *Macaca mulatta*; Bt: *Bos taurus*; Cf: *Canis familiaris*; Rn: *Rattus norvegicus*; Mm: *Mouse musculus* **(B).** Hypothetical mechanism for the genesis of the duplication in the *lofcgr-complex*, involving a non allelic homologous recombination (NAHR) (represented by a chiasma) between *FCGR2B* and the primate *FCGR2A*. The portion of the ancestral cluster (segment a) upstream the recombination event in *FCGR2A* is kept unchanged in the new cluster, as well as the portion (segment c), downstream the recombination event in *FCGR2B*.

The intermediate portion (segment b) only is duplicated (b1 and b2 segment) in the present *lofcgr*-complex.

Figure 3 : PCR screening for *FCGR2C* and *FCGR3B* genes in several primate species.

(A). A long PCR approach was designed to amplify in the same conditions *FCGR2A* and *FCGR2B* whatever the species. In the same experimental conditions, *FCGR2C* should be amplified, if it is present, by using the specific *FCGR2B* forward primer and the specific *FCGR2A* reverse primer. Amplification products of *FCGR2A*, *FCGR2B* and *FCGR2C* were observed for human, chimpanzee and gorilla whereas amplification products of only *FCGR2A* and *FCGR2B* were observed in orangutan, gibbon and macaque, suggesting absence of *FCGR2C* (B). A specific PCR was designed for amplification of *FCGR3B*. Amplification product were observed in human, chimpanzee and gorilla whereas no amplification product were observed for orangutan, gibbon and macaque (C). A PCR was designed to co-amplify *FCGR3B* and *FCGR3A* and sequencing of co-amplification product revealed presence of *FCGR3A* and *FCGR3B* in gorilla, whereas the *FCGR3A* (or *FCGR4*) specific codon is observed with only Orangutan DNA. Hs: *Homo sapiens*; Pt: *Pan troglodytes*; Gg: *Gorilla gorilla*; Pp: *Pan paniscus*; Hl: *Hylobate Lar*; Mf: *Macaca fascicularis*.

Figure 4 : Phylogenetic analysis of *FCGR2A*, *FCGR2B* and *FCGR2C* using the Maximum Parsimony method.

The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of taxa analyzed. Bootstrap values are indicated in interior branch. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset (A). Phylogenetic analysis of 157 positions in intron 3 of *FCGR2A*, *FCGR2B* and *FCGR2C*, out of which 84 were parsimony informative. (B). Phylogenetic analysis of 210 positions in intron 6

of *FCGR2A*, *FCGR2B* and *FCGR2C*, out of which 73 were parsimony informative. Hs: *Homo sapiens*; Pt: *Pan troglodytes*; Gg: *Gorilla gorilla*; Pp: *Pan paniscus*; Hl: *Hylobate Lar*; Mf: *Macaca fascicularis*; Mm: *Mouse musculus*

Figure 5 : Phylogenetic analysis of *FCGR3A* and *FCGR3B* using the Maximum Parsimony method.

The bootstrap consensus tree inferred from 1000 replicates is taken to represent the evolutionary history of taxa analyzed. Bootstrap values are indicated in interior branch. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset. Analysis of 176 positions of intron 3 of *FCGR3A* and *FCGR3B*, out of which 10 were parsimony informative. Hs: *Homo sapiens*; Pt: *Pan troglodytes*; Gg: *Gorilla gorilla*; Pp: *Pan paniscus*; Hl: *Hylobate Lar*; Mf: *Macaca fascicularis*; Mm: *Mouse musculus*

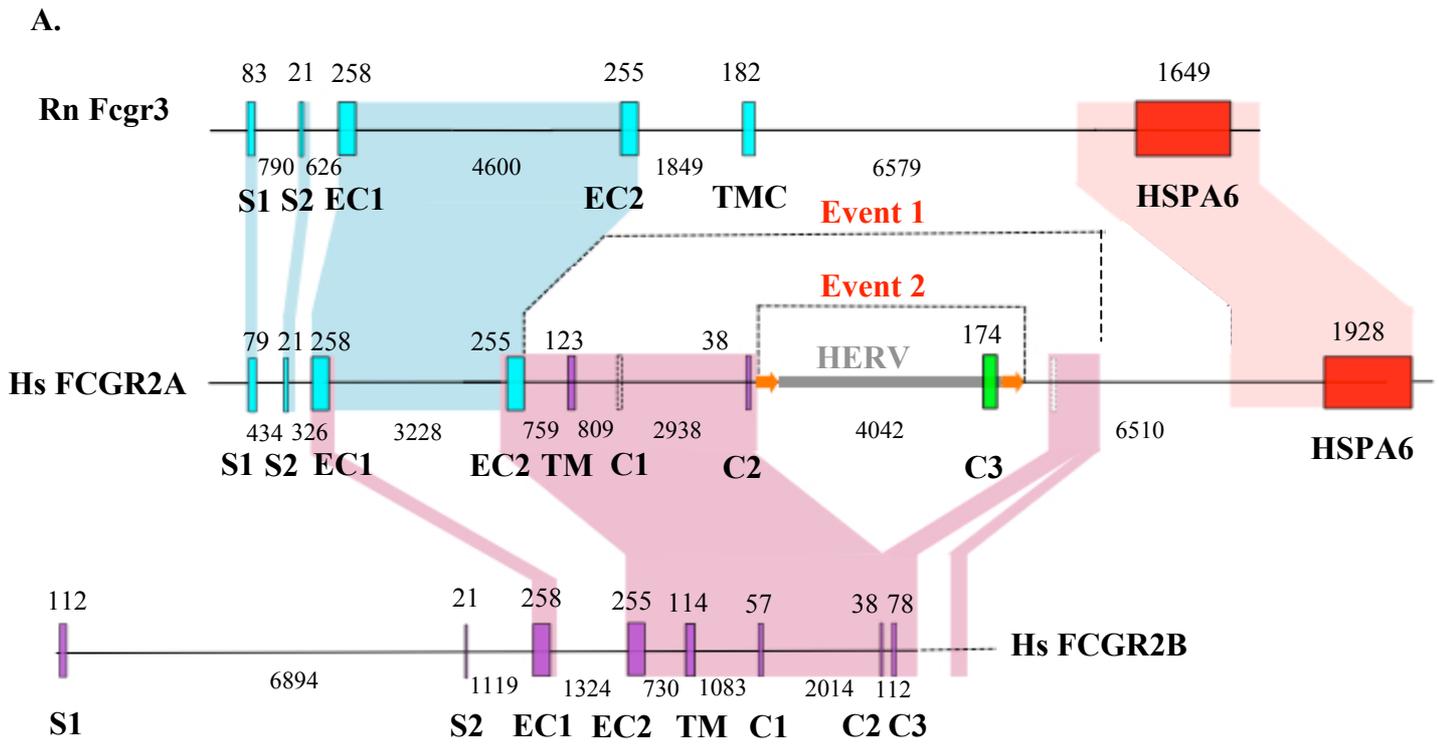
Figure 6 : Evolutive story of cluster coding for low-affinity FcγRs.

Situation 1: In most mammal species, cluster coding for low-affinity FcγRs is composed by *FCGR3* and *FCGR4* coding for FcγRIII and FcγRIV activatory receptors associated with FcR-γ whereas *FCGR2* coding for FcγRII the only inhibitory receptor.

Situation 2: Primates are characterized by a unique FcγRIIA with an ITAM like motif. A first recombination event probably occurred between *fcgr3* and *fcgr2* genes, bringing the EC2-IC3 *fcgr2* gene segment into *fcgr3* and probably conferring an inhibitory function to FcγRIII since the *FCGR2B* IC3 exon encodes the ITIM motif. Like a « knock-in » process, an endogenous retrovirus disrupted the ITIM encoding exon and brought an ITAM-like motif allowing the final transformation of *fcgr2/3* into *FCGR2A*, the first activatory FcγR not depending on the accessory FcR-γ chain.

Situation 3: It has been shown that the human *FCGR2/3* cluster is composed of two repetition blocks (~80 kb each with > 95 % homology) which result from a segmental duplication, in accordance with its current definition (Feuk *et al.*, 2006). *FCGR2C*, a well-known chimeric gene (Warmerdan *et al.*, 1993), straddles the two modules and appears as a signature of the segmental duplication event. This recombination event was an unequal crossing over favored by the high degree of homology between *FCGR2A* and *FCGR2B*. Since *FCGR2C* is found in gorilla and chimpanzee, contrarily to what has been previously published (Nimmerjahn *et al.*, 2006), but not in orang-utan, gibbon and macaque, the duplication event probably occurred in a homininae ancestor less than 9.2 millions years ago (Steiper *et al.*, 2006).

Figure 1



B.

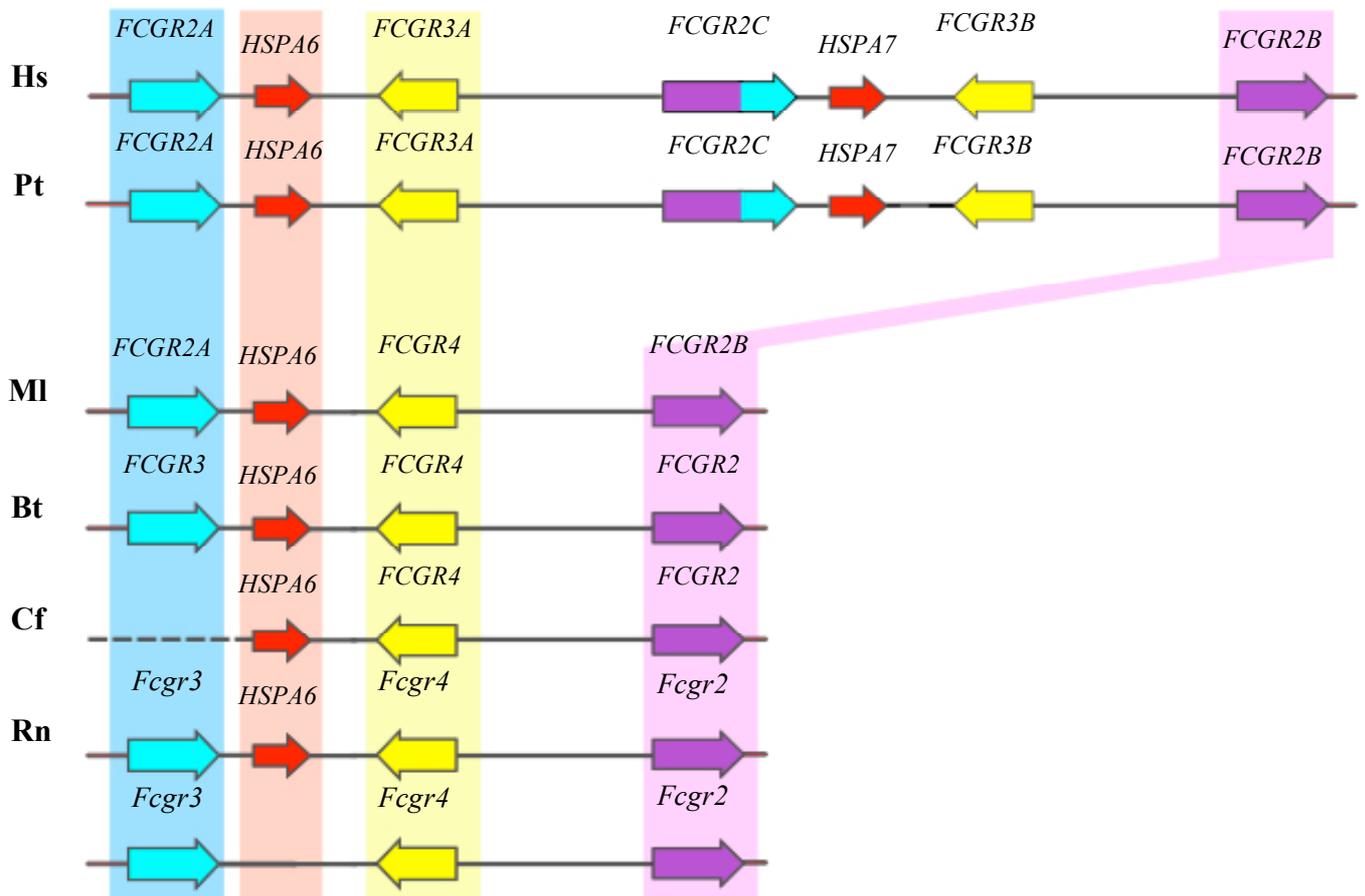


C.

ITAM like motif	Consensus : Dx ₂ Yx ₂ Lx ₁₁₋₁₂ Yx ₂ L
Human FcγRIIa	YETADGGVYMTLNPRAPTDDDKNIYLTLPNDHVNSN
Human FcγRIIc
Pigtailed FcγRIIa
Cynomolgus FcγRIIaV.....R.....A.....S.....
Rhesus FcγRIIaR.....S.....D.....
-R.....M.....S.....D.....
Classical ITAM motif	Consensus : Dx ₂ Yx ₂ Lx ₆ Yx ₂ L
Human FcR-γ	YEKSDGVYTGTLSTRNQETIYETLKHEKPPQ
Chimpanzee FcR-γ
Cynomolgus FcR-γ
Dog FcR-γP.....I.....
Cow FcR-γ	S.....I.....T.....
Mouse FcR-γA.A.....N.....S.....

Figure 2

A.



B.

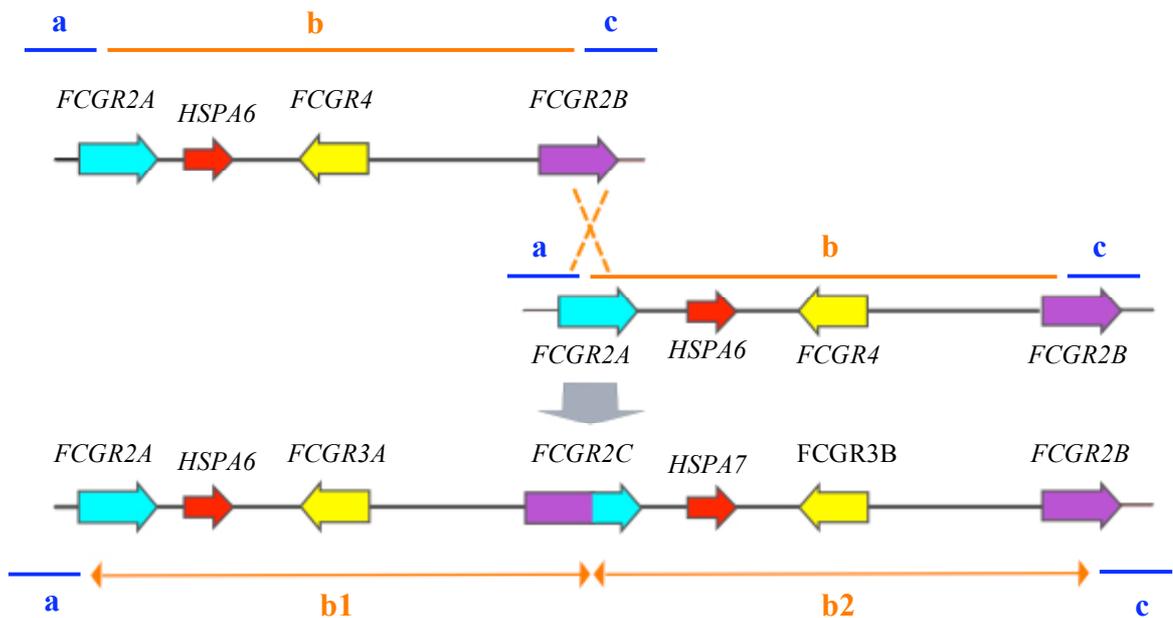
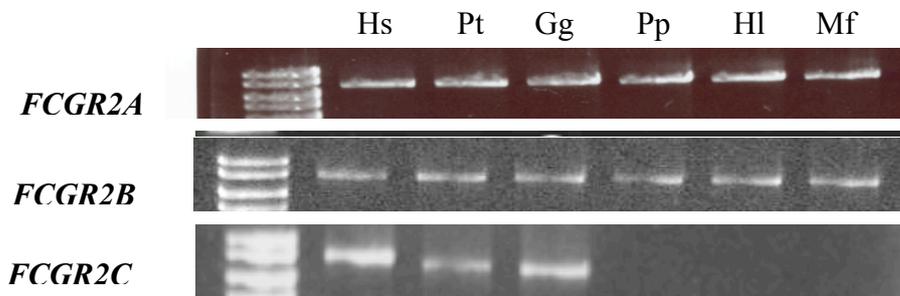
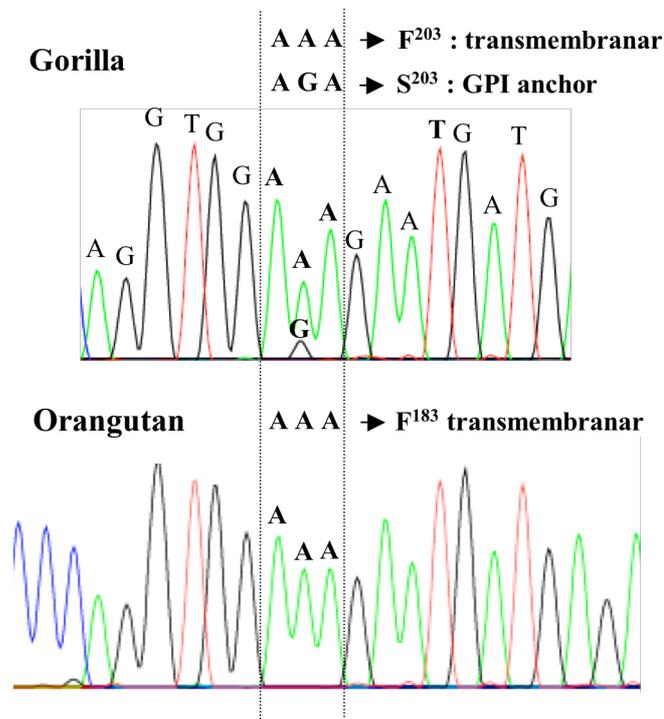


Figure 3

A.



B.

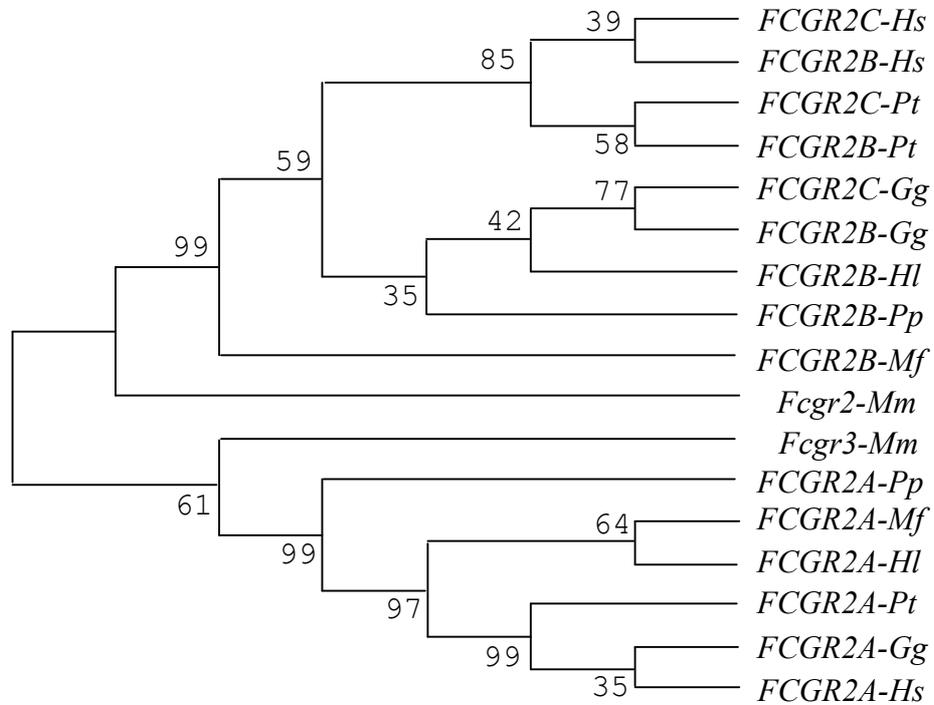


C.



Figure 4

A



B

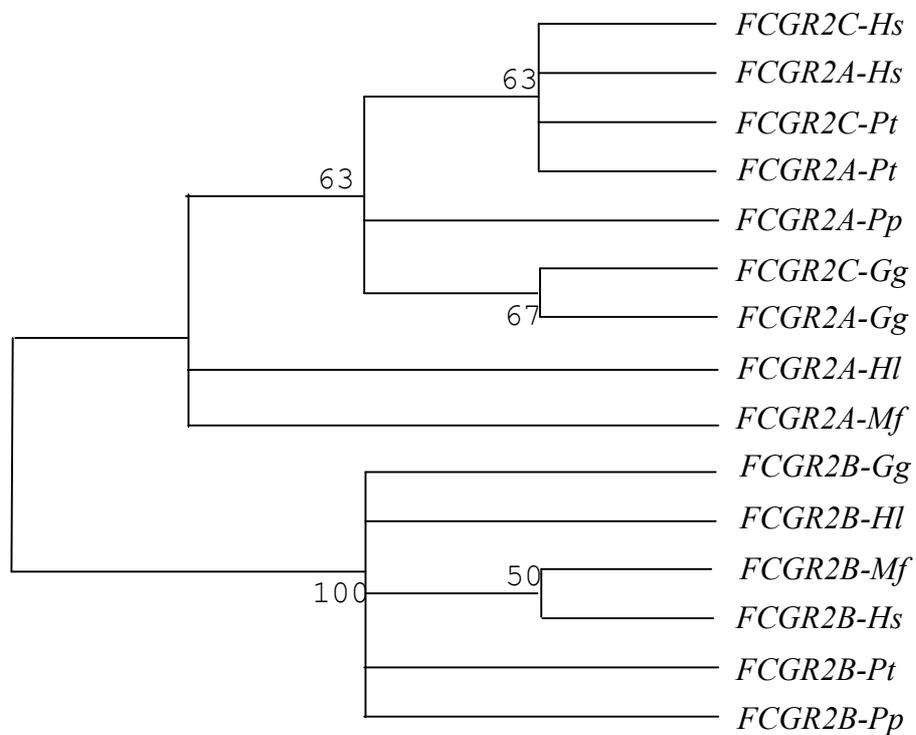


Figure 5

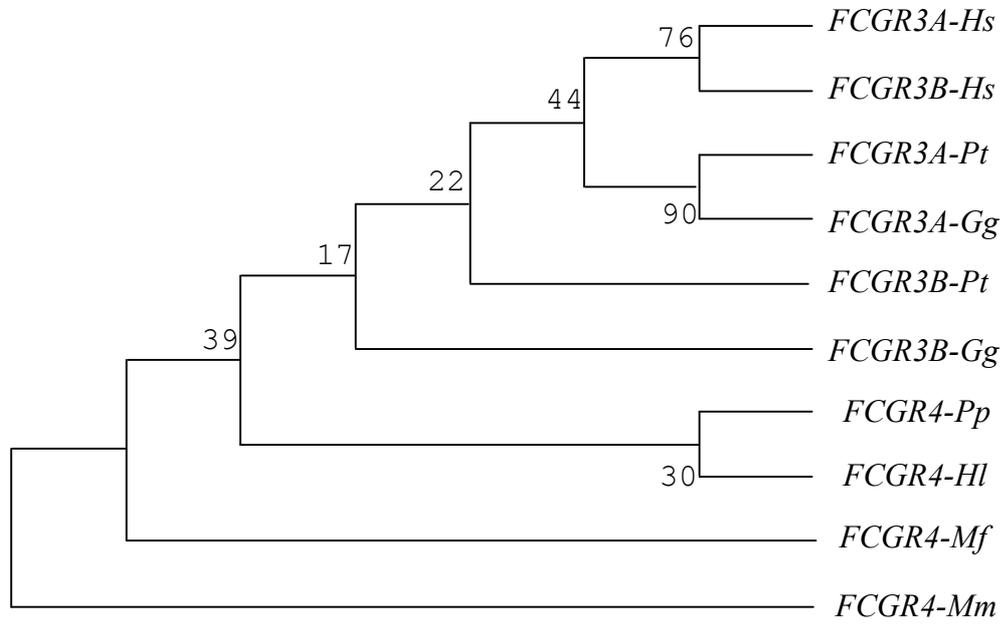
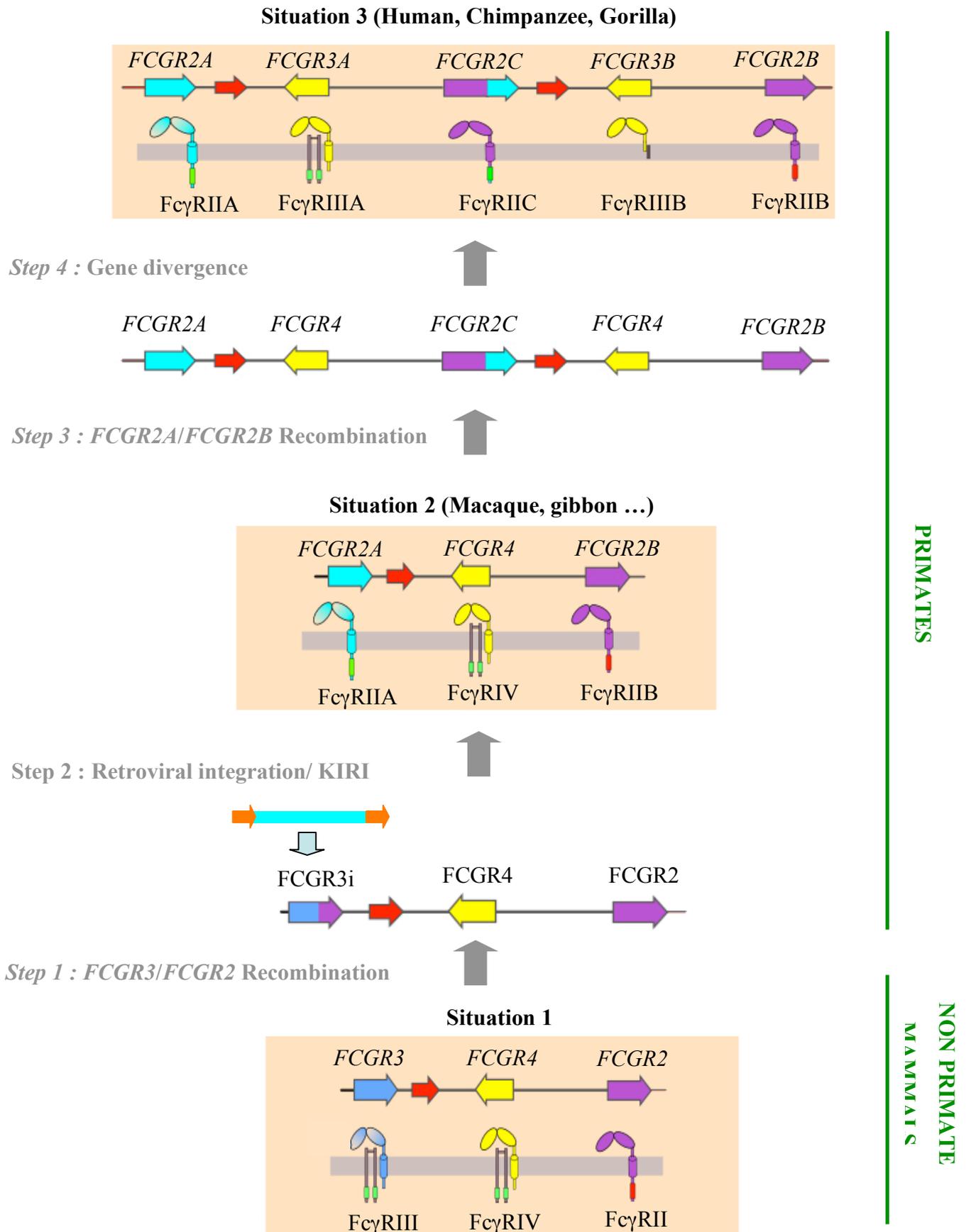


Figure 6



Supplementary Figures legends :**Supplementary Figure 1 : Duplication blocks of human *FCGR2/3* cluster.**

Dot matrix representation of duplicated segments. The two major repeated segments, containing part *FCGR2A* or *FCGR2B*, were affected at vertical and horizontal axis, respectively, before a 45° right hand rotation was applied at obtained matrix.

Supplementary Figure 2 : Long-PCR approach used for the screening of *FCGR2C*.

2aMfHse2-S and 2aMfHse7-AS were designed to specifically amplify *FCGR2A* whatever the primate species whereas 2bMfHse2-S and 2bMfHse6-AS were designed to amplify *FCGR2B*. Due to its chimeric structure between *FCGR2A* and *FCGR2B*, 2bMfHse2-S and 2aMfHse7-AS were used to specifically amplified *FCGR2C*. Homologous regions were indicated by background which color indicated origin of the homology.

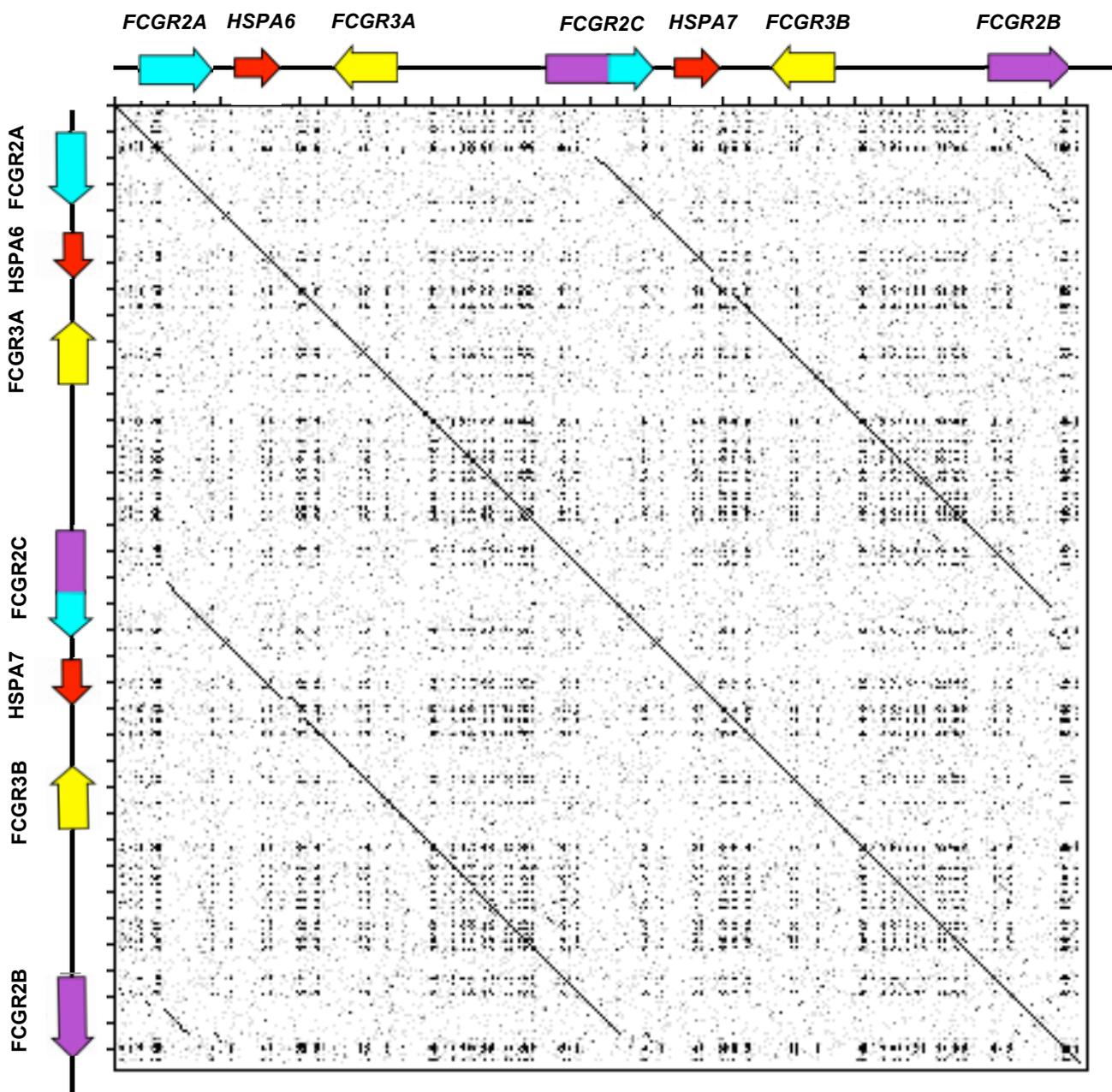
Supplementary Figure 3 : PCR screening of *FCGR2C* in gorilla and in orang-utan.

Through our long PCR approach we have amplified *FCGR2A* (1), *FCGR2B* (2) and *FCGR2C* (3) in two additionnal gorillas (A and B) whereas we have only amplified *FCGR2A* (1) and *FCGR2B* (2) in two additionnal orangutans (C and D).

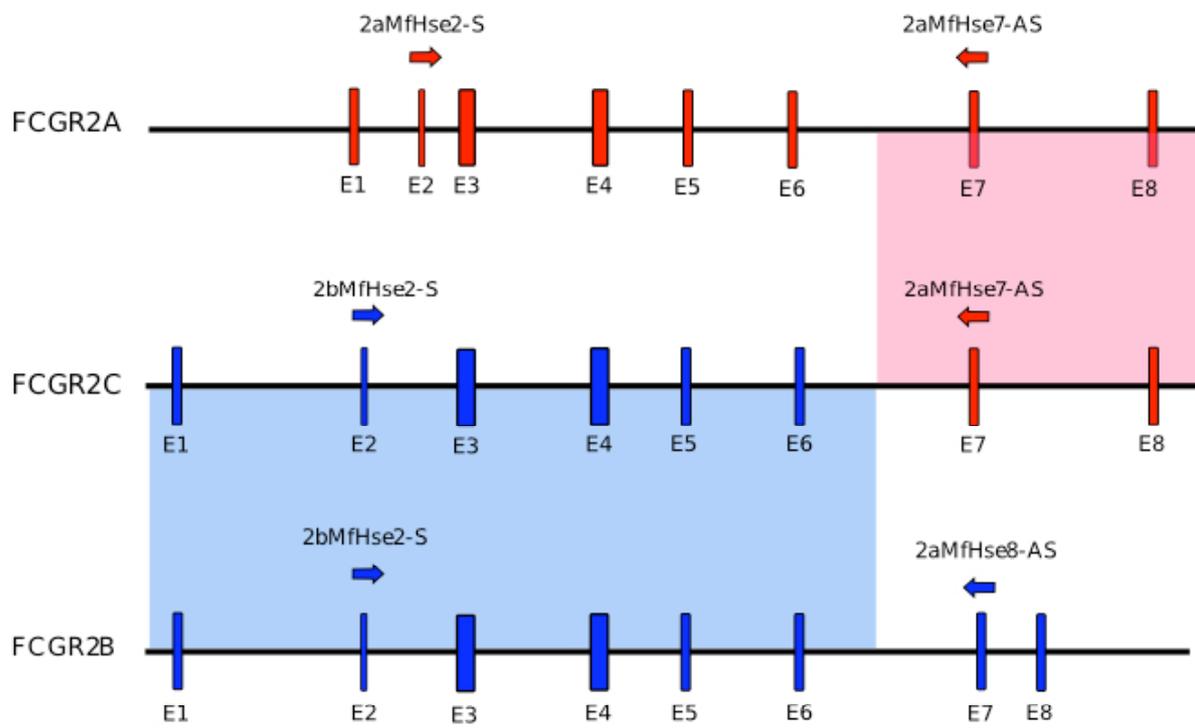
Supplementary Figure 4: Copy number variation of *FCGR2C* and *FCGR3B*.

The plasticity of the human *FCGR2/3* cluster, based on the instability generated by its segmental duplication which now favors further homologous recombination events between two closer related region, giving rise to haplotypes containing a variable number of b modules (from 1 to at least 3).

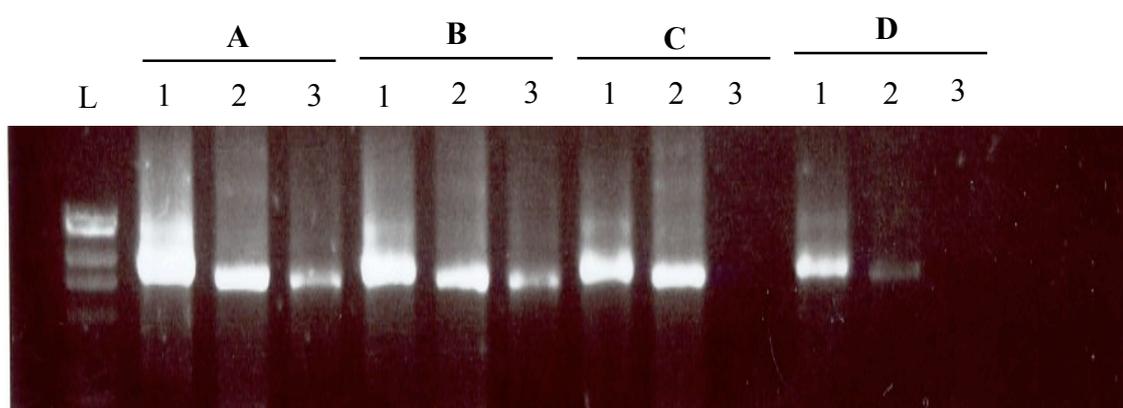
Supplementary Figure 1



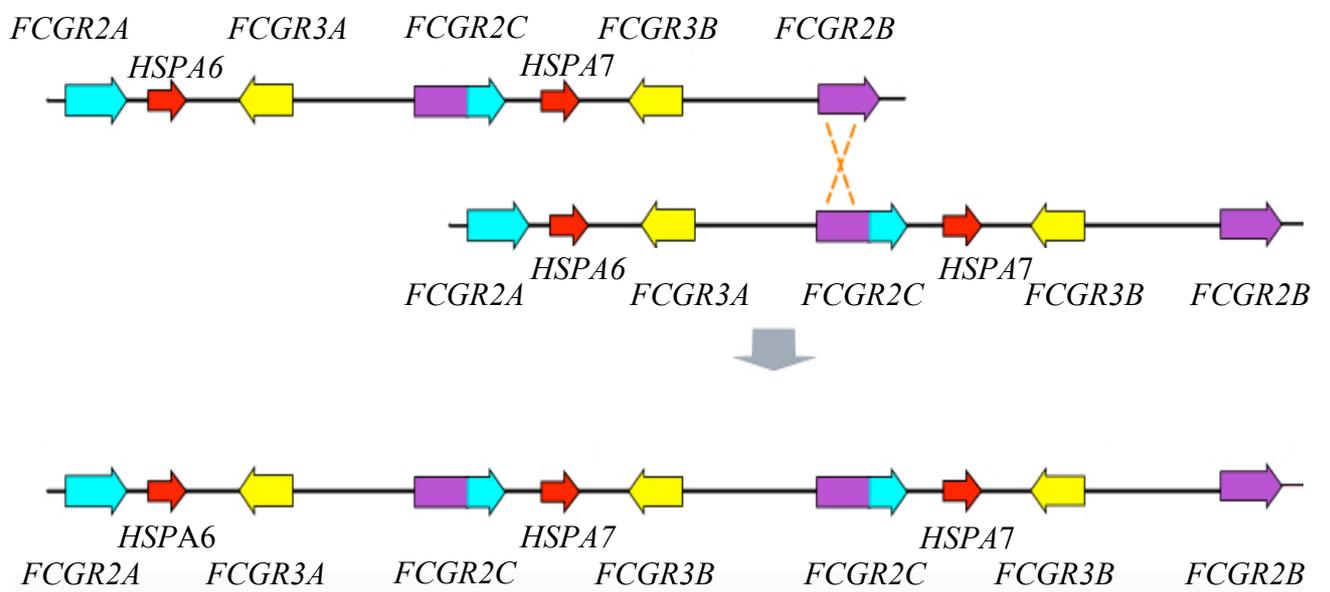
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



Supplementary Table legends

Supplementary Table 1 : Primers used for sequencing of *FCGR2A*, *FCGR2B* and *FCGR2C*.

Supplementary Table 2 : Homology between retroelement found in *FCGR2A* and retroelement from RepeatMasker database.

Supplementary Table 1

Sequencing of exon 3 (extra-cellular domain 1)					
Name	Sequence 5'-3'	Gene			Species
		FCGR2A	FCGR2B	FCGR2C	
2aMfHse2-S	CTTCTGCAGACACACAGTCAAGCTG	✓			1,2,3,4,5,6
2b-EC1-S	CTTCAGTTGCAGAACCATTC		✓	✓	1,2,3,4,5,6
EC1-MfHs-AS	CTCTTTCCTGCAAACCTCTG	✓	✓	✓	1,2,3,4,5,6
Sequencing of exon 4 (extra-cellular domain 2)					
EC2-2aMfHs-S	TTCTGTGAGTAATGTACCTG	✓			1,2,3,4,5,6
EC2-2bMfHs-S	TGTCACCAGTAAGGAAG		✓	✓	1,2,3,4,5,6
EC2-2a2b-AS	CAAAGTGAAACAACAGCCTG	✓	✓	✓	1,2,3,4,5,6
Sequencing of exon 5 (transmembrane domain)					
2abc-HsMf-int4-S	GAGGCACAAGTCCAG	✓	✓	✓	1,2,3,4,6
gib-2B-int4-S	GAGGCATAAGTGCAG		✓		5
2abc-HsMf-int5-AS	CTCTTTCATCCCCATGGC	✓	✓	✓	1,2,3,4,5,6
Sequencing of exon 6 (intra-cellular domain 1)					
2abc-HsMf-int5-S	GTCCTGAGGACTCAG	✓	✓	✓	1,2,3,6
OR-int5-S	GTCCTGAGTTCTCAG	✓	✓	✓	4
Gib-2A-int5-S	GTCCCGAGGACTCAG	✓			5
Gib-2B-int5-S	GATTCTGACGACTCAG		✓		5
2abc-HsMf-int6-AS	TCTTCTCATCTCCAG	✓	✓	✓	1,2,3,4,5,6
Sequencing of intron 6					
2a2b-extS	GTGCAGGGAAATGGGAGAG	✓	✓	✓	1,2,3,4,5,6
2a2bextAS	CAGAGTAGAGCCCCTAGTG	✓	✓	✓	1,2,3,4
2a2bextAS (2)	GCTGAGCTTTCCTAGAAGC	✓	✓	✓	1,2,3,4,5,6
Gib-2A-extAS	CAGAGTAGGGCCCCTAGTG	✓			5
Ma/Gi-2bExtAS	CTACAGTCTGGAGTTGC		✓		5,6

Supplementary Table 2

Position in genomic sequence of FCGR2A		Notation	% of divergence	% of deletion	% of insertion
begin	end				
8591	9055	MER57F	26.9	1.7	8.7
9059	9255	MER57A-int	25.7	2.0	3.1
10062	10328	MER57A-int	29.5	9.0	2.1
10342	10650	MER31-int	21.2	9.7	5.6
10774	10845	MER31-int	19.4	0.0	0.0
10842	11115	MER31-int	17.9	3.6	7.4
11150	11140	MER1-int	25.6	7.8	9.6
11771	11863	MER34-int	30.1	2.1	0.0
12407	12580	MER31-int	27.5	3.5	1.7
12800	12911	MER57F	22.5	5.4	0.8

References

- Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J *et al.*
Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans. *Nature*. 2006 ; 439(7078) : 851-5.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.
Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 ;215(3):403-10.
- Baltimore D.
Gene conversion: some implications for immunoglobulin genes. *Cell*. 1981 Jun;24(3):592-4.
- Chuang FY, Sassaroli M, Unkeless JC.
Convergence of Fc gamma receptor IIA and Fc gamma receptor IIIB signaling pathways in human neutrophils. *J Immunol*. 2000 ;164(1):350-60.
- Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV.
Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000 ;6(4):443-6.
- Coggeshall KM.
Inhibitory signaling by B cell Fc gamma RIIb. *Curr Opin Immunol*. 1999 ; 10(3) : 306-12.
- Dai X, Jayapal M, Tay HK, Reghunathan R, Lin G, Too CT, Lim YT *et al.*
Differential signal transduction, membrane trafficking, and immune effector functions mediated by FcgammaRI versus FcgammaRIIa. *Blood*. 2009 ;114(2):318-27.
- Deragon JM, Capy P.
Impact of transposable elements on the human genome. *Ann Med*. 2000 ;32(4):264-73.
- Feuk L, Marshall CR, Wintle RF, Scherer SW.
Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet*. 2006 ; 15 Spec No 1 : R57-66.
- Fromont P, Bettaieb A, Skouri H, Floch C, Poulet E, Duedari N, Bierling P.
Frequency of the polymorphonuclear neutrophil Fc gamma receptor III deficiency in the French population and its involvement in the development of neonatal alloimmune neutropenia. *Blood*. 1992 ; 79(8) : 2131-4.
- Isashi Y, Yamashita T, Nagasawa S, Murakami M, Uede T.
Molecular cloning and characterization of guinea pig Fc gamma RIII: expression but not function is independent of the gamma chain of Fc epsilon RI. *Int Immunol*. 1996 ;8(9):1335-46.
- Lee AS, Gutiérrez-Arcelus M, Perry GH, Vallender EJ, Johnson WE, Miller GM *et al.*
Analysis of copy number variation in the rhesus macaque genome identifies candidate loci for evolutionary and human disease studies. *Hum Mol Genet*. 2008 15;17(8):1127-36.

Li M, Wirthmueller U, Ravetch JV.

Reconstitution of human Fc gamma RIII cell type specificity in transgenic mice. *J Exp Med.* 1996 ;183(3):1259-63.

Lindsay SJ, Khajavi M, Lupski JR, Hurles ME.

A chromosomal rearrangement hotspot can be identified from population genetic variation and is coincident with a hotspot for allelic recombination. *Am J Hum Genet.* 2006 ;79(5):890-902.

Lorenc A, Makałowski W.

Transposable elements and vertebrate protein diversity. *Genetica.* 2003 ; 118(2-3) : 183-91.

Lupski JR.

Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet.* 1998 ; 14(10) : 417-22.

Maydt J, Lengauer T.

Recco: recombination analysis using cost optimization.

Bioinformatics. 2006 1;22(9):1064-71.

Inoue K, Lupski JR.

Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002 ; 3:199-242.

Hurles ME, Willey D, Matthews L, Hussain SS.

Origins of chromosomal rearrangement hotspots in the human genome: evidence from the AZFa deletion hotspots. *Genome Biol.* 2004;5(8):R55.

Mechetina LV, Najakshin AM, Alabyev BY, Chikaev NA, Taranin AV.

Identification of CD16-2, a novel mouse receptor homologous to CD16/Fc gamma RIII. *Immunogenetics.* 2002 ;54(7):463-8.

Mitchell MA, Huang MM, Chien P, Indik ZK, Pan XQ, Schreiber AD.

Substitutions and deletions in the cytoplasmic domain of the phagocytic receptor Fc gamma RIIA: effect on receptor tyrosine phosphorylation and phagocytosis. *Blood.* 1994 ; 84(6) : 1753-9.

Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV.

FcgammaRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity.

Immunity. 2005 ;23(1):41-51.

Nimmerjahn F.

Activating and inhibitory FcgammaRs in autoimmune disorders. *Springer Semin Immunopathol* 2006 ; 28(4) : 305-19.

Nimmerjahn F, Ravetch JV.

Fcgamma receptors: old friends and new family members. *Immunity* 2006 ; 24(1) : 19-28.

Papadakis MN, Patrinos GP.

Contribution of gene conversion in the evolution of the human beta-like globin gene family. *Hum Genet.* 1999 Feb;104(2):117-25.

Perry GH, Yang F, Marques-Bonet T, Murphy C, Fitzgerald T, Lee AS, Hyland C *et al.*

Copy number variation and evolution in humans and chimpanzees. *Genome Res.* 2008 ; 18 (11):1698-710.

Powell MS, Barnes NC, Bradford TM, Musgrave IF *et al.*

Alteration of the Fc gamma RIIa dimer interface affects receptor signaling but not ligand binding. *J Immunol.* 2006 ; 176(12) : 7489-94.

Reilly AF, Surrey S, Rappaport EF, Schwartz E, McKenzie SE.

Variation in human FCGR2C gene copy number. *Immunogenetics.* 1994 ; 40(6) : 456.

Ravetch JV, Perussia B.

Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med.* 1989 ;170(2):481-97.

Ravetch JV, Kinet JP.

Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:457-92.

Rogers KA, Scinicariello F, Attanasio R.

IgG Fc receptor III homologues in nonhuman primate species: genetic characterization and ligand interactions. *J Immunol.* 2006 ;177(6):3848-56.

Smit, AFA, Hubley, R & Green, P.

RepeatMasker Open-3.0.

1996-2004 <<http://www.repeatmasker.org>>.

Sharp AJ, Cheng Z, Eichler EE.

Structural variation of the human genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006 ; 7 : 407-42.

Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV.

Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice.

Nature. 1996 ;379(6563):346-9.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ.

CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.

Nucleic Acids Res. 1994 ;22(22):4673-80.

Van den Herik-Oudijk IE, Ter Bekke MW, Tempelman MJ, Capel PJ *et al.*

Functional differences between two Fc receptor ITAM signaling motifs.

Blood. 1995 ; 86(9):3302-7.

Warmerdam PA, Nabben NM, van de Graaf SA, van de Winkel JG, Capel PJ.

The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIC gene is a result of an unequal crossover event. *J Biol Chem* 1993 ; 268(10) : 7346-9.

C. Résultats complémentaires de l'article N°1

Grâce aux séquences nucléotidiques de différents primates obtenues lors de notre travail sur l'évolution du cluster codant les récepteurs FcγRs, nous avons pu déduire et analyser les séquences en acide aminés notamment au niveau de ceux qui interviennent dans la fixation aux IgG. Pour cela, nous avons procédé à un alignement des différentes séquences en acides aminés puis avons analysé les divergences affectant les résidus du domaine immunoglobulinique proximal qui interviennent dans l'interaction avec les IgG .

L'analyse des séquences du domaine immunoglobulinique de FcγRIIA nous a ainsi permis de mettre en évidence que le gorille et le chimpanzé possèdent 100% des résidus identiques à ceux de l'homme et que les autres espèces, notamment le macaque, présentent des divergences notamment au niveau des zones d'interaction avec les IgG. L'analyse de la position 131 a révélé qu'une histidine est retrouvée chez la plupart des espèces, excepté chez l'orang outang et le gibbon qui présentent respectivement une tyrosine (Y) ou une arginine (Figure 28A).

Par rapport à ce qui a été observé pour FcγRIIA, l'analyse des séquences de FcγRIIB révéla un nombre moins important de divergences. Au sein des primates, le macaque est là aussi l'espèce présentant le plus de divergence par rapport au FcγRIIB humain et l'on peut notamment y voir que les résidus valine (V) et histidine (H) en position 116 et 131 sont remplacés respectivement par une isoleucine (I) et une arginine (R). Chez l'homme, le chimpanzé et le gorille il convient de noter que les séquences de FcγRIIB et FcγRIIC sont parfaitement identiques, ce qui suggère une évolution concertée de ces récepteurs probablement par les mécanismes de conversion génique observés entre les gènes *FCGR2B* et *FCGR2C* (Figure 28B).

L'analyse des séquences de FcγRIIIA, FcγRIIIB et FcγRIV nous a permis de confirmer les divergences historiquement identifiés par notre équipe entre le FcγRIIIA humain et le FcγRIV de macaque et des divergences supplémentaires, affectant les autres espèces de

primates, ont été relevées. Nous avons aussi observé des divergences intra-espèces entre FcγRIIIA et FcγRIIIB au niveau des résidus 129 et 116 qui montrent que chez chaque espèce, ces deux récepteurs ont évolué de façon différente. Enfin, l'analyse de la position 158 a permis de retrouver un résidu valine (V) chez toutes les espèces sauf chez le macaque où l'on observe une isoleucine (I) et chez l'orang-outang chez qui on observe une leucine (L) (Figure 28C).

Lors de cette analyse nous avons également intégré les séquences en acides aminés des FcγRII, FcγRIII et FcγRIV de souris et les alignements nous montrent un nombre important de divergences avec les récepteurs FcγRs de primates, en particulier au niveau des acides aminés intervenant dans la fixation des IgG.

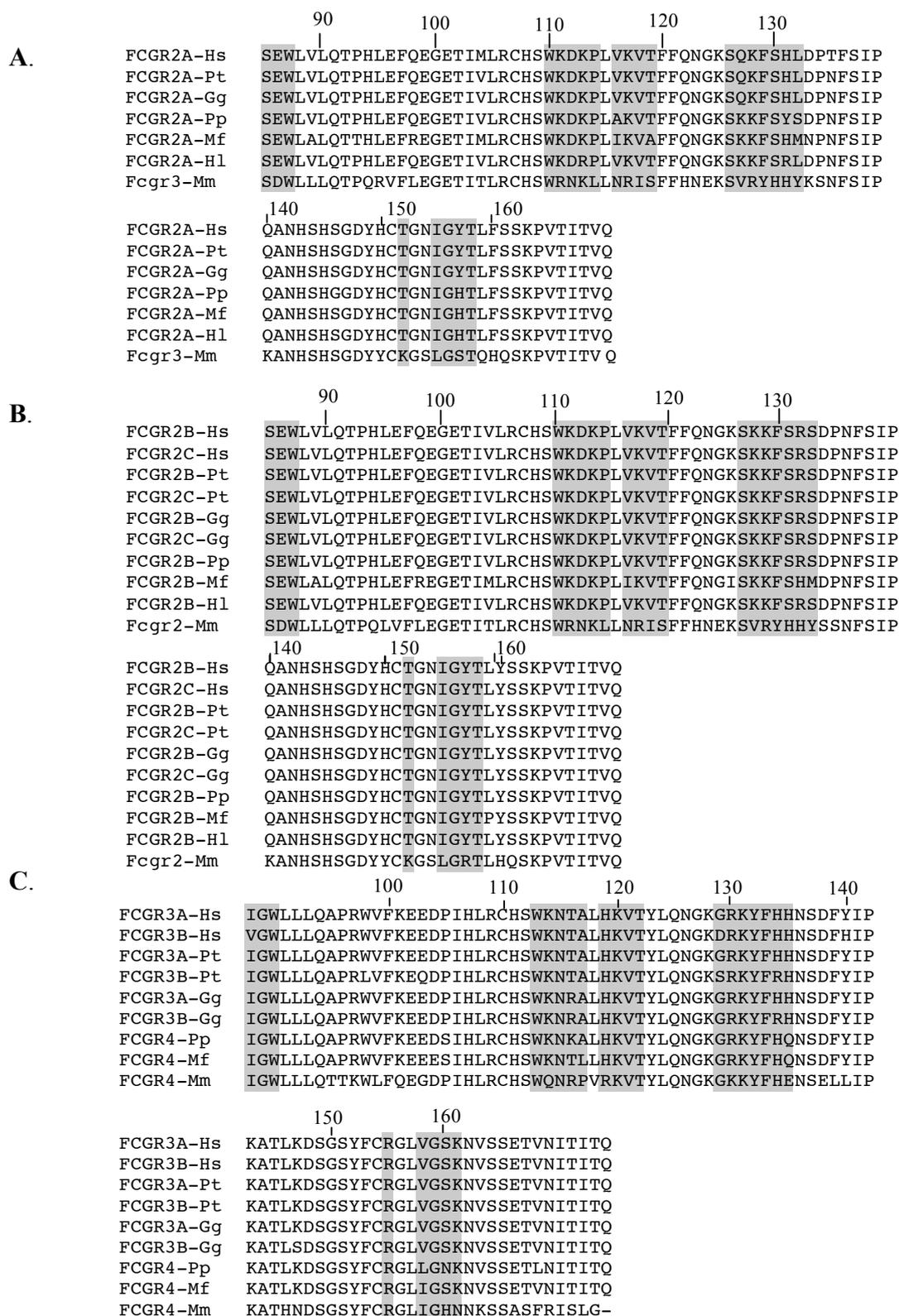


Figure 28 : Alignements des acides aminés du domaine immunoglobulinique proximal des récepteurs FcγRs de faible affinité.(A). Alignement des acides aminés du récepteur FcγRIIA (B). Alignement des acides aminés du récepteur FcγRIIB et FcγRIIC (C). Alignement des acides aminés du récepteur FcγRIIA, FcγRIIB et FcγRIV. Hs (*Homo sapiens*) ; Pt (*Pan troglodytes*) ; Gg (*Gorilla gorilla*) ; Pp (*Pongo pygmaeus*) ; Mf (*Macaca fascicularis*) ; Mm (*Mus musculus*). Les zones grisées représentent les acides aminés intervenant dans la fixation de la portion Fc des IgG.

D. Discussion

Lors de cette première partie nous avons montré qu'au cours de l'évolution, les gènes codant les FcγRs de faible affinité se sont diversifiés avec notamment l'acquisition de gènes supplémentaires codant des récepteurs aux propriétés particulières.

Chez la souris et chez la plupart des mammifères, le système des FcγRs est composé de deux récepteurs activateurs associés à la chaîne de transduction FcR-γ et d'un récepteur inhibiteur. Chez les primates, le système des FcγRs est différent avec l'apparition du récepteur FcγRIIA et de son motif ITAM-like. Les différences entre les motifs ITAM classiques et l'ITAM-like du récepteur humain FcγRIIA ont été caractérisées du point de vue de la transduction du signal (Dai *et al.*, 2009) mais aucune explication n'avait jamais été avancée pour expliquer l'origine de ce motif divergent. Grâce à une analyse détaillée, nous avons montré que le gène *FCGR2A* humain est caractérisé dans sa partie 3' par une forte homologie avec le gène *FCGR2B* et par la présence d'un rétrovirus endogène. Ce rétrovirus est en fait un rétrovirus composite et il contient l'exon codant le motif ITAM-like. Grâce à des recherches dans les banques de données nous avons trouvé des traces de ce rétrovirus, via ses LTR, chez de nombreux primates mais n'avons rien trouvé pour les autres mammifères. Ce motif de transduction ainsi que le récepteur FcγRIIA semble donc l'apanage des primates. Chez l'homme, le récepteur FcγRIIA est notamment exprimé à la surface des plaquettes et cette caractéristique semble le désigner comme l'élément responsable des épisodes thrombotiques observés chez l'homme après injection de l'anticorps anti-CD40 humanisé 5C8 (Kawai *et al.*, 2000). Aucune donnée concernant l'expression plaquettaire de ce récepteur chez les singes n'est disponible. Malgré tout, le fait que des macaques ayant reçu le 5C8 humanisé aient présenté des complications thrombotiques, suggère fortement chez cette espèce l'expression d'un FcγRIIA plaquettaire. Une étude de l'expression du récepteur FcγRIIA chez les primates non-humains permettrait de mieux appréhender la physiologie de ce récepteur chez ces espèces et de mieux prévoir la survenue de ce type d'événement indésirable.

L'analyse des gènes *FCGR* chez plusieurs espèces de mammifères nous a ensuite permis de mettre en évidence des différences en terme de nombre de gènes aboutissant à l'apparition d'un système à cinq FcγRs. Nous avons notamment montré la présence des gènes *FCGR2C* et *FCGR3B* uniquement chez l'homme, le gorille et le chimpanzé, ce qui suggèrent des différences en terme de fonctionnement du système immunitaire par rapport aux espèces ne présentant qu'un système à trois récepteurs FcγRs. En effet, des études ont montré chez l'homme que le récepteur FcγRIIB agit en coopération avec le FcγRIIA à la surface des neutrophiles (Kushner *et al.*, 1992) potentialisant l'action de ce dernier, alors que certains avancent l'idée d'un même type de coopération entre FcγRIIC et FcγRIIA à la surface des cellules NK (Ernst *et al.*, 2002). L'acquisition du récepteur FcγRIIB s'est également traduit par l'acquisition d'une expression sur les neutrophiles alors que chez le macaque l'expression de *FCGR4* est limitée aux cellules NK et aux macrophages. De plus, bien que son promoteur soit identique à celui du récepteur FcγRIIB, le récepteur FcγRIIC est exprimé chez l'homme à la surface des cellules NK (Metes *et al.*, 1998). Ces observations sous-entendent donc que des divergences ont eu lieu au niveau des promoteurs de ces différents gènes, leur permettant ainsi d'acquies de nouveaux profils d'expression.

L'ensemble des éléments que nous avons mis en évidence, laisse donc supposer une grande diversité dans le mode de fonctionnement des FcγRs et suggère donc de grandes différences concernant le système immunitaire des différentes espèces étudiées. Dans ce contexte, il est important de noter qu'au cours de l'évolution du cluster codant les FcγRs, aucun récepteur inhibiteur n'a été acquis et il n'est donc pas illogique que des mécanismes de régulation supplémentaires aient été développés. Cette complexité de la physiologie des FcγRs s'est trouvée dernièrement renforcée avec des travaux qui ont montré que des motifs ITAM pouvait avoir des propriétés inhibitrices. En effet, des études menées sur des macrophages de souris suggèrent que la signalisation passant par la molécule DAP12, qui contient deux motifs ITAM, pourrait inhiber la réponse inflammatoire de ces macrophages suite à la stimulation du TLR (Toll-like receptor) (Hamermam *et al.*, 2005). Ce phénomène pourrait être dû à un motif ITIM cryptique contenu dans le motif ITAM de la chaîne de signalisation de DAP12. De plus, l'activité inhibitrice des récepteurs activateurs à ITAM a été récemment illustrée par l'analyse de la transduction des signaux du récepteur FcαRI (récepteur membranaire pour les IgA) qui, comme le récepteur FcγRIIA, s'associe à la chaîne de transduction FcR-γ (van Egmond *et al.*, 1999). La fixation d'IgA agrégées entraîne une

agrégation du récepteur Fc α RI suivie d'une forte phosphorylation des tyrosines de l'ITAM ainsi qu'une activation des voies de transduction aboutissant au déclenchement d'une réponse pro-inflammatoires (Pasquier *et al.*, 2005). En revanche, la fixation d'IgA monomérique induit une faible phosphorylation des tyrosines du motif ITAM et conduit, comme dans le cas d'un motif ITIM, au recrutement de phosphatase et à l'inhibition. Le rôle présumé de ces motifs ITIM cryptiques et de ces motifs ITAM incomplètement phosphorylés serait d'éteindre la signalisation activatrice induite par les ITAM lorsque le niveau d'activation nécessaire n'est pas atteint et ceci afin d'éviter une activation cellulaire chronique (Barrow *et al.*, 2006).. Même si cela n'a pas été encore observé, il est tout a fait possible d'imaginer des phénomènes similaires pour le fonctionnement des Fc γ Rs, complexifiant d'avantage le mode de fonctionnement de ces récepteurs.

Lors de ce travail, nous avons amplifié, grâce à une approche de long-PCR, les gènes *FCGR2*, *FCGR3* et *FCGR4* chez différentes espèces de primates et nous avons ensuite séquencé ces produits d'amplification sur une partie des séquences codantes. L'ensemble des réactions de séquençage à été directement effectué sur les produits de PCR et cela nous apporté un certain nombre de désagréments notamment au niveau de la qualité des séquences obtenues. Il aurait donc été plus judicieux de cloner les produits de PCR dès le début de nos travaux, ce qui nous aurait facilité l'obtention des séquences et nous aurait également fait gagné du temps. Avec les séquences obtenues, nous avons procédé à une analyse phylogénétique et nous avons été confronté à une typologie anormale de nos arbres du fait de la présence de mécanismes de conversion génique qui perturbaient les relations d'orthologie et de paralogie. Hors, dès le début de mes travaux, nous savions, au vu des séquences disponibles dans les banques de données, que les gènes que nous allions étudier était soumis à des phénomènes de conversion génique. En n'intégrant pas dans nos objectifs initiaux la détermination des régions génomiques soumises à de la conversion génique, nous avons donc sous-estimé ce phénomène. Pour chaque espèce de primate que nous avons étudié, tous les gènes sont en cours de clonage et ces constructions seront par la suite séquencées dans leur totalité afin de bénéficier d'assez d'information pour pouvoir établir les profils de conversion génique et mener a bien une nouvelle analyse phylogénétique. L'ensemble de ces problèmes rencontrés aurait peut être pu être évité avec plus d'expériences et de recul, voir par la mise en place d'une collaboration avec une équipe de recherche spécialisée dans cette problématique.

Enfin, lors de cette première partie, nous avons également montré que ce passage de trois à cinq gènes est le résultat d'une duplication segmentale, qui a été possible grâce aux fortes homologies existantes entre les gènes *FCGR2A* et *FCGR2B* et qu'elle a permis la formation du gène *FCGR2C*. Chez l'homme, les homologies entre les gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C* sont encore présentes et sont entretenues par des mécanismes de conversion génique qui permettent la survenue de nouveaux événements de recombinaison qui permettent de générer des variations du nombre de copies des gènes *FCGR2C* et *FCGR3B*. Des variations du nombre de copies de *FCGR3A* ont été également rapportées mais nous n'avons pas été en mesure d'en expliquer le mécanisme de formation. Ajouté aux polymorphismes de types SNPs, ces variations de nombre de copies constitue donc un niveau supplémentaire de variabilité inter-individuelle en terme de gènes *FCGR2/3*.

II. Etude du polymorphisme ORF/STOP et des variations de nombre de copies du gène *FCGR2C*

A. Introduction

Comme nous l'avons expliqué dans la partie précédente, le cluster *FCGR2/3* humain possède la particularité de pouvoir subir de nouveaux événements de recombinaison non-allélique homologue qui aboutissent à des variations de nombre de copies.

Lors de mon arrivée au laboratoire en 2006, seuls les gènes *FCGR2C* et *FCGR3B* avaient été rapportés comme présentant des variations de nombre de copies et aucune technique n'était décrite à l'époque pour les étudier. Dans ce contexte, mon objectif fut d'identifier une technique qui pourrait permettre d'évaluer le nombre de copies de ces gènes tout en analysant les variations nucléotidiques qu'ils comportent (ORF/STOP pour *FCGR2C* et NA1/NA2 pour *FCGR3B*). Après une étude approfondie de la littérature, j'ai identifié la technique de pyroséquencage comme étant une solution possible (Figure 29). Cette technique régulièrement, utilisée pour l'étude de polymorphismes de type SNPs (Fakhrai-Rad *et al.*, 2002), présente l'avantage d'être quantitative et des études ont rapportées son usage afin de déterminer le nombre de copies du gène *CYP2D6* (Söderbäck *et al.*, 2005) ou du gène *GSTM1* (Jansson *et al.*, 2003). En revanche, aucune approche utilisant cette technique n'avait jamais été développée afin d'étudier simultanément un polymorphisme et les variations de nombre de copies d'un même gène. Grâce au réseau structurant MabImpact (Improving activation of FcγRIIIA-expressing effector cells, pharmacogenetic-based optimisation of monoclonal antibody (Mab) therapy for cancer), nous avons pu avoir accès au pyroséquenceur du centre de cancérologie Paul Papin d'Angers et ainsi développer une approche pour la quantification de nos gènes d'intérêts. Pour pouvoir quantifier le nombre de gène de *FCGR2C*, nous avons choisi de co-amplifier celui-ci avec les gènes *FCGR2B* et *FCGR2A* et de se servir de ces derniers comme gènes de références. Dans le cas de *FCGR3B*, nous avons choisi de le co-amplifier et d'utiliser le gène *FCGR3A* comme gène de référence. Ces deux approches ont été développées en parallèle pendant ma thèse, mais malheureusement en 2008,

des travaux ont montré pour la première fois que le gène *FCGR3A* pouvait parfois présenter des variations de nombre de copies (Breunis *et al.*, 2008), ce qui a totalement invalidé mon approche pour l'étude des CNV de *FCGR3B*. J'ai par la suite tenté de développer une approche par PCR quantitative pour pouvoir estimer le nombre de gènes de *FCGR3B* mais les résultats obtenus ne se sont pas montrés satisfaisants à ce jour. Seules les données concernant le gène *FCGR2C* seront donc présentées dans ce chapitre.

Dans le contexte de la variabilité de réponse aux anticorps thérapeutiques, le gène *FCGR2C* qui code le récepteur FcγRIIC, apparaît comme un bon candidat potentiel pour influencer la réponse aux anticorps thérapeutiques. Ce gène, chimère des gènes *FCGR2A* et *FCGR2B* (Warmerdam *et al.*, 1993), se caractérise par la présence d'un polymorphisme allélique dans l'exon 3 (allèles *FCGR2C*ORF/ FCGR2C*STOP*) qui va conditionner l'expression d'un récepteur FcγRIIC fonctionnel à la surface cellulaire (Ernst *et al.*, 2002). Peu de données sont actuellement disponibles concernant la physiologie de ce récepteur mais il semblerait que, lorsqu'il est exprimé à la surface des lymphocytes NK (allèle ORF) il jouerait un rôle dans l'ADCC en synergie avec le récepteur FcγRIIIA (Morel *et al.*, 1999 ; Metes *et al.*, 2001). Les patients porteurs d'un ou de plusieurs allèles *FCGR2C*ORF*, co-exprimant FcγRIIC donc et FcγRIIIA à la surface de leurs lymphocytes NK, pourraient donc présenter une meilleure réponse clinique que les patients porteurs de l'allèle *FCGR2C*STOP*. Comme nous l'avons abordé quelques lignes plus haut, en plus de ce polymorphisme allélique, le gène *FCGR2C* est également soumis à des variations du nombre de copies (délétion/ duplication) (Breunis *et al.* 2009 ; Reilly *et al.*, 1994). L'évaluation de la variabilité inter-individuelle liée au gène *FCGR2C* impose donc de raisonner non seulement en terme d'allèles mais aussi en nombre de copies de ce gène. De plus, l'étude de *FCGR2C* s'avère d'autant plus délicate du fait qu'il est pour moitié identique à *FCGR2A* et pour moitié à *FCGR2B* et qu'aucune position ne permet de le distinguer de ces deux derniers. Dans cette seconde partie, nous présenterons donc l'approche par pyroséquencage qui a été développée afin d'étudier le polymorphisme ORF/STOP ainsi que le nombre de copies de *FCGR2C*.

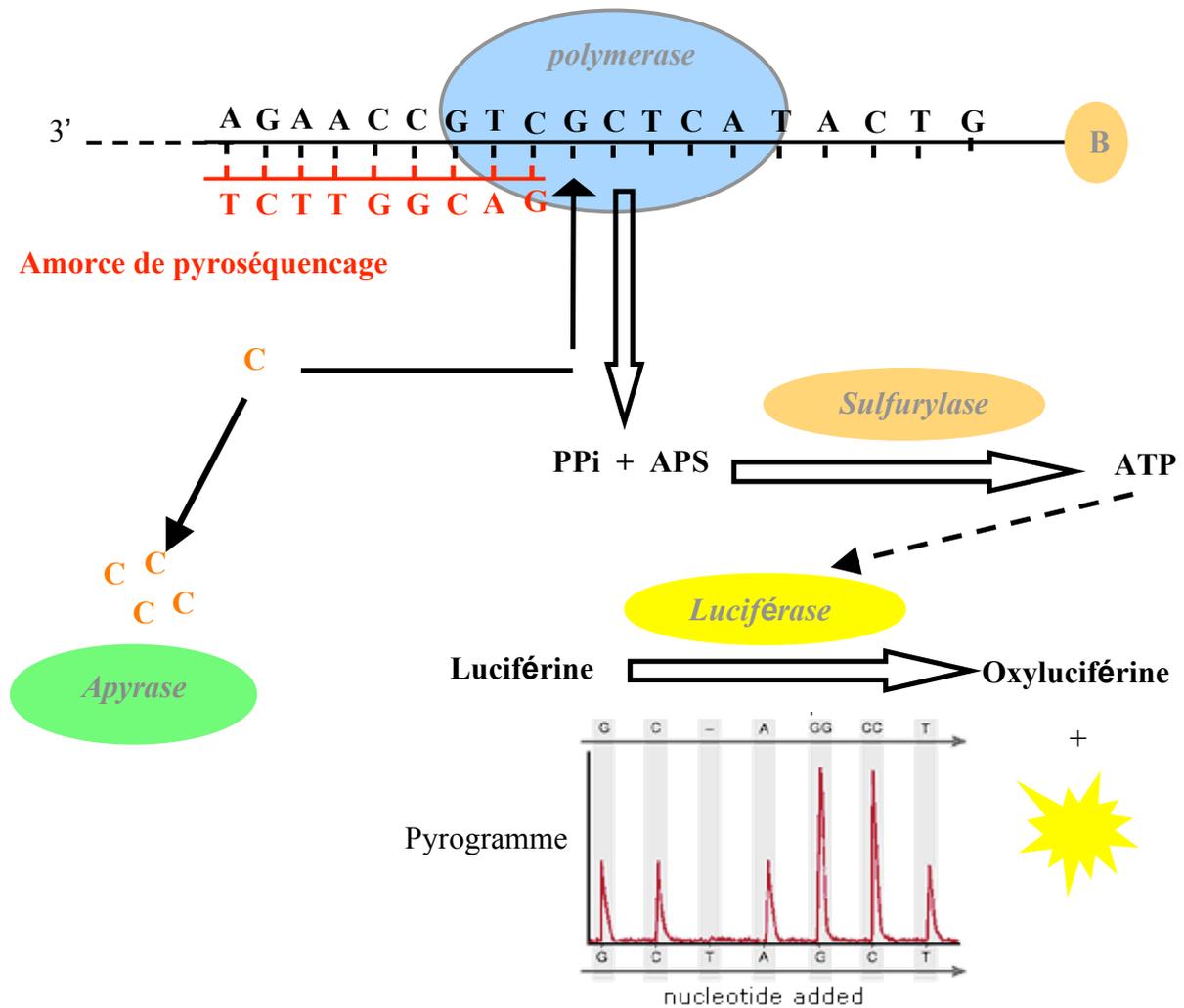


Figure 29 : Principe du pyroséquencage. Le pyroséquencage ou mini-séquencage luminométrique en temps réel, est un système fondé sur quatre réactions enzymatiques. **(A)**. Chaque nucléotide est distribué et testé individuellement pour son incorporation au niveau de l'ADN matrice par un réaction d'élongation effectuée par une polymérase. **(B)**. Chaque incorporation est accompagnée par la libération de phosphate inorganique qui sera converti en ATP par l'ATP sulfurylase en présence d'adénosine 5'-phosphosulfate (APS). **(C)**. L'ATP produit va permettre à la luciférase de convertir la luciférine en oxyluciférine tout en générant un signal lumineux dont l'intensité est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporé. **(D)**. Les nucléotides non-incorporés seront dégradés par l'apyrase permettant ainsi la ré-initialisation du système pour un nouveau cycle de pyroséquencage.

B. Matériels et méthodes

1. ADN utilisé

L'ensemble des ADN utilisés provient de donneurs de sang anonymes de l'Etablissement Français du Sang (EFS). Pour chaque donneur, 5 ml de sang ont été prélevés sur tube traité à l'EDTA (Vacuette®) puis l'ADN a été extrait grâce à l'utilisation d'un kit d'extraction (DNA extraction kit, Qiagen). Ces ADN ont ensuite été répertoriés dans les collections d'ADN de l'hôpital de Tours (Déclaration CHRU Tours DC-2008-308).

2. Amplification par PCR

Les amorces Biot-2abci2e3-S/ 2abce3-AS ont été utilisées (0,55 µL à 10 µM) dans un mélange réactionnel de 55 µL composé de : 40,4 µL d'eau, 5,5 µL de tampon 10X, 2,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 2,2 µL de dNTP (5 mM), 0,3 µL de Taq polymérase (Eurobio) et 2,75 µL d'ADN. Les conditions d'amplifications utilisées comportaient une étape de dénaturation initiale à 94°C pendant 5 minutes, suivie de 40 cycles comprenant chacun une dénaturation de 1 minute à 94°C, une étape d'hybridation de 30 secondes à 62°C et une étape d'élongation de 30 secondes à 72°C, et enfin une élongation finale de 5 minutes à 72°C. Les produits d'amplification obtenus d'une taille de 110 pb ont été ensuite déposés sur gel de polyacrylamide à 8 %, et soumis à une migration électrophorétique à 170 V pendant 30 minutes. La révélation de la migration a été effectuée sous lampe UV après avoir immergé le gel pendant 10 minutes dans une solution de bromure d'éthidium à 40 µg/mL.

3. Purification des produits de PCR

40 µL de produits de PCR ont été incubés avec 3 mL de billes de sépharose couplées à la streptavidine (Streptavidin Sepharose HP, Amersham Biosciences) et avec 37 mL de tampon de fixation (10 mM Tris-HCl pH 7,6 ; 2 M NaCl ; 1 mM EDTA ; 0,1 % Tween-20) puis mis à agiter pendant 5 minutes à température ambiante. Les billes sont ensuite remises en suspension en ajoutant 15 mL d'eau par aspiration/refoulement. L'ensemble est aspiré par le

hérisson du système de purification PyroMark Vacuum Prep workstation (Biotage), et incubé successivement pendant 5 secondes dans une solution d'éthanol 70%, une solution de dénaturation (0,2 M NaOH) et dans une solution de lavage (10 mM Tris-acetate pH 7,6 ; 4 mM acide acétique glacial). Le hérisson est ensuite trempé dans la plaque de pyroséquencage dans laquelle on a déposé au préalable 20 pmol d'amorce de pyroséquencage et 50 µL de tampon d'hybridation (20 mM Tris-acetate pH 7,6 ; 2 mM acétate de magnésium). La plaque est ensuite incubée à 80°C pendant 2 minutes puis mise à refroidir à température ambiante.

4. Pyroséquencage.

Les réactions de pyroséquencage ont été effectuées dans un pyroséquenceur PyroMark Q96 ID (Qiagen) localisé au centre Paul Papin d'Angers et sur un deuxième appareil localisé à la plateforme de biotechnologie moléculaire d'Angers. Dans les deux cas, les réactions ont été réalisées grâce à l'utilisation du kit « Pyro Gold Reagents PSQ 96 ». Les amorces de pyroséquencage ont été dessinées grâce au logiciel d'analyse VectorNTI (Invitrogen).

6. Analyses statistiques

L'association entre les divers allèles des polymorphismes d'intérêts à été testé par l'intermédiaire d'un test de CHI².

C. Résultats

1. Mise au point du pyroséquencage

1.1 Conception des amorces de PCR et de pyroséquencage

Lors de la mise au point du pyroséquencage, il nous a fallu porter une attention toute particulière à la conception de notre PCR d'amplification, ainsi qu'aux amorces de pyroséquencage. En effet, les réactions de pyroséquencage s'effectuant à 28°C, il est possible qu'à cette température les produits de PCR prennent des structures secondaires qui permettent à la polymérase d'initier des réactions d'élongation à l'origine de pics non spécifiques. De plus, les amorces de pyroséquencage peuvent également former des dimères et des structures secondaires de types « épingles à cheveux » qui peuvent également être à l'origine de pics non spécifiques.

Après avoir aligné les séquences des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C* au niveau de la région de l'exon 3 contenant le polymorphisme *FCGR2C**ORF/STOP, nous nous sommes aperçus qu'il existait un fort taux d'identité entre ces trois gènes. En effet, du fait de la nature chimérique du gène *FCGR2C*, il apparaît impossible de pouvoir distinguer celui-ci de *FCGR2B*, hormis sur la position responsable de la présence de l'allèle *FCGR2C**STOP (Figure 30). De plus, étant donné la nature du domaine protéique codé par cet exon (domaine immunoglobulinique distal), il existe un taux d'identité très élevé entre les gènes *FCGR2B*, *FCGR2C* et le gène *FCGR2A*. Nous avons profité de ce taux d'identité élevé et du fait que le gène *FCGR2A* et *FCGR2B* ne présentent pas de variation de nombre de copies, pour concevoir une PCR permettant de co-amplifier ces 3 gènes. Afin de disposer de plus de flexibilité, nous avons conçu plusieurs jeux d'amorces permettant la co-amplification de *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C* et avons ensuite testé les produits de PCR provenant de chacun. Pour cela, nous avons passé ces produits de PCR sur le pyroséquenceur en absence d'amorces de pyroséquencage et nous avons observé qu'un seul type de produit de PCR, provenant de l'utilisation des amorces Biot-2abc2e3-S/ 2abc3-AS, ne générerait pas de bruit de fond. Nous avons également conçu une amorce de pyroséquencage qui nous permet de

séquencer nos produits de PCR, d'étudier le nombre de copies du gène *FCGR2C* ainsi que le polymorphisme *FCGR2C**ORF/STOP. Là aussi, nous en avons testé plusieurs en étudiant le bruit de fond qu'elles pouvaient générer lors des réactions de pyroséquencage. Nous avons au final sélectionné une amorce nommée Pyro2-AS qui est située en aval du polymorphisme *FCGR2C**ORF/STOP et qui ne génère pas de pic non spécifique.

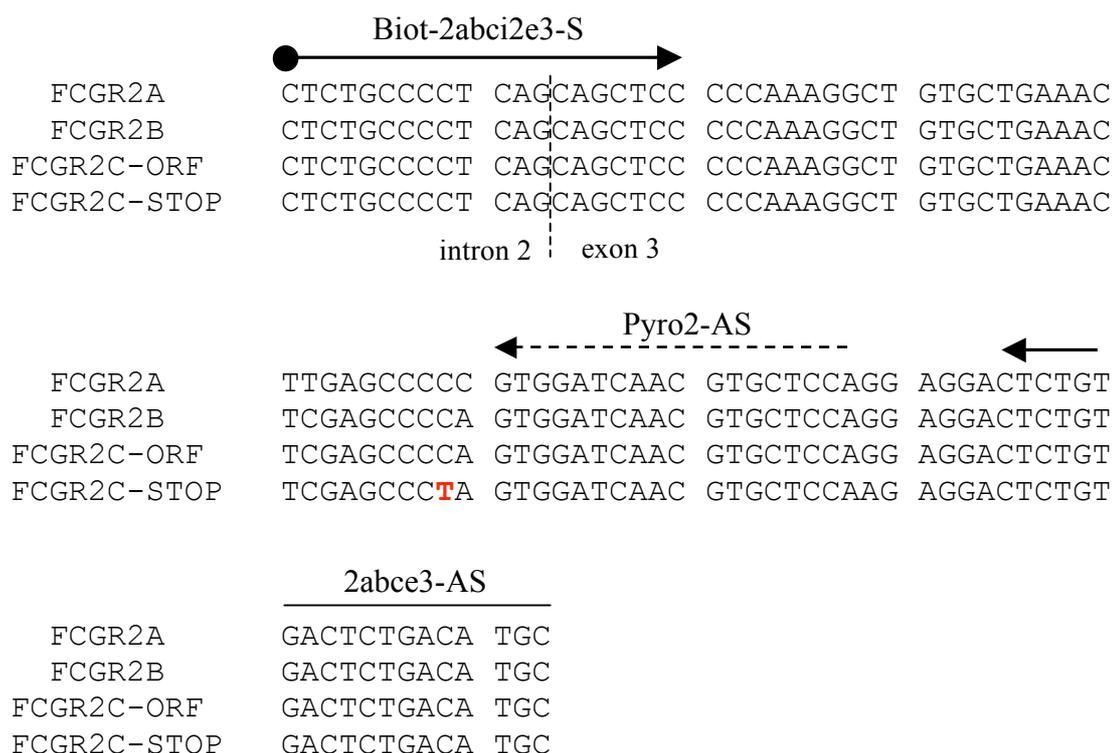


Figure 30 : Alignement des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C* au niveau de l'exon 3. L'amorce biotinylée Biot-2abci2e3-S et l'amorce 2abce3-AS ont permis la co-amplification par PCR des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C*. La purification des brins de PCR biotinylés puis l'hybridation de l'amorce pyro2-AS sur ces derniers a permis l'étude du nombre de copie de *FCGR2C* et du polymorphisme *FCGR2C**ORF/STOP (l'allèle *FCGR2C**STOP est représenté en rouge).

1.2 Test sur un échantillon de témoins

Nous avons ensuite décidé d'évaluer la pertinence de notre approche, en étudiant le génotype *FCGR2C* sur un panel d'ADN provenant de 30 témoins. Pour cela, il nous a fallu concevoir un ordre d'injection des nucléotides qui nous permet de générer des pics spécifiques et de calculer le nombre de copies de *FCGR2C* ainsi que la proportion d'allèle *FCGR2C*STOP*. Après une étude minutieuse de l'alignement *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C*, nous avons établi manuellement un ordre d'injection générant un pic spécifique de l'allèle *FCGR2C*STOP* (A1) et un pic spécifique de *FCGR2A* (G1) (Figure 31). Cet ordre d'injection démarre par l'injection d'un nucléotide G (G1) qui, par complémentarité de séquence, ne devrait être incorporé qu'au niveau des matrices d'ADN correspondant au gène *FCGR2A*. L'injection se poursuivra par l'injection d'un premier T (T1) qui ne devrait être incorporé qu'au niveau de *FCGR2B* et *FCGR2C* et qui sera proportionnelle au nombre de copies de *FCGR2C*. Ensuite, l'injection d'un nucléotide A, devrait générer un pic seulement si l'individu analysé est porteur de l'allèle STOP ; dans ce cas, la hauteur du pic généré devrait être proportionnelle au nombre de copies de *FCGR2C*STOP*. Etant donné que le nombre de gène *FCGR2A* nous pouvons en théorie avoir accès au nombre d'allèle STOP de chaque témoin en calculant le ratio A1/G1. De plus, le pic T1 devrait également permettre également de générer un pic commun aux gènes *FCGR2B* et *FCGR2C* qui, en comparaison avec le pic G1, devrait donner accès au nombre de copies du gène *FCGR2C*.

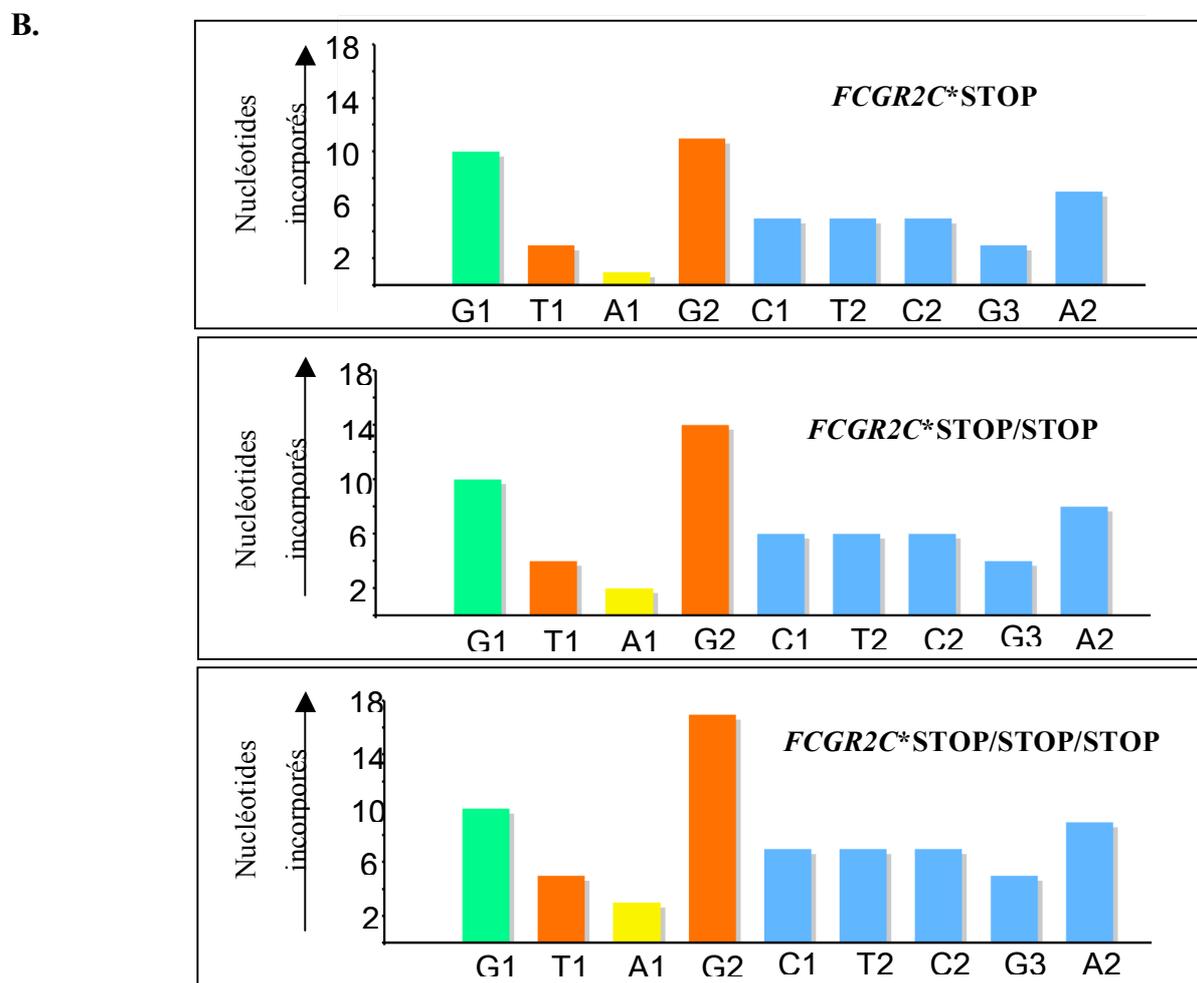
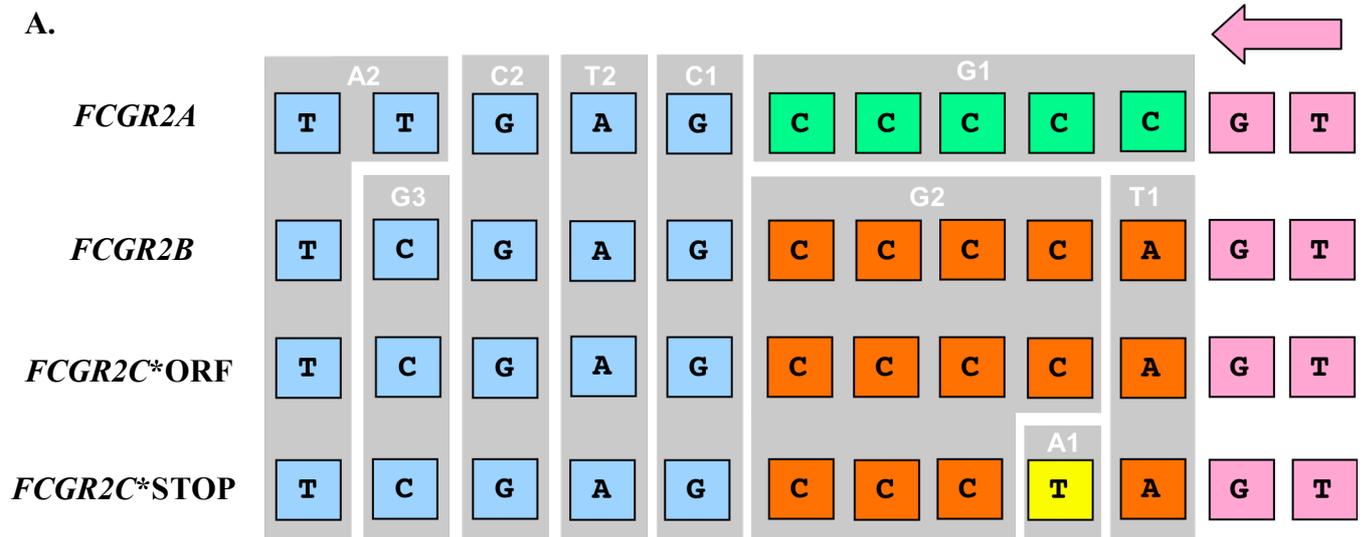


Figure 31 : Mise au point de l'ordre d'injection des nucléotides. (A). Alignement des séquences nucléotidiques des trois gènes analysés. Les nucléotides injectés sont représentés en gris avec en caractères blancs la nature de la base et son numéro d'injection selon la nomenclature de la partie B de la figure. Cet ordre permet de générer un pic spécifique de *FCGR2C*STOP* (en jaune), un pic spécifique de *FCGR2A* (en vert) et deux pics spécifiques des gènes *FCGR2B* et *FCGR2C* (en orange). Les nucléotides non-informatifs sont représentés en bleu. La portion de séquence en rose représente la localisation de l'amorce de pyroséquençage pyro2-AS (B). Ordre d'injection des nucléotides et représentation schématique des pyrogrammes attendus avec différents génotypes.

Cet ordre d'injection des nucléotides a donc été testé sur notre échantillon de témoins, et nous avons observé que les ratios A1/G1 ne se répartissaient pas de manière uniforme et continue mais qu'ils se répartissaient en trois groupes distincts (Figure 32A). Cette observation nous suggérait que ces différents ratios observés correspondent potentiellement à des différences en terme de nombre d'allèle *FCGR2C*STOP*, ce que nous attendions. De plus, la valeur moyenne de ces trois groupes de ratio, on s'aperçoit qu'elles sont très proches des valeurs théoriques que l'on s'attendait à trouver pour 0, 1 et 2 copies de l'allèle *FCGR2C*STOP*. Le calcul des ratios T1/G1 puis l'étude de leur dispersion (Figure 32B) nous permet aussi de voir apparaître trois groupes, autour des valeurs théoriques correspondant respectivement à 1, 2 et 3 copies de *FCGR2C*. Enfin, pour finaliser cette première analyse, nous avons décidé de reporter sur un même graphique le ratio T1/G1 en fonction du ratio A1/G1. Sur ce même graphique, nous avons également reporté les valeurs théoriques de chaque ratio et nous avons observé que les nuages de points se répartissaient de façon assez précise autour des intersections des valeurs théoriques (Figure 32C). Selon toute vraisemblance, il semblait donc à la suite de cette première analyse que la plupart des individus de l'échantillon étaient de génotype *FCGR2C*STOP/STOP*, que 3 individus pouvaient être porteurs d'une seule duplication de *FCGR2C* (3 copies de *FCGR2C*) tout en restant homozygotes pour l'allèle *FCGR2C*STOP*, et qu'un individu ne présentait qu'une copie de *FCGR2C*, de génotype *FCGR2C*ORF*.

D'après ces premiers résultats, la variabilité observée au niveau des ratios T1/G1 et A1/G1 pourrait être le reflet d'une variation du nombre de copie de *FCGR2C* et du nombre d'allèle *FCGR2C*STOP*. Pour confirmer cela et pour pouvoir valider cette approche, nous avons cherché à optimiser notre technique de pyroséquencage, puis nous avons étudié un échantillon de 190 individus.

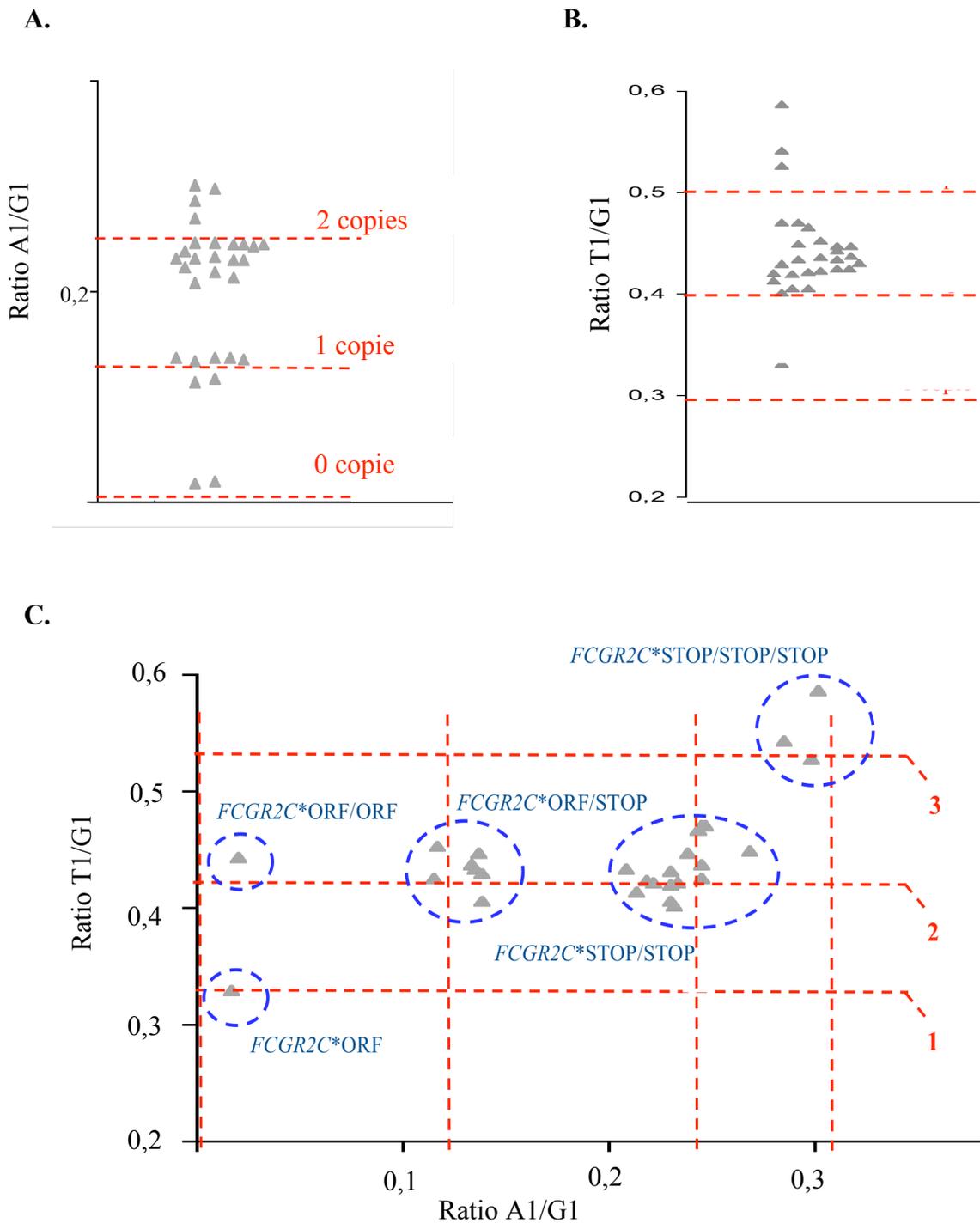


Figure 32 : Détermination du nombre de copies de *FCGR2C* et du nombre d'allèle *FCGR2C*STOP* sur un échantillons de 30 témoins. (A). Estimation du nombre de copies de *FCGR2C*STOP* grâce au ratio A1/G1. **(B).** Estimation du nombre de copies de *FCGR2C* grâce au ratio T1/G1. **(C).** Corrélation entre le nombre de copies de *FCGR2C* (T1/G1) et le nombre de copies de l'allèle *FCGR2C*STOP* (A1/G1).

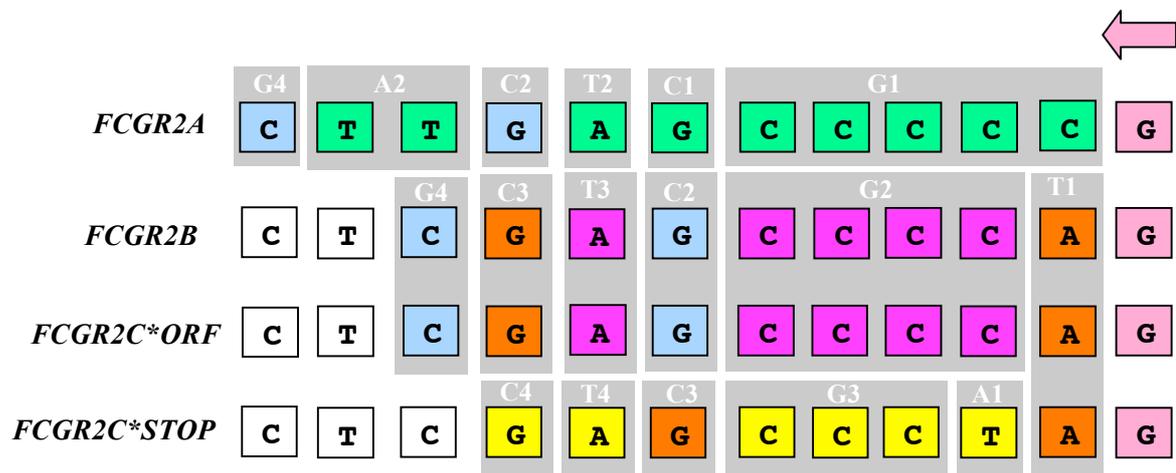
2. Optimisation du pyroséquencage

2.1 Optimisation de l'ordre d'injection des nucléotides

Comme nous l'avons vu précédemment, notre région d'intérêt ne présente qu'une divergence permettant de générer un pic spécifique de *FCGR2A* et seule une base permet de différencier l'allèle *FCGR2C*-ORF de l'allèle *FCGR2C*-STOP (Figure 30). Dans le but de maximiser le nombre de pics spécifiques, notre ingénieur informaticien a conçu un programme en langage PERL (*Practical Extraction and Report Language*) permettant d'optimiser la distribution des bases (Piégu *et al.*, non publié). Brièvement, un alignement, comprenant chacune des séquences cibles et la position du début du pyroséquencage, a été effectué. A partir cet alignement, le programme a exploré tout l'arbre des solutions d'ordre d'injection des nucléotides. Pour chaque ordre, un score a été attribué en fonction du nombre de fois ou un signal spécifique de chaque séquence était détecté. Le score des solutions pour lesquelles aucun signal spécifique d'une séquence cible ne pouvait être observé a été lourdement pénalisé. La solution présentant le meilleur score, et ainsi le plus de pics spécifiques, a été retenue et utilisée dans notre nouvelle approche.

Notre programme a donc déterminé un ordre d'injection permettant de créer un décalage au niveau de l'incorporation des nucléotides au niveau des différentes matrices des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C*. Grâce à cette approche, nous avons ainsi pu obtenir différents types de pics (Figure 33) : 4 pics spécifiques de *FCGR2A* (G1, C1, T2, A2) qui nous serviront de référence étant donné que le gène *FCGR2A* ne varie pas en nombre de copies ; 4 pics (A1, G3, T4, C4,) qui nous permettront d'estimer le nombre d'allèles *FCGR2C*-STOP ; 2 pics (G2, T3) permettant d'estimer le nombre d'allèles *FCGR2C*-ORF ; 2 pics (T1, C3) permettant d'estimer le nombre de copies du gène *FCGR2C*.

A.



B.

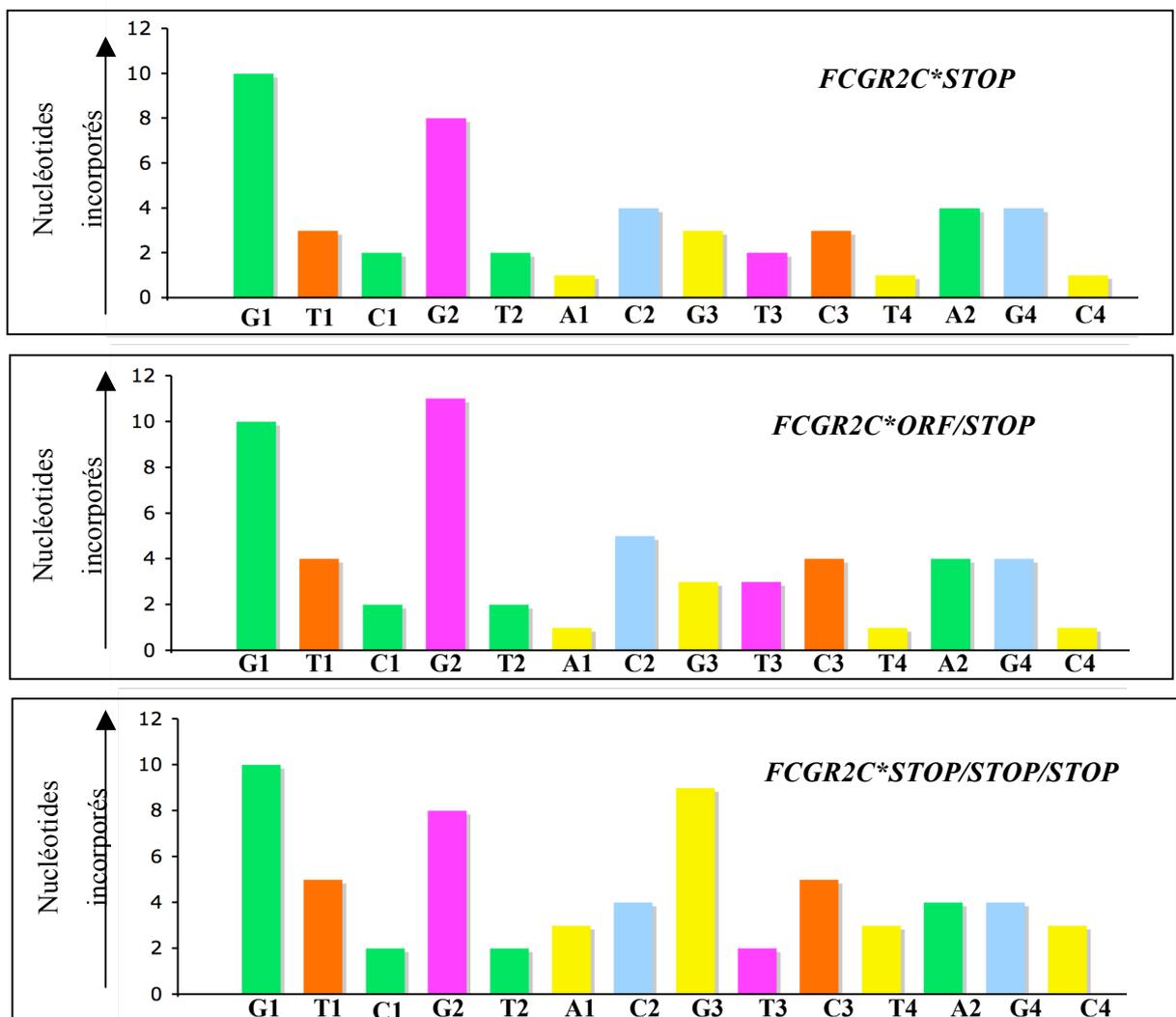


Figure 33 : Ordre d'injection des nucléotides permettant de maximiser le nombre de pics spécifiques. (A). Alignement des séquences nucléotidiques des trois gènes analysés. Les nucléotides injectés sont représentés en gris avec en caractères blancs la nature de la base et son numéro d'injection selon la nomenclature de la partie B de la figure. Cet ordre permet de générer 1 pic spécifique de *FCGR2C*STOP* (en jaune), 1 pic spécifique de *FCGR2A* (en vert), 2 pics spécifiques de *FCGR2B* et *FCGR2C*ORF* et 2 pics spécifiques des gènes *FCGR2B* et *FCGR2C* (en orange). Les nucléotides non-informatifs sont représentés en bleu. **(B).** Ordre d'injection des nucléotides et représentation schématique des pyrogrammes attendus avec différents génotypes.

2.2 Effet de la température d'hybridation sur la co-amplification des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C*

L'effet de la température d'hybridation des amorces de PCR sur la co-amplification des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C* a été évalué par un gradient de températures comprises entre 50 et 65°C. Afin de ne pas être influencé par les variations de nombre de copies de *FCGR2C* et par les différentes proportions d'allèles *FCGR2C*-ORF/STOP, nous avons utilisé pour ces mises au point un mélange de 10 échantillons d'ADN génomique. Au vu des différentes fréquences génotypiques de *FCGR2C*, nous avons ainsi pu avoir à disposition un échantillon d'ADN correspondant en théorie à deux copies du gène *FCGR2C* et deux copies de l'allèle *FCGR2C*-STOP. Nous avons donc comparé pour chaque température, la hauteur d'un pic spécifique de *FCGR2A* (T2), la hauteur d'un pic commun à *FCGR2B* et *FCGR2C**ORF (T3) et la hauteur d'un pic spécifique de *FCGR2C**STOP (T4) (Figure 33). Pour pouvoir comparer de façon équivalente ces deux hauteurs de pics, nous les avons normalisés par rapport à la hauteur attendue pour l'incorporation d'un seul nucléotide. Les différences observées entre les différentes hauteurs de pics indiquent clairement que le gène *FCGR2A* est moins bien amplifié que les gènes *FCGR2B* et *FCGR2C*, quelle que soit la température (Figure 34). De plus, en comparant les hauteurs des pics T3 et T4, on s'aperçoit que les gènes *FCGR2C* et *FCGR2B* sont amplifiés globalement de la même façon, indépendamment du polymorphisme *FCGR2C**ORF/STOP.

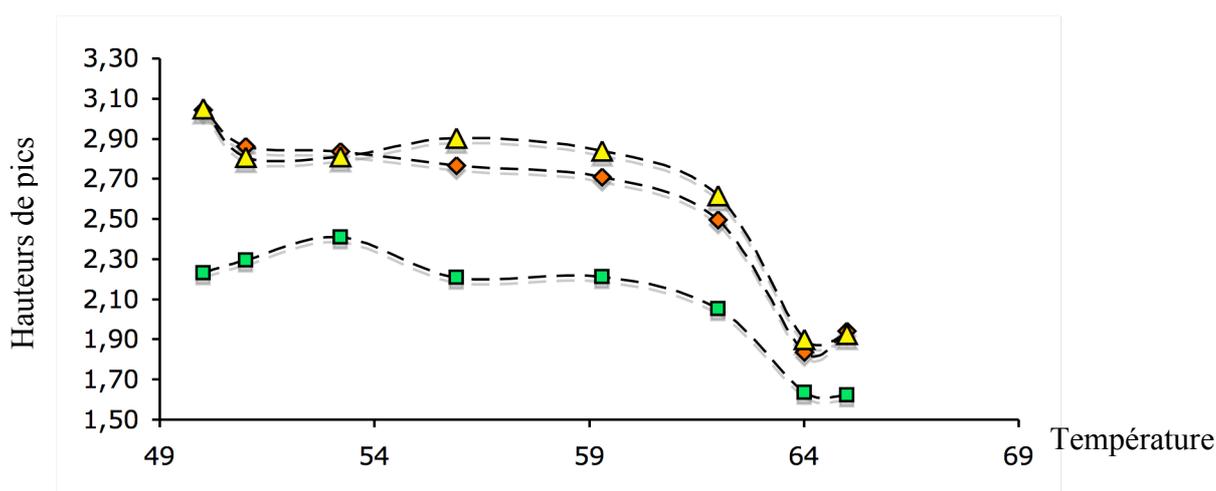


Figure 34 : Effet de la température sur la co-amplification des gènes *FCGR2A*, *FCGR2B* et *FCGR2C*. Quelle que soit la température, les hauteurs des pics correspondant au gène *FCGR2A* (carrés verts) sont toujours inférieures aux hauteurs de pics correspondant aux gènes *FCGR2B* et *FCGR2C**ORF (triangles jaunes) ou aux pics spécifique de l'allèle *FCGR2C**STOP (losanges oranges).

2.3 Analyse de la proportionnalité du signal sur les pics spécifiques

Comme nous l'avons vu précédemment, nous avons déterminé un ordre d'injection des nucléotides nous permettant de disposer de plusieurs pics spécifiques pour chaque gène analysé. Pour pouvoir utiliser la totalité de ces pics, il nous a fallu vérifier que leurs hauteurs étaient identiques tout au long de la réaction de pyroséquencage. Pour cela nous avons analysé, chez 7 individus, les hauteurs de chacun des pics spécifiques, en normalisant, lorsque cela était nécessaire, à la hauteur attendue pour l'incorporation d'un nucléotide. Les résultats obtenus montrent que, quelle que soit la position considérée, la hauteur des pics spécifiques reste constante au fil du pyrogramme (Figure 35).

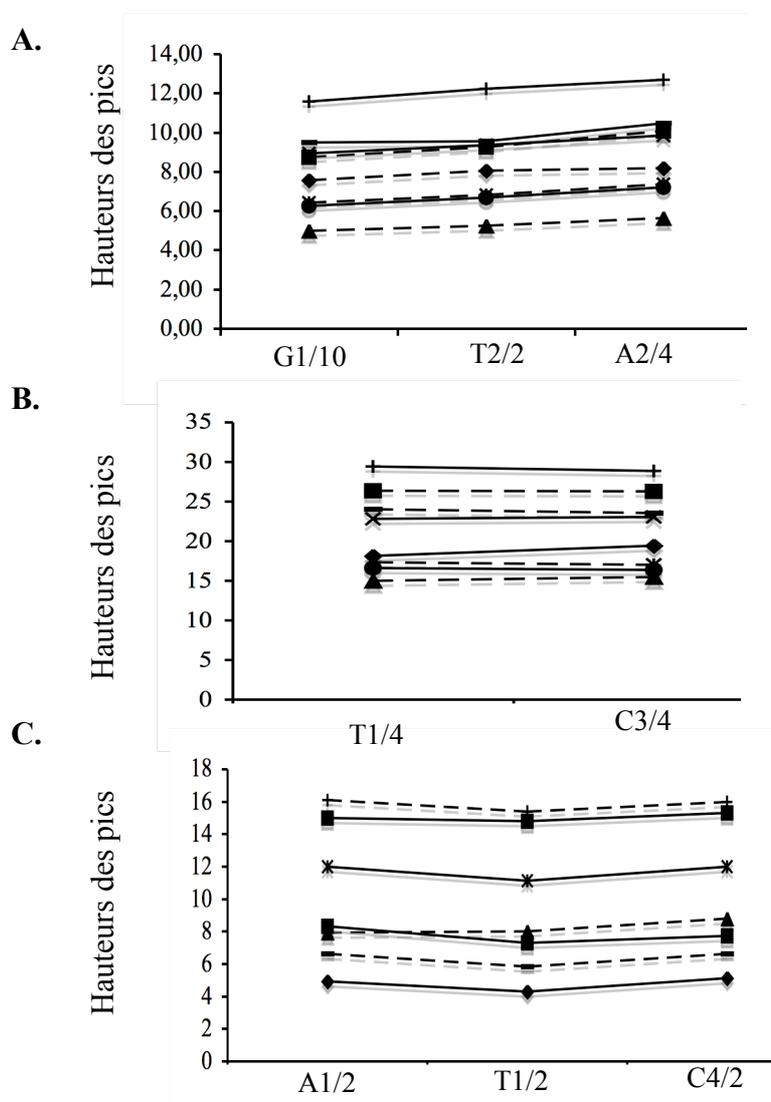


Figure 35 : Analyse de la proportionnalité sur les pics spécifiques. Afin de nous assurer qu les hauteurs des pics spécifiques étaient constantes tout au long du pyroséquencage, nous avons analysé les hauteurs de pics spécifiques de *FCGR2A* (A), de *FCGR2B/FCGR2C* (B) et de *FCGR2C *STOP* (C), en comparant à chaque fois les hauteurs pour l'incorporation d'un nucléotide.

2.4 Analyse de la reproductibilité

Afin de nous assurer de la fiabilité de notre approche, nous avons procédé à une étude de la variabilité de nos résultats au sein de la même expérience. Pour cela nous avons procédé à l'analyse de 8 témoins en triplicat et nous avons ensuite comparé les trois valeurs obtenues pour les ratios T1/T2 (nombre de *FCGR2C*), A1/A2 (nombre de *FCGR2C*STOP*) et T3/T2 (nombre de *FCGR2C*ORF*) (Tableau 11). L'ensemble des résultats obtenus montre que les écarts entre les différentes valeurs d'un même ratio ne dépassent pas 0,2 et que d'une façon générale nos résultats sont fortement répétables.

Nous avons ensuite testé, chez ces 8 témoins, la reproductibilité entre des expériences effectuées à des jours différents. Pour cela nous avons comparé les valeurs des ratios T1/T2, A1/A2 et T3/T2 obtenues à trois dates différentes et avons observé là aussi une très bonne reproductibilité des résultats (Tableau 12). Pour le reste de nos investigations, nous avons choisi de passer l'ensemble de nos échantillons en triplicat et de calculer la moyenne du ratio obtenu sur ces 3 passages. Lors d'un écart entre les différents ratios supérieur à 0,2, nous avons décidé de procéder à une ré-analyse de l'échantillon.

	T1/T2			A1/A2			T3/T2		
	R0	R1	R2	R0	R1	R2	R0	R1	R2
Témoin 1	2,3	2,3	2,3	0,04	0,06	0,04	2,2	2,2	2,3
Témoin 2	2,5	2,6	2,7	0,8	0,8	0,8	1,2	1,5	1,4
Témoin 3	2,4	2,5	2,2	0,7	0,7	0,8	1,3	1,3	1,2
Témoin 4	1,9	1,9	1,8	0,4	0,4	0,4	1,1	1,2	1,2
Témoin 5	2,2	2,0	2,0	0,4	0,4	0,4	1,5	1,4	1,4
Témoin 6	2,3	2,4	2,4	0,7	0,7	0,7	1,2	1,2	1,3
Témoin 7	2,2	2,2	2,5	0,7	0,7	0,7	1,0	1,1	1,2
Témoin 8	2,2	2,2	2,3	0,6	0,7	0,7	1,3	1,2	1,2

Tableau 11 : Répétabilité des ratios T1/T2, A1/A2 et T3/T2. Chaque témoin à été analysé en triplicat un jour donné puis les différentes valeurs des ratios T1/T2 (nombre de copies de *FCGR2C*), A1/A2 (nombre de *FCGR2C**STOP) et T3/T2 (nombre de *FCGR2C**ORF) ont été comparées.

	T1/T2			A1/A2			T3/T2		
	J1	J2	J3	J1	J2	J3	J1	J2	J3
Témoin 1	2,4	2,3	2,3	0,05	0,04	0,04	2,1	2,3	2,3
Témoin 2	2,6	2,4	2,6	0,6	0,6	0,7	1,3	1,4	1,4
Témoin 3	2,3	2,2	2,4	0,6	0,6	0,7	1,2	1,4	1,3
Témoin 4	1,9	1,9	1,8	0,3	0,3	0,4	1,3	1,5	1,2
Témoin 5	2,0	2,0	2	0,3	0,3	0,3	1,3	1,5	1,5
Témoin 6	2,5	2,5	2,4	0,5	0,7	0,7	1,2	1,5	1,2
Témoin 7	2,2	2,0	2,2	0,7	0,6	0,6	1,1	1,2	1,1
Témoin 8	2,3	2,2	2,2	0,6	0,6	0,7	1,2	1,3	1,2

Tableau 12 : reproductibilité (inter-expériences) des ratios T1/T2, A1/A2 et T3/T2. Chaque témoin a été analysé en triplicat puis les différentes valeurs des ratios T1/T2 (nombre de copies de *FCGR2C*), A1/A2 (nombre de *FCGR2C**STOP) et T3/T2 (nombre de *FCGR2C**ORF) ont été comparés.

3. Analyse d'une cohorte de témoins

3.1 Analyse du nombre de copies de *FCGR2C*

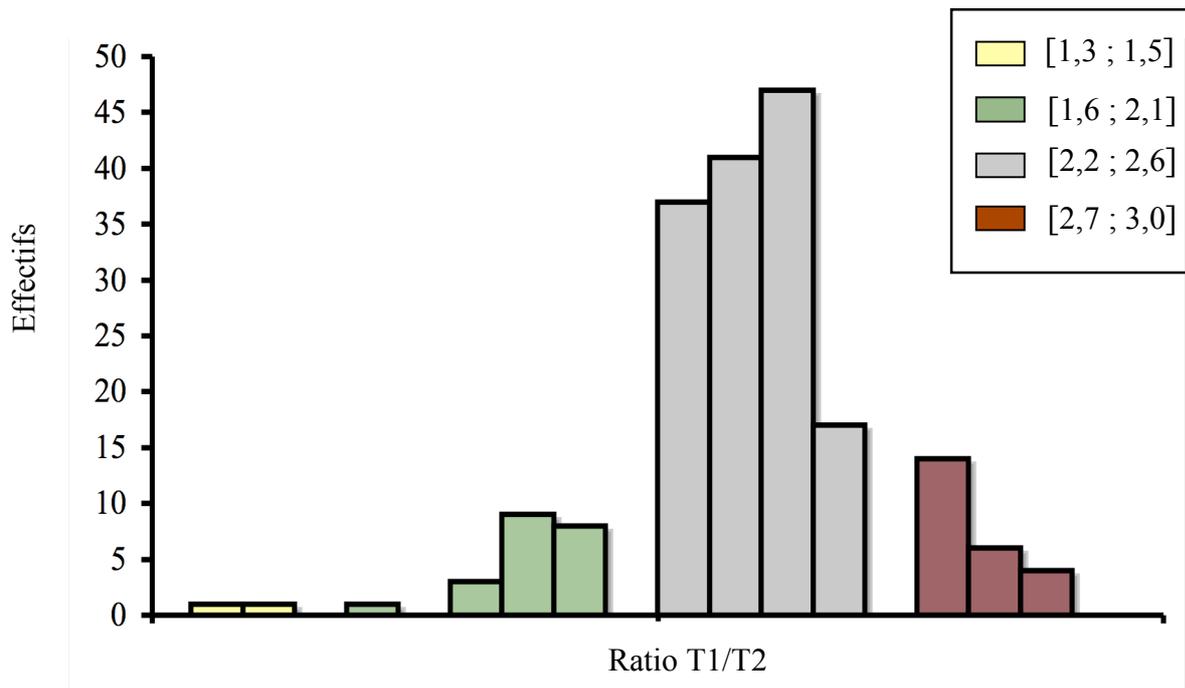
Dans un premier temps, nous avons analysé le nombre de copies du gène *FCGR2C* par l'intermédiaire du ratio T1/T2. Celui-ci a été déterminé pour les 190 témoins, et l'ensemble des ratios obtenus a été reporté sur un même graphique afin d'évaluer la distribution du ratio T1/T2 au sein de notre échantillon de témoins. Nous avons ainsi observé une distribution tri-modale, avec notamment un intervalle compris entre 2,2 et 2,6 où l'on retrouve 74 % de nos témoins (142/190). Les deux autres modes, qui présentent des effectifs inférieurs, correspondent quant à eux aux intervalles [1,6 ; 2,1] et [2,7 ; 3,0] (Figure 36A). Enfin deux témoins avec une faible valeur de T1/T2 (1,24 et 1,36) se distinguent, de même qu'un témoin avec une valeur de T1/T2 de 4,80 (Non représenté).

Si l'on se réfère aux données récemment publiées (Breunis *et al.*, 2008), la majorité des individus de la population générale sont porteurs de 2 copies de *FCGR2C*. Il y a donc de fortes probabilités pour que l'intervalle contenant le plus de témoins corresponde à 2 copies de *FCGR2C* et que les deux autres intervalles de part et d'autre de celui-ci correspondent respectivement à 1 et 3 copies de *FCGR2C*. Pour déterminer de façon plus précise à combien de copies de *FCGR2C* correspondent les trois points extrêmes observés, nous avons identifié la médiane du ratio T1/T2 pour chaque intervalle identifié. Nous avons ensuite procédé à la détermination de la droite de régression passant par ces trois points et déterminé que les deux points avec les plus faible valeur de T1/T2 correspondent probablement à une délétion totale (0 copie) de *FCGR2C* alors que le point le plus extrême correspond à 6 copies (Figure 36B/C).

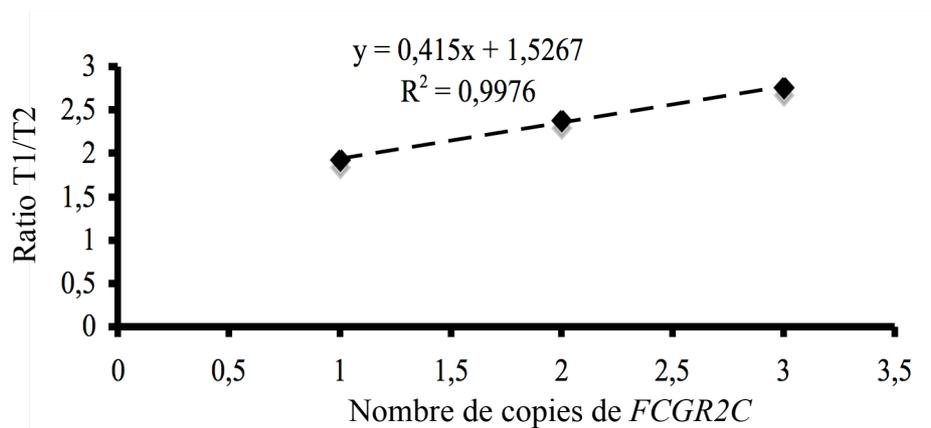
Nous avons ensuite analysé dans notre cohorte, la distribution du ratio entre les hauteurs du pic C3 et celles du pic C1 (ratio C3/C1) qui permet également d'estimer le nombre de copies de *FCGR2C*. Nous avons ainsi observé une distribution moins tranchée que la précédente mais avec néanmoins trois intervalles qui semblent se distinguer [1,8 ; 2,2], [2,25 ; 2,95], [2,95 ; 3,2] semblant correspondre respectivement à 1, 2 et 3 copies de *FCGR2C* (Figure 37A). Lorsque nous avons comparé les individus répartis dans ce ratio avec ceux obtenus avec le ratio T1/T2, nous avons trouvé une parfaite correspondance au niveau du nombre de

copies de *FCGR2C* estimé. Avec le ratio C3/C1, nous avons également observé deux témoins situés dans l'intervalle [1,45 ; 1,5] et un témoin avec une valeur du ratio C3/C1 de 4,63. Pour déterminer de façon plus précise à combien de copies de *FCGR2C* correspondent ces trois individus observés, nous avons identifié la médiane du ratio C3/C1 pour chaque intervalle identifié. Nous avons ensuite procédé à la détermination de la droite de régression passant par ces trois points et déterminé que les deux témoins avec les plus faible valeur de C3/C1 correspondent probablement à une délétion totale (0 copie) de *FCGR2C* alors que le témoin avec la valeur la plus extrême correspond à 6 copies (Figure 37B/C).

A.



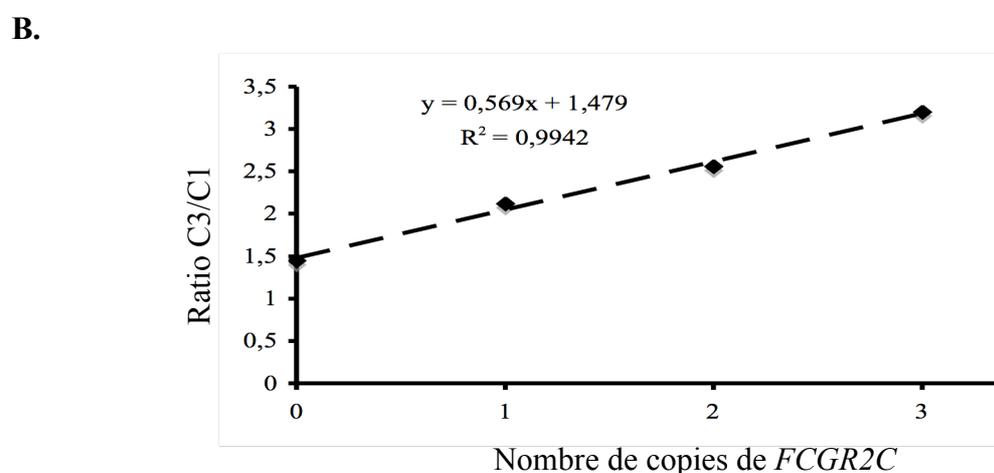
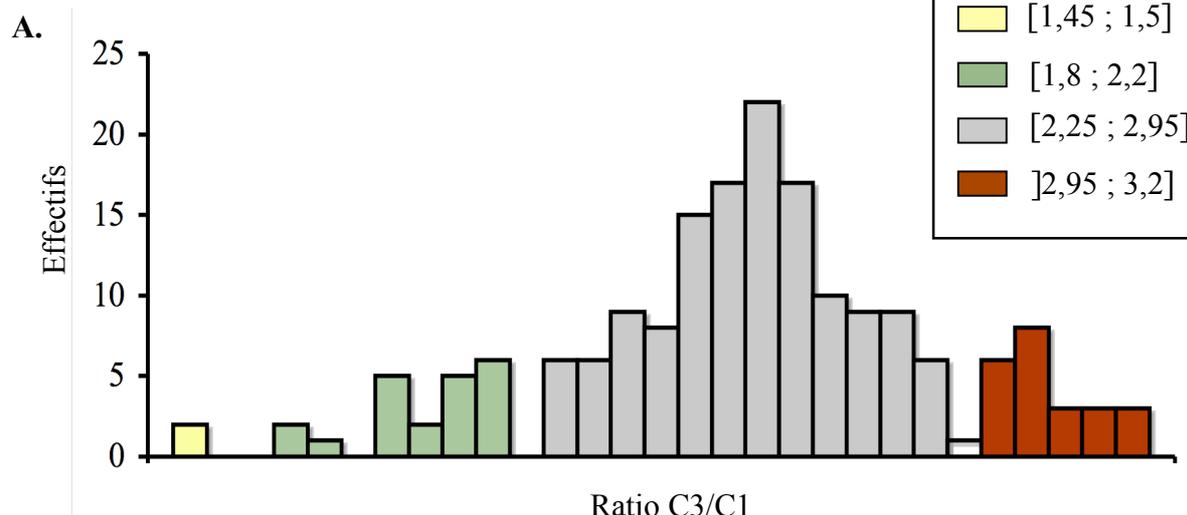
B.



C.

	0 copie	1 copie	2 copies	3 copies	6 copies
Effectifs	2 (1,05%)	21 (11,05%)	142 (74,7%)	24 (12,7%)	1 (0,5%)

Figure 36 : Détermination du nombre de copies de FCGR2C par l'intermédiaire du ratio T1/T2. (A). Distribution au sein de notre échantillon des valeurs du ratio T1/T2 en trois groupes déterminés par les intervalles [1,6 ; 2,1], [2,2 ; 2,6] et [2,7 ; 3,0]. Deux ratios supplémentaires sont situés dans l'intervalle [1,6 ; 2,1]. Chaque bâton présente une largeur correspondant à 0,1 (B). Détermination de l'équation de la droite de régression passant par les valeurs médianes correspondant aux ratios T1/T2 pour 1,2 et 3 copies de FCGR2C. (C). Variations du nombre de FCGR2C identifiées grâce au ratio T1/T2.



C.

0 copie	1 copie	2 copies	3 copies	4 copies	5 copies	6 copies
2 (1,05 %)	21 (11,05 %)	142 (74,7 %)	24 (12,7 %)	0	0	1 (0,5 %)

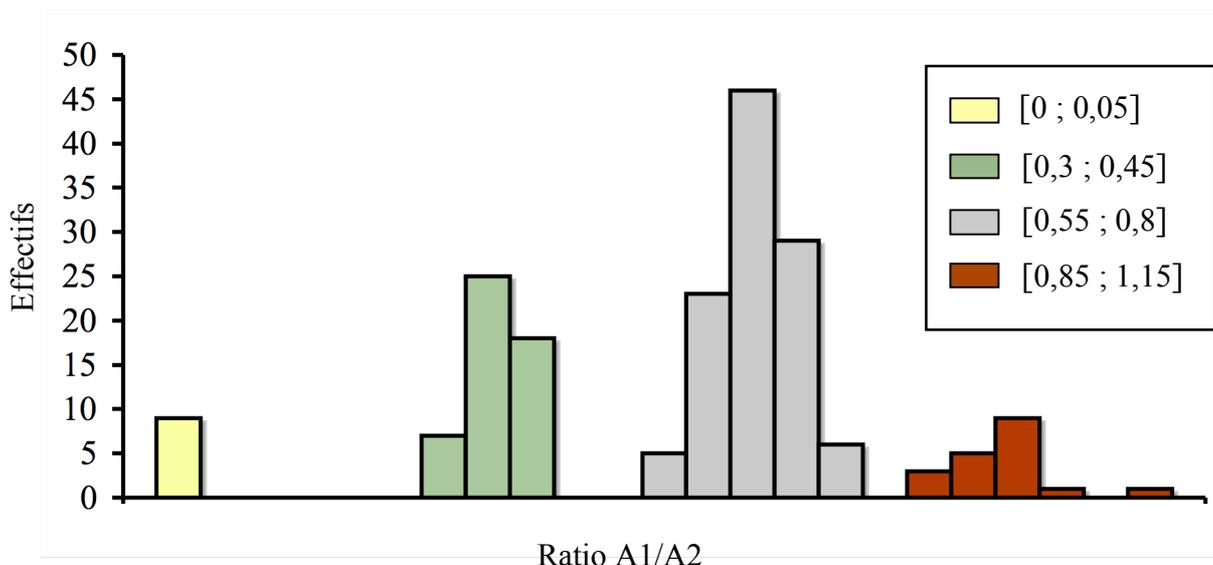
Figure 37 : Détermination du nombre de copies de *FCGR2C* par l'intermédiaire du ratio C3/C1. (A). Distribution au sein de notre échantillon des valeurs du ratio C3/C1 en trois groupes déterminés par les intervalles [1,8 ; 2,2], [2,25 ; 2,9] et [2,95 ; 3,2]. Deux ratios supplémentaires sont situés dans l'intervalle [1,45 ; 1,5]. Chaque bâton présente une largeur correspondant à 0,05 (B). Détermination de l'équation de la droite de régression passant par les valeurs médianes correspondant aux ratios T1/T2 pour 1,2 et 3 copies de *FCGR2C*. (C). Variations du nombre de *FCGR2C* identifiées grâce au ratio C3/C1.

3.2 Analyse du nombre de copies d'allèle *FCGR2C*-STOP

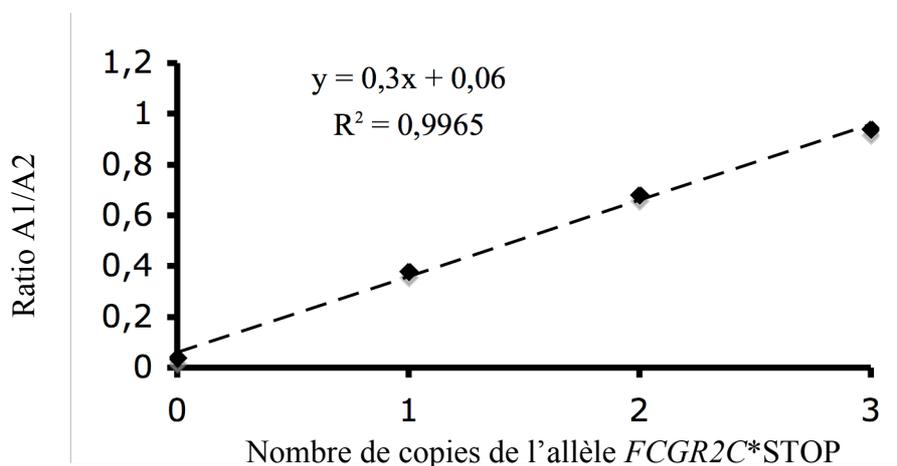
Nous avons tout d'abord analysé le nombre de copies de l'allèle *FCGR2C*-STOP par l'intermédiaire du ratio A1/A2 (Figure 33). Nous avons observé que ce ratio se distribue au sein de notre échantillon d'étude en plusieurs groupes dont un majoritaire, compris dans l'intervalle [0,55 ; 0,8]. Celui-ci correspond probablement à deux copies de *FCGR2C**STOP alors que les deux groupes de part et d'autre, avec des intervalles de [0,3 ; 0,45] et [0,85 ; 1,15], correspondent respectivement à 1 et 3 copies de *FCGR2C**STOP (Figure 38A). Nous avons également observé que 9 témoins présentent des valeurs de A1/A2 comprise dans l'intervalle [0 ; 0,05]. Parmi eux nous avons retrouvé les deux témoins que nous avons identifié précédemment comme présentant vraisemblablement une délétion totale de *FCGR2C*, ce qui laisse suggérer que cet intervalle de valeurs correspond à 0 copie de *FCGR2C**STOP. Enfin le témoin que nous avons identifié comme porteur de 6 copies de *FCGR2C* se distingue avec une valeur de A1/A2 de 1,44. Pour déterminer de façon plus précise à combien de copies d'allèles *FCGR2C**STOP correspond ce ratio, nous avons identifié la médiane du ratio A1/A2 pour chaque intervalle identifié. Nous avons ensuite procédé à la détermination de l'équation de la droite de régression passant par ces quatre points et déterminé que la valeur du ratio A1/A2 de 1,44 correspond approximativement à 5 copies de *FCGR2C**STOP (Figure 38B/C).

Nous avons ensuite analysé le nombre de copies de l'allèle *FCGR2**STOP par l'intermédiaire du ratio T4/T2 (Figure). Tout comme le ratio A1/A2, celui-ci se distribue au sein de notre échantillon d'étude en plusieurs groupes dont un majoritaire, compris dans l'intervalle [1,0 ; 1,4]. Celui-ci correspond probablement à deux copies de *FCGR2C**STOP alors que les deux groupes de part et d'autre, avec des intervalles de [0,5 ; 1,0] et [1,4 ; 1,8], correspondent respectivement à 1 et 3 copies de *FCGR2C**STOP (Figure 39A). Nous avons également observé que 9 témoins présentent des valeurs de A1/A2 comprise dans l'intervalle [0,1 ; 0,3]. Parmi eux nous avons retrouvé les deux témoins que nous avons identifié précédemment comme présentant vraisemblablement une délétion totale de *FCGR2C*, ce qui laisse suggérer que cet intervalle de valeurs correspond à 0 copie de *FCGR2C**STOP. Le témoin que nous avons identifié comme porteur de 6 copies de *FCGR2C* se distingue avec une valeur de T4/T2 de 2,42 (Figure). Enfin nous observons une excellente concordance entre les résultats des analyses des ratios A1/A2 et T4/T2 (Figure 39B/C).

A.



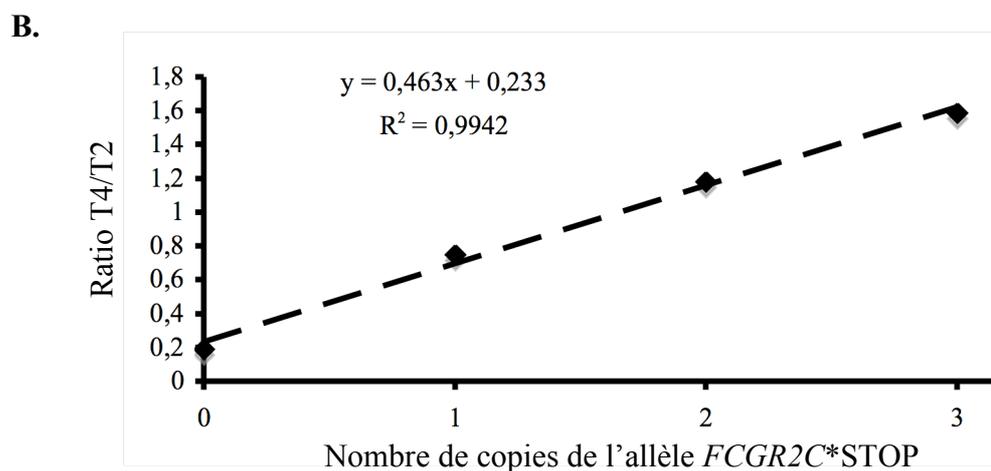
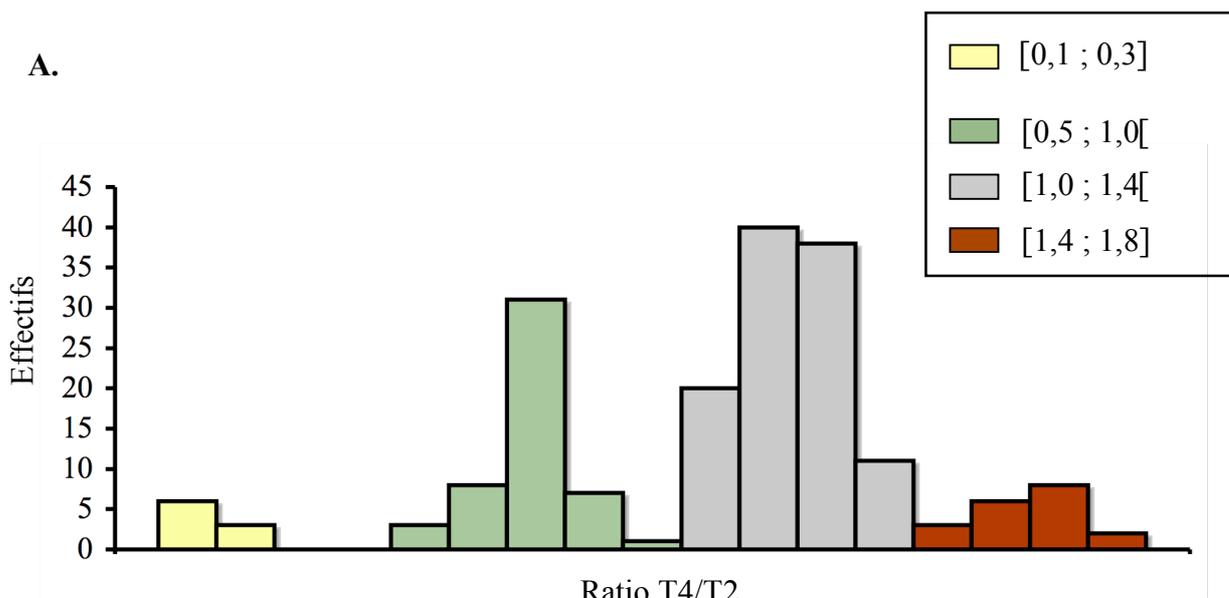
B.



C.

	0 copie	1 copie	2 copies	3 copies	5 copies
Effectifs	9 (4,8%)	50 (26,6%)	109 (58%)	19 (10,1%)	1 (0,5%)

Figure 38 : Détermination du nombre de copies de l'allèle *FCGR2C*STOP* par l'intermédiaire du ratio A1/A2. (A). Distribution au sein de notre échantillon des valeurs du ratio A1/A2 correspondant à 0, 1, 2 et 3 copies de *FCGR2C*STOP*. Chaque groupe est représenté par un intervalle et au sein de celui ci chaque bâton présente une largeur égale à 0,05 (B). Détermination de l'équation de la droite de régression passant par les valeurs médianes correspondante aux ratios A1/A2 pour 0,1,2 et 3 copies de *FCGR2C*STOP*. (C). Variations du nombre de *FCGR2C* identifiées dans notre échantillon grâce au ratio A1/A2.



C.

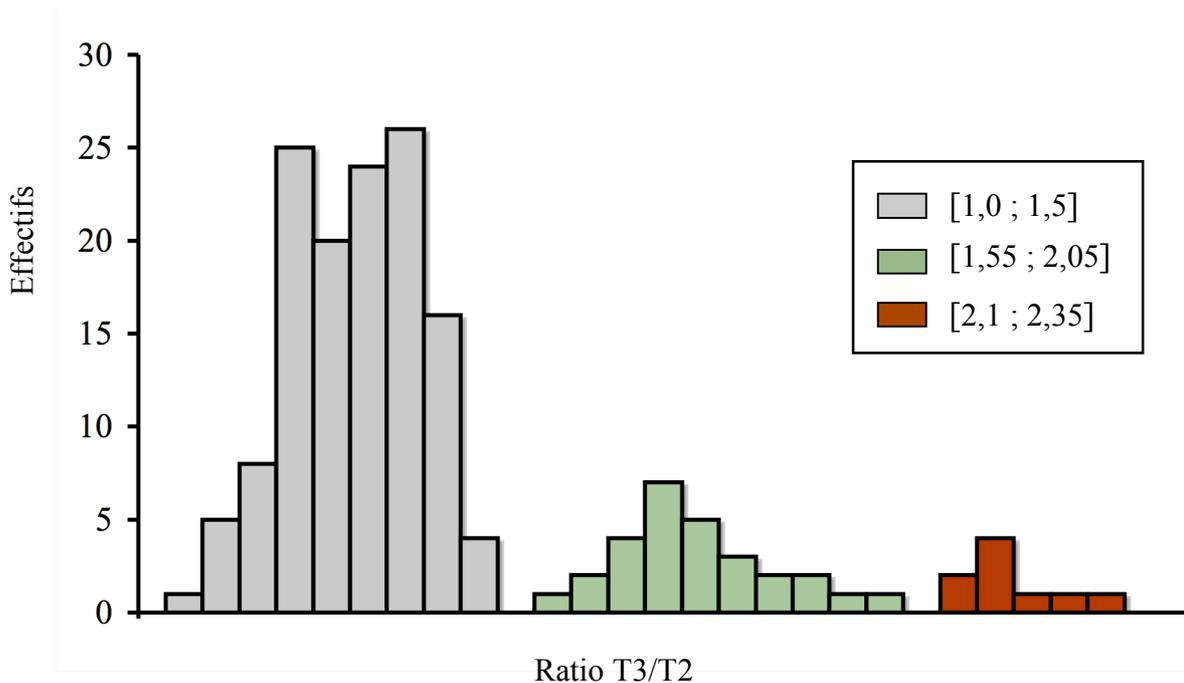
0 copie	1 copie	2 copies	3 copies	4 copies	5 copies
9 (4,8 %)	50 (26,6 %)	109 (58 %)	19 (10,1 %)	0 (0 %)	1 (0,53 %)

Figure 39 : Détermination du nombre de copies de l'allèle *FCGR2C*STOP* par l'intermédiaire du ratio T4/T2. (A). Distribution au sein de notre échantillon des valeurs du ratio T4/T2 correspondant à 0, 1, 2 et 3 copies de *FCGR2C*STOP*. Chaque groupe est représenté par un intervalle et au sein de celui-ci chaque bâton présente une largeur égale à 0,1 **(B).** Détermination de l'équation de la droite de régression passant par les valeurs médianes correspondant aux ratios T4/T2 pour 0,1,2 et 3 copies de *FCGR2C*STOP*. **(C).** Variations du nombre de *FCGR2C* identifiées dans notre échantillon grâce au ratio T4/T2.

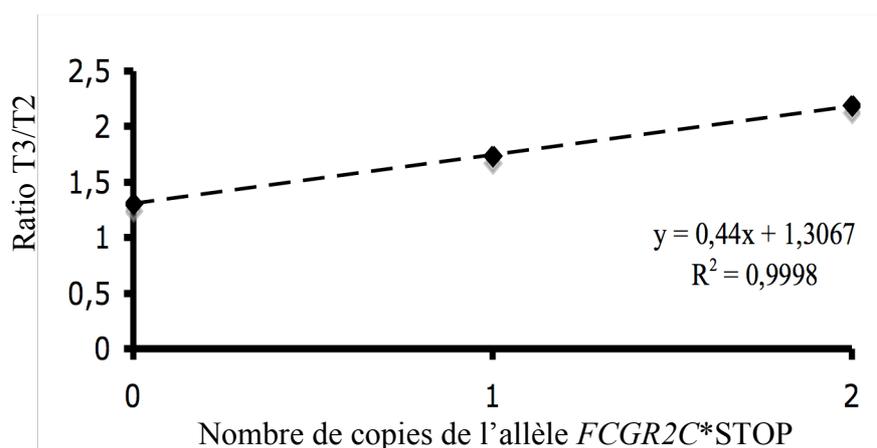
3.3 Analyse du nombre d'allèle *FCGR2C*-ORF

Nous avons analysé le nombre de copies de l'allèle *FCGR2C*-ORF grâce au calcul du ratio T3/T2 (Figure). Nous avons observé que la plupart des témoins se situe dans un intervalle compris entre 1,0 et 1,5, ce qui correspond probablement aux témoins qui ne sont pas porteurs de l'allèle *FCGR2C*-ORF (Figure 40A). Nous avons également observé deux autres groupes de ratio T3/T2, l'un compris entre 1,55 et 2,05 et le second compris entre 2,1 et 2,5 (Figure 39A), et correspondant respectivement aux témoins porteurs de 1 et 2 copies de *FCGR2C*-ORF. Les deux individus que nous avons identifiés précédemment comme porteur d'une délétion totale de *FCGR2C* présentent un ratio T3/T2 compris dans l'intervalle [1,0 ; 1,5] concordant avec une absence de *FCGR2C**ORF. De plus, un individu avec une valeur extrême de T3/T2 de 2,83, se distingue des autres ratios (Non représenté). Pour déterminer de façon plus précise à combien de copies d'allèles *FCGR2C**ORF correspond ce ratio, nous avons identifié la médiane du ratio T3/T2 pour chaque intervalle identifié. Nous avons ensuite procédé à la détermination de l'équation de la droite de régression passant par ces trois points et déterminé que la valeur du ratio T3/T2 de 2,83 correspond approximativement à 3 copies de *FCGR2C**ORF (Figure 40B/C).

A.



B.



C.

	0 copie	1 copie	2 copies	3 copies
Effectifs	152 (80%)	29 (15,26%)	8 (4,22%)	1 (0,52%)

Figure 40 : Détermination du nombre de copies de l'allèle *FCGR2C*ORF* par l'intermédiaire du ratio T3/T2. (A). Distribution au sein de notre échantillon des valeurs du ratio T3/T2 correspondant à 0, 1, 2 copies de *FCGR2C*ORF*. Chaque groupe est représenté par un intervalle et au sein de celui ci chaque bâton présente une largeur égale à 0,05 **(B).** Détermination de l'équation de la droite de régression passant par les valeurs médianes correspondant aux ratios T3/T2 pour 0,1 et 2copies de *FCGR2C*ORF*. **(C).** Variations du nombre de *FCGR2C*ORF* dans notre échantillon identifiées grâce au ratio T3/T2.

3.4 Corrélation entre les résultats obtenus

Pour confirmer les résultats obtenus précédemment, nous avons tout d'abord décidé d'analyser la corrélation entre le nombre de copies de *FCGR2C* (ratio T1/T2) et le nombre d'allèles *FCGR2C*-STOP (ratio A1/A2) chez les témoins homozygotes pour cet allèle. Pour cela nous avons reporté sur un même graphique les valeurs du ratio T1/T2 (nombre de *FCGR2C*) en fonction du ratio A2/A3 (nombre d'allèle *FCGR2C*-STOP). Nous avons ensuite, à partir de ce graphique, calculé un coefficient r d'une valeur de 0,86 qui indique une corrélation importante entre le nombre de copies *FCGR2C* et le nombre d'allèles *FCGR2C*-STOP (Figure 41). Afin de déterminer de façon précise les différents génotypes nous avons estimé le nombre total d'allèles portées par chaque témoin. Pour cela, nous avons reporté sur un même graphique le nombre d'allèles STOP (ratio A1/A2) en fonction du nombre d'allèle ORF (Figure 42A). De cette façon nous avons ainsi trouvé que la majorité des individus de nos témoins sont porteurs du génotype *FCGR2C*-STOP/STOP et que tout ceux qui sont porteurs d'une délétion de *FCGR2C* sont porteurs de l'allèle *FCGR2C*-STOP. Nous avons ensuite confronté les génotypes établis à l'aide des proportions d'allèles *FCGR2C*-ORF/STOP avec le nombre de copies de *FCGR2C* identifié avec le ratio. Dans tous les cas, nous avons confirmé que le nombre total d'allèles de *FCGR2C* était identique au nombre de copies de *FCGR2C* (Figure 42B).

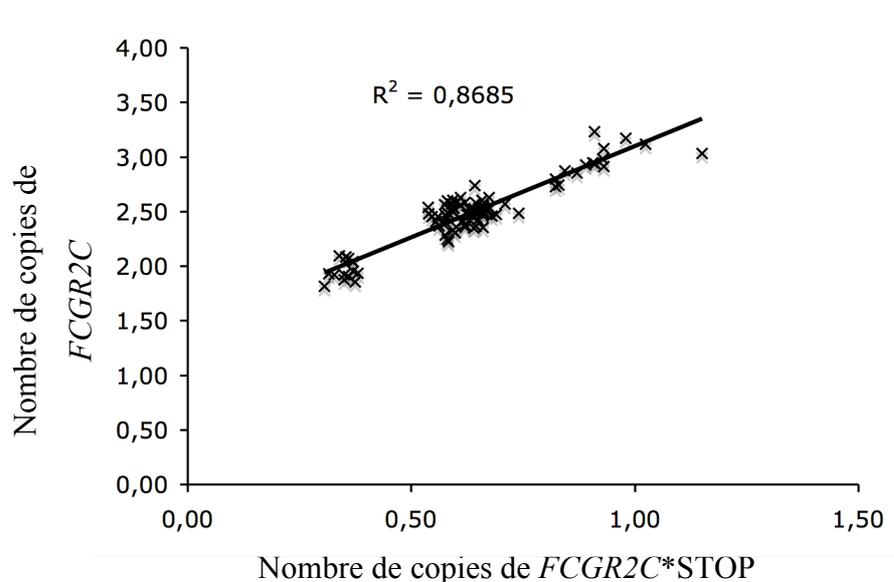
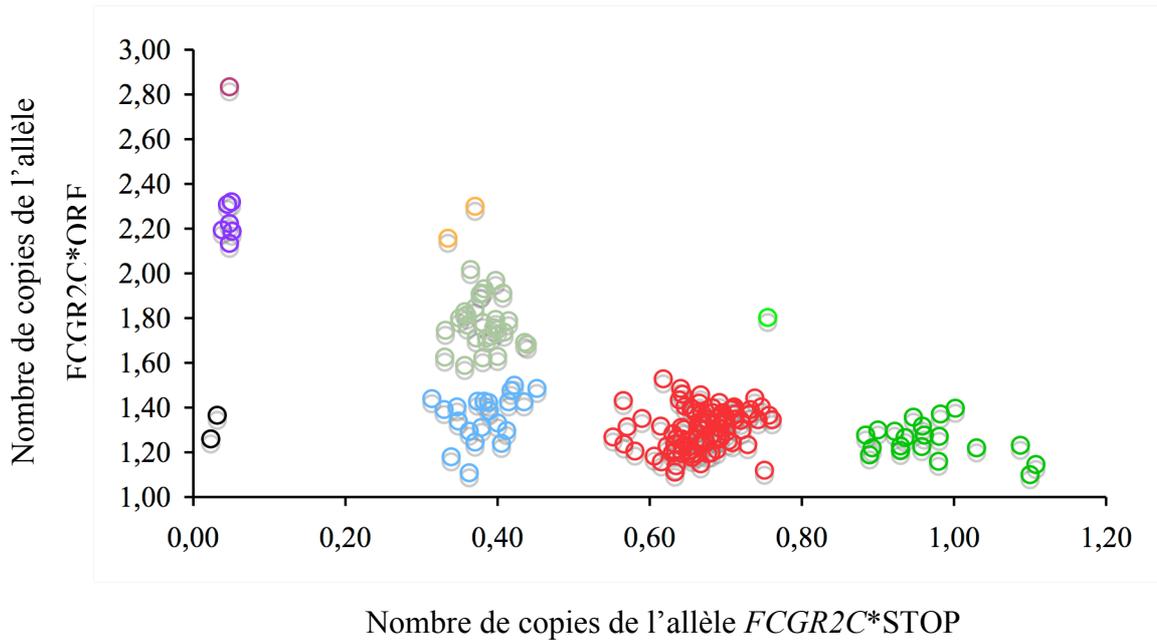


Figure 41 : Corrélation entre le nombre de gène *FCGR2C* et le nombre d'allèle *FCGR2CSTOP.** Représentation du nombre de copies de *FCGR2C* (ratio T1/T2) en fonction du nombre de copies de *FCGR2C**STOP (ratio A2/A3) chez les individus homozygotes pour cet allèle.

A.



B.

0 copies			
2 (1 %)			
ORF		STOP	
0 (0 %)		21 (11,05 %)	
ORF/ORF	STOP/ORF	STOP/STOP	
6 (3,1 %)	27 (14,2 %)	108 (56,8 %)	
STOP/STOP/STOP	STOP/STOP/ORF	STOP/ORF/ORF	ORF/ORF/ORF
20 (10,5 %)	1 (0,5 %)	2 (1 %)	1 (0,5 %)
STOP/STOP/STOP/STOP/STOP/ORF			
1 (0,5 %)			

Figure 42 : Corrélation entre le nombre d'allèle *FCGR2C*STOP* et le nombre d'allèle *FCGR2C*ORF*. (A) La représentation graphique du nombre de copies de *FCGR2C*STOP* (ratio A1/A2) en fonction du nombre de copies de *FCGR2C*ORF* (ratio T3/T2) permet de distinguer clairement les différentes catégories de génotypes de *FCGR2C*. (B). Récapitulatif des proportions des différents génotypes de *FCGR2C* identifiés dans notre échantillon de témoins.

3.5 Déséquilibre de liaison

Au sein de notre population, 20 % des témoins sont porteurs de l'allèle *FCGR2C-ORF*. Nous avons analysé la liaison pouvant exister entre cet allèle et les polymorphismes *FCGR3A-V158F* et *FCGR2A-H131R*.

Pour cela, nous avons dans un premier temps analysé la répartition des différents génotypes de *FCGR3A* chez les porteurs de l'allèle *FCGR2C*ORF* et avons ainsi mis en évidence une association préférentielle avec le génotype *FCGR3A-158VV* ($p = 0.0002547$). L'analyse de la répartition de l'allèle *FCGR2C*ORF* en fonction des allèles *FCGR3A-V* et *FCGR3A-158F* nous a quant à elle permis de mettre en évidence une association préférentielle entre l'allèle *FCGR3A-158V* et l'allèle *FCGR2C*ORF* ($p = 0,02129$).

Nous avons ensuite procédé à l'analyse de la répartition de l'allèle *FCGR2C*ORF* en fonction du génotype *FCGR2A-H131R* mais aucune association n'a été trouvée. En revanche lors de l'analyse en fonction des allèles *FCGR2A-131H* et *FCGR2A-131R*, nous avons mis en évidence une association préférentielle avec l'allèle *FCGR2A-131H* ($p = 0.006283$).

Enfin, nous avons regardé s'il y avait une association préférentielle entre les individus porteurs d'une seule copie de *FCGR2C* et le polymorphisme *FCGR3B-NA1/NA2*. Tous les individus porteurs d'une seule copie de *FCGR2C* sont homozygotes pour le polymorphisme *FCGR3B-NA1/NA2* ce qui semble conforter le modèle de duplication/ délétion que nous avons présenté dans la première partie de cette thèse. En revanche aucune association n'a été trouvée entre le polymorphisme *FCGR3B-NA1/NA2* et l'allèle *FCGR2C*STOP*.

D. Discussion

La principale caractéristique du pyroséquencage est son aspect quantitatif qui lui permet d'être utilisé notamment dans des problématiques comme la détermination du nombre de copies de gènes (Söderbäck *et al.*, 2005 ; Jansson *et al.*, 2003). Lors de cette partie nous rapportons pour la première fois l'usage de cette technique afin d'étudier simultanément pour un même gène, les variations du nombre de copies ainsi qu'un polymorphisme génétique.

Grâce à l'utilisation de cette technique nous avons mis en évidence la variation du nombre de copies du gène *FCGR2C* au sein d'une population témoin. Au cours de notre approche, nous avons optimisé l'ordre d'injection des nucléotides afin de maximiser le nombre de pics spécifiques de chaque gène, multipliant ainsi les contrôles internes et augmentant au final la fiabilité de nos résultats. Nos résultats montrent une grande variabilité, que ce soit en terme de nombre de copies du gène *FCGR2C* ou de la proportion entre les allèles ORF/STOP. La corrélation parfaite observée entre le nombre de copies de *FCGR2C* et le nombre des différents allèles *FCGR2C**ORF/STOP indique la fiabilité de cette approche. En revanche, dans l'optique d'une publication il serait souhaitable de pouvoir valider nos résultats par une technique alternative. La comparaison de nos résultats avec ceux obtenus avec la technique de MLPA (Breunis *et al.*, 2008) constituerait la meilleure des validations ; malheureusement cette technologie nous est difficile d'accès.

L'autre possibilité serait de corréler nos résultats à l'échelle phénotypique (ou fonctionnelle) en regardant par exemple si les individus identifiés comme porteurs de l'allèle *FCGR2C**ORF expriment bien le récepteur FcγRIIC à la surface de leurs cellules NK et que ceux qui n'ont que l'allèle *FCGR2C**STOP ne l'exprime pas. Cette approche permettrait par la même occasion de se rendre compte si le nombre de copies de *FCGR2C**ORF corrèle avec le niveau d'expression du récepteur FcγRIIC. Comme nous l'avons montré, la fréquence de l'allèle *FCGR2C**ORF est très faible dans notre population d'étude et de ce fait l'expression du récepteur FcγRIIC à la surface des cellules NK ne peut être mis en évidence que chez une très faible proportion d'individus. Du fait que nos échantillons d'ADN proviennent de donneurs anonymes de l'Etablissement Français du Sang, nous n'avons pas pu tester, par de analyses de cytométrie en flux, l'expression de FcγRIIC sur les cellules NK des témoins porteurs de l'allèle *FCGR2C**ORF. La recherche d'individus porteurs de l'allèle

*FCGR2C**ORF et susceptible de faire plusieurs dons de sang est donc nécessaire à la mise en place d'une telle approche. Etant donné que le récepteur FcγRIIC possède une partie extracellulaire identique au récepteur FcγRIIB, il ne sera pas possible de disposer d'un anticorps spécifique du récepteur FcγRIIC, ce qui impliquera donc d'utiliser un anticorps anti-CD32 ou un anticorps anti-FcγRIIB. Enfin, il conviendra également de prendre en compte que certaines populations de cellules NK expriment également le récepteur FcγRIIB à leur surface (Dutertre *et al.*, 2008) et qu'il ne sera donc pas possible de faire la distinction entre le récepteur FcγRIIB et FcγRIIC.

Les résultats obtenus pour notre cohorte de témoins montrent que, conformément à ce qui a été publié précédemment (Breunis *et al.*, 2008), la majorité des individus sont porteurs de deux copies du gène *FCGR2C* et sont homozygotes pour l'allèle STOP. En revanche, les pourcentages observés dans notre population concernant les porteurs de 1 copie *FCGR2C* (11,05 %) sont significativement différents de ceux publiés (3,1 %) par Breunis *et al.* Cette différence pourrait s'expliquer par une différence entre les deux populations d'études. En effet, la population de témoins sains génotypée par Breunis *et al.*, est d'origine néerlandaise alors que dans notre études nous avons utilisés des témoins sains tourangeaux recrutés comme donneurs de sang par l'Etablissement Français du Sang. Par exemple, il a été rapporté un gradient nord-sud de duplication du gène *CYP2D6* avec des fréquences de 1% dans la population scandinave (Dahl *et al.*, 1995), de 7 à 10 % dans la population italienne (Scordo *et al.*, 1999) et de 29 % dans la population éthiopienne (Akillu *et al.*, 1996). Il est donc tout à fait envisageable qu'un tel phénomène se produise pour les délétions du gène *FCGR2C*.

Nous avons également mis en évidence dans notre population d'étude des individus présentant des profils « atypiques » qui, pour une part, n'ont jamais été rapportés auparavant. Nous avons ainsi mis en évidence un individu porteur de 6 copies de *FCGR2C*. Même si cela n'avait jamais été rapporté concernant le gène *FCGR2C*, il existe de nombreux exemples de variation de nombre de copies de gènes pouvant aller jusqu'à 15 copies (Perry *et al.*, 2007). Nous avons également identifié deux individus présentant une délétion homozygote de *FCGR2C*. Même si cela n'a pas été mis en évidence par Breunis *et al.*, une étude a déjà rapporté auparavant la présence de ce genre de profil (Reilly *et al.*, 1994).

Enfin nous avons analysé le déséquilibre de liaison existant entre le polymorphisme *FCGR2C*-ORF/STOP et les polymorphismes *FCGR3A*-V158F et *FCGR2A*-R131H. Nous

avons mis en évidence que l'allèle ORF semblait s'associer de façon préférentielle avec l'allèle *FCGR3A*-158V et avec les homozygotes *FCGR2A*-131RR, ce qui n'avait jamais été rapporté jusqu'à présent. Néanmoins il conviendra de ré-analyser l'ensemble de ces données avec un modèle plus adapté à l'étude du déséquilibre de liaison entre les SNPs et les variations de nombre de copies (Lee *et al.*, 2008). Toutefois, si nos observations se trouvaient confirmées par des modèles plus élaborés, il conviendrait de considérer le gène *FCGR2C* comme un gène candidat sérieux dans la réponse aux anticorps thérapeutiques. Dans ce contexte, nous n'avons pas génotypé notre cohorte de patients traités par rituximab par manque d'ADN et du fait que nous ne disposons pas des données cliniques à long terme de ces patients (Cartron *et al.*, 2002). En revanche, cette technique est actuellement utilisée afin d'étudier le génotype *FCGR2C* sur une cohorte de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et traités par l'adalimumab (Miceli-Richard *et al.*, 2006).

Cette approche de pyroséquencage était initialement prévue pour l'étude des gènes *FCGR3B* et *FCGR2C* mais les résultats publiés en février 2008 rapportant des variations de *FCGR3A* (Breunis *et al.*, 2008) nous ont obligé à abandonner l'idée d'utiliser ce gène comme référence pour l'étude du nombre de copie de *FCGR3B*. Tout au long de ma thèse, l'éloignement géographique du pyroséquenceur a entraîné un manque de flexibilité et d'adaptabilité dans nos expériences, il m'a été impossible dans le temps restant à ma thèse, de développer une approche intermédiaire. Celle-ci aurait pu consister en une amplification multiplex du gène *FCGR3B* avec un ou des gène(s) de référence(s) puis l'étude de chacun d'eux en pyroséquencage avec des amorces spécifiques pour chaque gène (Pourmand *et al.*, 2002).

L'approche développée pour étudier les variations du nombre de copie de *FCGR2C* nous a permis de confirmer le fait que ce phénomène n'est pas rare dans la population générale. Les variations de nombre de copies de gènes est une thématique qui a émergé ces dernières années et de nombreuses études confirment qu'une grande partie de nos gènes est soumis à ce phénomène (Zhang *et al.*, 2009). Dans le cadre des recherches du laboratoire, il y a de forte chance pour que cette problématique de variation de nombre de copies resurgisse de nouveaux. En effet, de nombreux gènes du système immunitaire semblent présenter des variations de nombre de copies (Yang *et al.*, 2007 ; Nuytten *et al.*, 2009) et il sera donc nécessaire à l'avenir de réfléchir à l'accessibilité des différentes approches technologiques.

III. Etudes d'association entre les polymorphismes *FCGR* et la réponse aux anticorps thérapeutiques

A. Introduction

Comme nous l'avons indiqué précédemment, il existe une variabilité des effets des anticorps thérapeutiques selon les patients, qu'il s'agisse d'effets indésirables ne survenant habituellement que chez un faible nombre, ou d'efficacité se traduisant par une gamme étendue de réponses allant des patients réfractaires jusqu'aux très bons répondeurs. La constitution génétique du patient peut être l'un des facteurs qui expliquent ces variations (Watier, 2005), et notre équipe a été pionnière dans ce domaine en découvrant le premier facteur génétique associé à la réponse aux anticorps thérapeutiques, le polymorphisme V158F du *FCGR3A* (Cartron *et al.*, 2002). La variation V158F du FcγRIIIa (phénylalanine en position 158 substituée par une valine), localisée dans la zone de contact avec les IgG, modifie l'affinité du récepteur pour les IgG1 (Dall'Ozzo *et al.*, 2004), sans en modifier le niveau d'expression (Congy-Jolivet *et al.*, 2008).

Le polymorphisme *FCGR2A*-H131R est également responsable d'une différence d'affinité envers les IgG. En effet des travaux récents ont montré que l'alloforme FcγRIIA-131H présente une affinité pour les IgG1, IgG2 et IgG4 supérieure à celle de l'alloforme FcγRIIA-131R (Bruhns *et al.*, 2009). La conséquence fonctionnelle de ce polymorphisme est une capacité de phagocytose des particules opsonisées par des IgG2 plus efficace par les polynucléaires exprimant l'alloforme FcγRIIA-131R que par ceux exprimant l'alloforme FcγRIIA-131R (Parren *et al.*, 1992). Il apparaît donc légitime que le polymorphisme *FCGR2A*-H131R soit intégré dans la plupart des études d'association avec la réponse aux anticorps thérapeutiques (Cartron *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2006 ; Bibeau *et al.*, 2008). En revanche lors des études d'association incluant plusieurs polymorphismes, il convient d'estimer le déséquilibre de liaison pouvant exister entre les différents gènes candidats. L'objectif de notre travail a été d'analyser le déséquilibre de liaison entre les polymorphismes *FCGR3A*-V158F et *FCGR2A*-H131R ou de le ré-analyser dans différentes populations à partir de données déjà publiées.

B. Résultats

Article N°2 : Journal of Clinical Oncology, octobre 2008.

Evidence for linkage disequilibrium between FcγRIIIA-V158F and FcγRIIA-H131R polymorphisms in Caucasians, and for an FcγRIIIa-restricted influence on the response to therapeutic antibodies

Julien Lejeune^{1,2}, Gilles Thibault^{1,3,4}, David Ternant^{1,2}, Guillaume Cartron⁵,
Hervé Watier^{1,2,4}, and Marc Ohresser^{1,2}

¹CNRS UMR 6239 « Génétique Immunothérapie Chimie et Cancer », Tours, France; ²Université François-Rabelais de Tours, France; ³Université d'Auvergne-Clermont 1, Clermont-Ferrand, France; ⁴CHRU de Tours, Laboratoire d'immunologie, France; ⁵INSERM U847, Biothérapies des cellules souches normales et cancéreuses and CHU Lapeyronie, Service d'Hématologie et Biothérapies, Montpellier, France.

Evidence for Linkage Disequilibrium Between FcγRIIIa-V158F and FcγRIIa-H131R Polymorphisms in White Patients, and for an FcγRIIIa-Restricted Influence on the Response to Therapeutic Antibodies

TO THE EDITOR: Since our pioneering work demonstrating that a better clinical response to rituximab (anti-CD20, MabThera, Rituxan) was associated with the 158 valine (V) allotype of fragment C receptor [FcγR]IIIa, a receptor for the Fc portion of immunoglobulin G (IgG),¹ similar results have been obtained in at least four cohorts of patients with non-Hodgkin's lymphoma treated with this antibody.^{2,3,4,5} However, similar data were not available for antibodies targeting solid tumors. Indeed, the initial study with trastuzumab (anti-ErbB2, Herceptin; Genentech, Inc, South San Francisco, CA) was negative,⁶ and a study performed on a small cohort of patients treated by cetuximab (anti-ErbB1, Erbitux; ImClone Systems Inc, Branchburg, NJ) led to the opposite conclusion.⁷ The recent publication by Musolino et al⁸ in *Journal of Clinical Oncology*, now convincingly shows that a better response to trastuzumab is associated with the 158 VV genotype. This result is consistent with the corpus of data acquired with rituximab. Similarly, a recent communication at the American Society of Clinical Oncology Annual Meeting concluded that the 158 VV genotype of FcγRIIIa is associated with a better response to cetuximab.⁹ Although the landscape becomes clear for FcγRIIIa, this is not the case for FcγRIIa, since its histidine (H) 131 arginine (R) polymorphism was found associated with the clinical response in some but not all studies, either independently^{2,7} or combined with FcγRIIIa-V158 phenylalanine (F) polymorphism.⁸ Clinical results are frequently analyzed on the basis of a presumed random distribution of FcγRIIa and FcγRIIIa alleles, referring to the article by Lehrnbecher et al,¹⁰ which reported "no evidence for nonrandom distribution of combinations of variant genotypes" using a classical χ^2 test (Table 1).^{1,2,10,12-14} However, as already discussed,¹¹ linkage disequilibrium (LD) between FcγRIIa and FcγRIIIa polymorphisms has been demonstrated by a χ^2 test in a larger group of white patients: 131 RR/158 FF and 131 HH/158 VV frequencies were increased at the expense of 131 RR/158 VV and 131 HH/158 FF genotypes, respectively (Table 1).¹² After analysis of available data with two more appropriate and sensitive tests (Linkdis; Department of Entomology, Iowa State University, Ames, IA¹³; and Genopop; Laboratoire de Génétique et Environnement, Montpellier, France¹⁴), LD was confirmed in the latter group¹² and was also demonstrated in the former,¹⁰ as well as in a control French white population (Table 1). When applied to clinical studies, this LD was observed in the Cartron et al cohort¹ as well as in that from Weng and Levy² (Table 1). We were unable to perform the same analysis on the cohort of Musolino et al⁸ because bilocus geno-

types were not presented in the article. However, the LD is suggested in their cohort by the 158 VV genotype over-representation in 131 HH individuals (deduced from their Table 3) and probably explains the trend observed for a higher antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in FcγRIIa-131 HH individuals (their Fig 3). Finally, we confirm the absence of LD in the Japanese control population,¹² whereas only one test revealed LD in the African-American population (Table 1).¹⁰

Multivariate analysis such as logistic regression is imposed by the nonrandom distribution of the alleles. Through this approach, Weng and Levy² have shown independent effects of both FcγRIIIa-158 VV and FcγRIIa-131 HH genotypes on the clinical response to rituximab,² whereas we found a VV-restricted effect on this response.¹ This difference might be related to a putative different repartition of ethnic origin among the studied populations. In contrast, using a multivariate logistic regression, Musolino et al⁸ reported that combination of the two favorable FcγRIIIa and FcγRIIa genotypes (158 VV and/or 131 HH) was the only independent predictive factor for response to trastuzumab. In their opinion, this combined effect could not be ascribed to a LD between FcγRIIa and FcγRIIIa polymorphisms. Given the highly suspected LD in their white cohort,⁸ we performed univariate logistic regression¹⁵ using FcγRIIa (131 HH ν R carriers), FcγRIIIa (158 VV ν F carriers) and the association of both genotypes (131 HH and/or 158 VV ν others genotypes) as dependent variables. The Cox-Snell pseudo R² coefficient which approximates part of data variability explained by the logistic model was calculated for each variable;¹⁶ the higher the R² coefficient, the more the factor included in the model explains the observed variability. FcγRIIIa-158 VV genotype was found significantly associated with the response to trastuzumab (odds ratio, 6.9; 95% CI, 1.3 to 35.8; $P = .02$; R² = 12%), whereas FcγRIIa-131 HH was not (odds ratio, 3.1; 95% CI, 0.7 to 13.5; $P = .12$; R² = 4.3%). The association of both genotypes was found significant (odds ratio, 3.9; 95% CI, 1.1 to 13.6; $P = .03$; R² = 9.0%), even if R² for the association of genotypes is weaker than R² for FcγRIIIa alone. A bivariate logistic regression was then performed on these two genetic factors omitting the other covariates (eg, sex, age), which do not influence the response.⁸ This analysis confirmed the significant influence of the FcγRIIIa genotype ($P = .02$) and indicates that the combined effect of 158 VV and 131 HH reported by Musolino et al⁸ provides no additional information than, and may be due to, the sole effect of the FcγRIIIa genotype. This FcγRIIIa-158 VV-restricted effect is concordant with their in vitro results showing that the 158 VV genotype and the combination of 158 VV and/or 131 HH were associated with similar trastuzumab-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (their Fig 3A ν 3C) and with the in vivo response to rituximab in white patients.⁸ This conclusion has important therapeutic implications: for example, it strongly suggests that the use of engineered antibodies with improved binding to FcγRIIIa, which is currently evaluated in lymphoproliferative malignancies, may be also applied to solid tumors.¹⁷

Table 1. Linkage Disequilibrium Between FcγRIIIa-131 H/R and FcγRIIIa-158 V/F Alleles

Population	Controls by Race/Ethnicity												Patients								
	White ¹⁰			White ¹²			White*			African American ¹⁰			Japanese ¹²			White ¹			Unspecified ²		
	No.	%	P	No.	%	P	No.	%	P	No.	%	P	No.	%	P	No.	%	P	No.	%	P
No.	180			514			206			150			149			49			87		
HH																					
VV	11†	19.6		31	22.9		14	24.1		6	15.0		9	9.9		5	55.6		3	15.0	
VF	24	42.9		69	51.1		31	53.5		18	45.0		29	31.9		4	44.4		14	70.0	
FF	21	37.5		35	26.0		13	22.4		16	40.0		53	58.2		0	0.0		3	15.0	
HR																					
VV	7	8.6		33	12.9		15	15.3		5	7.8		4	7.6		2	8.4		8	18.6	
VF	32	39.5		127	49.6		47	48.0		35	54.7		23	43.4		11	45.8		16	37.2	
FF	42	51.9		96	37.5		36	36.7		24	37.5		26	49.0		11	45.8		19	44.2	
RR																					
VV	1	2.3		10	8.1		5	10.0		1	2.2		0	0		3	18.7		2	8.4	
VF	15	34.9		47	38.2		22	44.0		22	47.8		1	20.0		6	37.5		10	41.6	
FF	27	62.8		66	53.7		23	46.0		23	50.0		4	80.0		7	43.8		12	50.0	
χ ²	.078			.00099			.077			.779			NA			NA			NA		
Linkdis ¹³	.0005			.0001			.0035			.0814			.92			.0189			.0432		
GENEPOP ¹⁴	.000111			.00002			.002217			.002927			.4692			.01562			.001578		

Abbreviations: H, histidine allotype of FcγRIIIa-131; R, arginine allotype of FcγRIIIa-131; F, phenylalanine allotype of FcγRIIIa-158; V, valine allotype of FcγRIIIa-158; NA, not applicable, due to theoretical number < 5.

*Control population of blood donors in Tours, France.

†Absolute number of individuals having the combined genotype and percentage of the FcγRIIIa-158 genotype group within each the FcγRIIIa-131 genotype group.

Julien Lejeune

Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6239, Génétique Immunothérapie Chimie et Cancer; Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

Gilles Thibault

Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6239, Génétique Immunothérapie Chimie et Cancer; Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, Laboratoire d'Immunologie, Tours; Université d'Auvergne-Clermont 1, Clermont-Ferrand, France

David Ternant

Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6239, Génétique Immunothérapie Chimie et Cancer; Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

Guillaume Cartron

L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U847, Biothérapies des cellules souches normales et cancéreuses and Centre Hospitalier Universitaire Lapeyronie, Service d'Hématologie et Biothérapies, Montpellier, France

Hervé Watier

Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6239, Génétique Immunothérapie Chimie et Cancer; Université François-Rabelais de Tours, France; Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, Laboratoire d'immunologie, Tours, France

Marc Ohresser

Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6239, Génétique Immunothérapie Chimie et Cancer; Université François-Rabelais de Tours, Tours, France

ACKNOWLEDGMENT

Supported by the Institut National du Cancer and Canceropôle Grand Ouest, and the Fondation Langlois. Julien Lejeune is granted by the Région Centre.

AUTHORS' DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al: Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99:754-758, 2002
- Weng WK, Levy R: Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21:3940-3947, 2003
- Ghielmini M, Rufibach K, Salles G, et al: Single agent rituximab in patients with follicular or mantle cell lymphoma: Clinical and biological factors that are predictive of response and event-free survival as well as the effect of rituximab on the immune system: A study of the Swiss Group for Clinical Cancer Res (SAKK). *Ann Oncol* 16:1675-1682, 2005
- Treon SP, Hansen M, Branagan AR, et al: Polymorphisms in FcγRIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 23:474-481, 2005
- Kim DH, Jung HD, Kim JG, et al: FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 108:2720-2725, 2006
- Foster C, Harris K, Ostland M, et al: FCGR3A V/F polymorphism does not predict response to Herceptin (H) monotherapy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 21:57a, 2002 (abstr 227)
- Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, et al: FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol* 25:3712-3718, 2007
- Musolino A, Naldi N, Bortesi B, et al: Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 26:1789-1796, 2008
- Bibeau F, Crapez E, Di Fiore F, et al: Association of FcγRIIa and FcγRIIIa polymorphisms with clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients (mCRC) treated with cetuximab and irinotecan. *J Clin Oncol* 26:579s, 2008 (suppl; abstr 11004)
- Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, et al: Variant genotypes of the low-affinity Fcγ receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcγ receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood* 94:4220-4232, 1999
- Ternant D, Ohresser M, Thomas C, et al: Dose-response relationship and pharmacogenetics of anti-RhD monoclonal antibodies. *Blood* 106:1503-1504, 2005

Correspondence

12. van der Pol WL, Jansen MD, Sluiter WJ, et al: Evidence for non-random distribution of Fcγ receptor genotype combinations. *Immunogenetics* 55:240-246, 2003

13. Black WC, Krafusur ES: A FORTRAN program for the calculation and analysis of two-locus linkage disequilibrium coefficients. *Theor Appl Genet* 70:491-496, 1985

14. Raymond M, Rousset F. Genepop (version 1.2): A population genetics software for exact test and ecumenicism. *J Heredity* 86:248-249, 1995

15. S-Plus 6 User's Guide. Insightful Corporation, Seattle, WA, 2002

16. Long SJ: Regression models for categorical and limited dependent variables. Thousand Oaks, CA, Sage Publications, 1997

17. Sibérlil S, Dutertre CA, Fridman WH, et al: FcγR: The key to optimize therapeutic antibodies? *Crit Rev Oncol Hematol* 62:26-33, 2007

DOI: 10.1200/JCO.2008.19.4118; published online ahead of print at www.jco.org on October 27, 2008



D. Discussion

La plupart des études s'accordent sur le fait que le génotype *FCGR3A-158VV* est associé à une meilleure réponse clinique, que ce soit avec le rituximab (Cartron *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2006 ; Weng *et al.*, 2003), le cétuximab (Zhang *et al.*, 2007 ; Bibeau *et al.*, 2008) ou le trastuzumab (Musolino *et al.*, 2008). En revanche l'association du polymorphisme H131R avec la réponse clinique reste encore discutée. Des études ont en effet montré l'association de ce dernier, soit indépendamment (Weng *et al.*, 2003), soit combiné avec le polymorphisme V158F, avec la réponse clinique au rituximab ou au trastuzumab (Musolino *et al.*, 2008). L'étude de ce polymorphisme apparaît pertinente dans les études d'association avec la réponse aux anticorps thérapeutiques notamment du fait de la différence d'affinité des deux alloformes de FcγRIIA pour les IgG1 (Bruhns *et al.*, 2008).

Comme nous l'avons montré en utilisant une méthodologie adaptée, il existe dans certains cas un déséquilibre de liaison entre ces deux locus, tendant à associer préférentiellement les génotypes *FCGR3A-158VV* et *FCGR2A-131HH*. Il en résulte donc que, dans certaines études, l'association de *FCGR2A-131 HH* avec une meilleure réponse clinique est probablement le résultat de son association avec le génotype *FCGR3A-158VV*. Au cours de ce travail nous n'avons malheureusement pas pu analyser de façon précise les résultats de génotypage publiés par Musolino *et al* et montré l'existence d'un déséquilibre de liaison dans cette cohorte de patients. Néanmoins, du fait de l'origine géographique de ces patients, il est fort probable que celui-ci existe.

En revanche à partir des données cliniques, et de génotypage, disponibles de l'étude de Musolino *et al.*, nous avons effectué une régression logistique et montré que seul le facteur FcγRIIA demeure associé à la réponse thérapeutique au trastuzumab. Il semble donc que sur l'ensemble des études publiées seule l'étude publiée par Weng *et al.* rapporte un effet propre du FcγRIIA dans la réponse aux anticorps thérapeutiques. Ces observations soulèvent donc la question de la réelle implication du récepteur FcγRIIA dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques et de la réelle association du polymorphisme *FCGR2A-H131R* avec celle-ci. La seule différence d'affinité entre les deux alloforme ne semble pas être suffisante pour influencer la réponse aux anticorps thérapeutiques et on pourrait tout à fait envisager que

cette liaison ne soit que la conséquence d'un nouveau déséquilibre de liaison avec un polymorphisme environnant. Dans ce sens, des études sont actuellement menées au sein de notre équipe sur des polymorphismes du promoteur de *FCGR2A* qui pourraient influencer la densité de FcγRIIA à la surface cellulaire et qui pourraient être en déséquilibre de liaison avec le polymorphisme *FCGR2A*-H131R.

Discussion

Au cours de mon travail de thèse, les investigations que j'ai menées dans le domaine de la génomique se sont portées vers l'étude de l'évolution du cluster codant les récepteurs FcγRs de faible affinité chez les mammifères.

J'ai ainsi procédé à une analyse phylogénétique des gènes codant les récepteurs de faible affinité pour les IgG (FcγRs) et j'ai montré qu'il existait de grandes différences entre l'homme et les autres mammifères en terme de nombre de gènes codant ces récepteurs et en terme de caractéristiques de ces derniers. A première vue, il peut paraître étonnant pour un laboratoire travaillant sur la pharmacologie des anticorps thérapeutiques de s'intéresser à ce genre de problématique. En effet, l'objectif principal de la phylogénie étant de retracer les relations généalogiques entre des gènes, et donc des espèces qui les portent, nous sommes loin du cadre de l'étude des anticorps thérapeutiques et de leur mécanisme d'action chez l'homme. En réalité, si l'on se penche quelque peu sur les informations apportées par nos analyses phylogénétiques, nous nous apercevons que cette approche est riche d'enseignements.

Le premier type d'information que nous ont apporté nos analyses, ce sont les relations existantes entre nos gènes d'intérêt en terme de paralogie et d'orthologie. Jusqu'à présent très peu d'informations étaient disponibles sur les orthologues des gènes *FCGR* humains et les différences de nomenclature observées entre les espèces ne facilitaient pas la situation. Par exemple en 2006, Aitman *et al.*, ont publié un article montrant que le nombre de copies du gène *Fcgr3* chez le rat prédispose à la survenue de glomérulonéphrite (Aitman *et al.*, 2006). En voulant transposer ces observations à l'homme, ils ont étudié le gène *FCGR3B* alors que, comme nous l'avons montré, le véritable orthologue humain de *Fcgr3* est *FCGR2A*, et la physiologie du récepteur qu'il code (ITAM-like, au lieu d'association à FcR-γ pour FcγRIII et ancre GPI pour FcγRIIB) est bien différente. Notre analyse nous a donc permis de clarifier les relations entre ces différentes orthologies et de dresser un panorama clair de la situation de ces gènes chez les différentes espèces de mammifères. Dans le cadre de notre problématique sur les anticorps thérapeutiques, elle nous a permis de mieux évaluer les modèles animaux utilisés dans les études pré-cliniques. Les modèles murin apparaissent les plus éloignés de la situation observée chez l'homme notamment du fait de l'absence de *FCGR2A*, néanmoins étant donné l'affinité des FcγRs murins pour les IgG1 humaines (Clynes *et al.*, 2000), ces modèles restent tout de même pertinents lors d'études de preuve de concept d'anticorps thérapeutiques. Le modèle macaque, utilisé dans les études toxicologiques apparaît quant à lui

plus problématique, notamment du fait de l'absence des gènes *FCGR2C* et *FCGR3B*. De plus, il semble qu'il existe des différences au niveau de la physiologie des FcγRs de macaque par rapport à l'homme, comme en témoigne la non-survenue d'événements thrombotiques lors d'injection d'IgG1 humaine anti-CD40 ligand (Kirk *et al.*, 2000). Comme nous l'avons montré dans cette thèse, il existe entre les macaques rhésus et cynomolgus une différence en terme d'acide aminés contenus dans l'espaceur du motif ITAM-like de FcγRIIA. Celle-ci pourrait expliquer le fait que des singes cynomolgus (12 acides aminés) aient développé des complications suite à l'injection d'une IgG1 murine anti-CD40 ligand (Kawai *et al.*, 2000) alors que l'injection de cet anticorps sous sa humaine chez le singe rhesus (11 acides aminés) n'a pas entraîné d'effets indésirables (Kirk *et al.*, 1999). Une connaissance plus approfondie de l'expression et du fonctionnement des FcγRs de macaques, semble donc requise pour pouvoir évaluer le mieux possible leur utilisation dans les études pré-cliniques des anticorps thérapeutiques. Le deuxième type d'information apporté par cette analyse concerne les caractéristiques du cluster *FCGR2/3* humain. A une échelle différente, notre analyse se rapproche des stratégies d'évolution-développement (« évo-dévo ») mises en place dans le domaine des gènes du développement et dans lesquelles on cherche à comprendre ce qui se passe chez l'homme, en mettant à jour la situation dans des espèces (Gehring *et al.*, 2009). Dans notre cas, en étudiant des espèces comme la souris et le macaque, nous avons compris les mécanismes ayant abouti à la formation du cluster humain. Ces informations nous permettent donc de mieux appréhender l'étude génétique de ce cluster et permet de comprendre certains phénomènes se produisant chez l'homme comme la variation de nombre de copies.

Au cours de notre analyse phylogénétique, nous avons également mis en évidence qu'au milieu du cluster de gènes codant les FcγRs de faible affinité, se trouvent un ou des gènes codant des protéines HSP (*HSPA6* et/ou *HSPA7*). Etant donné le rôle prépondérant des protéines HSP (*Heat shock protein*) dans la régulation des fonctions physiologiques, il apparaît légitime de se demander si les gènes *HSP* que nous avons mis en évidence peuvent intervenir dans la physiologie des FcγRs. Des résultats ont montré que l'expression du gène *HSPA6* est strictement inductible en condition de stress cellulaire et que la protéine HSP70 résultant de l'expression de ce gène, pouvait être considéré comme un marqueur de stress cellulaire (Noonan *et al.*, 2007). Une étude a récemment mis en évidence une association entre la transcription du gène *FCGR2A* et la transcription du gène *HSPA6* dans des conditions

de stress oxydatif et inflammatoire, (Diego *et al.*, 2007), suggérant une régulation transcriptionnelle commune des gènes *HSPA6* voir *HSPA7* et des gènes *FCGR2/3*. Au vue de nos résultats qui montrent que *FCGR2A* et *HSPA6* sont dans les mêmes orientations, il est dès lors possible d'imaginer un mécanisme régulant simultanément la transcription de ces deux gènes. De plus il a été montré que l'activation des FcγRs de monocytes par des complexes immuns, entraîne une activation de la transcription du gène *HSPA6* qui est indispensable à la synthèse d'IL1 par les monocytes (Hammad *et al.*, 2009), suggérant donc un rôle primordial des protéines HSP dans les fonctions effectrices médiées par les FcγRs. On peut également envisager que lors de l'acquisition des gènes *FCGR2C* et *FCGR3B*, le gène *HSPA7* ait été modelé pour pouvoir contrôler la régulation de *FCGR2C*. Des études ont rapporté que le gène *HSPA7* peut être considéré comme un pseudogène (Parsian *et al.*, 2000 ; Leung *et al.*, 1992) et il est tout à fait envisageable d'imaginer que ce pseudogène ne soit qu'un variant allélique du gène *HSPA7* qui serait en déséquilibre de liaison avec l'allèle *FCGR2C*STOP*.

De plus, il n'est pas étonnant de trouver ces gènes codant des protéines *HSP* au sein du cluster *FCGR2/3*. En effet, ce cluster est un paralogue du CMH de classe III situé sur le chromosome 6 et ces derniers se caractérisent pour la plupart par la présence à proximité de gènes codant des protéines *HSP*. La plupart des gènes contenus dans ces paralogues de CMH de classe III interviennent dans des fonctions physiologiques importantes notamment du système immunitaire et il existe des liens entre l'expression de ces gènes et celle des gènes *HSP* situés à proximité (Milner *et al.*, 1990) (Figure 43). Dans ce sens, il est intéressant de noter que beaucoup de gènes situés dans ces cluster en paralogie avec le CMH de classe III, présentent des variations de nombre de copies. C'est le cas par exemple pour le gène codant la fraction C4 du complément qui se situe dans une région de paralogie du CMH de classe III et pour lequel des variations de nombre de copies ont été mis en évidence (Figure 43) (Wu *et al.*, 2007).

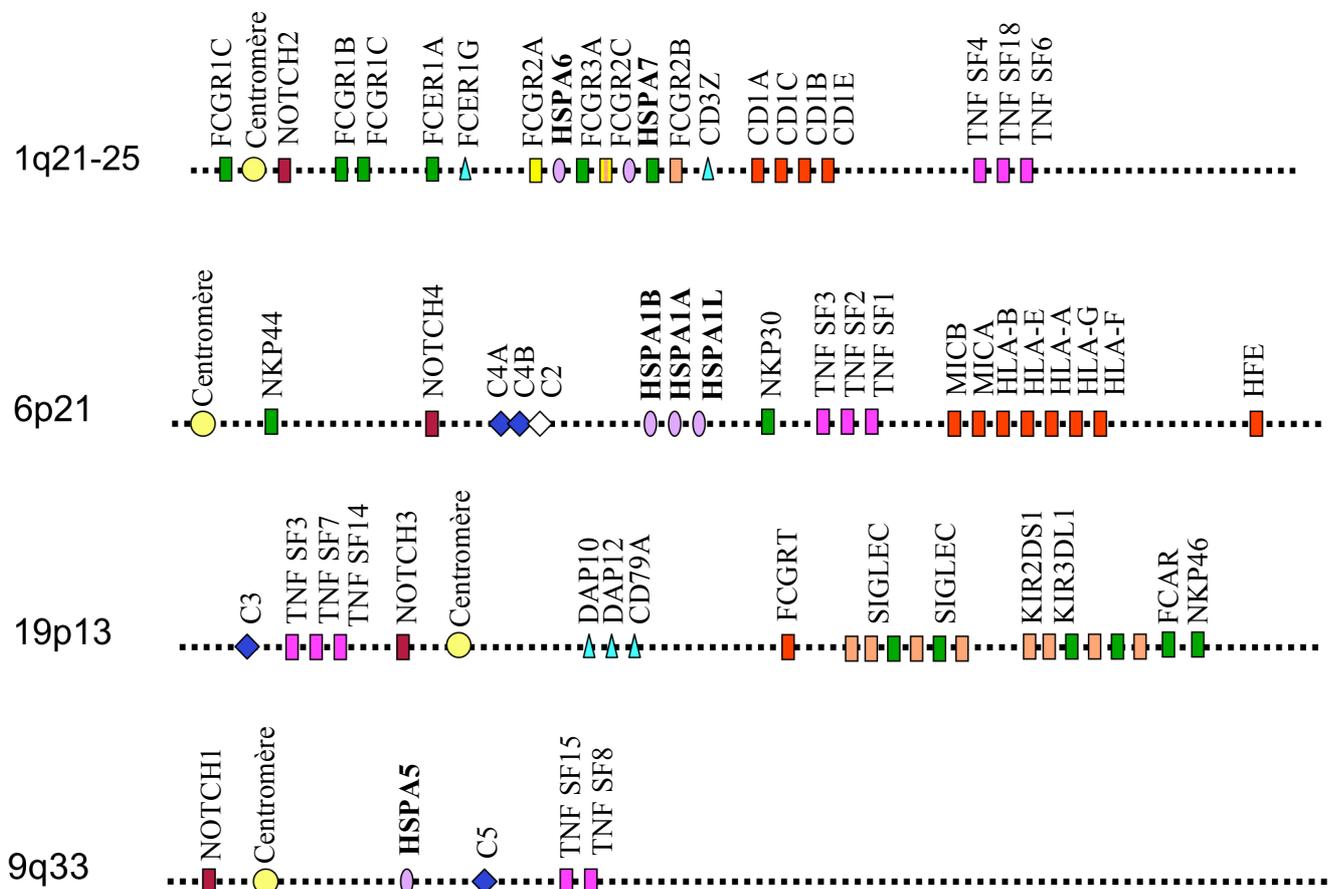


Figure 43 : Paralogues du CMH de classe III et gènes *HSP*. Les paralogues du CMH de classe III contiennent un certain nombre de gènes du système immunitaire et la majorité comportent à leurs côtés des gènes *HSP*

Au cours de mon travail de thèse, mes investigations dans le domaine de la génétique se sont portées plus précisément sur les gènes *FCGR2A* et *FCGR2C* qui, au sein du cluster *FCGR2/3*, encadrent le gène *FCGR3A*.

J'ai montré que le gène *FCGR2A*, qui code un récepteur activateur possédant un motif ITAM-like, est spécifique des primates. Chez l'homme, la différence entre ce motif ITAM-like et les ITAM canoniques est connue depuis longtemps (Van den Herik-Oudijk *et al.*, 1995), mais nous sommes les premiers à montrer que ce motif ITAM-like est retrouvé chez tous les primates et qu'il provient de l'insertion d'un élément rétroviral. Cette insertion a permis grâce à un mécanisme que nous avons dénommé KIRI (*knock-in-type retroviral element integration*) d'inactiver le gène inhibiteur *FCGR3i* et permis parallèlement l'acquisition d'un nouvel exon C3 codant pour le motif ITAM-like. Chez l'homme, FcγRIIA est notamment retrouvé à la surface des plaquettes et beaucoup d'observations le désignent comme responsable des complications thrombotiques observées lors de l'injection de certains anticorps thérapeutiques (Mirabet *et al.*, 2007). Étant donné que l'administration de ces anticorps sous forme d'IgG1 humaine à des macaques rhésus n'a pas provoqué d'effets indésirables (Kirk *et al.*, 1999), il serait intéressant de déterminer l'expression plaquettaire du récepteur FcγRIIA chez différentes espèces de primates. Il est intéressant de noter que lors de l'injection d'une IgG1 humaine anti-CD40L, des effets indésirables ont été détectés chez le cynomolgus (Kawai *et al.*, 2000) alors que l'injection d'une IgG1 murine anti-CD40L chez le singe rhésus n'a pas provoqué d'effets secondaires (Kirk *et al.*, 1999). Cette différence pourrait à première vue être expliquée par une expression différentielle du FcγRIIA plaquettaire entre ces deux espèces mais cette hypothèse est fortement remise en cause par le fait que des études ont rapportées l'expression de FcγRIII à la surface de plaquette de porc (Mulot *et al.*, 2009). Une différence au niveau de la fixation des IgG est également peu probable car il s'agit là de deux genres de macaques et il y a peu de chances pour que celles-ci divergent au niveau des résidus impliqués dans la fixation aux IgG. Lors de nos analyses, nous avons mis en évidence des différences concernant le nombre de résidus de l'espaceur de l'ITAM-like du FcγRIIA de rhésus (11 résidus) et du FcγRIIA du cynomolgus (12 résidus). Cette différence de résidus du motif ITAM-like pourrait entraîner une différence d'activation plaquettaire et potentiellement expliquer les différences entre singes rhésus et cynomolgus lors de l'injection d'anti-CD40L.

J'ai également montré que le polymorphisme *FCGR2A*-H131R est en déséquilibre de liaison avec le polymorphisme *FCGR3A*-V158F et que ceci explique dans bon nombre de cas l'association entre *FCGR2A*-H131R et la réponse aux anticorps thérapeutiques. Néanmoins, ces observations ne veulent pas pour autant dire que le récepteur FcγRIIA n'intervient pas dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques et, même s'il ne s'agit que de preuves indirectes, des arguments plaident dans ce sens. Lors de l'injection d'une IgG1 murine anti-CD8, une parfaite concordance a été observée entre la déplétion en cellules CD8+ observées chez les patients et la présence de l'alloforme FcγRIIA-131R (Wee *et al.*, 1989). De plus, seuls les patients porteurs du génotype *FCGR2A*-131R ont présenté une lymphopénie après injection de l'anticorps de WT31, à nouveau une IgG1 murine anti-TCR (Buysmann *et al.*, 1997). Enfin, il a été montré une association entre le génotype *FCGR2A*-131R/R et la réponse clinique à une IgG3 murine anti-ganglioside utilisée dans le cas du traitement de neuroblastome (Nai-Kong *et al.*, 2006) suggérant ainsi que ce récepteur intervient dans les mécanismes d'action des anticorps thérapeutiques. Au vu de ces différentes données, il convient donc de poursuivre des investigations en vue de comprendre plus précisément l'implication de FcγRIIA dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques. Ces études pourront porter sur l'identification et l'étude de nouveaux polymorphismes ayant des répercussions fonctionnelles et qui peuvent potentiellement être de bons candidats pour de futures études d'association. Dans ce sens des études sont actuellement menées au sein de notre laboratoire sur des polymorphismes du promoteur de *FCGR2A*, dont certains ont été rapportés comme associés au lupus érythémateux (Harley *et al.*, 2008) et qui pourraient potentiellement être à l'origine d'une différence dans la densité de FcγRIIA présent à la surface cellulaire (Rosenfeld *et al.*, 1986 ; Looney *et al.*, 1988).

J'ai également étudié de façon extensive le gène *FCGR2C* et montré notamment que celui-ci n'est présent que chez l'homme, le chimpanzé et le gorille. Le récepteur FcγRIIC se caractérise, comme FcγRIIA, par la présence d'un motif ITAM-like et ne présente qu'un profil d'expression très restreint (Morel *et al.*, 1999). Chez l'homme, ce gène est soumis à un polymorphisme de substitutions entraînant chez la plupart des individus l'absence de FcγRIIC à la surface des cellules NK. Dans ces conditions, il est logique de se poser la question d'une réelle utilité de ce récepteur dans le système immunitaire humain. Malgré tout, il semble que, lorsqu'il est présent, ce récepteur intervienne dans l'ADCC exercée par les

lymphocytes NK comme l'ont montrés Metes *et al.* (Metes *et al.*, 2001). Lors de nos analyses phylogénétiques, ce polymorphisme *FCGR2C**ORF/STOP n'a pas été trouvé chez le chimpanzé et chez le gorille et nous allons poursuivre ces investigations en analysant grâce notre approche de pyroséquencage le polymorphisme ORF/STOP ainsi que la variation de nombre de copies de *FCGR2C* chez plusieurs individus de ces espèces.

Lors de mon travail, j'ai donc développé une approche de pyroséquencage permettant d'étudier simultanément le polymorphisme *FCGR2C*-ORF/STOP et les variations du nombre de copies de *FCGR2C*. Cette approche se révèle originale du fait que s'est la première fois que le pyroséquencage est utilisé afin d'étudier simultanément le nombre de copies et les polymorphismes alléliques d'un gène d'intérêt. A partir de l'analyse d'une cohorte de témoins, nous avons montré une association préférentielle entre l'allèle *FCGR3A*-158V et l'allèle *FCGR2C*-ORF. Même si cette liaison doit être confirmée par le biais d'une méthode d'analyse adaptée permettant de prendre en compte les variations de nombre de copies et les polymorphismes alléliques (Locke *et al.*, 2006). Cette liaison nous amène à penser qu'il existe probablement deux types d'haplotypes présents chez l'homme et faisant intervenir les polymorphismes *FCGR2A*-H131R, *FCGR3A*-V158F et *FCGR2C*-ORF/STOP. Tout d'abord un haplotype associant les allèles *FCGR2A*-131R, *FCGR3A*-158V et *FCGR2C*-ORF serait « favorable » dans le contexte de la réponse aux anticorps thérapeutiques, mais en revanche « défavorable » dans le contexte de la prédisposition à certaines maladies auto-immunes faisant intervenir des anticorps cytolytiques. En effet, chacun de ces polymorphismes prédispose à certaines maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde ou les thrombopénies auto-immunes (Kastbom *et al.*, 2005; Breunis *et al.*, 2008). D'autre part, il y aurait donc un haplotype « défavorable » pour la réponse aux anticorps thérapeutiques associant les allèles *FCGR2A*-131H, *FCGR3A*-158F et *FCGR2C*-STOP. Cet haplotype serait également défavorable pour le système immunitaire lorsqu'il s'agit d'éliminer des complexes immuns et c'est ce qui explique probablement l'association des polymorphismes *FCGR3A*-158F/F et *FCGR2A*-H/H avec la survenue de lupus érythémateux (Jönsen *et al.*, 2007 ; Pan *et al.*, 2008).

Dans le contexte de la réponse aux anticorps thérapeutiques, de nouvelles associations peuvent probablement être identifiées par le biais de l'approche gène-candidat. Les gènes contenus dans les paralogues de CMH de classe III apparaissent comme de bons candidats comme par exemple le gène *FCGRT* codant le récepteur FcRn (Figure 43) qui pourraient être impliqués dans la pharmacocinétique des anticorps thérapeutiques. L'identification de nouveaux gènes impliqués dans la variabilité de la réponse aux anticorps thérapeutiques pourrait également passer par des approches pan-génomiques qui permettraient d'étudier simultanément plusieurs régions génomiques ainsi que de nombreux polymorphismes génétiques inclus dans ces régions. De plus certaines d'entre-elles comme la technique Illumina permettent également d'effectuer des mesures du nombre de copie des gènes étudiés (Peiffer *et al.*, 2006). Ces approches requièrent en revanche de cibler spécifiquement des régions génomiques présentant des variations de type SNPs et des variations de nombre de copies, et là aussi les régions génomiques contenant les paralogues de CMH de classe III pourraient être des cibles d'intérêt.

Bibliographie

Bibliographie

A

Aitman TJ, Dong R, Vyse TJ, Norsworthy PJ, Johnson MD, Smith J, Mangion J *et al.*
Copy number polymorphism in Fcgr3 predisposes to glomerulonephritis in rats and humans.
Nature. 2006 ; 439(7078):851-5.

Akllilu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M.
Frequent distribution of ultrarapid metabolizers of debrisoquine in an ethiopian population
carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles.
J Pharmacol Exp Ther. 1996 ; 278(1):441-6.

Amzel LM, Poljak RJ.
Three-dimensional structure of immunoglobulins.
Annu Rev Biochem. 1979 ; 48:961-97.

B

Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D' Haens G, Carbonez A, Rutgeerts P.
Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease.
N Engl J Med. 2003 ; 348(7):601-8.

Barrow AD, Trowsdale J.
You say ITAM and I say ITIM, let's call the whole thing off: the ambiguity of
immunoreceptor signalling. *Eur J Immunol*. 2006 ;36(7):1646-53.

Beyersdorf N, Hanke T, Kerkau T, Hünig T.
Superagonistic anti-CD28 antibodies: potent activators of regulatory T cells for the therapy of
autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*. 2005 ;64 Suppl 4:iv91-5.

- Bi W**, Sapir T, Shchelochkov OA, Zhang F, Withers MA, Hunter JV, Levy T *et al.*
Increased LIS1 expression affects human and mouse brain development. *Nat Genet.* 2009 ; 41 (2) : 168-77.
- Boumpas DT**, Furie R, Manzi S, Illei GG, Wallace DJ, Balow JE *et al.*
A short course of BG9588 (anti-CD40 ligand antibody) improves serologic activity and decreases hematuria in patients with proliferative lupus glomerulonephritis.
Arthritis Rheum. 2003 ;48(3):719-27.
- Brasch-Andersen C**, Christiansen L, Tan Q, Haagerup A, Vestbo J, Kruse TA.
Possible gene dosage effect of glutathione-S-transferases on atopic asthma: using real-time PCR for quantification of GSTM1 and GSTT1 gene copy numbers.
Hum Mutat. 2004 ; 24 (3) : 208-14.
- Breunis WB**, van Mirre E, Bruin M, Geissler J, de Boer M, Peters M, Roos D *et al.*
Copy number variation of the activating FCGR2C gene predisposes to idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2008 ; 111(3):1029-38.
- Breunis WB**, van Mirre E, Geissler J, Laddach N, Wolbink G, van der Schoot E *et al.*
Copy number variation at the FCGR locus includes FCGR3A, FCGR2C and FCGR3B but not FCGR2A and FCGR2B. *Hum Mutat.* 2009 ; 30(5):E640-50.
- Brooks DG**, Qiu WQ, Luster AD, Ravetch JV.
Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp Med* 1989 ; 170 : 1369-85.
- Bux J**, Stein EL, Bierling P, Fromont P, Clay M, Stroncek D, Santoso S.
Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fc gamma receptor IIIb. *Blood.* 1997 ; 89(3) : 1027-34.
- Buysmann S**, Schellekens PT, Tax WJ, ten Berge IJ.
Different CD3/T cell receptor monoclonal antibodies have distinct capacities to induce adhesion of T lymphocytes to endothelium. *Lab Clin Med.* 1997 ;130(1):91-101.

C

Carlsson LE, Santoso S, Baurichter G, Kroll H, Papenberg S, Eichler P *et al.* Heparin-induced thrombocytopenia: new insights into the impact of the FcγRIIIa-R-H131 polymorphism. *Blood*. 1998 ; 92(5) : 1526-31.

Carter DL, Shieh TM, Blosser RL, Chadwick KR, Margolick JB, Hildreth JE *et al.* CD56 identifies monocytes and not natural killer cells in rhesus macaques. *Cytometry*. 1999 ;37(1):41-50.

Carter P.

Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies.

Nat Rev Cancer. 2001 ; 1(2):118-29.

Cartron G, Dacheux L, Salles G *et al.* Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002, 99:754-758.

Cheung NK, Sowers R, Vickers AJ, Cheung IY, Kushner BH, Gorlick R.

FCGR2A polymorphism is correlated with clinical outcome after immunotherapy of neuroblastoma with anti-GD2 antibody and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Oncol*. 2006 ;24(18):2885-90.

Clark MR, Clarkson SB, Ory PA, Stollman N, Goldstein IM.

Molecular basis for a polymorphism involving Fc receptor II on human monocytes. *J Immunol*. 1989 ; 143(5) : 1731-4.

Clarkson SB, Kimberly RP, Valinsky JE, Witmer MD, Bussel JB, Nachman RL *et al.*

Blockade of clearance of immune complexes by an anti-Fc gamma receptor monoclonal antibody. *J Exp Med*. 1986 ;164(2):474-89.

Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV.

Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets.

Nat Med. 2000 ;6(4):443-6.

Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R *et al.*

CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 235-42.

Collins RA, Gelder KI, Howard CJ.

Nucleotide sequence of cattle FcGRIII: its identification in gammadelta T cells.

Immunogenetics. 1997 ;45(6):440-3.

Congy-Jolivet N, Bolzec A, Ternant D, Ohresser M, Watier H, Thibault G.

Fc gamma RIIIA expression is not increased on natural killer cells expressing the Fc gamma RIIIA-158V allotype. *Cancer Res*. 2008 ; 68(4) : 976-80.

Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD *et al.*

Origins and functional impact of copy number variation in the human genome.

Nature. 2009 Oct 7.

Coosemans V, Hadji-Azimi I.

Partial characterization of different cell types found in the *Xenopus laevis* lymphoreticular tumor based on the presence or absence of surface immunoglobulins and Fc molecules. *Dev Comp Immunol*. 1986 ; 10(4) : 547-59.

Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A *et al.*

Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004 ; 351: 337-45.

D

Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P *et al.*

Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 4664-9.

Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F.

Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 ; 274(1):516-20.

de Haas M, Kleijer M, van Zwieten R, Roos D, von dem Borne AE.

Neutrophil Fc gamma RIIIB deficiency, nature, and clinical consequences: a study of 21 individuals from 14 families. *Blood.* 1995 ; 86 (6) : 2403-13.

de Haas M, Koene HR, Kleijer M, de Vries E, Simsek S, van Tol MJ *et al.*

A triallelic Fc gamma receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc gamma RIIIa. *J Immunol.* 1996 ; 156(8) : 2948-55.

Diego VP, Rainwater DL, Wang XL, Cole SA, Curran JE, Johnson MP, Jowett JB *et al.*

Genotype x adiposity interaction linkage analyses reveal a locus on chromosome 1 for lipoprotein-associated phospholipase A2, a marker of inflammation and oxidative stress.

Am J Hum Genet. 2007 ;80(1):168-77.

Dutertre CA, Bonnin-Gélizé E, Pulford K, Bourel D, Fridman WH, Teillaud JL.

A novel subset of NK cells expressing high levels of inhibitory FcγRIIB modulating antibody-dependent function. *J Leukoc Biol.* 2008 ; 84(6):1511-20.

E

Ellis LM.

Mechanisms of action of bevacizumab as a component of therapy for metastatic colorectal cancer. *Semin Oncol.* 2006 ; 33(5 Suppl 10) : S1-7.

Ernst LK, Metes D, Herberman RB, Morel PA.

Allelic polymorphisms in the FcγRIIC gene can influence its function on normal human natural killer cells. *J Mol Med.* 2002 ; 80(4):248-57.

F

Fakhr Rai-H, Pourmand N, Ronaghi M.

Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms.

Hum Mutat. 2002 ; 19(5):479-85.

Fanciulli M, Norsworthy PJ, Petretto E, Dong R, Harper L, Kamesh L et al.

FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat Genet.* 2007 ; 39 (6) : 721-3.

Feuk L, Carson AR, Scherer SW.

Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 2006 ; 7(2) : 85-97.

G

Gehring WJ, Kloter U, Suga H.

Evolution of the Hox gene complex from an evolutionary ground state.

Curr Top Dev Biol. 2009;88:35-61.

Goidts V, Cooper DN, Armengol L, Schempp W, Conroy J, Estivill X, Nowak N *et al.*

Complex patterns of copy number variation at sites of segmental duplications: an important category of structural variation in the human genome. *Hum Genet.* 2006 ; 120(2) : 270-84.

Goldstein G, Fuccello AJ, Norman DJ, Shield CF 3rd, Colvin RB, Cosimi AB.

OKT3 monoclonal antibody plasma levels during therapy and the subsequent development of host antibodies to OKT3. *Transplantation.* 1986 ; 42(5):507-11.

Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J.

Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res.* 1995 ; 1(11):1311-8.

Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, Mangano A, Sanchez R, Catano G *et al.*

The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science.* 2005 ; 307 (5714) : 1434-40.

Greenwood J, Clark M, Waldmann H.

Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions.

Eur J Immunol. 1993 ; 23(5):1098-104.

Grundy HO, Peltz G, Moore KW, Golbus MS, Jackson LG, Lebo RV.

The polymorphic Fc gamma receptor II gene maps to human chromosome 1q.

Immunogenetics 1989 ; 29 : 331-9.

H

Halloran PJ, Sweeney SE, Kim YB.

Biochemical characterization of the porcine Fc gamma RIII alpha homologue G7.

Cell Immunol. 1994 ; 158(2):400-13.

Hamerman JA, Tchao NK, Lowell CA, Lanier LL.

Enhanced Toll-like receptor responses in the absence of signaling adaptor DAP12.

Nat Immunol. 2005 ; 6(6):579-86.

Hammad SM, Twal WO, Barth JL, Smith KJ, Saad AF, Virella G, Argraves WS *et al.*

Oxidized LDL immune complexes and oxidized LDL differentially affect the expression of genes involved with inflammation and survival in human U937 monocytic cells.

Atherosclerosis. 2009 ;202(2):394-404.

Hansen S, Leslie RG.

TGN1412: scrutinizing preclinical trials of antibody-based medicines.

Nature. 2006 18 ; 441(7091):282.

Harley JB, Alarcón-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, Moser KL *et al*.

Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci.

Nat Genet. 2008 ;40(2):204-10.

Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G.

Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet*. 2009 ; 10(8) : 551-64.

Haynes L, Fuller L, McKinney EC.

Fc receptor for shark IgM. *Dev Comp Immunol*. 1988 ; 12(3) : 561-71.

Hollox EJ, Detering JC, Dehnugara T.

An integrated approach for measuring copy number variation at the FCGR3 (CD16) locus.

Hum Mutat. 2009 ;30(3):477-84.

Huang J, Wu X, Montenegro G, Price J, Wang G, Vance JM, Shy ME, Züchner S.

Copy number variations are a rare cause of non-CMT1A Charcot-Marie-Tooth disease.

J Neurol. 2009.

Huizinga TW, Kleijer M, Tetteroo PA, Roos D, von dem Borne AE.

Biallelic neutrophil Na-antigen system is associated with a polymorphism on the phospho-inositol-linked Fc gamma receptor III (CD16). *Blood*. 1990 ; 75(1) : 213-7.

I

Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW, Lee C.

Detection of large-scale variation in the human genome.

Nat Genet. 2004 ; 36(9) : 949-51.

Isashi Y, Yamashita T, Nagasawa S, Murakami M, Uede T.

Molecular cloning and characterization of guinea pig Fc gamma RIII: expression but not function is independent of the gamma chain of Fc epsilon RI.

Int Immunol. 1996 ; 8(9):1335-46

J

Jacobs PA.

Human chromosome heteromorphisms (variants).

Prog Med Genet. 1977 ; 2:251-74.

Jakobovits A, Amado RG, Yang X, Roskos L, Schwab G.

From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol.* 2007 ; 25(10):1134-43.

Jansson M, Rada A, Tomic L, Larsson LI, Wadelius C.

Analysis of the Glutathione S-transferase M1 gene using pyrosequencing and multiplex PCR -no evidence of association to glaucoma. *Exp Eye Res.* 2003 ; 77(2):239-43.

Jönsen A, Gunnarsson I, Gullstrand B, Svenungsson E, Bengtsson AA, Nived O *et al.*

Association between SLE nephritis and polymorphic variants of the CRP and Fc gamma RIIIa genes. *Rheumatology* 2007 ;46(9):1417-21

K

Kalmanson GM, Bronfenbrenner J.

THE REVERSAL OF PNEUMOCOCCUS QUELLUNG BY DIGESTION OF THE ANTIBODY WITH PAPAIN. *Science.* 1942 ; 96(2479):21-22.

Kastbom A, Ahmadi A, Söderkvist P, Skogh T.

The 158V polymorphism of Fc gamma receptor type IIIA in early rheumatoid arthritis: increased susceptibility and severity in male patients (the Swedish TIRA project).

Rheumatology 2005 ;44(10):1294-8.

Kawai T, Andrews D, Colvin RB, Sachs DH, Cosimi AB.

Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nat Med.* 2000 ;6(2):114.

Kazazian HH Jr, Moran JV.

The impact of L1 retrotransposons on the human genome.

Nat Genet. 1998 ; 19 (1) : 19-24.

Kenyon NS, Chatzipetrou M, Masetti M, Ranuncoli A, Oliveira M, Wagner JL *et al.*

Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in rhesus monkeys treated with humanized anti-CD154. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 ;96(14):8132-7.

Kirk AD, Burkly LC, Batty DS, Baumgartner RE, Berning JD, Buchanan K *et al.*

Treatment with humanized monoclonal antibody against CD154 prevents acute renal allograft rejection in nonhuman primates. *Nat Med.* 1999 ;5(6):686-93.

Knosalla C, Gollackner B, Cooper DK.

Anti-CD154 monoclonal antibody and thromboembolism revisited.

Transplantation. 2002 ;74(3):416-7.

Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M.

Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype.

Blood. 1997 ; 90(3) : 1109-14.

Koene HR, Kleijer M, Swaak AJ, Sullivan KE, Bijl M, Petri MA *et al.*

The Fc gammaRIIIA-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus.

Arthritis Rheum. 1998 ; 41(10) : 1813-8.

Koene HR, Kleijer M, Roos D, de Haas M, Von dem Borne AE.

Fc gamma RIIIB gene duplication: evidence for presence and expression of three distinct Fc gamma RIIIB genes in NA(1+,2+)SH(+) individuals. *Blood.* 1998 ; 91 (2) : 673-9.

Köhler G, Milstein C.

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature. 1975 ; 256(5517):495-7.

Kono H, Kyogoku C, Suzuki T, Tsuchiya N, Honda H, Yamamoto K, Tokunaga K, Honda Z. FcgammaRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet*. 2005 ; 14(19) : 2881-92.

Korbel JO, Kim PM, Chen X, Urban AE, Weissman S, Snyder M, Gerstein MB. The current excitement about copy-number variation: how it relates to gene duplications and protein families. *Curr Opin Struct Biol*. 2008 ; 18(3) : 366-74.

Klungland H, Gomez-Raya L, Howard CJ, Collins RA, Rogne S, Lien S.

Mapping of bovine FcgammaR (FCGR) genes by sperm typing allows extended use of human map information. *Mamm Genome*. 1997 ; 8(8):573-7.

Kushner BH, Cheung NK.

Absolute requirement of CD11/CD18 adhesion molecules, FcRII and the phosphatidylinositol-linked FcRIII for monoclonal antibody-mediated neutrophil antihuman tumor cytotoxicity. *Blood*. 1992 ;79(6):1484-90.

L

Lam KW, Jeffreys AJ.

Processes of copy-number change in human DNA: the dynamics of {alpha}-globin gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 ; 103 (24) : 8921-7.

Lee S, Kasif S, Weng Z, Cantor CR.

Quantitative analysis of single nucleotide polymorphisms within copy number variation.

PLoS One. 2008 ; 3(12):e3906.

Lee JA, Carvalho CM, Lupski JR.

A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*. 2007 ; 131 (7) : 1235-47.

Leung TK, Hall C, Rajendran M, Spurr NK, Lim L.

The human heat-shock genes HSPA6 and HSPA7 are both expressed and localize to chromosome 1. *Genomics*. 1992 ;12(1):74-9.

Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM.

Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell*. 2005 ; 7(4):301-11.

Li X, Wu J, Carter RH, Edberg JC, Su K, Cooper GS, Kimberly RP.

A novel polymorphism in the Fc gamma receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum*. 2003 ; 48(11) : 3242-52.

Locke DP, Sharp AJ, McCarroll SA, McGrath SD, Newman TL, Cheng Z et al.

Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *Am J Hum Genet*. 2006 ;79(2):275-90.

Loisel S, Ohresser M, Pallardy M, Daydé D, Berthou C, Cartron G, Watier H.

Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007 ;62(1):34-42.

Looney RJ, Anderson CL, Ryan DH, Rosenfeld SI.

Structural polymorphism of the human platelet Fc gamma receptor. *J Immunol*. 1988 ;141(8):2680-3.

Lupski JR.

Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet*. 1998 ; 14 (10) : 417-22.

Lupski JR, Stankiewicz P.

Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet.* 2005 ; 1 (6) : e49.

M

Magdelaine-Beuzelin C, Pinault C, Pintaud G, Watier H.

Therapeutic antibody in ophthalmology. *Mab* 2010; 2- 176-180.

Malyguine AM, Saadi S, Platt JL, Dawson JR.

Differential expression of natural killer cell markers: human versus baboon. *Transplantation.* 1996 ;62(9):1319-24.

Maresco DL, Chang E, Theil KS, Francke U, Anderson CL.

The three genes of the human FCGR1 gene family encoding Fc gamma RI flank the centromere of chromosome 1 at 1p12 and 1q21. *Cytogenet Cell Genet.* 1996 ; 73(3) : 157-63.

Maresco DL, Blue LE, Culley LL, Kimberly RP, Anderson CL, Theil KS.

Localization of FCGR1 encoding Fc gamma receptor class I in primates: molecular evidence for two pericentric inversions during the evolution of human chromosome 1. *Cytogenet Cell Genet.* 1998 ; 82(1-2) : 71-4.

Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M *et al.*

Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 4265-74.

McKinney C, Merriman ME, Chapman PT, Gow PJ, Harrison AA, Highton J *et al.*

Evidence for an influence of chemokine ligand 3-like 1 (CCL3L1) gene copy number on susceptibility to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008 ; 67 (3) : 409-13.

Mendelsohn J.

Antibody-mediated EGF receptor blockade as an anticancer therapy: from the laboratory to the clinic. *Cancer Immunol Immunother.* 2003 ; 52(5):342-6.

Metes D, Ernst LK, Chambers WH, Sulica A, Herberman RB, Morel PA.

Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcgammaRIIC gene. *Blood.* 1998 ;91(7):2369-80.

Miceli-Richard C, Ohresser M, Comets E, Goupille P, Verstuyft C, Ravaud P *et al.*

Analysis of Fc-gamma-receptor IIa, IIIa and IIIb gene polymorphisms as predictive factors of response to adalimumab in rheumatoid arthritis patients treated in the ReAct study.

70th Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology (ACR), Washington, 10-15 novembre 2006

Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R.

Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody.

N Engl J Med. 1982 ; 306(9):517-22.

Milner CM, Campbell RD.

Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes.

Immunogenetics. 1990;32(4):242-51.

Mirabet M, Barrabés JA, Quiroga A, Garcia-Dorado D.

Platelet pro-aggregatory effects of CD40L monoclonal antibody.

Mol Immunol. 2008 ;45(4):937-44.

Morel PA, Ernst LK, Metes D.

Functional CD32 molecules on human NK cells.

Leuk Lymphoma. 1999 ; 35(1-2) : 47-56.

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):6851-5.

Mourad GJ, Preffer FI, Wee SL, Powelson JA, Kawai T, Delmonico FL *et al.*

Humanized IgG1 and IgG4 anti-CD4 monoclonal antibodies: effects on lymphocytes in the blood, lymph nodes, and renal allografts in cynomolgus monkeys.

Transplantation. 1998 15;65(5):632-41

Muller YA, Chen Y, Christinger HW, Li B, Cunningham BC, Lowman HB, de Vos AM.

VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 Å resolution and mutational analysis of the interface.

Structure. 1998 ; 6(9):1153-67.

Mulot A, Marchand-Arvier M, Vigneron C, Menu P, Lecompte T.

Indirect evidence for a Fc gamma receptor on guinea pig platelets: guinea pig represents a promising species for the investigation of human disorders with immune platelet activation.

Thromb Res. 2009 ;123(4):665-70.

Munn DH, Bree AG, Beall AC, Kaviani MD, Sabio H, Schaub RG *et al.*

Recombinant human macrophage colony-stimulating factor in nonhuman primates: selective expansion of a CD16⁺ monocyte subset with phenotypic similarity to primate natural killer cells. *Blood*. 1996 ;88(4):1215-24.

N

Nadler LM, Stashenko P, Hardy R, Kaplan WD, Button LN, Kufe DW.

Serotherapy of a patient with a monoclonal antibody directed against a human lymphoma-associated antigen. *Cancer Res*. 1980 ; 40(9):3147-54.

Nimmerjahn F, Ravetch JV.

Fcγ receptors: old friends and new family members.

Immunity. 2006 ; 24(1):19-28.

Noonan EJ, Place RF, Giardina C, Hightower LE.

Hsp70B' regulation and function. *Cell Stress Chaperones*. 2007 ;12(4):393-402.

Nuytten H, Wlodarska I, Nackaerts K, Vermeire S, Vermeesch J *et al*.

Accurate determination of copy number variations (CNVs): application to the alpha- and beta-defensin CNVs. *J Immunol Methods*. 2009 ; 344(1):35-44.

O

Ohresser M, Olive D, Vanhove B, Watier H.

Risk in drug trials. *Lancet*. 2006 ;368(9554):2205-6.

Osman N, Kozak CA, McKenzie IF, Hogarth PM.

Structure and mapping of the gene encoding mouse high affinity Fc gamma RI and chromosomal location of the human Fc gamma RI gene. *J Immunol*. 1992 ; 148(5) : 1570-5.

P

Pan F, Tang X, Zhang K, Li X, Xu J, Chen H, Ye DQ.

Genetic susceptibility and haplotype analysis between Fc gamma receptor IIB and IIIA gene with systemic lupus erythematosus in Chinese population. *Lupus*. 2008 ;17(8):733-8.

Parren PW, Warmerdam PA, Boeije LC, Arts J, Westerdaal NA, Vlug A *et al*.

On the interaction of IgG subclasses with the low affinity Fc gamma RIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J Clin Invest*. 1992 ; 90 : 1537-46.

Parsian AJ, Sheren JE, Tao TY, Goswami PC, Malyapa R, Van Rheeden R *et al*.

The human Hsp70B gene at the HSPA7 locus of chromosome 1 is transcribed but non-functional. *Biochim Biophys Acta*. 2000 ;1494(1-2):201-5.

Pasquier B, Launay P, Kanamaru Y, Moura IC, Pfirsch S, Ruffié C *et al*.

Identification of Fc α RI as an inhibitory receptor that controls inflammation: dual role of Fc γ RIITAM. *Immunity*. 2005 ;22(1):31-42.

Peiffer DA, Le JM, Steemers FJ, Chang W, Jenniges T, Garcia F, Haden K, Li J *et al.*
High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res*. 2006 ;16(9):1136-48.

Peltz GA, Grundy HO, Lebo RV, Yssel H, Barsh GS, Moore KW.
Human Fc gamma RIII: cloning, expression, and identification of the chromosomal locus of two Fc receptors for IgG. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 1013-7.

Perry GH, Dominy NJ, Claw KG, Lee AS, Fiegler H, Redon R, Werner J *et al.*
Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation.
Nat Genet. 2007 ; 39(10):1256-60.

Pope CG.

The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. I. True digestion of the proteins. *Br J Exp Pathol*, 1939, 20, 132-149.

Pourmand N, Elahi E, Davis RW, Ronaghi M.
Multiplex Pyrosequencing. *Nucleic Acids Res*. 2002 ; 30(7):e31.

Presta LG, Namenuk AK.

Non-Human primate Fc receptors and methods of use.
Patent Application Publication, 2007, 0106069 A1.

Probst A, Cartron G, Watier H.

Mechanisms of action of recombinant monoclonal antibodies used in oncology.
Bull Cancer 2006 ; hors série : 107-12.

Pukac L, Kanakaraj P, Humphreys R, Alderson R, Bloom M, Sung C *et al.*

HGS-ETR1, a fully human TRAIL-receptor 1 monoclonal antibody, induces cell death in multiple tumour types in vitro and in vivo. *Br J Cancer*. 2005 ; 92(8):1430-41.

Q

Qiu WQ, de Bruin D, Brownstein BH, Pearse R, Ravetch JV.

Organization of the human and mouse low-affinity Fc gamma R genes: duplication and recombination. *Science*. 1990 ; 248(4956) : 732-5.

R

Radaev S, Motyka S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Sun PD.

The structure of a human type III Fc gamma receptor in complex with Fc. *J Biol Chem*. 2001 ;276(19):16469-77.

Rai KR, Freter CE, Mercier RJ, Cooper MR, Mitchell BS, Stadtmauer EA *et al*.

Alemtuzumab in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients who also had received fludarabine. *J Clin Oncol*. 2002 ; 20(18):3891-7.

Ravetch JV, Perussia B.

Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* 1989 ; 170 : 481-97.

Reilly AF, Surrey S, Rappaport EF, Schwartz E, McKenzie SE.

Variation in human FCGR2C gene copy number. *Immunogenetics*. 1994 ; 40 (6) : 456.

Rogers KA, Scinicariello F, Attanasio R.

IgG Fc receptor III homologues in nonhuman primate species: genetic characterization and ligand interactions. *J Immunol*. 2006 ;177(6):3848-56.

Rosenfeld SI, Ryan DH, Looney RJ, Anderson CL, Abraham GN, Leddy JP.

Human Fc gamma receptors: stable inter-donor variation in quantitative expression on platelets correlates with functional responses. *J Immunol.* 1987 ;138(9):2869-73.

S

Salles G, Mounier N, de Guibert S, Morschhauser F, Doyen C, Rossi JF *et al.*

Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood* 2008 ; 112 : 4824-31.

Salmon JE, Edberg JC, Kimberly RP.

Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest.* 1990 ; 85(4) : 1287-95

Scordo MG, Spina E, Facciola G, Avenoso A, Johansson I, Dahl ML.

Cytochrome P450 2D6 genotype and steady state plasma levels of risperidone and 9-hydroxyrisperidone. *Psychopharmacology.* 1999 ; 147(3):300-5.

Seabright M.

A rapid banding technique for human chromosomes.

Lancet. 1971 ; 2(7731) : 971-2.

Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S *et al.*

Large-scale copy number polymorphism in the human genome.

Science. 2004 ; 305 (5683) : 525-8.

Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, Troge J, Lese-Martin C, Walsh T, Yamrom B *et al.*

Strong association of de novo copy number mutations with autism.

Science. 2007 ; 316 (5823) : 445-9.

Sharp AJ, Cheng Z, Eichler EE.

Structural variation of the human genome.

Annu Rev Genomics Hum Genet. 2006 ; 7:407-42.

Shaw CJ, Lupski JR.

Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet.* 2004 ; 13 Spec No 1 : R57-64.

Söderbäck E, Zackrisson AL, Lindblom B, Alderborn A.

Determination of CYP2D6 gene copy number by pyrosequencing.

Clin Chem. 2005 Mar;51(3):522-31.

Stafford JL, Wilson M, Nayak D, Quiniou SM, Clem LW, Miller NW, Bengtén E.

Identification and characterization of a FcR homolog in an ectothermic vertebrate, the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J Immunol.* 2006 ; 177(4) : 2505-17.

Stankiewicz P, Lupski JR.

Genome architecture, rearrangements and genomic disorders.

Trends Genet. 2002 ; 18 (2) : 74-82.

Su K, Wu J, Edberg JC, McKenzie SE, Kimberly RP.

Genomic organization of classical human low-affinity Fcγ receptor genes.

Genes Immun. 2002 ; 3 : S51-6.

Su K, Wu J, Edberg JC, Li X, Ferguson P, Cooper GS, Langefeld CD, Kimberly RP.

A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing FcγRIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. I. Regulatory FCGR2B polymorphisms and their association with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2004 ; 172(11) : 7186-91.

Su K, Li X, Edberg JC, Wu J, Ferguson P, Kimberly RP.

A promoter haplotype of the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing FcγRIIb alters receptor expression and associates with autoimmunity. II. Differential binding of GATA4 and Yin-Yang1 transcription factors and correlated receptor expression and function. *J Immunol.* 2004 ; 172(11) : 7192-9.

Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, Brett SJ, Castello-Cortes A, Brunner MD *et al.*
Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412.
N Engl J Med. 2006 ;355(10):1018-28.

T

Tate BJ, Witort E, McKenzie IF, Hogarth PM.
Expression of the high responder/non-responder human Fc gamma RII. Analysis by PCR and transfection into FcR-COS cells. *Immunol Cell Biol.* ; 70 : 79-87.

Taylor C, Hershman D, Shah N, Suci-Foca N, Petrylak DP, Taub R, Vahdat L *et al.*
Augmented HER-2 specific immunity during treatment with trastuzumab and chemotherapy.
Clin Cancer Res. 2007 ; 13(17):5133-43.

V

Van Den Herik-Oudijk IE, Westerdaal NA, Henriquez NV, Capel PJ, Van De Winkel JG.
Functional analysis of human Fc gamma RII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes.
J Immunol. 1994 ; 152(2) : 574-85.

Van den Herik-Oudijk IE, Ter Bekke MW, Tempelman MJ, Capel PJ, Van de Winkel JG.
Functional differences between two Fc receptor ITAM signaling motifs. *Blood* 1995 ; 86 :
3302-7.

van Egmond M, van Vuuren AJ, Morton HC, van Spriel AB, Shen L, Hofhuis FM *et al.*
Human immunoglobulin A receptor (FcalphaRI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR gamma chain and CR3 (CD11b/CD18). *Blood.* 1999 ;93(12):4387-94.

Vega MI, Huerta-Yepez S, Jazirehi AR, Garban H, Bonavida B.
Rituximab (chimeric anti-CD20) sensitizes B-NHL cell lines to Fas-induced apoptosis.
Oncogene. 2005 ; 24(55):8114-27.

Vincenzi B, Zoccoli A, Pantano F, Venditti O, Galluzzo S.

Cetuximab: from bench to bedside. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010 ; 10(1):80-95.

W

Waibler Z, Sender LY, Merten C, Hartig R, Kliche S, Gunzer M *et al*.

Signaling signatures and functional properties of anti-human CD28 superagonistic antibodies. *PLoS One*. 2008 Mar 5;3(3):e1708.

Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, Addington AM, Pierce SB, Cooper GM *et al*.

Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science*. 2008 ; 320 (5875) : 539-43.

Warmerdam PA, van de Winkel JG, Gosselin EJ, Capel PJ.

Molecular basis for a polymorphism of human Fc gamma receptor II (CD32). *J Exp Med*. 1990 ; 172(1) : 19-25.

Warmerdam PA, van de Winkel JG, Vlug A, Westerdaal NA, Capel PJ.

A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol* 1991 ; 147 : 1338-43.

Warmerdam PA, Nabben NM, van de Graaf SA, van de Winkel JG, Capel PJ.

The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIC gene is a result of an unequal crossover event. *J Biol Chem*. 1993 ; 268(10) : 7346-9.

Wee SL, Colvin RB, Phelan JM, Preffer FI, Reichert TA, Berd D, Cosimi AB.

Fc-receptor for mouse IgG1 (Fc gamma RII) and antibody-mediated cell clearance in patients treated with Leu2a antibody. *Transplantation*. 1989 ;48(6):1012-7.

Willcocks LC, Lyons PA, Clatworthy MR, Robinson JI, Yang W, Newland SA *et al*.

Copy number of FCGR3B, which is associated with systemic lupus erythematosus, correlates

with protein expression and immune complex uptake. *J Exp Med.* 2008 ; 205 (7) : 1573-82.

Wu YL, Savelli SL, Yang Y, Zhou B, Rovin BH, Birmingham DJ *et al.*

Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans.

Am J Hum Genet. 2007 ;80(6):1037-54.

Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly RP.

A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest.* 1997 ; 100(5) : 1059-70.

Y

Yan Y, Zhang G, Chen C, Li X, Li Q.

Bovine FcγRIII with a single extracellular domain.

Res Vet Sci. 2000 ; 68(2):115-8.

Yang Y, Chung EK, Wu YL, Savelli SL, Nagaraja HN, Zhou B, Hebert M *et al.*

Gene copy-number variation and associated polymorphisms of complement component C4 in human systemic lupus erythematosus (SLE): low copy number is a risk factor for and high copy number is a protective factor against SLE susceptibility in European Americans.

Am J Hum Genet. 2007 ; 80(6):1037-54.

Z

Zhang F, Gu W, Hurles ME, Lupski JR.

Copy number variation in human health, disease, and evolution.

Annu Rev Genomics Hum Genet. 2009 ; 10:451-81.

Zhang G, Qiao S, Li Q, Wang X, Duan Y, Wang L, Xiao Z, Xia C.

Molecular cloning and expression of the porcine high-affinity immunoglobulin G Fc receptor (FcγRI). *Immunogenetics*. 2006 ; 58(10):845-9.

Zhou M, Todd RF 3rd, van de Winkel JG, Petty HR.

Cocapping of the leukoadhesin molecules complement receptor type 3 and lymphocyte function-associated antigen-1 with Fc gamma receptor III on human neutrophils. Possible role of lectin-like interactions. *J Immunol*. 1993 ; 150(7) : 3030-41

Annexes

Rôle des récepteurs à la portion Fc des IgG (FcγRs) dans l'activité des anticorps thérapeutiques

Implications of receptors for the Fc portion of IgG (FcγRs) in mechanism of action of therapeutic antibodies

J. Lejeune^{1,2}, G. Thibault^{1,2,3}, G. Cartron⁴, M. Ohresser^{1,2}, H. Watier^{1,2,3}

¹UMR CNRS 6239, génétique, immunothérapie, chimie et cancer, 37200 Tours, France

²Université François-Rabelais de Tours, 10, boulevard Tonnellé, 37032 Tours cedex, France

³Laboratoire d'immunologie, CHRU de Tours, 37044 Tours, France

<watier@med.univ-tours.fr>

⁴UMR CNRS 5235, dynamique des interactions membranaires normales et pathologiques, service d'hématologie, CHU de Montpellier, 371, avenue du Doyen-G.-Giraud, 34295 Montpellier cedex 05, Montpellier, France

Article reçu le 12 novembre 2009,

accepté le 22 février 2010

Tirés à part : H. Watier

Résumé. Les anticorps monoclonaux recombinants ont permis, depuis quelques années, une révolution thérapeutique en cancérologie. Bien que leur efficacité clinique n'est plus à prouver, leur mode d'action chez les patients reste peu connu. L'effet thérapeutique des anticorps ciblant des antigènes membranaires passe par le recrutement d'effecteurs cytotoxiques exprimant des récepteurs pour la portion Fc des IgG (FcγRs). Cette synthèse illustre les différentes fonctions dépendantes des FcγRs et leurs rôles potentiels dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques. Une meilleure connaissance de ces fonctions devrait permettre, dans le futur, d'optimiser l'effet thérapeutique de ces traitements. ▲

Abstract. From several years ago, recombinant monoclonal antibodies have allowed a revolution in therapeutic approach of cancer patients. Whereas the clinical efficacy of many antibodies is now demonstrated, their mechanism of action in patients remains elusive. For antibodies targeting membrane antigens, they particularly resort to cytotoxic effectors, which expressed receptors for Fc portion of IgG (FcγRs). This review analyses different functions depending of FcγR and their potential role in mechanism of action of therapeutic antibodies. A better knowledge of these functions should allow in the next future the optimisation of these treatments. ▲

Mots clés : anticorps thérapeutique, récepteur pour la portion Fc des IgG (FcγRs)

Key words: therapeutic antibody, receptor for the Fc portion of IgG (FcγRs)

Depuis la fin des années 1990, les anticorps monoclonaux recombinants ont considérablement modifié la prise en charge des patients atteints de cancer. Ces biomédicaments ont ainsi permis d'améliorer significativement la survie des patients atteints d'un lymphome non hodgkinien [1, 2], d'un cancer du sein [3] ou d'un cancer colorectal [4]. Ce progrès thérapeutique contraste avec une certaine méconnaissance de leurs mécanismes d'action chez l'homme [5]. Pour les anticorps ciblant des antigènes solubles, les effets thérapeutiques résultent des propriétés de l'anticorps à fixer et à neutrali-

ser l'antigène comme c'est le cas pour le bevacizumab (Avastin®) vis-à-vis du VEGF [6]. Les anticorps ciblant des antigènes membranaires des cellules cancéreuses (figure 1) vont aussi faire intervenir les fonctions effectrices liées à la reconnaissance de la cible, mais posséderont aussi des effets cytolytiques liés au recrutement des FcγRs par la portion Fc de l'IgG. Ainsi, ces anticorps pourront induire une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), une cytotoxicité cellulaire dépendante du complément ou CDC (complement dependant cytotoxicity) et une

DCI	Nom commercial	Cible	Isotype	Indications
rituximab	Mabthera Rituxan	CD20	IgG1	Lymphomes folliculaires non Hodgkiniens
alemtuzumab	MabCampath	CD52	IgG1	Leucémies lymphoïdes chroniques à cellules B
trastuzumab	Herceptin	erbB2	IgG1	cancers du sein erbB2+
cetuximab	Erbitux	erbB1	IgG1	cancer colorectaux cancers épidermoïdes de la tête et du cou
panitumumab	Vectibix	erbB1	IgG2	cancer colorectaux

Figure 1. Anticorps monoclonaux thérapeutiques utilisés en cancérologie et ciblant des antigènes membranaires.

phagocytose de la cellule opsonisée. Nous avons mis en évidence qu'un polymorphisme localisé sur l'exon 6 de *FCGR3A* (codant le récepteur FcγRIIIA) était associé à la réponse au rituximab (ch-IgG1κ anti-CD20, Mabthera®) dans les lymphomes malins non hodgkiniens de type folliculaire. Ce polymorphisme conduit à une substitution au niveau de l'acide aminé 158 (valine [V] ou phénylalanine [F]), et nous avons observé que les patients homozygotes VV avaient une meilleure réponse clinique et moléculaire au rituximab que les patients porteurs de l'allotype F [7]. Cette plus grande efficacité clinique est vraisemblablement liée à une meilleure affinité des IgG1 humaines pour les récepteurs V et à une meilleure ADCC, comme nous l'avons montré *in vitro* par rapport au récepteur F. Toutefois, il existe d'autres mécanismes d'action possibles des anticorps thérapeutiques faisant intervenir les FcγRs. Au cours de cette revue, nous aborderons tout d'abord les caractéristiques et les différentes fonctions médiées par les FcγRs en conditions physiologiques. Dans un second temps, nous reviendrons sur l'implication de ces fonctions dans l'activité thérapeutique des anticorps.

Caractéristiques générales des FcγRs

Historique

À la fin du XIX^e siècle est apparue l'idée que certains constituants du sérum pouvaient interagir avec les cellules du système immunitaire. Pour Hericourt, l'un des pères de la sérothérapie anticancéreuse, « le secours dont l'organisme a besoin, le sérum le lui apporte ; et les phagocytes y trouvent le stimulant nécessaire à leur insuffisante activité. C'est l'appoint qui décide la victoire en leur faveur » [8]. Le principe actif de la

sérothérapie, dénommé quelques années plus tard par Paul Ehrlich par le terme d'anticorps, ne commença à être réellement connu sur le plan de sa structure moléculaire qu'à partir de 1959, grâce notamment aux travaux sur la fragmentation des immunoglobulines G (IgG) et l'identification d'une portion cristallisable, la région Fc [9]. En 1965, Berken et Benacerraf observent que du sérum de porcs immunisés avec des érythrocytes de mouton contient des anticorps capables de faire adhérer ces érythrocytes à des macrophages péritonéaux de porc (donnant l'allure de rosettes en microscopie) [10]. Ils mirent également en évidence que seuls certains anticorps (les IgG) possédaient cette propriété, et que la liaison aux macrophages se faisait par l'intermédiaire de la portion Fc. Les premiers, ils évoquèrent un probable récepteur pour le Fc des IgG à la surface des macrophages. Les tentatives ultérieures de purification de ces récepteurs révélèrent qu'il en existait de plusieurs sortes. L'un d'entre eux, exprimé à la surface des monocytes, était le seul à pouvoir lier les IgG monomériques avec une forte affinité [11]. Avec l'arrivée des anticorps monoclonaux à la fin des années 1970, il devint possible de détecter ces récepteurs et de commencer leur dénombrement. Trois classes de récepteurs furent alors identifiées et dénommées FcγRI, FcγRII et FcγRIII par l'Union internationale des sociétés d'immunologie (IUIS) [12]. La lettre grecque γ désigne la spécificité pour l'isotype γ de chaîne lourde, caractéristique de la classe des IgG, et le chiffre romain la classe de récepteur [13]. Dans la numérotation des classes de différenciation (CD), ils correspondent respectivement aux CD64, CD32 et CD16. Le clonage moléculaire des FcγRs réserva quelques surprises et permit de faire la relation entre structure et fonction de ces récepteurs. En effet, différentes formes de récepteurs FcγRII (FcγRIIA, FcγRIIB et FcγRIIC) et FcγRIII (FcγRIIIA et FcγRIIIB), se distinguant par leur

ancrage membranaire et/ou leur motif de signalisation, furent alors caractérisées [14, 15].

Structure

Les récepteurs FcγRs sont des glycoprotéines membranaires de la superfamille des immunoglobulines, dont la portion extracellulaire comprend deux à trois domaines immunoglobuliniques. D'un récepteur à l'autre, le degré d'identité de ces domaines est important, en lien avec leur fonction commune de liaison aux IgG. Les récepteurs activateurs FcγRI et FcγRIIA comportent une région transmembranaire comprenant un résidu chargé [16] et une courte région intracytoplasmique. Le résidu chargé permet au récepteur de s'associer à des dimères d'une chaîne transductrice FcR-γ. Cette chaîne possède une très courte région extracellulaire, une région transmembranaire et une région intracytoplasmique comportant un motif de transduction ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) impliqué dans l'activation cellulaire, qui se produit suite à l'agrégation des récepteurs FcγRI et FcγRIIA par des complexes immuns formés d'antigènes et d'IgG. L'association du récepteur FcγRIIA avec la chaîne FcR-γ est indispensable pour qu'il soit exprimé en surface. En effet, FcγRIIA contient, dans son domaine intracellulaire, une séquence de rétention dans le réticulum endoplasmique qui va entraîner sa destruction en l'absence d'association avec la chaîne FcR-γ [17].

Les récepteurs FcγRIIA et FcγRIIC sont également des récepteurs activateurs se distinguant des précédents par le fait qu'ils possèdent leur propre motif de transduction ITAM dans leur portion intracytoplasmique et qu'ils n'ont donc pas besoin de chaînes accessoires pour entraîner l'activation cellulaire. Comme eux, le récepteur FcγRIIB contient son propre motif de transduction de type ITIM (*immunoreceptortyrosine-basedinhibition motif*), ce qui fait de lui l'unique FcγR inhibiteur [18]. Enfin, le récepteur FcγRIIIB est un récepteur atypique du fait qu'il s'agit d'une protéine glypiée, c'est-à-dire reliée au feuillet externe de la membrane par une liaison glycosylphosphatidylinositol (GPI) qui la localise principalement dans les radeaux lipidiques. Sa structure ne lui confère aucune capacité intrinsèque de transduction du signal, mais il peut coopérer avec d'autres récepteurs, comme FcγRIIA, amenant à proximité de ces derniers des éléments de signalisation associés aux radeaux lipidiques. Cette hétérogénéité des FcγRs est accentuée par la

présence de variants d'épissage, permettant la synthèse de formes solubles de récepteurs, ou de récepteurs différenciant par la longueur de leur portion intracytoplasmique [19, 20] (*figure 2*).

Expression cellulaire

Les FcγRs sont exprimés sur la majorité des cellules myéloïdes et sur certaines cellules lymphoïdes (*figure 2*). Chaque récepteur présente un profil d'expression particulier, tandis que chaque type cellulaire exprime le plus souvent plusieurs classes de FcγRs. Ceux-ci seront donc engagés ensemble par des complexes immuns, les amenant à coopérer positivement, comme par exemple FcγRIIA et FcγRIIIB sur les neutrophiles, ou négativement lorsque FcγRIIB est coexprimé avec FcγRI et parfois FcγRIIA à la surface des monocytes et des macrophages. En conditions physiologiques et après engagement d'une faible quantité de complexes immuns, la balance entre les signaux activateurs et les signaux inhibiteurs conduit la cellule à ne pas s'activer [21]. Certaines cytokines, comme l'IFN-γ, ou des anaphylatoxines pourraient modifier cette balance en modifiant le rapport entre récepteurs activateurs et inhibiteurs, conduisant alors à l'activation de la cellule [22, 23].

Génétique des FcγRs

Les gènes *FCGR*, codant les FcγRs, sont tous localisés sur le chromosome 1. Les gènes *FCGR1* (*FCGR1A*, *FCGR1B* et *FCGR1C*) sont localisés de part et d'autre du centromère (1p23 et 1q21), et seul *FCGR1A* semble coder le récepteur de forte affinité, les deux autres gènes présentant des codons-stop au niveau de l'exon codant le troisième domaine extracellulaire [24]. Les gènes codant les récepteurs, *FCGR2/3*, sont, quant à eux, localisés au sein d'un cluster en position 1q23. De nombreux polymorphismes affectent ces gènes *FCGR2/3* (*figure 2*), le plus connu d'entre eux, le polymorphisme V158F du gène *FCGR3A* a été initialement décrit en 1989 [25]. Une substitution du nucléotide à la position 559 de l'ADNc de *FCGR3A* conduit au codage d'une V ou d'une F au niveau du domaine proximal (acide aminé 158) impliqué dans le site de liaison des IgG. Il n'est dès lors pas surprenant que ce polymorphisme influence la liaison de ces dernières (cf. *infra*). Le gène *FCGR3A* présente également un polymorphisme triallélique en position 48 (domaine

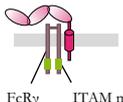
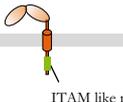
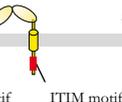
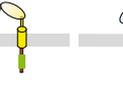
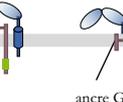
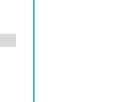
	CD64		CD32			CD16	
Récepteur	FcγRI	FcγRIIA	FcγRIIB	FcγRIIC	FcγRIIA ²	FcγRIIB ²	
Structure							
Gène	<i>FCGR1A</i> ¹	<i>FCGR2A</i>	<i>FCGR2B</i>	<i>FCGR2C</i>	<i>FCGR3A</i>	<i>FCGR3B</i>	
Polymorphisme (s)	-	R131H	I232T ⁵	Q57X ³	V158F 48 L/R/H	NA1/NA2/SH ⁶	
Expression	Macrophages Monocytes Dendritiques Eosinophiles ³ Neutrophiles ³	Macrophages Monocytes Eosinophiles Dendritiques Neutrophiles Mastocytes Plaquettes	Macrophages Monocytes Eosinophiles Dendritiques Mastocytes Neutrophiles Lymphocytes B	NK	Macrophages Monocytes Dendritiques NK Mastocytes Lymphocytes Tγδ	Neutrophiles Eosinophiles ³	
Transcrits	a1,a2	a1,a2 ⁸	b1,b2,b3	c1,c2,c3,c4 ⁷	a1-a6	b	
Régulation	+ IFN-γ, IL-10, G-CSF				IFN-γ, TGF-β	IFN-γ, GM-CSF	
	- IL-4				IL-4	TNF-α	

Figure 2. Caractéristiques générales des récepteurs pour la portion Fc des IgG (FcγR).

¹ Des transcrits des gènes *FCGR1B* et *FCGR1C* ont été détectés et pourraient coder des récepteurs solubles, bien que ces derniers n'aient jamais été réellement identifiés au niveau protéique. Le gène *FCGR1B* peut également donner un deuxième transcrit par épissage alternatif codant une protéine transmembranaire tronquée avec seulement deux domaines immunoglobuliniques.

² Des formes solubles de ces récepteurs ont été décrites. Ces molécules ne sont pas des isoformes dérivant d'un épissage alternatif, mais proviennent d'un clivage protéolytique des récepteurs membranaires.

³ Expression inductible en présence d'IFN-γ.

⁴ Polymorphisme entraînant au niveau du domaine transmembranaire la substitution d'une isoleucine en thréonine (Ile/Thr 187) responsable d'une mauvaise association avec les radeaux lipidiques associée à une atténuation de son effet inhibiteur.

⁵ Polymorphisme retrouvé chez la majorité des individus et entraînant l'apparition prématurée d'un codon-stop et l'absence du récepteur à la surface des cellules NK.

⁶ Ces deux allèles du gène *FCGR3B* vont générer deux variants qui vont différer sur quatre positions, NA1 (R36, N65, D82, V106) et NA2 (S36, S65, N82, I106) entraînant des profils de glycosylation différents. Une mutation ponctuelle (A78D) de l'allèle NA2 va générer un variant supplémentaire nommé SH.

⁷ Les transcrits c2 à c4 sont issus d'un épissage alternatif probablement à l'origine de formes solubles de ce récepteur.

⁸ Le transcrit a1 correspond à une forme membranaire de ce récepteur et le transcrit a2 à une forme soluble résultant d'un épissage alternatif de l'exon codant la région transmembranaire.

distal), entraînant la présence d'une leucine (L), d'une arginine (R) ou d'une histidine (H) [26]. Un polymorphisme de *FCGR2A* se traduit par la présence en position 131 du domaine immunoglobulinique distal d'une R (alloforme 131R) ou d'une H (alloforme 131H). Cette substitution, connue depuis 1991, affecte fortement l'affinité du récepteur FcγRIIA pour les IgG1 de souris. Les deux variants alléliques *FCGR2A*-131H (appelé LR pour *low-responder*) et *FCGR2A*-131R (appelé HR pour *high-responder*) lient les IgG2a et IgG2b de souris, mais seul l'allèle *FCGR2A*-131R lie fortement les IgG1 de souris [27].

Affinité pour les IgG

La cristallographie a permis de déterminer la structure des domaines extracellulaires de plusieurs FcγRs

(FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIIB) et de comprendre précisément comment s'effectue l'interaction entre ces récepteurs et la portion Fc des IgG [28, 29]. La structure générale de ces récepteurs est apparentée, avec des domaines immunoglobuliniques reliés par un peptide connecteur. L'étude du cocrystal FcγRIIIB-IgG1 a montré que la portion Fc se fixait au domaine extracellulaire proximal ainsi qu'à la région de connexion entre les deux domaines (*figure 4A*). Un récepteur ne pouvant fixer qu'une seule IgG, l'activation cellulaire ne peut avoir lieu que lorsque les récepteurs sont engagés par des ligands multivalents. Comme mentionné plus haut, FcγRI a été historiquement identifié à la surface des monocytes par sa capacité à lier les IgG monomériques, d'où une forte affinité pour ces dernières. Les autres FcγRs présentent une affinité moindre pour les IgG monomériques, mais fixent avec avidité les IgG

RITUXIMAB						
Auteurs	polymorphisme(s) étudié(s)			Type(s) de cancer(s)	Patients	Association(s)
	FCGR3A 158V/F	FCGR3A 48L/R/H	FCGR2A 131H/R			
Cartron <i>et al.</i> (7)	✓	✓		Lymphomes folliculaires non hodgkiniens	49	
Kim <i>et al.</i> (49)	✓		✓	Lymphomes diffus à grandes cellules B	85	
Ghielmini <i>et al.</i> (50)	✓			Lymphomes folliculaires/ du manteau	113	FCGR3A 158 VV associés à une meilleure réponse
Treon <i>et al.</i> (51)	✓	✓		Macroglobulinémie de Waldenström	58	
Weng <i>et al.</i> (52)	✓		✓	Lymphomes folliculaires non hodgkiniens	71	FCGR3A 158 VV et FCGR2A 131 H/H indépendamment associés avec une meilleure réponse
CETUXIMAB						
Zhang <i>et al.</i> (53)	✓		✓		39	FCGR3A 158 FF et FCGR2A 131 H/H indépendamment associés avec une meilleure réponse
Bibeau <i>et al.</i> (54)	✓		✓	cancers colo-rectaux	69	FCGR3A 158 VV et FCGR2A 131 H/H indépendamment associés avec une meilleure réponse
Grimaldi <i>et al.</i> (55)	✓		✓		52	FCGR3A 158 VV associés à une meilleure réponse
TRASTUZUMAB						
Muolino <i>et al.</i> (56)	✓		✓	cancer du sein	54	FCGR3A 158 VV et FCGR2A 131 H/H indépendamment associés avec une meilleure réponse

Figure 3. Études d'association entre polymorphismes des gènes FCGR et réponse aux anticorps thérapeutiques.

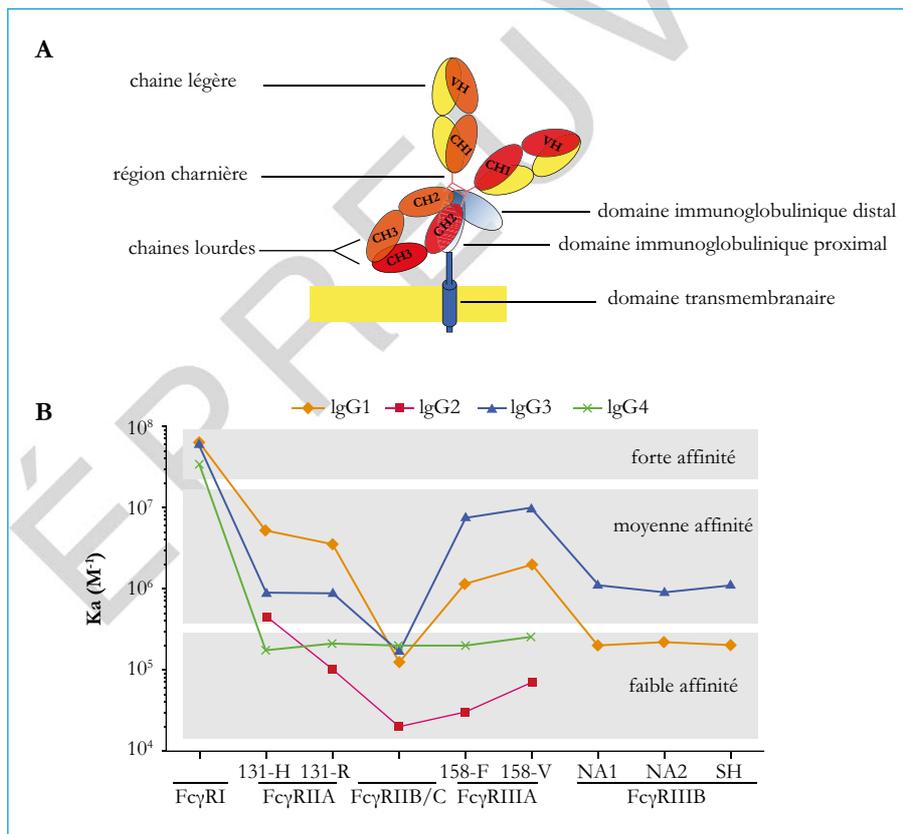


Figure 4. Interaction et affinité entre les IgG et les FcγRs. **A**) L'interaction entre les deux domaines CH2 de l'immunoglobuline G et le domaine immunoglobulinique proximal et la région charnière du FcγR ; **B**) d'après les données publiées par Bruhns *et al.*, représentation des affinités des FcγRs en fonction des différentes sous-classes d'IgG.

engagées dans des complexes immuns. Ces différences d'affinité/avidité ont été longuement explorées pour tenter d'établir une hiérarchie des FcγRs. Il a notamment été montré que le polymorphisme V158F de FcγRIIIA influençait la fixation des IgG indépendamment

du polymorphisme en position 48 [26]. Le récepteur FcγRIIA présente une affinité pour les IgG1 et les IgG3, mais il semble que l'alloforme FcγRIIA-131H soit la seule capable de lier les IgG2 humaines [30]. Très récemment, par des analyses combinées de cytométrie

en flux et de résonance plasmonique de surface, une équipe de l'Institut Pasteur de Paris a permis d'avoir une vue d'ensemble de l'affinité des différents FcγRs pour chaque sous-classe d'IgG [31] (*figure 4B*). Contrairement à ce qui a longtemps été écrit, il n'y a pas de restriction de fixation des FcγRs pour une ou des sous-classes d'IgG, en dehors des IgG2 qui ne sont fixées ni par FcγRI ni par FcγRIIB. Par comparaison avec les autres récepteurs, qui présentent une affinité moyenne/faible pour les IgG, le récepteur FcγRI apparaît comme un récepteur de forte affinité, probablement à cause de son domaine immunoglobulinique supplémentaire. À l'inverse, FcγRIIB lie très faiblement toutes les sous-classes d'IgG. Comme il avait été rapporté précédemment [26], l'alloforme FcγRIIA-158V présente une affinité pour les IgG1, les IgG2 et les IgG3 supérieure à celle de l'alloforme FcγRIIA-158F. Les variants FcγRIIA-131H et FcγRIIA-131R présentent des différences d'affinité concernant les IgG1, les IgG2 et les IgG4 mais fixent les IgG3 de la même façon.

Mécanisme d'action

Le déclenchement d'une réponse cellulaire *via* les FcγRs va être conditionné, pour les récepteurs de faible affinité, par l'agrégation de ces récepteurs grâce à l'interaction avec des complexes immuns solubles ou avec des cellules opsonisées/sensibilisées par des IgG. Pour le récepteur de forte affinité FcγRI, elle se fera lors de la reconnaissance d'un antigène multivalent. L'agrégation de ces récepteurs conduira à leur migration au sein de radeaux lipidiques. Cette étape est indispensable pour la transduction des signaux [32]. La phosphorylation des tyrosines des motifs ITAM ainsi que le recrutement de protéines-kinases de la famille Src (lck, lyn, hck) et Syk (Syk, ZAP-70, etc.) vont être les premières étapes de l'activation cellulaire induite par les FcγRs. Ces kinases activées vont catalyser la phosphorylation et l'activation d'un certain nombre de substrats comme la phospholipase C (PLC), la PI3-kinase ou encore des protéines de la famille des MAP-kinases [21]. Ces différents substrats dépendront du type de cellule, de la fonction cellulaire concernée et également du type de récepteur engagé. La transduction du signal s'opérant par le motif ITAM-like des récepteurs FcγRIIA et FcγRIIC sera à l'origine d'une activité cellulaire différente de celle observée *via* le motif ITAM classique des dimères FcR-γ [33].

En fonction du type cellulaire et de son équipement en récepteur FcγRs, on distingue quatre grands types de fonctions cellulaires pouvant découler de ces voies d'activation. La première est la phagocytose, exercée par les phagocytes « professionnels » que sont les macrophages et les neutrophiles (*figure 5*). En présence d'agents pathogènes, de cellules ou de débris cellulaires opsonisés par des IgG, les phagocytes vont émettre des pseudopodes autour des complexes immuns pour former un phagosome. Celui-ci va fusionner avec des lysosomes ou différents granules pour former un phagolysosome contenant diverses enzymes hydrolytiques, voire des protéines cationiques. Ce processus s'accompagne aussi d'une explosion oxydative par mise en jeu de la NADPH-oxydase, aboutissant à la génération de radicaux libres de l'oxygène, de peroxyde d'hydrogène ou H₂O₂ (myéloperoxydase du neutrophile) et d'oxyde nitrique ou NO (synthétase de l'oxyde nitrique du macrophage) [34].

La présentation antigénique constitue une deuxième voie de réponse enclenchée par les FcγRs et permettra d'activer une réponse immunitaire adaptative. Ainsi, les cellules dendritiques vont pouvoir endocyter les particules antigéniques *via* leurs FcγRs, les dégrader et les présenter sous forme de peptides apprêtés dans des molécules du CMH [35] (*figure 5*). En règle générale, ces peptides issus de protéines exogènes sont présentés par des molécules de CMH de classe II, induisant l'activation de lymphocytes T auxiliaires CD4+, mais la capture par les FcγRs semble également favoriser la présentation de ces peptides exogènes *via* le CMH de classe I (*cross-presentation*), permettant l'initiation de réponses T CD8+ cytotoxiques [36].

Le troisième type de réponse enclenché par l'activation des FcγRs est la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps ou ADCC. Il s'agit de la plus connue dans le contexte d'une action antitumorale, et les cellules NK et les monocytes/macrophages en sont les principaux acteurs (*figure 5*). Après la liaison à la cellule cible par les FcγRs, les granules contenus dans le cytoplasme des cellules NK sont acheminés jusqu'à la membrane plasmique et déversés dans l'espace intercellulaire séparant l'effecteur et la cible. En se polymérisant à la surface des cibles, la perforine va créer des pores conduisant à une déstabilisation de la bicouche lipidique. La perméabilité ainsi obtenue va favoriser l'entrée de granzymes, autres constituants cytotoxiques des granules NK. Parmi eux, le granzyme B va agir sur la cascade des caspases et entraîner

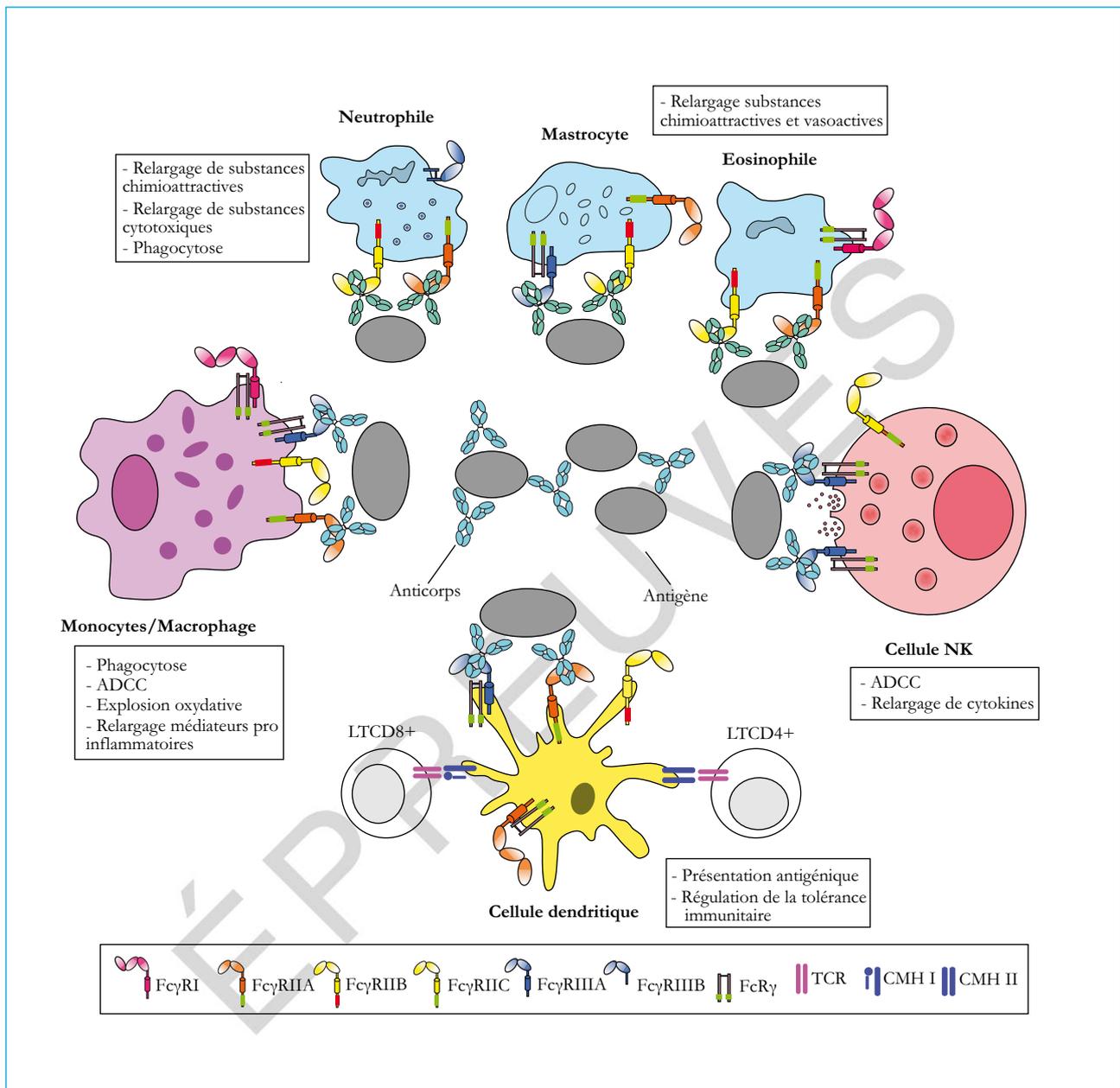


Figure 5. Mécanismes d'action activés par l'intermédiaire des FcγRs. En fonction du type cellulaire, quatre grands types de fonctions peuvent être enclenchés : la cytotoxicité, la phagocytose, la présentation antigénique et la sécrétion de facteurs solubles.

l'apoptose des cibles ; d'autres granzymes vont coopérer et provoquer la mort des cellules cibles [37]. Au niveau des macrophages, cette cytotoxicité cellulaire va prendre la forme d'une « phagocytose extériorisée ». Les granules normalement déversés dans les phagosomes sont exocytés au niveau de l'espace intercellulaire, permettant ainsi la lyse de la cellule cible grâce à leur contenu particulièrement riche en enzymes protéolytiques, en radicaux libres et en NO [38].

Il est vraisemblable qu'un tel phénomène existe aussi avec les polynucléaires neutrophiles [39].

Le quatrième mécanisme activé par les FcγRs est la sécrétion de facteurs solubles comme des cytokines ou des substances vasoactives. Suite à l'activation par les FcγRs, ce mécanisme va jouer des rôles variés comme, par exemple, la modulation de la réponse immunitaire mise en jeu avec des cytokines comme l'IFN-γ ou l'IL-10 [40]. Il pourra également jouer un rôle dans la cyto-

toxicité des cellules NK avec l'intervention de cytokines membranaires que sont les ligands de récepteurs de mort, comme le ligand de FAS ou TRAIL [41].

Implication des FcγRs dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques

Modèles murins, anticorps monoclonaux thérapeutiques et FcγRs

L'étude des souris dont les gènes des récepteurs Fc ont été invalidés permet une évaluation de l'implication de ces récepteurs dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques. Malgré la relative proximité phylogénétique entre les deux espèces, il existe de nombreuses différences entre les FcγRs humains et murins. La souris, contrairement à l'homme, ne possède que trois récepteurs activateurs, le FcγRI, le FcγRIII et le FcγRIV plus récemment décrit [42], et un seul récepteur inhibiteur (FcγRII), avec des profils d'expression différents des récepteurs FcγRs humains [43]. Bien qu'il existe un risque d'immunogénicité chez les souris immunocompétentes quand une IgG1 humaine est administrée, l'utilisation d'anticorps thérapeutiques chez la souris est possible et présente une certaine pertinence du fait que les IgG1 humaines présentent de l'affinité pour les FcγRs murins, alors que l'inverse n'est pas vrai [44]. En revanche, l'antigène cible humain est rarement partagé avec la souris, ce qui oblige pour l'étude des effets thérapeutiques d'anticorps humanisés le développement de modèle de greffes de cellules tumorales humaines exprimant l'antigène cible humain (modèles xénogéniques reposant sur des souris immunodéficientes), ou à des modèles où l'antigène cible humain est exprimé par les cellules murines (modèles syngéniques chez des souris immunocompétentes). Des souris nude et FcR-γ^{-/-} (n'exprimant donc pas FcγRI, FcγRII et FcγRIV) se révèlent partiellement incapables de contrôler des xéngreffes de cellules exprimant le CD20 ou le HER2 humain, en présence de rituximab ou de trastuzumab respectivement [45]. De même, des souris nude et FcγRII^{-/-} (orthologue du récepteur humain FcγRIIb) présentent une augmentation de la capacité à éliminer les cellules tumorales en présence de rituximab [46]. Les cellules NK murines n'exprimant pas FcγRII, ces résultats pourraient être dus aux macrophages qui seraient recrutés et

activés plus efficacement chez les souris FcγRII^{-/-}. Enfin, l'ensemble des données disponibles concernant ces souris invalidées tend à démontrer que les neutrophiles [47] ou les macrophages [48] seraient les principales populations cellulaires impliquées dans le mécanisme d'action de ces deux anticorps thérapeutiques chez la souris.

Polymorphismes FCGR et réponse clinique aux anticorps thérapeutiques

Les études d'associations des polymorphismes des gènes FCGR avec la réponse thérapeutique constituent, bien qu'elles soient indirectes, la seule preuve de l'implication des FcγRs dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques (figure 3). Du fait de leur positionnement dans une région d'interaction directe avec les IgG, les polymorphismes V158F de FcγRIIIA et H131R de FcγRIIA sont ceux sur lesquels porte la quasi-totalité de ces études d'association. La plupart s'accordent sur le fait que le génotype FCGR3A-158VV est associé à une meilleure réponse clinique, que ce soit avec le rituximab [7, 49-52], le cetuximab [53-55] ou le trastuzumab [56] (figure 3). En revanche, l'association du polymorphisme H131R avec la réponse clinique reste discutée. Des études ont en effet montré l'association de ce dernier, soit indépendamment, soit combiné avec le polymorphisme V158F, avec la réponse clinique au rituximab ou au trastuzumab. Comme nous l'avons démontré récemment en utilisant une méthodologie adaptée [57], il existe dans certains cas un déséquilibre de liaison entre ces deux locus, tendant à associer préférentiellement les génotypes FCGR3A-158VV et FCGR2A-131HH. Il en résulte donc que l'association de FCGR2A-131HH avec une meilleure réponse clinique est probablement le résultat de son association avec le génotype FCGR3A-158VV. Les autres polymorphismes des FcγRs n'ont pas été montrés comme associés à une meilleure réponse aux anticorps thérapeutiques [58, 59], ce qui signifie que le polymorphisme V158F de FcγRIIIA reste, à ce jour, le seul qui soit réellement associé à la réponse aux anticorps thérapeutiques.

Criblage d'anticorps thérapeutiques sur leur capacité à engager *in vitro* les FcγRs

Des modèles d'études *in vitro* ont été développés afin de cribler les anticorps thérapeutiques sur leurs

capacités à engager les FcγRs et pour étudier les fonctions effectrices qui leur sont associées. Chacun de ces modèles apporte des éléments sur l'implication des FcγRs dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques et ouvre la porte à de nouvelles perspectives thérapeutiques. Les études *in vitro* concernant l'implication de l'ADCC dans le mécanisme d'action des anticorps thérapeutiques sont, sans aucun doute, les plus documentées, et elles ont permis de mettre en évidence que des anticorps comme le rituximab [60] ; le trastuzumab [61], le cetuximab [62] ou encore l'alemtuzumab [63] étaient capables de lyser des cellules cibles tumorales en présence d'effecteurs cytotoxiques. Parmi ces effecteurs, les NK s'avèrent être presque toujours les acteurs de cette ADCC même si, dans certaines conditions expérimentales, il a été montré que les neutrophiles [64], les monocytes ou des macrophages [65, 66] étaient également capables d'ADCC à l'encontre de cellules tumorales sensibilisées par du rituximab ou d'autres anticorps. Il a également été montré qu'en présence de rituximab [67, 68], de trastuzumab [56] ou de cetuximab [69], les NK issus de donneurs de génotypes FCGR3A-158VV exercent une ADCC « supérieure » à celle qu'exercent les NK issus de donneurs des deux autres génotypes. Pour analyser plus finement ce phénomène, nous avons quantifié la sensibilité des cellules NK au rituximab, en recherchant la concentration en rituximab induisant 50 % de la lyse totale (EC50) de cellules Daudi (cellules exprimant le CD20). Nous avons montré que l'EC50 des cellules NK de génotype VV est significativement inférieure à celle requise par les cellules NK de génotype FF, ce qui est parfaitement en accord avec la plus faible affinité pour les IgG1 de l'alloforme 158F du FcγRIIIA. En revanche, le pourcentage de lyse maximale n'est pas significativement différent entre les deux génotypes [67]. Ces observations permettent de mieux appréhender l'importance des concentrations en anticorps et donc de l'exposition au médicament dans la relation génotype-phénotype observée cliniquement. Elles suggèrent également qu'une activité maximale *in vivo* pourrait être obtenue pour chaque patient, pourvu que la concentration en rituximab chez les individus de génotype 158FF soit plus importante que chez les 158VV. Un modèle obtenu *in silico* a utilisé les résultats d'essais cliniques pour simuler la relation dose-survie sans progression chez les sujets VV et chez les porteurs de l'allèle F. Cette étude

indique en réalité qu'un ajustement des doses en fonction du génotype FCGR3A ne serait pas réalisable, car même après une augmentation massive de la dose de rituximab (jusqu'à 2 250 mg/m²), la survie sans progression des sujets porteurs de F serait toujours inférieure à celle des sujets VV [70].

Outre l'ADCC, l'opsonisation de cellules tumorales par un anticorps thérapeutique peut conduire à sa phagocytose par les macrophages [60] ou les neutrophiles [71] (cf. *supra*). La phagocytose exercée par les macrophages semble dépendre du FcγRIIIa et n'est donc pas affectée par le polymorphisme V158F. La sensibilisation par le rituximab peut aussi provoquer la capture des cellules tumorales par des cellules dendritiques (cf. *supra*), la présentation de peptides antigéniques dérivés de la tumeur et la génération de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques spécifiques [72]. Cet effet « vaccinal » du rituximab a été confirmé très récemment par la démonstration que des lymphocytes T de patients ayant été traités par cet anticorps sont capables de s'activer lorsqu'ils sont mis en présence de cellules dendritiques chargées avec des peptides issus de l'idiotype de l'immunoglobuline de membrane du clone lymphomateux [73].

Au vu des différentes fonctions pouvant être enclenchées par les anticorps thérapeutiques *via* les FcγRs, il est légitime de chercher à potentialiser les interactions entre ces deux partenaires. Pour que les anticorps thérapeutiques aient une meilleure affinité pour les FcγRs, la première approche consiste à muter la séquence codante de l'anticorps dans la région interagissant avec les FcγRs pour accroître les interactions moléculaires. Cette approche a été utilisée par différents industriels, comme Genentech, Applied Molecular Evolution ou Xencor, pour produire des mutants du trastuzumab ou du rituximab [74, 75]. De tels anticorps mutés présentent de fait une phagocytose augmentée [76] ainsi qu'une augmentation de leurs capacités cytolytiques *in vitro* et *in vivo* [74, 77]. Le développement clinique de tels anticorps pourrait toutefois, du fait de l'introduction des mutations dans la séquence peptidique, se heurter à des problèmes d'immunogénicité accrue. La seconde approche, permettant de potentialiser l'interaction entre FcγRs et anticorps thérapeutiques, repose sur la glyco-ingénierie des anticorps. En effet, la modification du N-glycane situé dans la portion Fc des IgG1 (sur l'Asn297 du domaine CH2) modifie la liaison aux FcγRs. Il a été montré que

l'absence de fucose à la racine de l'oligosaccharide était le facteur favorisant le plus la liaison aux FcγRs [78, 79]. Plusieurs firmes pharmaceutiques se sont lancées dans la génération d'anticorps à glycosylation modifiée (afucosylation principalement) : GlycoMab® chez Roche-GlycoArt, EMABling® au LFB, Potelligent® chez Kyowa/Biowa. *In vitro*, les anticorps afucosylés anti-CD20 développés présentent une phagocytose augmentée médiée par les neutrophiles [64] ainsi qu'une ADCC médiée par les NK supérieure à celle observée pour le rituximab [80]. Plusieurs essais de phase I/II du GA101/RO5072759, un nouvel anti-CD20 humanisé afucosylé, ont été lancés par Roche et montrent, d'après les premiers résultats, une toxicité similaire à celle du rituximab et une efficacité sensiblement supérieure [81].

Perspectives

Au vu des différentes données abordées au cours de cette revue, il apparaît justifié que le développement des anticorps thérapeutiques s'oriente vers une potentialisation de leur interaction avec les FcγRs. Dans ce sens, la glyco-ingénierie semble être actuellement la perspective la plus intéressante comme l'illustrent les différents résultats obtenus avec des anticorps afucosylés. Le rôle majeur des cytokines dans la régulation de la physiologie des FcγR se présente également comme une piste intéressante : ainsi, l'administration de GM-CSF comme adjuvant a notamment permis de montrer chez des patients une potentialisation de la réponse chez les patients traités par le rituximab [82]. Enfin, de nouvelles études concernant le cluster codant les récepteurs FcγRII et FcγRIII ont montré qu'il existait une variation du nombre de copies des gènes *FCGR3A*, *FCGR3B* et *FCGR2C* [83], ce qui devra être pris en compte dans l'interprétation de futures études d'association entre gènes des récepteurs Fc et réponses aux anticorps thérapeutiques. ▼

Références la présentation des références requiert la présence des six premiers auteurs avant et al., veuillez compléter la liste des auteurs des références suivantes : 54 et 55

1. Salles G, Mounier N, de Guibert S, Morschhauser F, Doyen C, Rossi JF, et al. Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood* 2008 ; 112 : 4824-31.

2. Coiffier B, Lepage E, Briere J, Herbrecht R, Tilly H, Bouabdallah R, et al. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 235-42.

3. Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, Snyder R, Mauriac L, Tubiana-Hulin M, et al. Randomised phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 4265-74.

4. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 337-45.

5. Probst A, Cartron G, Watier H. Mechanisms of action of recombinant monoclonal antibodies used in oncology. *Bull Cancer* 2006 ; hors série : 107-12.

6. Ellis LM. Mechanisms of action of bevacizumab as a component of therapy for metastatic colorectal cancer. *Semin Oncol* 2006 ; 33 (5 Suppl 10) : S1-7.

7. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIa gene. *Blood* 2002 ; 99 : 754-8.

8. Hericourt J. La sérothérapie; historique ; état actuel ; bibliographie. Paris : Rueff, 1899 In-8, 336 pp.

9. Porter RR. The hydrolysis of rabbit γ-globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J* 1959 ; 73 : 119-26.

10. Berken A, Benacerraf B. Properties of antibodies cytophilic for macrophages. *J Exp Med* 1966 ; 123 : 119-44.

11. Anderson CL. Isolation of the receptor for IgG from a human monocyte cell line (U937) and from human peripheral blood monocytes. *J Exp Med* 1982 ; 156 : 1794-806.

12. Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* 1988 ; 6 : 251-81.

13. Nomenclature of Fc receptors. IUIS/WHO subcommittee on nomenclature of Fc receptors. *Bull World Health Organ* 1994 ; 72 : 809-10.

14. Brooks DG, Qiu WQ, Luster AD, Ravetch JV. Structure and expression of human IgG FcRII (CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp Med* 1989 ; 170 : 1369-85.

15. Peltz GA, Grundy HO, Lebo RV, Yssel H, Barsh GS, Moore KW. Human Fc gamma RIII: cloning, expression, and identification of the chromosomal locus of two Fc receptors for IgG. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 1013-7.

16. Kim MK, Huang ZY, Hwang PH, Jones BA, Sato N, Hunter S, et al. Fc gamma receptor transmembrane domains: role in cell surface expression, gamma chain interaction and phagocytosis. *Blood* 2003 ; 101 : 4479-84.

17. Cosson P, Lankford SP, Bonifacino JS, Klausner RD. Membrane protein association by potential intramembrane charge pairs. *Nature* 1991 ; 351 : 414-6.

18. Coggeshall KM. Inhibitory signaling by B cell Fc gamma RIIB. *Curr Opin Immunol* 1998 ; 10 : 306-12.

19. Rappaport EF, Cassel DL, Walterhouse DO, McKenzie SE, Surrey S, Keller MA, et al. A soluble form of the human Fc receptor Fc gamma RIIA: cloning, transcript analysis and detection. *Exp Hematol* 1993 ; 21 : 689-96.

20. Moldovan I, Galon J, Maridonneau-Parini I, Roman Roman S, Mathiot C, Fridman WH, et al. Regulation of production of soluble Fc gamma receptors type III in normal and pathological conditions. *Immunol Lett* 1999 ; 68 : 125-34.

21. Sánchez-Mejorada G, Rosales C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol* 1998 ; 63 : 521-33.

22. Hartnell A, Kay AB, Wardlaw AJ. IFN-gamma induces expression of Fc gamma RIII (CD16) on human eosinophils. *J Immunol* 1992 ; 148 : 1471-8.
23. Werfel T, Sonntag G, Weber MH, Götze O. Rapid increases in the membrane expression of neutral endopeptidase (CD10), aminopeptidase N (CD13), tyrosine-phosphatase (CD45) and Fc gamma-RIII (CD16) upon stimulation of human peripheral leukocytes with human C5a. *J Immunol* 1991 ; 147 : 3909-14.
24. Ernst LK, van de Winkel JG, Chiu IM, Anderson CL. Three genes for the human high-affinity Fc receptor for IgG (Fc gamma RI) encode four distinct transcription products. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 15692-700.
25. Ravetch JV, Perussia B. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII (CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* 1989 ; 170 : 481-97.
26. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gamma RIIIA-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gamma RIIIA, independently of the Fc gamma RIIIA-48L/R/H phenotype. *Blood* 1997 ; 90 : 1109-14.
27. Tax WJ, Willems HW, Reekers PP, Capel PJ, Koene RA. Polymorphism in mitogenic effect of IgG1 monoclonal antibodies against T3 antigen on human T cells. *Nature* 1983 ; 304 : 445-7.
28. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gamma RIII complex. *Nature* 2000 ; 406 : 267-73.
29. Sondermann P, Kaiser J, Jacob U. Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. *J Mol Biol* 2001 ; 309 : 737-49.
30. Warmerdam PA, van de Winkel JG, Vlug A, Westerdaal NA, Capel PJ. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fc gamma receptor II is critical for human IgG2 binding. *J Immunol* 1991 ; 147 : 1338-43.
31. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, et al. Specificity and affinity of human Fc gamma receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* 2009 ; 113 : 3716-25.
32. Bournazos S, Hart SP, Chamberlain LH, Glennie MJ, Dransfield I. Association of Fc gamma RIIa (CD32a) with lipid rafts regulates ligand binding activity. *J Immunol* 2009 ; 182 : 8026-36.
33. Van den Herik-Oudijk IE, Ter Bekke MW, Tempelman MJ, Capel PJ, Van de Winkel JG. Functional differences between two Fc receptor ITAM signaling motifs. *Blood* 1995 ; 86 : 3302-7.
34. Indik ZK, Park JG, Hunter S, Schreiber AD. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 1995 ; 86 : 4389-99.
35. Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 1996 ; 157 : 541-8.
36. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M, et al. Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 1999 ; 189 : 371-80.
37. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol* 2008 ; 26 : 389-420.
38. Connor RI, Shen L, Fanger MW. Evaluation of the antibody-dependent cytotoxic capabilities of individual human monocytes. Role of Fc gamma RI and Fc gamma RII and the effects of cytokines at the single cell level. *J Immunol* 1990 ; 145 : 1483-9.
39. Valerius T, Repp R, de Wit TP, Berthold S, Platzer E, Kalden JR, et al. Involvement of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI; CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy. *Blood* 1993 ; 82 : 931-9.
40. te Velde AA, de Waal Malefijt R, Huijbens RJ, de Vries JE, Figdor CG. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4 and IL-10. *J Immunol* 1992 ; 149 : 4048-52.
41. Oshimi Y, Oda S, Honda Y, Nagata S, Miyazaki S. Involvement of FAS ligand and FAS-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol* 1996 ; 157 : 2909-15.
42. Nimmerjahn F, Bruhns P, Horiuchi K, Ravetch JV. Fc gamma RIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity. *Immunity* 2005 ; 23 : 41-51.
43. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008 ; 8 : 34-47.
44. Loisel S, Ohresser M, Pallardy M, Daydé D, Berthou C, Cartron G, et al. Relevance, advantages and limitations of animal models used in the development of monoclonal antibodies for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007 ; 62 : 34-42.
45. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000 ; 6 : 443-6.
46. Wernersson S, Karlsson MC, Dahlström J, Mattsson R, Verbeek JS, Heyman B. IgG-mediated enhancement of antibody responses is low in Fc receptor gamma chain-deficient mice and increased in Fc gamma RII-deficient mice. *J Immunol* 1999 ; 163 : 618-22.
47. Hernandez-Ilizaliturri FJ, Jupudy V, Ostberg J, Oflazoglu E, Huberman A, Repasky E, et al. Neutrophils contribute to the biological antitumor activity of rituximab in a non-Hodgkin's lymphoma severe combined immunodeficiency mouse model. *Clin Cancer Res* 2003 ; 9 : 5866-73.
48. Uchida J, Hamaguchi Y, Oliver JA, Ravetch JV, Poe JC, Haas KM, et al. TF. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* 2004 ; 199 : 1659-69.
49. Kim DH, Jung HD, Kim JG, Lee JJ, Yang DH, Park YH, et al. *FCGR3A* gene polymorphisms may correlate with response to R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2006 ; 108 : 2720-5.
50. Ghielmini M, Rufibach K, Salles G, Leoncini-Francini L, Léger-Falandry C, Cogliatti S, et al. Single agent rituximab in patients with follicular or mantle cell lymphoma: clinical and biological factors that are predictive of response and event-free survival as well as the effect of rituximab on the immune system: a study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Ann Oncol* 2005 ; 16 : 1675-82.
51. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, et al. Polymorphisms in Fc gamma RIIIA (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 474-81.
52. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2003 ; 21 : 3940-7.
53. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, Yang DY, Nagashima F, Azuma M, et al. *FCGR2A* and *FCGR3A* polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol* 2007 ; 25 : 3712-8.
54. Bibeau F, Crapez E, Di Fiore F, et al. Association of *FcγRIIIa* and *FcγRIIIb* polymorphisms with clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients (mCRC) treated with cetuximab and irinotecan. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 1122-9.
55. Etienne-Grimaldi M, Bennouna J, Formento J, Douillard J, Francoual M, et al. Prospective pharmacogenetic analysis in advanced colorectal cancer (CRC) patients receiving first-line cetuximab-UFT-irinotecan therapy: importance of gene polymorphisms related to antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *J Clin Oncol* 2009 ; 15s (suppl; abstr 4069).

56. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 1789-96.
57. Lejeune J, Thibault G, Ternant D, Cartron G, Watier H, Ohresser M. Evidence for linkage disequilibrium between Fc gamma RIIIA-V158F and Fc gamma RIIa-H131R polymorphisms in white patients, and for an Fc gamma RIIIA-restricted influence on the response to therapeutic antibodies. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 5489-91.
58. Cartron G, Ohresser M, Salles G, Solal-Céligny P, Colombat P, Watier H. Neutrophil role in *in vivo* anti-lymphoma activity of rituximab: FCGR3B-NA1/NA2 polymorphism does not influence response and survival after rituximab treatment. *Ann Oncol* 2008 ; 19 : 1485-7.
59. Weng WK, Levy R. Genetic polymorphism of the inhibitory IgG Fc receptor Fc gamma RIIb is not associated with clinical outcome in patients with follicular lymphoma treated with rituximab. *Leuk Lymphoma* 2009 ; 50 : 723-7.
60. Manches O, Lui G, Chaperot L, Gressin R, Molens JP, Jacob MC, et al. *In vitro* mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2003 ; 101 : 949-54.
61. Beano A, Signorino E, Evangelista A, Brusa D, Mistrangelo M, Polimeni MA, et al. Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *J Transl Med* 2008 ; 6 : 25.
62. Roda JM, Joshi T, Butchar JP, McAlees JW, Lehman A, Tridandapani S, et al. The activation of natural killer cell effector functions by cetuximab-coated, epidermal growth factor receptor positive tumor cells is enhanced by cytokines. *Clin Cancer Res* 2007 ; 13 : 6419-28.
63. Golay J, Manganini M, Rambaldi A, Introna M. Effect of alemtuzumab on neoplastic B cells. *Hematologica* 2004 ; 89 : 1476-83.
64. van der Kolk LE, de Haas M, Grillo-López AJ, Baars JW, van Oers MH. Analysis of CD20-dependent cellular cytotoxicity by G-CSF-stimulated neutrophils. *Leukemia* 2002 ; 16 : 693-9.
65. Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. Optimization of antibody binding to Fc gamma RIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2008 ; 7 : 2517-27.
66. Lopes de Menezes DE, Denis-Mize K, Tang Y, Ye H, Kunich JC, Garrett EN, et al. Recombinant interleukin-2 significantly augments activity of rituximab in human tumor xenograft models of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *J Immunother* 2007 ; 30 : 64-74.
67. Dall'Ozzo S, Tartas S, Piantaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, et al. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 2004 ; 64 : 4664-9.
68. Hatjiharissi E, Xu L, Santos DD, Hunter ZR, Ciccarelli BT, Verselis S, et al. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc{gamma}RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* 2007 ; 110 : 2561-4.
69. López-Albaitero A, Lee SC, Morgan S, Grandis JR, Gooding WE, Ferrone S, et al. Role of polymorphic Fc gamma receptor IIIa and EGFR expression level in cetuximab mediated, NK cell dependent *in vitro* cytotoxicity of head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2009 ; 58 : 1853-64.
70. Ternant D, Henin E, Cartron G, Tod M, Piantaud G, Girard P. A drug — disease simulation model for rituximab in follicular non-Hodgkin lymphoma. PAGE. *Abstr Annu Meet Pop Approach Group in Europe* 2009, (Abstr 1519).
71. Shibata-Koyama M, Iida S, Misaka H, Mori K, Yano K, Shitara K, et al. Nonfucosylated rituximab potentiates human neutrophil phagocytosis through its high binding for Fc gamma RIIb and MHC class II expression on the phagocytotic neutrophils. *Exp Hematol* 2009 ; 37 : 309-21.
72. Selenko N, Majdic O, Jäger U, Sillaber C, Stöckl J, Knapp W. Cross-priming of cytotoxic T cells promoted by apoptosis-inducing tumor cell reactive antibodies? *J Clin Immunol* 2002 ; 22 : 124-30.
73. Hilchey SP, Hyrien O, Mosmann TR, Livingstone AM, Friedberg JW, Young F, et al. Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a “vaccinal effect” of rituximab. *Blood* 2009 ; 113 : 3809-12.
74. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 4005-10.
75. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, et al. High-resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 6591-604.
76. Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. Optimization of antibody binding to Fc gamma RIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2008 ; 7 : 2517-27.
77. Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, Rankin CT, Li H, Burke S, et al. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells *in vitro* and controls tumor expansion *in vivo* via low-affinity activating Fc gamma receptors. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 8882-90.
78. Jefferis R, Lund J. Interaction sites on human IgG-Fc for Fc gamma R: current models. *Immunol Lett* 2002 ; 82 : 57-65.
79. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 26733-40.
80. de Romeuf C, Dutertre CA, Le Garff-Tavernier M, Fournier N, Gaucher C, Glacet A, et al. Chronic lymphocytic leukaemia cells are efficiently killed by an anti-CD20 monoclonal antibody selected for improved engagement of Fc gamma RIIIA/CD16. *Br J Hematol* 2008 ; 140 : 635-43.
81. Salles GA, Morschhauser F, Cartron G, Lamy T, Milpied N, Thieblemont C, et al. A Phase I/II Study of RO5072759 (GA101) in Patients with relapsed/refractory CD20+ malignant disease. *Am Soc Hematol Meet 112*, (Abstract 234).
82. Cartron G, Zhao-Yang L, Baudard M, Kanouni T, Rouillé V, Quittet P, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor potentiates rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 2725-31.
83. Breunis WB, van Mirre E, Geissler J, Laddach N, Wolbink G, van der Schoot E, et al. Copy number variation at the FCGR locus includes FCGR3A, FCGR2C and FCGR3B but not FCGR2A and FCGR2B. *Hum Mutat* 2009 ; 30 : 640-50.



Julien LEJEUNE



**Génétique et génomique des récepteurs de faible affinité
pour les IgG (FcγRs)**

Résumé

Les récepteurs Fc jouent un rôle important en permettant aux cellules de l'immunité d'interagir avec les anticorps, notamment thérapeutiques. Dans cette thèse, nous montrons que des mécanismes de recombinaison homologue, de *knock-in* par insertion rétrovirale et de duplication segmentale ont permis l'acquisition chez les Primates (*FCGR2A*) puis chez les Hominidés (*FCGR2C* et *FCGR3B*) de gènes codant des récepteurs Fc ayant de nouvelles propriétés, tout en rendant instable ce cluster (variation de nombre de copies), et très complexe son analyse chez l'Homme. Grâce à une approche originale de pyroséquencage, nous sommes parvenus à étudier simultanément le polymorphisme allélique ORF/STOP du *FCGR2C*, ainsi que son nombre de copies. Nous avons ainsi révélé de nouveaux déséquilibres de liaison, s'ajoutant au déséquilibre *FCGR3A-FCGR2A* dont nous avons montré l'importance d'une prise en compte adaptée dans les études d'association avec la réponse aux anticorps thérapeutiques. Ces résultats devraient contribuer à améliorer le développement pré-clinique (pertinence des modèles animaux) et clinique (variabilité des effets) des anticorps thérapeutiques.

Mots-clés : récepteurs pour la portion Fc des IgG - polymorphismes génétiques - anticorps thérapeutiques – CNV – déséquilibre de liaison.

Résumé en anglais

Fc receptors play an important allowing connexion between immune cells and antibody notably therapeutic. In this thesis, we have shown that homologous recombination events, knock-in by retroviral insertion and segmental duplication led to the acquisition in primates (*FCGR2A*) then in Hominids (*FCGR2C* and *FCGR3B*) of genes coding for Fc receptors with new properties, led to genomic instability of the cluster (copy number variation) and to complex analysis in human. Through a original pyrosequencing approach, we have studied simultaneously ORF/STOP polymorphism and copy number variation of *FCGR2C*. We have also revealed new linkage disequilibrium, additionnaly to *FCGR3A-FCGR2A* disequilibrium which we have shown the importance of a suitable methodology in association studies with responses to therapeutic antibodies. These results contribute to improve pre-clinical (of animal models) and clinical (variability effects) development of therapeutic antibodies.

Keywords : receptors for the Fc portion of IgG - genetic polymorphisms - therapeutic antibodies – linkage disequilibrium.