



Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

UMR CNRS 7276- INSERM 1262 CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

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

Discipline : Science Biologie Santé/Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue par

Zeinab DALLOUL

Le 26 Novembre 2018

**Mécanistique de la commutation de classe des immunoglobulines
et production de classes rares (IgE, IgA2 et pseudo-IgG)**

Thèse dirigée par Pr. Michel COGNÉ

Rapporteurs

Dr. Marion Espéli

Dr. Pierre Bruhns

Chargée de recherche INSERM-Paris

Directeur de recherche INSERM-Paris

Examineurs

Dr. Ahmed Amine Khamlichi

Dr. Claude-Agnes Reynaud

Directeur de recherche-Toulouse

Directeur de recherche INSERM-Paris

Directeurs et co-directeurs de thèse

Pr. Michel Cogné, Professeur des Universités Limoges

Dr. Jeanne Cook-Moreau, Maître de conférences, CRIBL, Université de Limoges

Dr. Yolla El Makhour, Université Libanaise, Liban



*Islamic Association for
Guidance &
Higher Education*



Au cours de ces travaux de thèse, j'ai bénéficié pendant les trois premières années d'un financement par le centre islamique d'orientation et de l'éducation supérieure (CIOES) du Liban. J'ai eu par la suite un contrat doctoral avec l'université de Limoges pour un an pour finaliser les projets. La source essentielle était une bourse FFRMG (Fondation Française pour la Recherche sur le Myélome et les Gammopathies).



Laboratoire CRIBL « Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations »
UMR CNRS 7276, INSERM 1262
Faculté de Médecine, CBRS : Centre de Biologie et de Recherche en Santé
2, rue du Docteur Marcland
87025 LIMOGES Cedex



Faculté de

Médecine
Limoges

*Quoique je puisse dire et écrire,
je ne pourrais exprimer ma grande affection
et ma profonde reconnaissance*

Je dédie cet événement marquant de ma vie

*À la mémoire de **mon cher Papa** disparu trop tôt.*



*J'espère que, du nouveau monde qui te contient, tu apprécies cet humble geste
comme preuve de reconnaissance de la part de ta fille qui a toujours prié pour le
salut de ton âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !*

Tu étais toujours dans mon esprit et dans mon cœur durant ces années

A ma très chère maman



*Toute l'encre du monde ne pourrait suffire pour exprimer mes sentiments envers
un être très cher.*

*Ce travail est le résultat de l'esprit de sacrifice dont tu as fait preuve, de
l'encouragement et le soutien que tu ne cesses de manifester, j'espère que tu y
trouveras les fruits de ta semence et le témoignage de ma grande fierté de t'avoir
comme mère.*

*J'implore Dieu, tout puissant, de t'accorder une bonne santé, une longue vie et
beaucoup de bonheur.*

A mes sœurs Chadia, Katia et Iman

A mon petit frère Mohammad



«Le bonheur ne coûte rien sauf le courage de l'affronter.»

Proverbe Soufi

Remerciements

A l'issue de la rédaction de cette thèse, je suis convaincue que ce travail est un effort collectif impossible que je n'ai pu le faire toute seule sans le soutien d'un très grand nombre de personnes du laboratoire et hors du labo qui m'ont permis de progresser et d'arriver à ce jour aussi important dans ma vie.

En premier lieu, je tiens à remercier de cœur mon directeur de thèse Pr. Michel Cogné pour la confiance qui m'a accordée en acceptant de diriger ce travail, pour ses multiples conseils, son aide, son respect et pour m'avoir appris comment être une bonne élève plus autonome tout au long de ces années de thèse. J'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral. Un grand merci pour vous. En tant que directeur d'UMR 7276, merci de me donner l'opportunité d'être un membre de cette équipe et de m'accueillir au sein de votre laboratoire.

Je souhaiterais exprimer aussi mes sincères gratitude à mes deux codirectrices de thèse Dr. Jeanne Cook-Moreau et Dr. Yolla El Makhour. Merci beaucoup Jeanne, ma deuxième maman à l'étranger, tu étais toujours à côté de moi et surtout pendant les périodes les plus difficiles. Merci de me corriger toujours mes fautes d'orthographe. Pareil, un grand merci pour Dr. Yolla, pour ton soutien de loin. J'apprécie beaucoup le temps que tu m'as consacré pour discuter les projets, les résultats et surtout d'essayer de me soutenir moralement.

Je voudrais remercier chaleureusement les membres de jury qui ont bien accepté de juger mon travail de thèse. Merci aux Dr. Pierre Bruhns et Marion Espéli de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie aussi mes deux examinateurs Claude-Agnès Reynaud et Ahmed Amine Khamlichi d'accepter d'examiner ce travail.

Mes remerciements vont également à Brice, mon petit chef, qui m'a appris pas mal de manip surtout au début de ma thèse. Merci de suivre mes nouvelles du loin et de me soutenir toujours. Je t'espère une vie pleine de joie et une bonne chance dans ton post-doc aux states.

Maintenant c'est le temps pour remercier tous les membres d'UMR 7276 présents et qui ont quitté le team. Merci beaucoup Batoul et Hussein, groupe <Castel Phebus>, vous allez me manquer beaucoup mes voisins. Merci à mes collègues Leena, Nour, Racha, Hend, Ophélie, Omar, Jean-Marie, Morgane, Sébastien, Victoria, Emilie, Audrey, Nivine, Nicolas, Anderson. Merci d'être toujours présents pour m'écouter et me comprendre. Je vous souhaite une bonne continuation remplie de succès et de bonheur. Merci Julie pour tes conseils surtout pendant la rédaction de cette thèse.

Un grand merci à Eric, Laurent, Jean-Claude, Christophe, Anne, Yves, Sophie, Sandrine, Stéphanie pour vos encouragements et vos aides. Merci Jean-Claude pour la très bonne ambiance que j'ai toujours trouvée en votre présence.

Je ne peux pas oublier les ingénieurs du laboratoire. Merci à Mylène, je t'ai pas mal déranger pour les compensations en cytométrie en flux. Merci pour ta sympathie que tu m'as témoigné. Egalement merci beaucoup à Claire, Cendrine, Zéhli, Marie Marquet, Christelle. Votre présence dans l'équipe m'a fait toujours sentie que je suis parmi ma famille. Merci aussi François pour les analyses bioinformatiques, c'était très gentil de m'aider pendant ma présence dans le laboratoire.

Merci aussi Aurore, Sara, Alexis.

Chaleureusement je voudrais remercier Sylvie, Bernadette et David qui m'ont offert une grande aide dans la partie animalerie. Merci Sylvie pour ta gentillesse et tes conseils. Vous allez me manquez tous.

Je souhaiterais aussi adresser ma gratitude à l'équipe du Pr. Jean Feuillard. Merci Jean, Chantal, Nathalie, Robin, Oussama, Cathy, Christelle Vincent-Fabert. Vous étiez tellement gentils et humains avec moi. Merci beaucoup pour vos encouragements et vos aides.

Non ce n'est pas la fin, merci aux personnes qui m'ont soutenue de loin : Zahraa El Bazzal, Aya Atwe, Fabienne Bejjani, Rim Akiki. Merci d'être dans ma vie mes "best friends".

Je garde cette dernière partie à ma famille "ma source de force" sans laquelle je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci beaucoup Maman pour ton soutien quotidien indéfectible et ton enthousiasme à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Je ne trouve pas les mots que tu mérites pour te dire merci pour cette tendresse infinie. Merci mes deux grandes sœurs Chadia et Katia. Vous étiez toujours mon exemple typique en patience, merci mon petit mignon frère Mohammad, merci pour ton humour tous les jours. Merci de m'aider accomplir cette tâche et de dépasser les moments durs. J'espère que vous êtes tous fiers de votre sœur. Je vous aime beaucoup, toujours, <My everything>. Impossible d'oublier ma petite sœur Iman, aussi membre d'UMR 7276. Tu étais et tu es toujours un vrai exemple d'une sœur qui essaye d'entrer la joie et le bonheur dans la vie de sa sœur. Merci de ta présence à côté de moi pendant ces quatre années de thèse. J'adresse mille mercis à toi aussi de m'aider dans tous les papiers et les démarches officielles que je déteste à faire dans ma vie. C'est unique que nous les deux soutenions dans la même période, les futures Dr Dalloul de la famille.

Finalement, c'est ton tour mon ange, mon papa. Ton rêve de me voir à ce niveau d'éducation est devenu vrai aujourd'hui. Mais ma joie est incomplète en ton absence. Ce travail est le fruit de ton effort pendant tous mes années d'études. Merci beaucoup pour tous les souvenirs de ces bons moments passés ensemble durant toutes ces années. Mes souhaits c'étaient d'être avec moi ce jour, mais la mort nous a séparées. Mais j'espère que tu es fier de moi. Mes sincères gratitudes pour tous que tu m'as offerts dans ma vie. Tous ces mots restent insuffisants pour te remercier «my angel».

Résumé

Le processus de la commutation de classe ou commutation isotypique (CSR) des gènes d'immunoglobulines caractérise les cellules de la lignée B et implique principalement les régions switch précédant les gènes constants au sein du locus IgH. Des jonctions entre la région switch donneuse S μ et celle acceptrice S α sont créées pendant ce processus. Plusieurs études ont démontré que le destin des cellules de la lignée B était largement modulé en fonction de la classe de l'immunoglobuline qu'elles produisent et en particulier selon les signaux transmis par leur BCR (qui peuvent par exemple pour la classe IgE, comporter des signaux pro-apoptotiques). Nous avons utilisé plusieurs modèles visant à l'étude de la physiologie et de la mécanistique du switch vers différentes classes de BCR et d'immunoglobulines peu exprimées. Nous avons cherché à forcer l'expression de l'isotype IgA2 grâce à un modèle transgénique dédié, dans le but d'approfondir les spécificités du signal BCR transduit par cet isotype en comparaison avec le BCR IgA1. En outre, et d'une façon très intéressante, nous avons découvert l'existence (jusqu'ici ignorée et masquée par les 4 autres sous-classes plus abondantes) d'une cinquième sous-classe d'IgG humaine, l'IgG5 qui est codé par un gène jusqu'ici faussement classifié pseudo-gène. Ainsi nous avons étudié les modalités d'expression du gène correspondant après un switch non-canonique, le répertoire normal des IgG5, leur représentation parmi les IgG humaines monoclonales ainsi que leurs fonctions immunitaires grâce à un IgG5 fabriquée artificiellement portant une activité anti-CD20 humaine. Enfin, nous avons testé des produits pharmaceutiques (RHPS4 : stabilisant des structures G-quadruplex au niveau d'ADN et JQ1 : inhibiteur des facteurs de transcription à bromodomaines), montrant leur capacité à retarder ou inhiber la commutation de classe in vitro mais aussi in vivo dans des souris allergiques.

Mots clés :

Cellules B, Immunoglobulines (Igs), commutation de classe (CSR), locus IgH, G-quadruplexe (G4), protéines de bromodomaines.

Summary

The process of class switch recombination (CSR) or isotypic switching of immunoglobulin genes characterizes the B cell lineage and primarily involves switch regions preceding the constant genes within the IgH locus. Junctions between donor switch region S μ and acceptor S α are generated during this process. Several studies have shown that the fate of B cells is largely modulated according to the class of immunoglobulin they produce and in particular the signals transmitted by their BCR (for example for IgE, BCRs can combine proapoptotic signals). We used several relevant mouse models to study the physiological aspect and the B cell compartment after switching to IgA2 (a dedicated transgenic model expressing IgA2) since IgA2 conveys a membrane signal different from that of IgA1. Interestingly, we also demonstrated the existence (till now ignored and maybe masked by the other 4 more abundant IgG subclasses) of a fifth subclass of human IgG, IgG5 which is encoded by a gene classified as a pseudo-gene. We studied the expression modalities of the corresponding gene after a non-canonical switch, the normal IgG5 repertoire, their representation among the monoclonal human IgGs as well as their immune functions through an artificially synthesized IgG5 with human anti-CD20 activity. In addition, we tested two pharmaceuticals drugs (RHPS4: stabilizer of G-quadruplex structures at the DNA level and JQ1: inhibitor of bromodomain proteins) showed their ability to delay or inhibit class switching towards IgE in vitro but also in vivo in allergic mice.

Keywords:

B cells, immunoglobulins (Igs), class switching (CSR), IgH locus, G-quadruplex (G4), bromodomain proteins.

Table de matières

Remerciements	7
Résumé	9
Summary	10
Abbréviations	13
Introduction générale.....	17
Chapitre I : La lymphopoïèse B	21
I. Les gènes des immunoglobulines	21
1. Les loci kappa et lambda	21
2. Locus des chaînes lourdes	22
3. Les recombinaisons du locus IgH pendant la différenciation des cellules B	24
3.1. Comment obtenir une immunoglobuline fonctionnelle	24
3.1.1. Mécanismes des réarrangements VDJ du locus IgH pendant la phase précoce du développement des B	25
3.1.2. Les réarrangements tardifs des loci d'immunoglobulines.....	28
3.1.2.1. Hypermutation somatique ou SHM	28
3.1.2.2. Commutation de classe ou CSR	30
3.1.2.2.1. La modulation du switch vers des Igs « rares » chez l'Homme (IgE, IgA2 et Pseudo-IgG)	34
i. IgE comme immunoglobuline rarement exprimée dans l'organisme	37
ii. IgA2 : l'IgA la moins abondante du sérum (l'IgA d'en bas !).....	41
iii. Pseudo-IgG : une nouvelle sous-classe d'IgG chez l'Homme ?	45
II. Les stades de différenciation des lymphocytes B	49
Chapitre II : Effets de certaines drogues sur le locus IgH et sur la CSR	55
I. Cas des quadruplexes de guanine (facteur cis)	55
1. Structure et caractéristiques des G-quadruplexes	55
2. Rôles biologiques des G-quadruplexes	56
3. Ligands des G-quadruplexes	59
3.1. Le RHPS4.....	59
3.1.1. Caractéristiques	59
3.1.2. Effets biologiques	59

II. Cas des protéines à bromodomaines (facteur <i>trans</i>) et de leurs ligands	60
1. Définition	60
2. Rôles biologiques	61
3. Petites molécules modulant les fonctions biologiques des bromodomaines	63
Objectifs et problématiques	66
Résultats	68
Article 1	69
Article 2	71
Article 3	73
Article 4	76
Discussion	78
Conclusion générales et Perspectives	88
Annexes	90
Annexes 1	91
Annexes 2	99
Annexes 3	103
Annexes 4	104
Annexes 5	105
Annexes 6	106
Annexes 7	107
Annexes 8	108
Références bibliographiques	109

Abréviations

3'RR: 3' Regulatory Region

α: alpha

κ: kappa

λ: lambda

μ: mu

δ: delta

ε: epsilon

γ: gamma

ψG: pseudo-gamma

A

Ac: Anticorps

ACF-WSTF: ATP-utilizing, chromatin remodelling and assembly factor–Williams syndrome transcription factor

ADCC: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity

A-EJ: Alternative End Joining

Ag: Antigen

AID: Activation-Induced cytidine Deaminase

ALT: Alternative Lengthening of Telomeres

AP: Site Apyrimidinique/Apurinique

AP1 : Activator Protein 1

APE1/2: AP Endonucléase ½

APRIL : A Proliferation-Inducing Ligand

ARN PolIII: ARN polymérase II

ASC: Antibody-Secreting Cells

ASH1L: Absent from Small and Homeotic disks protein 1-Like

ASGP-R: Asialoglycoprotein Receptor

Asn: Asparagine (acide aminé)

B

BAFF: B-cell Activating Factor

BAZ1A: Bromodomain Adjacent to Zinc finger domain protein 1A

BCL2: B-cell lymphoma 2

BCR: B Cell Receptor

BER: Base Excision Repair

BET: Bromo et Extra-Terminal

BLNK: B Cell Linker

BRD: Bromodomain-containing protein

BRWD1: BRD and WD repeat-containing protein 1

BSAP: B cell Specific Activator protein

BTK: Bruton Tyrosine Kinase

C

C1q: Complement Component 1, q Subcomponent

CD: Cluster de différenciation

CDC : Complement Dependent Cytotoxicity

CDR: Complementarity Determining Region

CH: Constant Heavy chain

ChIP: Chromatin immunoprecipitation

CL: Constant Light chain

CLP : Common Lymphoid Precursors

CTCF: CCCTC-binding factor

CREBBP: CREB-binding protein

CSH: cellule souche hématopoïétique

CSR: Class Switch Recombination

D

D: Segments de Diversité

DBR1 : Debranching RNA Lariats 1

DC: Dendritic Cells

dC: désoxy-Cytidine

dIgA: dimeric IgA

DSB: Double-Strand Break

dU: désoxy-Urdine

E

E: Enhancer

E2A: E box protein Binding 2A

EBF1: Early B cell Factor-1

EP300: E1A-associated protein P300

EXO1 : Exonucléase 1

F

FO: cellules folliculaires

FOXP3 : Forkhead-Box-Protein P3

FR: Framework Region

G

G: Guanine

G4: G-quadruplexe

GC: Germinal Center

GFP: Green Fluorescent protein

H

HMG: High-Mobility Group

HoxC4: Homeobox protein 4

HP1: Heterochromatin-associated Proteins

Hs : activateurs transcriptionnels hypersensibles à la DNase I

I

Id2: DNA-binding protein inhibitor

Ig: Immunoglobuline

IgH: Immunoglobulin Heavy chain locus

IgL: Immunoglobulin Light chain locus

IKK: Inhibitor of NF- κ B (I κ B) Kinase

IL: Interleukine

INF- γ : Interféron- γ

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation motif

J

J: Segments de Jonction

K

Kb: Kilobase

KDa: Kilodalton

KDM5C: lysine-specific demethylase 5C

L

LMPP: Lymphoid-primed Pluripotent Progenitors

LPS : Lipopolysaccharide

LS: Like Switch

LSR: Locus Suicide Recombination

LZ: Light Zone

M

M1: Exon membranaire 1

M2: Exon membranaire 2

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MARs : Matrix Associated Region

mIgE : membrane IgE

m_sIgE : membrane Short IgE

m_lIgE : membrane Long IgE

MLL : mixed-lineage leukaemia

MM: Multiple myeloma

MMR: Mismatch Repair pathway

MPP: Multipotent progenitors

MSH: Mut S homolog

MZ : Cellules B de la zone marginale

N

NFAT: Nuclear factor of activated T cells

NF- κ B: Nuclear factor- κ B

NHEJ: Non Homologous End Joining

NK: Natural Killer cells

NORC: nucleolar remodelling complex

NuRD: nucleosome remodelling and deacetylase

P

Pax5: Paired-box gene 5

pb: paire de base

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

pIgR : Récepteur d'immunoglobulines polymériques

PKC : Protéine Kinase C

PLC γ 2 : Phospholipase Cy2

Pol η : Polymérase η

P-TEFb : Positive Transcription Elongation Factor

PTX3: Pentraxine 3

PU1: Purine box factor-1

O

Oct-1 : Octamer-binding transcription factor 1

R

RAG : Recombination-Activating gene

RSS : Recombination Sequence Signal

S

S: Switch

SC: Composant Sécrétoire

SHM: Somatic HyperMutation

SIgA: Secratory IgA

SLC: Surrogate Light Chain

SMARCA: SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin subfamily A member

SMUG1: Single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase

SP: speckled protein

STAT6: Signal transducer and activator of transcription 6

SWI-SNF: Switch/Sucrose non-fermenting

SYK: Spleen Tyrosine Kinase

T

TGF- β : Transforming Growth Factor

TH: T helper cells

TFs: Transcription Factors

TLR: Toll-like Receptor

TLS: Translesion Synthesis

Treg: T regulatory cells

TRIM: Tripeptide Motif-containing

U

UNG: Uracil DNA-Glycosylase

V

V: Segment Variable

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VH: Région et segments variable des chaînes lourdes

VL: Région et segments Variable des chaînes légères

W

WICH : WSTF-ISWI chromatin remodelling complex

Z

ZMYND8: zinc-finger MYND domain-containing protein 8

Table des illustrations

Figure 1: Représentation schématique de la structure d'une Immunoglobuline	19
Figure 2: Représentation schématique des loci de chaînes légères kappa et lambda	22
Figure 3: Représentation schématique du locus IgH d'immunoglobuline.....	24
Figure 4: Représentation schématique de la recombinaison V(D)J dans la moelle osseuse	26
Figure 5 : Mécanistique des recombinaisons VDJ.....	27
Figure 6: Mécanisme moléculaire de SHM.....	30
Figure 7 : Mécanisme de la commutation de classe (CSR) vers IgA	32
Figure 8: Cascade de transduction de signalisation via le BCR	34
Figure 9: Représentation schématique de la structure pentamérique d'IgM	36
Figure 10: Représentation schématique d'Immunoglobuline E (IgE)	37
Figure 11 : Mécanismes de CSR vers l'immunoglobuline E (IgE)	39
Figure 12 : Mécanismes d'allergie impliquant les cellules Th2	41
Figure 13: Représentation schématique des différentes formes d'IgA chez l'Homme.....	43
Figure 14 : Sites de glycosylation des chaînes lourdes d'IgA1, IgA2m (1) et IgA2m (2)	43
Figure 15 : Les différentes sous-classes d'IgG.....	46
Figure 16 : Les récepteurs d'IgG humaines (FcγR).....	49
Figure 17: Le microenvironnement du centre germinatif.....	53
Figure 18: Représentation schématique d'un G-quartet.....	56
Figure 19: Les structures lors de la transcription de régions switch portant des motifs	57
Figure 20: Les G4 au niveau du locus IgH.....	58
Figure 21: Représentation schématique de la structure d'un bromodomaine	61
Figure 22: Rôles des bromodomains dans la régulation des gènes	63
Figure 23: Mécanisme de ciblage des ARN post-épissés par des AID durant la CSR.....	81

Introduction Générale

Chez les vertébrés supérieurs, le système immunitaire est directement impliqué pour protéger l'organisme contre les pathogènes extérieurs considérés comme non-soi (virus, parasites, bactéries), mais il peut aussi être dirigé contre les éléments du soi (cas des maladies auto-immunes). Différents organes et types cellulaires, constituant le système immunitaire, accomplissent ces tâches. Un dysfonctionnement immunitaire peut être à l'origine de nombreuses pathologies dys-immunitaires, notamment allergiques et auto-immunes.

L'immunité est divisée en deux grandes entités: l'immunité innée et l'immunité adaptative. La première, qui agit d'une façon immédiate et spontanée, permet la défense de l'organisme contre les agents infectieux en recrutant les cellules immunitaires (macrophages, polynucléaires...) vers le site de l'infection. Ce type d'immunité est peu spécifique. Par contre, l'immunité adaptative permet une reconnaissance spécifique très fine de l'antigène, dans le détail de chacun de ses épitopes. Elle implique deux lignées lymphoïdes, les lymphocytes B et T, et se manifeste *in fine* par la production d'anticorps (réponses humorales), et la génération de cellules spécifiques aux fonctions multiples (auxiliaires, régulatrices, ou encore cytotoxiques) qui seront les garantes de la mémoire immune.

Les lymphocytes B expriment à leur membrane plasmique un récepteur transmembranaire appelé "Récepteur des Cellules B" pour l'antigène, ou "BCR pour B-Cell Receptor". Ce récepteur est une immunoglobuline monomérique étroitement associée à deux autres protéines transmembranaires exprimées par les cellules B: CD79a et CD79b. En cas de liaison d'un antigène, la transduction du signal est assurée par la partie intra-cytoplasmique des CD79a et CD79b qui possèdent les motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif). La phosphorylation de ces motifs par des kinases associées au BCR lors de leur activation, permet une cascade de signalisation au sein des lymphocytes B.

Les immunoglobulines (Ig) sont des hétérodimères protéiques qui peuvent en fait exister sous deux formes différentes: tandis que la forme membranaire exprimée à la surface des cellules B forme le BCR, la forme sécrétoire est produite par les plasmocytes sous forme d'anticorps. Ceux-ci sont les molécules effectrices terminales des cellules de la lignée lymphocytaire B. Leur rôle principal consiste, en se liant spécifiquement à un antigène, à le neutraliser et l'éliminer. En termes de structure, les immunoglobulines des mammifères sont constituées de deux chaînes lourdes ou IgH (Immunoglobulin Heavy Chain) qui déterminent les cinq classes des Igs: IgM, IgD, IgG, IgE et IgA et qui correspondent aux chaînes μ , δ , γ , ϵ et α respectivement. Lors d'une réponse immune

primaire, les IgM sont les premières Igs sécrétées; elles sont sous forme pentamérique. Les IgD sont produites majoritairement lors d'une réponse anti-bactérienne. Les IgA sont produites dans de nombreux tissus (notamment rate, moelle osseuse et foie) sous forme surtout monomérique, mais elles sont aussi une composante majeure de réponse à des infections des muqueuses, site où elles sont surtout sous forme dimérique ou polymérique et existent chez l'Homme en deux sous-classes : IgA1 (majoritaire) et IgA2 (moins abondant). Les IgE, essentielles contre les venins et certaines toxines, sont aussi impliquées dans la défense anti-parasitaire, et en pathologie dans les réactions allergiques ; ces Ig sont produites en très faible quantité. Mais la classe majeure produite dans notre organisme est l'IgG, très diffusible, ayant de multiples capacités de cytophilie, et impliquée dans les réponses anti-virale, anti-bactérienne, anti-parasitaire... Les IgG sont diversifiées en plusieurs sous-classes ayant des fonctions effectrices différentes: IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 chez la souris et IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 chez l'Homme. (Pendant ma thèse, nous avons identifié une cinquième sous classe : pseudo-IgG chez l'homme (IgG5) qui sera détaillée par la suite). Les Igs ont aussi deux chaînes légères ou IgL (Immunoglobulin Light Chain) divisées en deux types, Ig κ et Ig λ . Les deux chaînes lourdes et légères sont identiques deux à deux et reliées entre elles par des ponts disulfures. Pour chaque immunoglobuline, on peut distinguer deux régions différentes: une région variable amino-terminale constituant le site de reconnaissance de l'antigène et formée de l'association des domaines variables des IgH (VH) et des IgL (VL) et une région constante carboxy-terminale qui confère des fonctions effectrices aux Igs (fixation sur certains récepteurs exprimés sur d'autres types cellulaires, activation du système du complément...) (**Figure 1**).

Les Igs sont codées par trois loci différents : deux pour les chaînes légères: loci Ig κ et Ig λ , et un pour les chaînes lourdes: IgH. Pour devenir fonctionnels, les lymphocytes B subissent plusieurs types de recombinaisons de leur génome pour assembler une séquence d'Ig spécifique. Alors que les réarrangements V(D)J précoces génèrent un répertoire pré-immun aux stades pro-B/pre-B, les gènes des Ig vont continuer à maturer après le contact avec l'antigène en modifiant la classe des régions constantes (par CSR pour *Class Switch Recombination*) ou en modifiant les séquences des régions variables pour sélectionner une structure de haute affinité pour sa cible (par SHM pour *Somatic Hypermutation*) (2 processus dont l'accessibilité dépend étroitement d'un super-enhancer du locus IgH).

Nous nous sommes intéressés dans ce travail aux recombinaisons qui touchent le locus IgH et surtout les recombinaisons qui nous donnent des immunoglobulines « rarement » exprimées (IgE, Pseudo-IgG ou IgG5 et, à moindre degré de rareté, IgA2) mais aussi aux inhibiteurs qui pourraient

bloquer ou retarder le switch (CSR) du fait de leur affinité soit pour l'ADN des régions switch (RHPS4 qui stabilisent les G-quadruplexes) soit pour des protéines connues comme agissant au niveau des enhancers (JQ1, qui inhibe les protéines possédant des bromodomaines et dont le rôle sur la CSR n'a jamais été exploré en détail).

La partie « revue de la littérature » détaillera les différentes étapes de l'ontogenèse des lymphocytes B, en approfondissant les recombinaisons qui touchent le locus IgH ainsi que les facteurs qui favorisent ou inhibent la commutation de classe. En outre, je décrirai les différentes classes d'Ac en insistant sur les Igs produite en très faibles quantités.

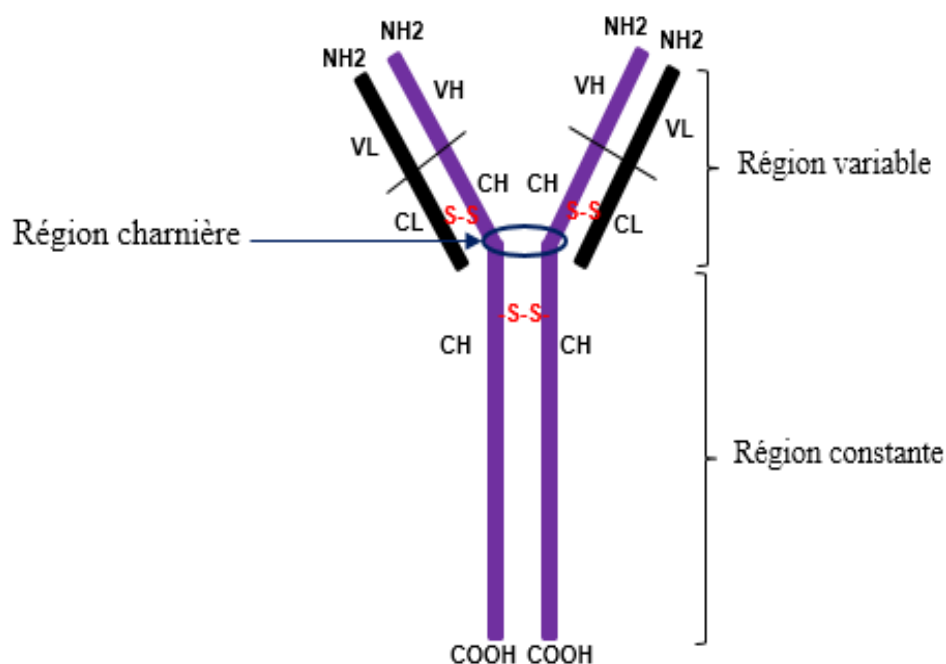


Figure 1: Représentation schématique de la structure d'une Immunoglobuline.

Les chaînes lourdes sont représentées en violet et les chaînes légères en noir. Les chaînes lourdes sont composées des VH et des CH. Les chaînes légères sont formées des VL et des CL. La région variable est constituée de VL-CL/VH-CH (une partie de CH). La région constante est formée de CH. Les chaînes lourdes et légères, ainsi que les deux chaînes lourdes sont reliées par des ponts disulfures –S-S–.

CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I. La lymphopoïèse B

I. Les gènes des immunoglobulines

Les gènes des immunoglobulines de l'Homme et de la souris sont répartis en loci localisés sur trois chromosomes différents (deux loci qui codent pour les chaînes légères kappa ($Ig\kappa$) et lambda ($Ig\lambda$), et un qui code pour la chaîne lourde (IgH)). Dans leur configuration germinale, ces loci sont formés de successions des segments suivants: du côté 5', on distingue les gènes variables [V], les gènes de diversité [D] (existant uniquement au niveau du locus IgH) et les gènes de jonction [J]. Cette partie V(D)J code, une fois assemblée, la région variable responsable de la reconnaissance d'un antigène donné. Du côté 3' du locus, existent les gènes constants (C) des chaînes d'Ig. Ces trois loci sont contrôlés par différents éléments de régulation transcriptionnelle qui régulent également l'accessibilité aux recombinaisons. Ces éléments incluent de nombreux promoteurs (notamment en amont de chaque segment V, mais aussi à différents niveaux de « transcription germinale » du locus, notamment à proximité des gènes constants), ainsi que des activateurs (« enhancers ») ou encore des silencers. Les enhancers principaux sont introniques (E_k et E_μ suivant les segments J_k et J_H), ou bien situés en 3' de chacun des trois loci $Ig\kappa$, $Ig\lambda$ et IgH . Pour ce dernier locus, les enhancers 3', multiples, forment un « superenhancer » encore appelé région régulatrice 3' (IgH 3'RR) (Giudicelli et al., 2005; Pinaud et al., 2011).

1. Les loci kappa et lambda

Le locus $Ig\kappa$ est situé sur le chromosome 6 chez la souris et 2 chez l'Homme. La différence entre le locus murin et humain est le nombre de segments formant les gènes V, J et C. Il existe: 174 segments V_κ murin dont 94 à 96 sont fonctionnels et 76 V_κ humain dont 31 à 35 sont fonctionnels; 4 segments J_κ chez la souris et 6 segments chez l'Homme et un seul segment C_κ chez la souris et chez l'Homme (**Figure 2A**) (Giudicelli et al., 2005).

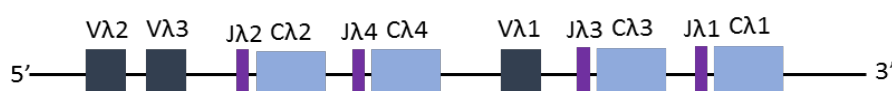
Le locus $Ig\lambda$ est situé sur le chromosome 16 chez la souris et 22 chez l'Homme. Les segments de ce locus sont organisés d'une façon différente du locus kappa. Il comporte 3 segments V_λ chez la souris organisés sous cette forme : $V2-V3$ - $J2-C2-J4-C4$ et $V1-J3-C3$ - $J1-C1$ (**Figure 2B**). Cette organisation est différente chez l'Homme où ce locus est formé de 69 gènes V_λ (dont 31 sont fonctionnels); 4 à 7 segments J_λ ($J\lambda-C\lambda$). Outre des variations alléliques de nombre, les clusters $J-C\lambda1$, $J-C\lambda2$, $J-C\lambda3$, et $J-C\lambda7$ sont fonctionnels alors que les clusters $J-C\lambda4$, $J-C\lambda5$ et $J-C\lambda6$ sont

non fonctionnels (**Figure 2C**) (van der Burg et al., 2001; Giudicelli et al., 2005; Tümkaya et al., 2001; Zou et al., 2003).

A. Locus Ig κ



B. Locus Ig λ murin



C. Locus Ig λ humain



Figure 2: Représentation schématique des loci de chaînes légères kappa et lambda.

A: Représentation du locus Ig κ localisé sur le chromosome 6 chez la souris et 2 chez l'Homme.

B: Représentation du locus Ig λ murin situé sur le chromosome 16.

C : Représentation du locus Ig λ humain localisé sur le chromosome 6.

2. Locus des chaînes lourdes

Le locus IgH est localisé sur le chromosome 12 chez la souris et le chromosome 14 chez l'humain. Il est divisé en plusieurs segments situés tout au long du locus. Du côté 5' (télomérique), est localisé le cluster des gènes variables (VH) (216 segments chez la souris et 164 segments chez l'Homme), de diversités (DH) (9 segments chez la souris et 37 segments chez l'Homme) et de jonctions (JH) (4 segments chez la souris et 6 segments chez l'Homme). Sur ce locus, diverses séquences régulatrices spécifiques de la lignée B agissent de façon concertée pour induire l'accessibilité aux réarrangements successifs qui gouvernent l'expression des immunoglobulines, réarrangements DJ et VDJ aux étapes précoces, puis réarrangements de commutation de classe (switch ou CSR) vers les différentes classes d'Ig. Les activateurs principaux actifs aux différents stades sont: E μ , situé entre la région JH et C μ du côté 5' du cluster des gènes constants, et actif

surtout aux stades précoces, il comprend un certain nombre de sites de liaison pour les facteurs de transcription spécifiques aux cellules B (Bottaro et al., 1998; Ernst and Smale, 1995). Il existe des deux côtés d'E μ des régions d'ancrage à la matrice nucléaire ou MARs (Matrix Associated Region). Ces éléments, en agissant avec E μ , permettent à ce dernier d'agir à distance. Oancea et ses collègues ont montré que la délétion des régions MARs diminue l'expression d'un transgène IgM dans un hybridome (Oancea et al., 1997). D'autres études ont montré que l'absence de l'activateur transcriptionnel E μ et de ses éléments MARs flanquants diminue la commutation de classe (CSR) mais elle n'est pas totalement abolie (Bottaro et al., 1998). Un autre activateur majeur est la région régulatrice 3'RR dans la région 3' flanquante du gène C α , du côté 3' du locus IgH (côté centromère). Cette région 3'RR est composée chez la souris de 4 activateurs transcriptionnels hypersensibles à la DNase I (HS3a, HS1.2, HS3b, HS4) et suivi de régions isolatrices (HS5, HS6 et HS7) qui incluent des sites de liaison pour CTCF (CCCTC-binding factor) et marquent la fin du locus (Garrett et al., 2005). D'autres séquences régulatrices ont été décrites au sein du locus IgH murin, avec 4 sites hs en amont du cluster V (Pawlitzky et al., 2006), et 6 autres dans la région V–D intergénique (Featherstone et al., 2010), auxquels on peut ajouter le « promoteur-enhancer DQ52 » en partie superposé à la séquence codante de ce segment D (Alessandrini and Desiderio, 1991).

L'organisation du locus IgH est différente chez l'Homme. Il existe en effet une duplication ancestrale du locus IgH commune à tous les primates de l'ancien monde, avec un module dupliqué qui inclue un ensemble de gènes γ , ϵ et α suivi des mêmes éléments régulateurs dupliqués en 3' de chaque gène α . Le locus IgH contient donc deux régions régulatrices très homologues: 3'RR1 et 3'RR2 avec au sein de chacune des activateurs HS3, HS1.2 et HS4 (Bébin et al., 2010; D'Addabbo et al., 2011).

Entre la région 5' et 3' se trouve la région des gènes constants qui codent les cinq classes d'Igs. Chaque gène est formé de plusieurs exons qui codent les différents domaines de chaque classe d'anticorps (CH1 à CH3 ou CH4 selon les isotypes) et la région charnière en plus des exons membranaires de chaque immunoglobuline. Chaque région constante est précédée par une région switch constituée de répétitions riches en GC (d'une longueur de 20-50 pb), dont leurs longueurs varient de 1 à 10 kb selon l'isotype d'Ig (à l'exception d'IgD qui est dépourvue d'une vraie région switch) elle-même précédée par un promoteur "I".

De façon intéressante, des régions très répétitives « like switch » (LS) sont aussi présentes dans la région 3'RR chez l'Homme et chez la souris (Chauveau and Cogné, 1996; D'Addabbo et al., 2011;

Giudicelli et al., 2005; Péron et al., 2012), et peuvent être ciblées par des recombinaisons voisines de la commutation de classe mais abrogeant l'expression des gènes constants IgH au lieu de la commuter (Péron et al., 2012).

Les loci IgH murin et humain sont représentés dans la **Figure 3A** et **3B** respectivement.

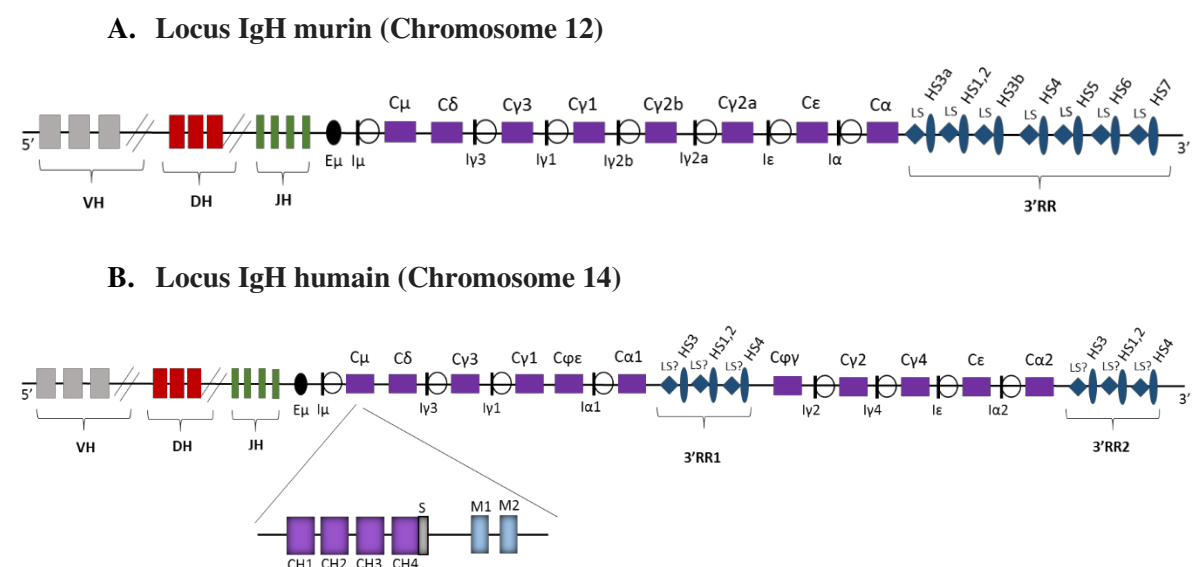


Figure 3: Représentation schématique du locus IgH d'immunoglobuline.

A: Représentation du locus IgH sur le chromosome 12 chez la souris.

B: Représentation du locus IgH sur le chromosome 14 chez l'Homme avec une duplication de la région régulatrice 3'RR (3'RR1 et 3'RR2). Les petits cercles devant les gènes constants représentent les régions switch. La région constante (exemple Cμ) montre les quatre exons CH1, CH2 CH3 et CH4 lui-même associé à l'exon sécrétoire (S) et aux exons membranaires (M1 et M2).

3. Les recombinaisons du locus IgH pendant la différenciation des cellules B

3.1) Comment obtenir une immunoglobuline fonctionnelle ?

Dans leurs configurations germinales, les loci κ , λ et IgH non réarrangés ne peuvent pas coder de protéines fonctionnelles. Pour devenir « fonctionnels », ils doivent être remodelés, transcrits et réarrangés au fil d'étapes qui ponctuent le processus de la lymphopoïèse B ou ontogenèse B. Chez les mammifères, les réarrangements V(D)J ont d'abord lieu (dans le foie fœtal chez l'embryon ou la moelle osseuse chez l'adulte) indépendamment de l'antigène (stades précoces pro-B). Ces phases précoces de la lymphogenèse B permettent la formation d'un BCR fonctionnel (ou immunoglobuline fonctionnelle) de type IgM après les réarrangements VJ et VDJ respectivement sur les loci Ig κ ou Ig λ et sur le locus IgH.

Plus tard, les cellules B matures peuvent subir d'autres remaniements dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les ganglions lymphatiques ou les plaques de Peyer après la rencontre avec un antigène donné (stade tardif du développement des lymphocytes B) (pour revue: Pieper et al., 2013). Ces phases tardives regroupent les recombinaisons de classe ou CSR qui ont lieu uniquement sur le locus IgH et qui permettent l'obtention d'une immunoglobuline autre que l'IgM, adaptant ainsi les mêmes domaines de reconnaissance de l'Ag à une nouvelle fonction effectrice bien caractérisée d'une Ig non-IgM. Un autre type de remaniement est l'hypermutation somatique ou SHM qui permet, chez la souris et l'Homme, la maturation de l'affinité du BCR et des anticorps *via* l'introduction de mutations au niveau de la région variable du locus IgH augmentant ainsi la spécificité et l'affinité vis-à-vis d'un antigène donné (Sheppard et al., 2018). Dans certaines espèces tels que le poulet, le mouton ou encore le lapin, il semble particulièrement fréquent que ce soit plutôt des phénomènes de conversion génique qui puissent permettre la maturation d'affinité des régions variables.

Le type alternatif de remaniement évoqué plus haut comme abrogeant l'expression du locus IgH repose sur les mêmes enzymes et survient selon un timing voisin de celui de CSR et SHM, mais il aboutit cette fois à la perte d'expression du locus et a donc été surnomé « recombinaison suicide du locus » ou LSR (pour Locus Suicide Recombination) responsable de la mort des lymphocytes B (Péron et al., 2012).

3.1.1) Mécanismes des réarrangements VDJ du locus IgH pendant la phase précoce du développement des B

Les recombinaisons V(D)J ont lieu dans la moelle osseuse. Elles assemblent les gènes V, D et J. Les mécanismes de cette recombinaison VDJ pendant chaque stade de développement précoce des lymphocytes B dans la moelle osseuse sont illustrés dans la **Figure 4**. Les réarrangements VDJ commencent par l'implication du complexe recombinaise: RAG1 et RAG2 (Recombination-Activated Gene). Schlissel et ses collègues ont montré qu'aucune recombinaison VDJ n'avait lieu chez des souris déficientes en l'une ou l'autre des protéines RAG, montrant leur importance critique pendant le développement des cellules B dans la moelle osseuse (Schlissel et al., 1993).

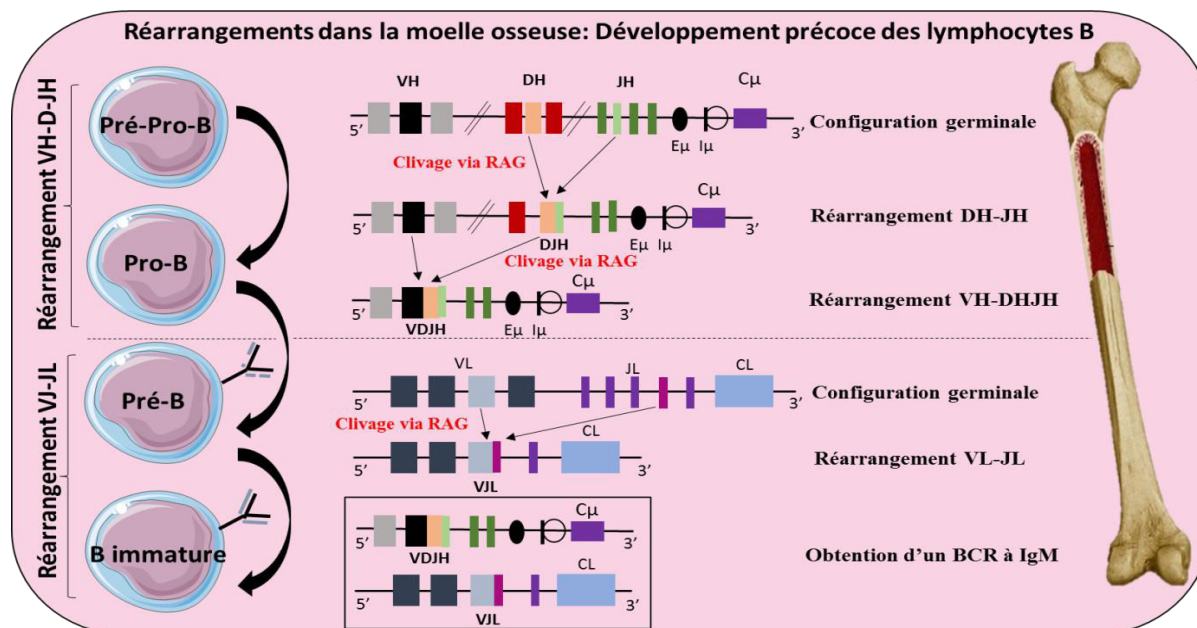


Figure 4 : Représentation schématique de la recombinaison V(D)J dans la moelle osseuse.

La création du répertoire antigénique commence dans la moelle osseuse en absence de tout antigène. La région variable du locus IgH située du côté 5' est dans une configuration germinale dans le stade pré-pro-B du développement des cellules B. Les premières recombinaisons V(D)J commencent durant la phase pro-B par les réarrangements D_H-J_H au premier temps suivi par des réarrangements V_H-DHJ_H . Par contre les premiers réarrangements V_L-J_L commencent pendant le stade pré-B. L'obtention d'un vrai BCR de type IgM n'a lieu que dans les cellules B immatures.

Les recombinaisons VDJ se produisent seulement entre les segments des gènes d'Ig flanqués de séquences conservées de signal de recombinaison ou RSS (Recombination Signal Sequence). Les RSS sont composées d'un heptamère conservé (7 nucléotides: CACAGTG) et d'un nonamère riche en A (9 nucléotides: ACAAAAACC) séparés par des espaceurs de 12 ou 23 pb non conservés. La recombinaison V(D)J se produit uniquement entre deux segments de gènes flanqués, respectivement, par des RSS qui contiennent 11 à 12 bases (RSS-12) et 22 à 23 (RSS-23) suivant alors une règle appelé la règle 12/23 (**Figure 5: gauche**) (Bassing et al., 2002). La règle 12/23 gouverne l'assemblage ordonné et correct des segments des gènes IgH pour donner des V-D-J bien associés, ou V-J dans des locus des chaînes légères d'Ig. Ainsi, la règle 12/23 sert à empêcher l'assemblage de la même classe de segments de gènes (V-V) ou de combinaisons incorrectes (c'est-à-dire VJ dans les locus de gènes contenant des segments D) (pour revue: Rodgers, 2017). Un cas exceptionnel utilisant deux segments D-D superposant ainsi 2 RSS pouvant prêter à des

combinaisons VDDJ est montré in-vivo et associé au développement de certaines maladies auto-immunes (Klonowski and Monestier, 2000; Klonowski et al., 1999; Watson et al., 2006).

Le processus de recombinaison V(D)J est divisé en deux phases: clivage et jonction (**Figure 5: droite**). Dans la réaction de clivage, les protéines RAG1 et RAG2 agissent ensemble comme une endonucléase; deux autres protéines accessoires du groupe à haute mobilité, HMG1 et HMG2, sont aussi impliquées pour aider les RAG dans leurs fonctions. Tout d'abord, les RAG1 et RAG2 se fixent sur les RSS-12 et RSS-23 aux bords des segments des gènes V, D et J. Les cassures double brin (DSB: Double-Strand Break) sont créées à la frontière du segment RSS et du segment codant. RAG1 introduit une coupure sur un simple brin générant ainsi un 3'-OH libre. RAG2 maintient le complexe RSS-RAG1 et attaque une autre séquence RSS donnant alors une structure en forme d'épingle à cheveux. Cette réaction donne, au niveau des RSS, deux extrémités codantes en épingle à cheveux et deux extrémités franches (Akamatsu and Oettinger, 1998; Fugmann, 2001; Pavlicek et al., 2008).

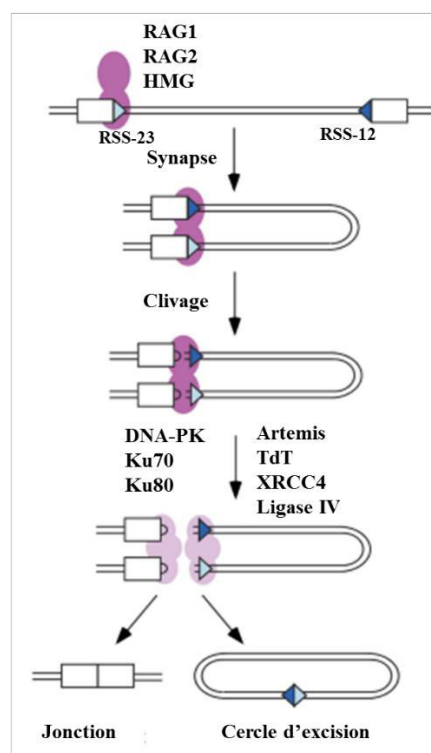
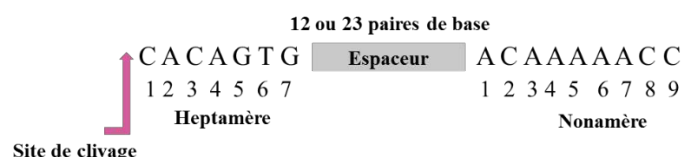


Figure 5 : Mécanistique des recombinaisons V(D)J.

Les segments codants V, D et J sont ciblés par des recombinases RAG1/2 et les HMG qui reconnaissent les séquences RSS comprenant des éléments heptamérique et du nonamérique séparés par des séquences spacers de 12 ou 23 pb. Une recombinaison efficace nécessite une paire RSS-12 /RSS-23. Lors de la liaison des protéines RAG, la paire RSS 12/23 est réunie pour former un complexe synaptique. Le clivage de l'ADN s'ensuit formant ainsi des structures en épingles à cheveux (qui seront ensuite ouvertes par Artemis). Ensuite certains facteurs tels que Ku70/80 et DNA-PK sont recrutés à ce niveau. Des nucléotides N sont ensuite ajoutés par la TdT. Les jonctions sont enfin ligaturées par le complexe Cernunnos, XRCC4 et la ligase IV (Adapté de Roth and Roth, 2000 (gauche) et Krangel, 2003 (droite)).

Dans la seconde réaction de jonction et de réparation, les DSB créées au niveau de l'ADN seront refermées. Les réparations sont assurées dans les cellules par l'intermédiaire des enzymes appartenant à la machinerie de réparation des erreurs effectuées au niveau de l'ADN. Ce sont les enzymes de la voie NHEJ (*Non Homologous End Joining*) qui réparent les extrémités non homologues surtout dans les cassures double brin (pour revue: Malu et al., 2012; Sadofsky, 2001). Deux types de réparations sont impliqués: une pour les extrémités franches des RSS et l'autre pour les extrémités en épingle à cheveux des segments codants (V, D, J) (Kragel, 2003; Lewis, 1994).

3.1.2) Les réarrangements tardifs des loci d'immunoglobulines

Les immunoglobulines sont diversifiées par deux processus : SHM et CSR. Ces deux mécanismes nécessitent l'activité d'une enzyme de 24 kDa appelée AID (Activation-Induced cytidine Deaminase), une enzyme spécifiquement exprimée dans les lymphocytes B activés et qui catalyse la désamination ciblée des résidus de désoxycytidine transformant une paire C:G en une paire U:G (pour revue : Di Noia and Neuberger, 2007). AID chez l'Homme est codée par le gène AICDA. Chez des souris et chez l'Homme déficients en AID, la SHM et la CSR sont bloquées *in vivo*. Ces individus ne présentant aucun phénotype majeur autre que leur syndrome hyper-IgM (avec production d'IgM non mutées et de basse affinité). L'expression de l'AID à un niveau mutagène est limitée aux cellules B du centre germinatif et aux cellules B induites *in vitro* en présence de LPS ou de CD40L soluble, suggérant un rôle de l'AID dans la différenciation terminale des cellules B (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). L'importance physiologique d'une expression à des stades B plus précoces, dans la moelle osseuse, reste l'objet de conjectures (Cantaert et al., 2015). Un certain nombre de travaux démontrent aussi aujourd'hui un rôle d'AID à plus bas niveau que dans la lignée B, dans le maintien de la pluripotence des cellules souches ou dans les choix de lignée hématopoïétiques, via une contribution à la déméthylation des cytosines (Kumar et al., 2013; Kunitomo et al., 2017).

3.1.2.1) Hypermutation somatique ou SHM

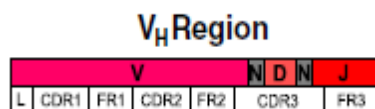
Après une activation antigène-dépendante, les cellules B matures diversifient leur répertoire des anticorps par le processus du SHM qui se produit au niveau du V-D-J dans laquelle plusieurs substitutions de nucléotides uniques sont introduites dans et autour du segment des gènes V (D) J réarrangés de manière productive fournissant alors un substrat structural pour la sélection d'Ig ayant une plus grande affinité pour l'antigène (Ag) (Almejun and Borge, 2017).

Au cours de la SHM, AID désamine les résidus cytidines présents dans les régions variables (IgV) des deux chaînes IgH et IgL. Il convient de noter que ces désaminations ciblent préférentiellement

des points chauds spécifiques ou "hotspots", y compris le motif RGYW / WRCY, où R représente les nucléotides G ou A, Y les nucléotides C ou T et W les nucléotides A ou T (Ameratunga et al., 2013). Par ce processus, AID produit des mésappariements uracile à guanine (U:G) dans les régions IgV. Des corrections sont assurées ensuite par des voies de réparation spécifiques, y compris la réparation d'excision de base et réparation de mésappariement (MMR). L'excision de la déoxyuridine par l'Uracile Glycosylase (UNG « *Uracil DNA-Glycosylase* »), crée un site abasique qui est pris en charge par la voie BER (*Base Excision Repair*) faisant intervenir des polymérases infidèles qui insèrent une des quatre bases à la place de dU (ce type de mutation est la transition ou transversion) (**Figure 6B**) (Bahjat and Guikema, 2017). D'autres glycosylases peuvent se substituer à UNG, la Thymine-DNA glycosylase, et SMUG1 ; par ailleurs on sait aujourd'hui que les voies BER et MMR ne sont pas simplement alternatives, mais éventuellement simultanées et en capacité de collaborer (Girelli Zubani et al., 2017).

Les mutations ponctuelles induites par AID dans les régions IgV génèrent des mutations de façon aléatoire et aveugle, simplement en fonction de la proximité des motifs ciblés ; par contre le processus de sélection cellulaire qui se déroule parallèlement en fonction des qualités de liaison du BCR pour l'antigène (et de sa fonctionnalité) va conserver principalement des remplacements d'acides aminés dans les régions déterminant la complémentarité (CDR : *Complementarity Determining Region*), mais en épargnant au maximum les régions charpentes (FR: *Framework Region*) qui régulent l'organisation structurale des Ig (**Figure 6A**) (Odegard and Schatz, 2006).

A.



B.

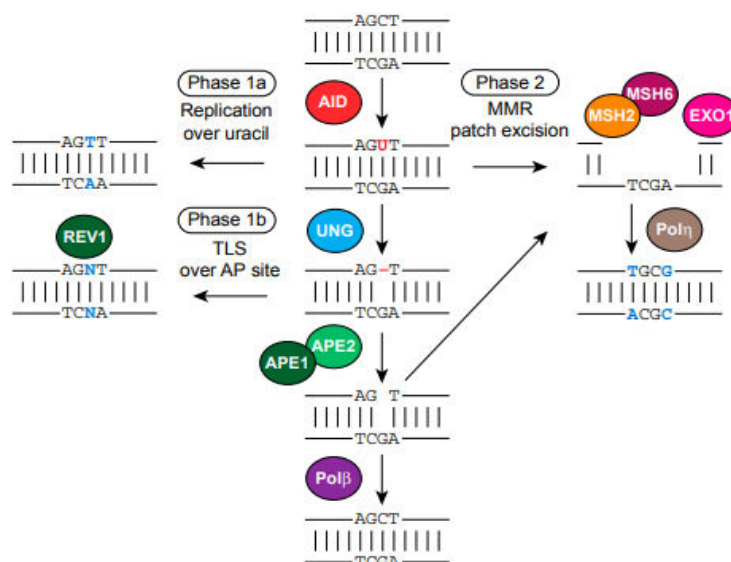


Figure 6: Mécanisme moléculaire de SHM.

A : Schéma de la région V de l'IgH contenant les segments variables (V), de diversité (D) et de jonction (J). Au sein de chaque réarrangement V (D) J, on distingue la région leader conservée (L) et les régions déterminantes complémentaires (CDR) en association avec des zones conservées appelées régions charpentes (FR) (Almejun et Borge, 2017).

B : Mutation induite par AID (représentée en rouge) détermine l'étendu de la SHM (mutations sont représentées en bleu). La réplication de l'ADN entraîne des mutations de transition C-à-T / G-à-A (SHM de phase 1a). Suppression de l'uracile par l'uracil-ADN-glycosylase (UNG : uracil-DNA-glycosylase) suivi par la réplication sur le site abasique (représenté par un trait rouge) par TLS (Translesion Synthesis). Les actions des ADN polymérases telles que REV1 aboutissent à des mutations de transition ou de transversion dans les paires de bases C / G (Phase 1b du SHM). Les mésappariements U:G provoqués par AID sont pris en charge par l'ADN Polβ qui déclenche une réparation fidèle des lésions après l'intervention de l'AP endonucléase 1/2 (APE1 / 2) qui clive les sites AP (apyrimidinique/apurinique, sites abasiques). Ces mésappariements peuvent aussi être prises en charge par les composants de la voie de réparation de mésappariement (MMR) tel que MSH2 et MSH6 (Mut S homolog 2 et 6). Le recrutement de l'ADN exonucléase 1 (EXO1) conduit à l'excision et le recrutement ultérieur de l'ADN polymérase η (Polη) qui, en présence d'erreurs, en particulier à A et T, entraîne des mutations A / T (phase 2 SHM) (Extrait de la revue: Bahjat and Guikema, 2017).

3.1.2.2) Commutation de classe ou CSR

Les régions constantes de différents isotopes d'immunoglobulines sont codées par des groupes distincts d'exons CH, qui sont organisés dans l'ordre Cμ, Cδ, Cγ, Cε et Cα dans le locus IgH. La commutation de classe (CSR) est cruciale pour la maturation de la réponse humorale et nécessite l'implication d'AID. Elle entraîne le remplacement du groupe d'exons Cμ pour IgM par Cγ, Cα ou Cε (dépendant de l'environnement cytokinique) donnant naissance à des IgG, IgA ou IgE dans lesquelles les régions variables sont inchangées (pour revue : Xu et al., 2012). Les cellules B peuvent changer la classe d'immunoglobuline *in vivo* après immunisation ou infection ou lors d'une activation appropriée en culture *in vitro*. Les cytokines sécrétées par les lymphocytes T et

d'autres cellules dirigent le changement d'IgM vers un autre isotype. L'engagement du récepteur CD40 (exprimé par les lymphocytes B) par son ligand CD40L (CD154) (exprimé surtout par les lymphocytes T) ou la liaison du lipopolysaccharide (LPS) sur le récepteur Toll-like 4 (TLR4) exprimé par les cellules B murines fournit une signalisation cruciale favorisant le mécanisme de CSR vers les isotypes IgG2b et IgG3. L'ajout d'interleukine 4 (IL4) au LPS utilisé pour activer les cellules B réoriente la commutation de classe vers les isotypes IgG1 et IgE tandis que l'ajout d'interféron- γ (INF- γ) induit le switch vers IgG2a. L'addition de TGF- β (Transforming Growth Factor) induit la CSR vers IgA ainsi que vers IgG2b (Stavnezer et al., 2008).

La CSR est le plus souvent une recombinaison d'ADN par délétion qui se produit entre les régions switch (S) qui sont situées en amont de tous les gènes constants (CH) à l'exception de C δ . Elle nécessite une transcription qui s'initie au niveau d'un promoteur de la région intermédiaire (I_H) de l'IgH et se poursuit à travers l'exon I_H, la région S et ensuite le groupe d'exons CH; ceci est connu comme la transcription germinale I_H-S-C_H (Xu et al., 2012). Pendant la recombinaison, des cassures doubles brins (DSB) sont générés dans la région donneuse S μ et une région switch acceptrice en aval. Ceci conduit à la juxtaposition de l'ADN de VDJ réarrangé avec un groupe d'exons CH en aval et la délétion de la séquence intermédiaire entre les régions S donneuse et acceptrice sous forme d'un cercle ou épisode (**Figure 7**). Notons que les régions S sont riches en G et possèdent une forte densité de motifs WGCW (A/TGCA/T), la cible préférée pour l'AID, qui initie la CSR en désaminant les cytosines au niveau de la région S, convertissant la désoxycytidine dC à dU. Les DSB sont finalement réparés par la voie classique non-homologue (NHEJ : Non-Homologous End-Joining) ou par la voie alternative A-EJ (pour Alternative End Joining) (processus de réparation de cassure double brin (DSB) qui se produit en l'absence de certains composants de la voie de réparation non homologue NHEJ), générant ainsi une région de microhomologie entre les extrémités de DSB jusqu'au fin de la jonction (DiMenna and Chaudhuri, 2016; Revy et al., 2000; Stavnezer and Schrader, 2014; Xu et al., 2012).

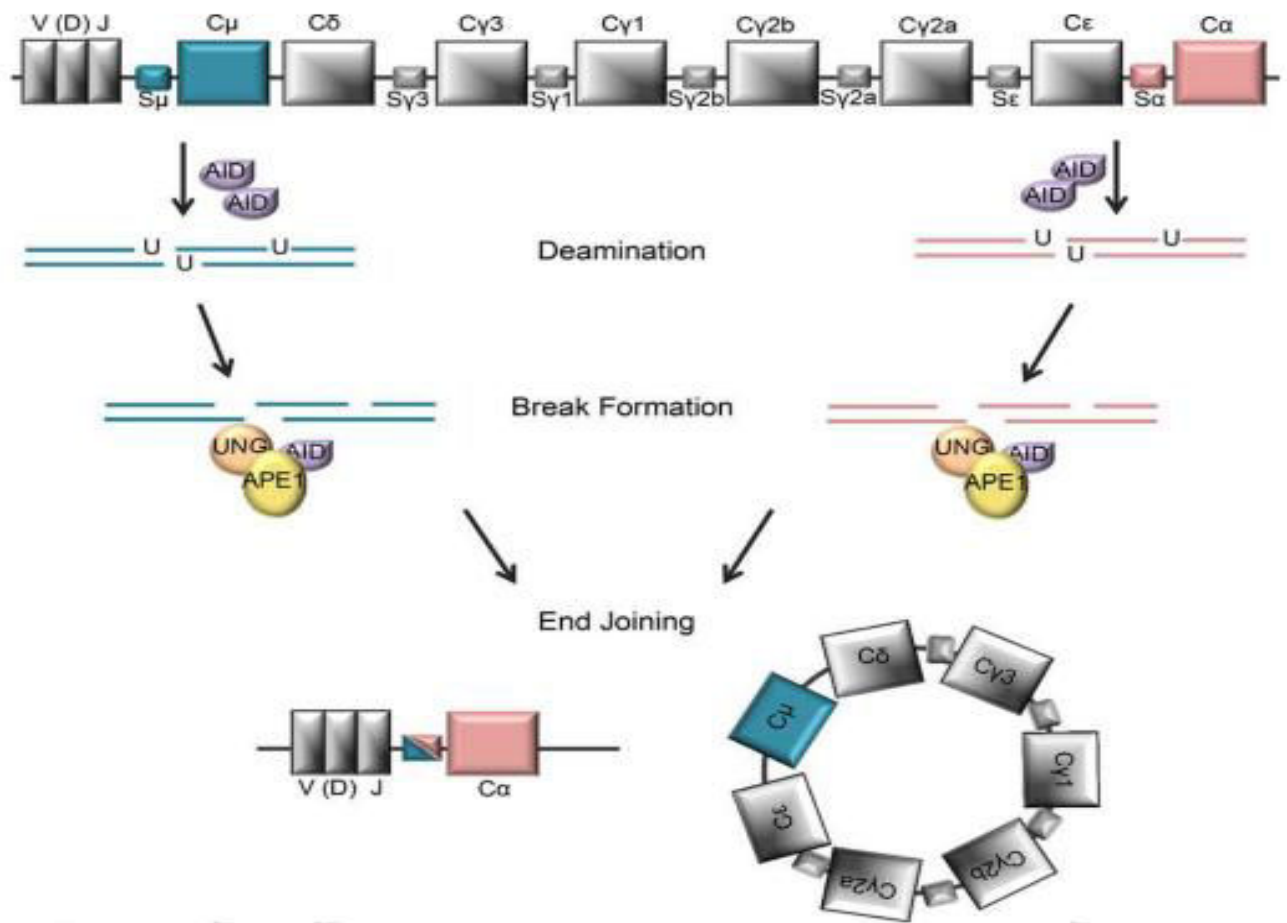


Figure 7 : Mécanisme de la commutation de classe (CSR) vers IgA.

Au cours de la CSR à IgA, AID désamine les régions S_μ et S_α déclenchant la formation de DSB. Les régions S_μ et S_α se recombinaient permettant l'association du segment VDJ avec le gène C_α . La jonction terminale des DSB entre les régions S accepteur et donneur complète la CSR (en bas à gauche), tandis que l'ADN intermédiaire de la région C sera perdu sous forme d'épisme (en bas à droite) (Extrait de la revue: DiMenna and Chaudhuri, 2016).

CSR humaine

Chez l'Homme comme chez la souris, le même mécanisme de CSR décrit plus haut, se produit. Les gènes constants chez l'Homme sont dupliqués avec deux régions régulatrices 3'RR (3'RR1 et 3'RR2), les recombinaisons S_μ - S_x peuvent avoir lieu avec n'importe quel gène dupliqué. Contrairement à la souris, l'Homme exprime deux sous-classes d'IgA : IgA1 et IgA2. La CSR chez l'Homme fait intervenir l'équilibre de différences influences cytokiniques. Par exemple, il a été montré que IL4 seule est suffisante pour activer un bas niveau de l'enzyme AID mais que l'interaction CD40-CD40L est requise pour une production optimale de cet enzyme. Les cytokines produites par les différentes populations T (T reg producteurs d'IL10 et de TGF β , Th9 producteurs d'IL9, TH1 producteurs d'IL2 et d'IFN γ , TH2 producteurs d'IL4 et d'IL14, agissent de façon

concertée pour donner une polarisation de la réponse immune qui va profondément influencer le switch en agissant à la fois sur l'expression d'AID et sur l'accessibilité différentielle des différents gènes constants au sein du locus IgH.

Enfin la CSR donne un BCR bien fonctionnel qui a deux rôles principaux : le premier est la transduction du signal contrôlant le devenir des cellules B. Le second est la présentation d'un antigène aux cellules T activant ainsi la fonction effectrice des cellules B (Niiron and Clark, 2002). La liaison de l'antigène sur le BCR permet la transmission du signal au compartiment intracellulaire. Ensuite le signal se propage à l'intérieur des cellules B via des messagers secondaires activés par phosphorylation et l'interaction protéique. Enfin les facteurs de transcription impliqués dans la survie, l'apoptose et la différenciation des cellules B sont transloqués au noyau (pour revue : Dal Porto et al., 2004). Suite à la liaison d'un antigène à un BCR, la protéine kinase SYK et la protéine tyrosine kinase LYN sont tout d'abord activées. Ainsi LYN se retrouve associée au CD79a et CD79b entraînant alors la phosphorylation de ces derniers qui à leurs tours recrutent et activent les protéines BTK et autres qui sont illustrées dans la **Figure 8** (pour revue : Zhang et al., 2018).

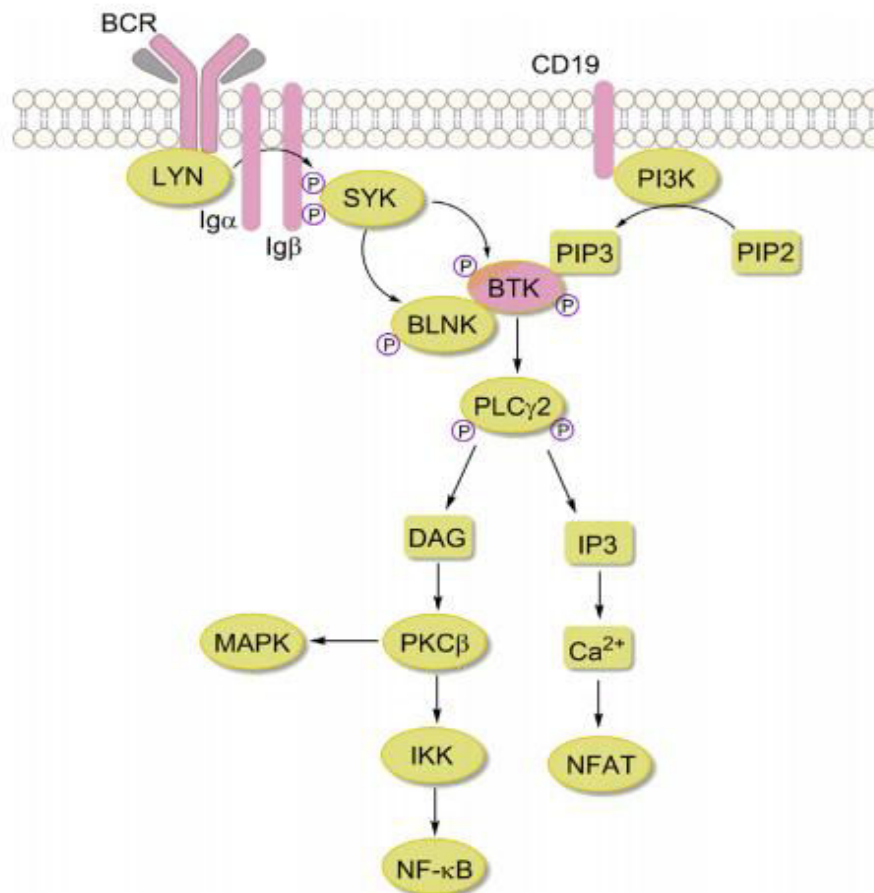


Figure 8: Cascade de transduction de signalisation via le BCR.

La transduction du signal commence suite à la liaison d'un ligand sur le BCR suivie par l'activation des deux sous-unités : Igα et Igβ. Trois protéines kinases sont ensuite activées : LYN, SYK et BTK. Les effecteurs en aval de la signalisation de BCR sont PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) et PLCγ2 (Phospholipase Cγ2). Les adaptateurs de BCR BLNK (B Cell Linker) connectent efficacement les kinases aux effecteurs. L'activation de PLCγ2 entraîne la libération de Ca²⁺ intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC), ces deux facteurs activent ensuite les MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase) et par la suite l'activation des facteurs de transcriptions comprenant le NF-κB (Nuclear factor-κB) et le NFAT (Nuclear factor of activated T cells) déterminant ainsi le destin des cellules B (Zhang et al., 2018).

3.1.2.2.1) La modulation du switch vers des Igs « rares » chez l'Homme (IgE, IgA2 et Pseudo-IgG)

Il existe un switch fréquent de l'expression d'IgM vers des sous-classes d'Ig majoritaires et « prototypiques » (au premier plan desquelles les IgG1, IgG3 ou IgA1). Notre unité s'intéressant de façon générale à la mécanistique de la CSR, nous avons voulu étudier les modalités d'expression d'Ig pour lesquelles la mise en évidence de cellules commutées est plus rare (IgE, IgA2...), voire précédemment réputée nulle (gène pseudo-gamma).

Les immunoglobulines se présentent sous deux formes principales: les anticorps solubles et les anticorps liés à la membrane (BCR). L'épissage alternatif régule la production d'anticorps sous forme sécrétés ou sous forme de BCR.

L'IgM est la première classe d'Ig apparaissant pendant l'ontogenèse et la seule produite par toutes les espèces de vertébrés (Fellah et al., 1992). Les IgM représentent environ 5-10% des anticorps sériques et sont les premiers anticorps produits lors d'une réponse immunitaire. L'IgM humaine est présent à ~1-2 mg / ml dans le sang avec une demi-vie de ~5 jours. L'IgM sécrétée existe sous forme pentamérique et c'est cette structure multimérique qui confère à l'IgM sa capacité de former des interactions fortes avec plusieurs partenaires (**Figure 9**). L'IgM existe aussi sous forme monomérique sur la membrane des lymphocytes B (pour revue: Ehrenstein and Notley, 2010). Pentamérique, elle semble être une molécule en forme de champignon avec une région protubérante centrale, qui lie le composant du complément C1q, facilitant ainsi l'élimination des cellules apoptotiques (Czajkowsky and Shao, 2009). La région constante est constituée de quatre domaines (CH1 à CH4). Les IgM sont produites par deux populations différentes de lymphocytes B: les cellules B1 synthétisent l'IgM appelée naturelle sans nécessité d'immunisation préalable et avant que les cellules B aient subi une hypermutation somatique, donc avec une faible affinité pour les Ag. Les cellules B de la zone marginale produisent aussi surtout des IgM, notamment affines pour les polysaccharides de capsules d'un certain nombre de germes. Alors que ces cellules B de la zone marginale ont des BCR non mutés chez la souris, ils sont le plus souvent porteurs de mutation chez l'Homme (Reynaud et al., 2012). Chez la souris comme chez l'Homme, la population des B de la zone marginale semble correspondre à une voie de différenciation propre et NOTCH2-dépendante (Descatoire et al., 2014). Les cellules MZ expriment typiquement des niveaux élevés d'IgM, CD21, CD1b, CD9 avec des niveaux faibles à négligeables d'IgD, CD23, CD5 et CD11b qui aident à les distinguer phénotypiquement des cellules B folliculaires (FO) et des B1. Il est probable que les cellules B des zones marginales spléniques sont une source importante d'anticorps spécifiques des lipides (pour revue : Pillai and Cariappa, 2009). De manière similaire aux cellules B1, les cellules MZ peuvent être rapidement recrutées dans les réponses immunitaires précoces d'une manière indépendante de cellules T (Dunn-Walters et al., 1995). Enfin, les lymphocytes conventionnels, B2, produisent des IgM en réaction à des stimuli antigéniques. L'IgM induite par l'immunisation diffère de l'IgM naturelle par l'affinité, le répertoire de spécificité et par la fonction (pour revue: Klimovich, 2011).

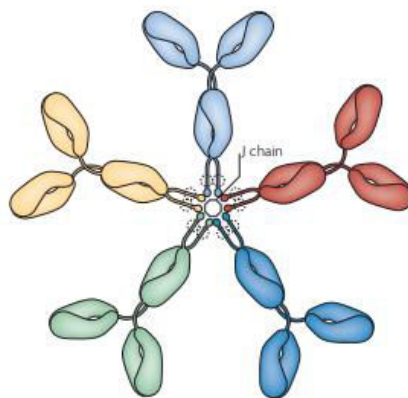


Figure 9: Représentation schématique de la structure pentamérique d'IgM.

La structure pentavale de l'IgM est montrée. La chaîne de jonction (J) favorise la formation du pentamère. La partie centrale du pentamère fait saillie pour maximiser les interactions avec les ligands (Extrait de la revue: Ehrenstein and Notley, 2010).

IgD est une classe d'immunoglobuline fréquemment (et surtout) exprimée à la surface des lymphocytes B. Tout en étant un « BCR fréquent », notamment sur les cellules B matures et naïves, l'IgD se fait beaucoup plus rare sous sa forme sécrétée, qui représente moins de 1% d'immunoglobuline plasmatique totale chez l'Homme. Sa concentration sérique est seulement 30mg/L chez un adulte. A la membrane, elle est généralement co-exprimée avec l'IgM. IgD a la même structure de base qu'une IgG mais avec une région charnière plus étendue qui est sensible à la digestion protéolytique (Ishioka et al., 1987). Après avoir quitté la moelle osseuse pour coloniser les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes B acquièrent des IgD de surface de la même spécificité que les IgM par épissage alternatif d'un pré-ARNm (Maki et al., 1981). Au contraire, dans les plasmocytes produisant de l'IgD, qui sont surtout fréquents au niveau des amygdales et de tissus lymphoïdes annexés aux muqueuses, l'IgD semble souvent produite non par épissage alternatif d'un pré-messenger mais, malgré l'absence de région switch vraiment bien caractérisée, par CSR impliquant l'AID (en outre indépendamment du super-enhancer IgH 3'RR) (Rouaud et al., 2014). Ces IgD circulantes interagissent avec les basophiles par l'intermédiaire d'un récepteur calcique induisant ainsi des facteurs antimicrobiens, opsonisants, inflammatoires et immunostimulants tels que la cathélicidine, la pentraxine-3 (PTX3), l'IL-1 et l'IL-4 (Chen et al., 2009).

Dans la suite de cette partie, les différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines humaines (IgG: IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4; IgA: IgA1) seront rapidement décrites. Nous consacrerons plus d'attention aux immunoglobulines rares sur lesquelles nous avons travaillé pendant cette thèse (IgE, IgA2 et la recherche d'une pseudo-IgG).

i. IgE comme immunoglobuline rarement exprimée dans l'organisme

L'IgE est une classe d'Ig présente uniquement chez les mammifères et qui a été découverte et caractérisée en 1966 par Kimishige Ishizaka. C'est la dernière classe d'Ig découverte du fait de sa faible quantité dans les fluides corporels et de la rareté des cellules IgE+ *in vivo*. Sa concentration sérique est normalement <1µg/ml, sa demi-vie est généralement très courte (~2 jours) en comparaison avec les autres isotypes.

Chez les proto-mammifères, l'IgE a évolué comme l'IgG à partir d'une molécule « reptilienne » ancestrale, l'IgY, avec une structure d'IgE bien conservée (domaines constants, positions des ponts disulfures et site de N-glycosylation de domaine CH3) ce qui permet sa reconnaissance par son récepteur de haute affinité (FcεRI) (pour revue : Laffleur et al., 2017; Warr et al., 1995). Contrairement aux IgG, les IgE ont quatre domaines de chaîne lourde constants (Cε1-Cε2-Cε3-Cε4), le deuxième domaine CH2 agit comme région charnière (**Figure 10**).

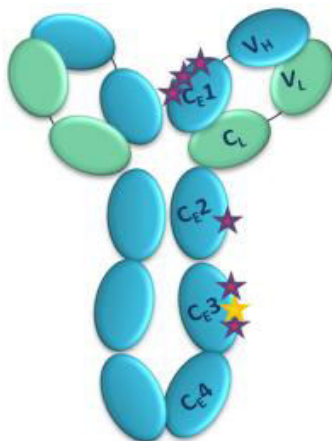


Figure 10: Représentation schématique d'Immunoglobuline E (IgE).

IgE est composé de deux chaînes lourdes identiques comprenant un domaine variable (VH) et quatre domaines constants (Cε1, Cε2, Cε3 et Cε4) avec 7 sites de N-glycosylation (Extrait de la revue: Gilgunn et al., 2016).

Le promoteur Iε est impliqué dans la régulation du switch vers l'IgE du fait de la présence des sites de fixation de facteurs de transcription spécifiques. Il permet la fixation d'E2A, AP1, STAT6, PU.1, Pax5 et NF-κB. La transcription Iε-Sε qui précède le switch vers IgE est induite par la phosphorylation et la dimérisation de STAT6 activée par IL4 alors que la fixation de CD40 active de manière synergique NF-κB (Monticelli and Vercelli, 2001). En revanche, plusieurs régulateurs négatifs inhibent la transcription des régions S et par suite le switch. Bcl6, fortement exprimé en centre germinatif, inhibe le switch vers IgE par compétition avec STAT6 sur les mêmes sites de liaison. Id2, en séquestrant E2A et Pax5, inhibe la transcription d'Iε. Le TGF-β, l'IFNγ et l'IL10

contribuent également à ces régulations négatives chez l'Homme par inhibition de la liaison des protéines HoxC4 et Oct-1 sur le promoteur I ϵ (Sugai et al., 2003).

La structure de la région S ϵ contribue elle-même à la régulation et la limitation du switch vers IgE, puisqu'elle est la région la plus courte et la moins répétitive des régions S (2 kb seulement, alors que S γ 1 mesure environ 10 kb). Ainsi, le remplacement de S ϵ par S μ ou l'insertion de C ϵ en aval de S γ 1 accroît la production d'IgE (Lübben et al., 2013; Misaghi et al., 2013).

Le switch vers IgE peut être direct (S μ en S ϵ) ou séquentiel (d'abord S μ à S γ 1 puis à S ϵ) (**Figure 11**) (YOSHIDA et al., 1990). Le switch direct ne semble permettre que la production d'IgE à faible affinité pour l'antigène qui, en saturant les récepteurs Fc ϵ R, pourraient alors jouer plutôt un rôle inhibiteur des réponses immunes spécifiques induites par les IgE de haute affinité (surtout générées par switch séquentiel). Wu et ses collègues ont montré qu'une faible activation induit le switch direct vers IgE tandis qu'un niveau plus élevé favorise le switch vers IgG1, suivi d'un switch secondaire vers IgE (Wu et al., 2017).

Une fois que le switch vers IgE a eu lieu, les lymphocytes B expriment des transcrits des chaînes lourdes membranaires (mIgE), contenant les quatre exons constants (C ϵ 1 à C ϵ 4) et deux exons qui codent un domaine d'ancrage membranaire (M1 et M2) tandis que les cellules plasmocytaires produisent des transcrits sécrétés dépourvus de ces exons membranaires (pour revue : Laffleur et al., 2017; Zhang et al., 1992).

Contrairement aux autres gènes d'Igs, les exons membranaires qui codent la chaîne lourde des IgE sont dépourvus de sites de polyadénylation AATAAA (polyA) en aval du dernier exon membranaire réduisant alors probablement l'efficacité de maturation des ARNm correspondants, et donc le taux d'expression des mIgE tandis que la forme sécrétoire des transcrits reste ainsi majoritaire (Karnowski et al., 2006).

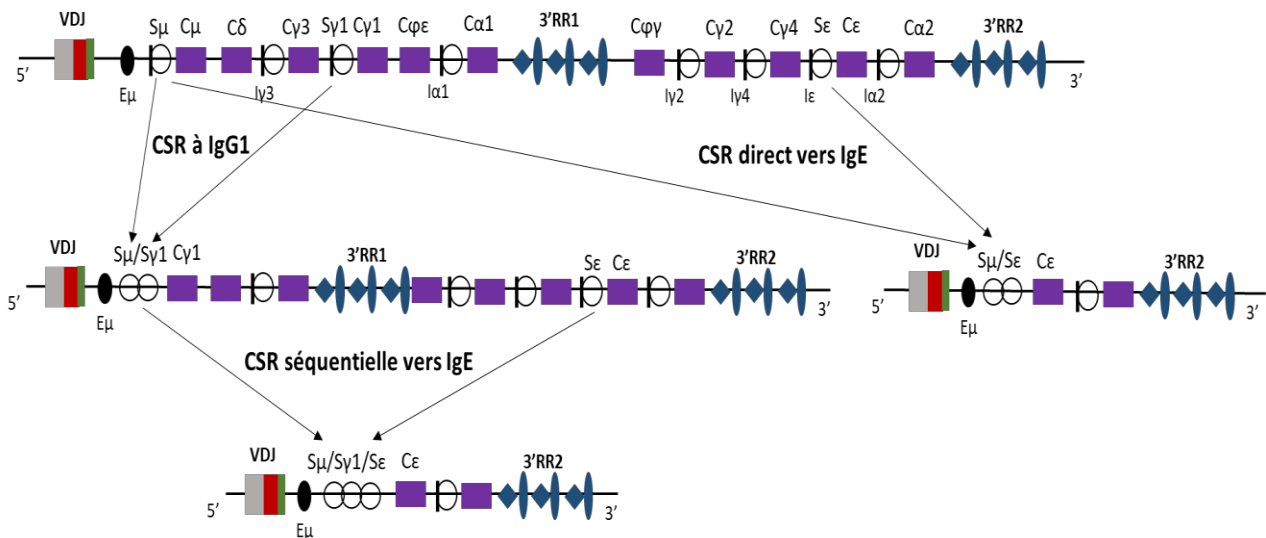


Figure 11 : Mécanismes de CSR vers l'immunoglobuline E (IgE).

En haut : le locus IgH humain avec la VDJ réarrangée. Au milieu : la CSR vers IgG1 montrant les jonctions $S_{\mu}/S_{\gamma 1}$ et la CSR direct vers IgE montrant les jonctions S_{μ}/S_{ϵ} . En bas : La CSR séquentielle vers IgE avec les jonctions $S_{\mu}/S_{\gamma 1}/S_{\epsilon}$. Les régions switch (S) sont représentées par des cercles blancs. Les promoteurs (I) sont représentés par des tirets verticaux noirs précédant les régions S (Adapté de la revue : Laffleur et al., 2017).

Parmi les rôles principaux des IgE, figure la réponse anti-parasitaire et surtout contre les helminthes (larges organismes multicellulaires) tels que *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*, and *Fasciola hepatica*. Les réponses IgE contre les helminthes entraînent une polarisation TH2 et une élévation du taux d'IgE accompagnée par une éosinophilie (Capron and Capron, 1994). Ces IgE promeuvent l'ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) permettant ainsi la destruction des parasites. Les IgE ont aussi un rôle majeur dans la protection contre les venis et certaines toxines (Marichal et al., 2013; Palm et al., 2013).

Malheureusement les IgE sont aussi impliquées dans les réactions allergiques immédiates (asthme, allergie alimentaire...) qui peuvent parfois conduire jusqu'au choc anaphylactique. Lors de la phase de sensibilisation des réactions allergiques, certaines interleukines sont synthétisées (IL4, IL5, IL13...). En particulier en présence d'IL-4, les cellules T naïves activées par les cellules présentatrices d'antigènes se différencient en cellules Th2. Les lymphocytes B ayant reconnu l'allergène s'activent ensuite avec l'aide des Th2 spécifiques (aussi en présence d'IL-4) et libèrent d'IgE qui fixent sur leurs récepteurs de haute affinité FcεR1 exprimé par les mastocytes et les basophiles. La ré-exposition à l'allergène active les mastocytes et les basophiles qui produisent des médiateurs biogéniques (histamine, protéases, leucotriènes et les cytokines) responsables des symptômes d'hypersensibilité allergique de type 1. Plus tard, IL-5, la cytokine responsable de

l'activation, de la survie et du recrutement tissulaire des éosinophiles est produite (**Figure 12a**) (pour revue : Kucuksezer et al., 2013). Les traitements actuels ciblent les médiateurs (anti-histamines et anti-leucotriènes et corticostéroïdes) libérés par les mastocytes suite à la liaison des allergènes aux IgE fixées sur le récepteur FcεR1. D'autres stratégies neutralisent les IgE sécrétées (immunothérapie passive, anti-IgE) (Luger et al., 2010). Les traitements de fond reposent sur la désensibilisation visant à inverser la polarité de la réponse immune vers une orientation Th1. Les cellules T de polarisation Th9, qui potentialisent les réponses IgE, constituent aussi une cible thérapeutique (Xiao et al., 2018). Les lymphocytes T régulateurs (Treg) peuvent également être efficaces pendant le traitement des allergies. Ces cellules sont FoxP3+CD25+ et jouent un rôle inhibiteur des réponses de type IgE. Plusieurs voies de suppression sont décrites. Les cellules Treg suppriment les cellules Th2 et leur production d'interleukine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 qui sont indispensables à la fois pour la différenciation, la survie et l'activité des mastocytes, des basophiles, des éosinophiles et des cellules productrices de mucus. L'IL-10 et le facteur de croissance transformant (TGF-β) suppriment la production d'IgE tout en induisant l'IgG4, qui est un isotype d'immunoglobuline qui n'est pas impliquée dans les réactions inflammatoires (**Figure 12b**) (Ozdemir et al., 2009).

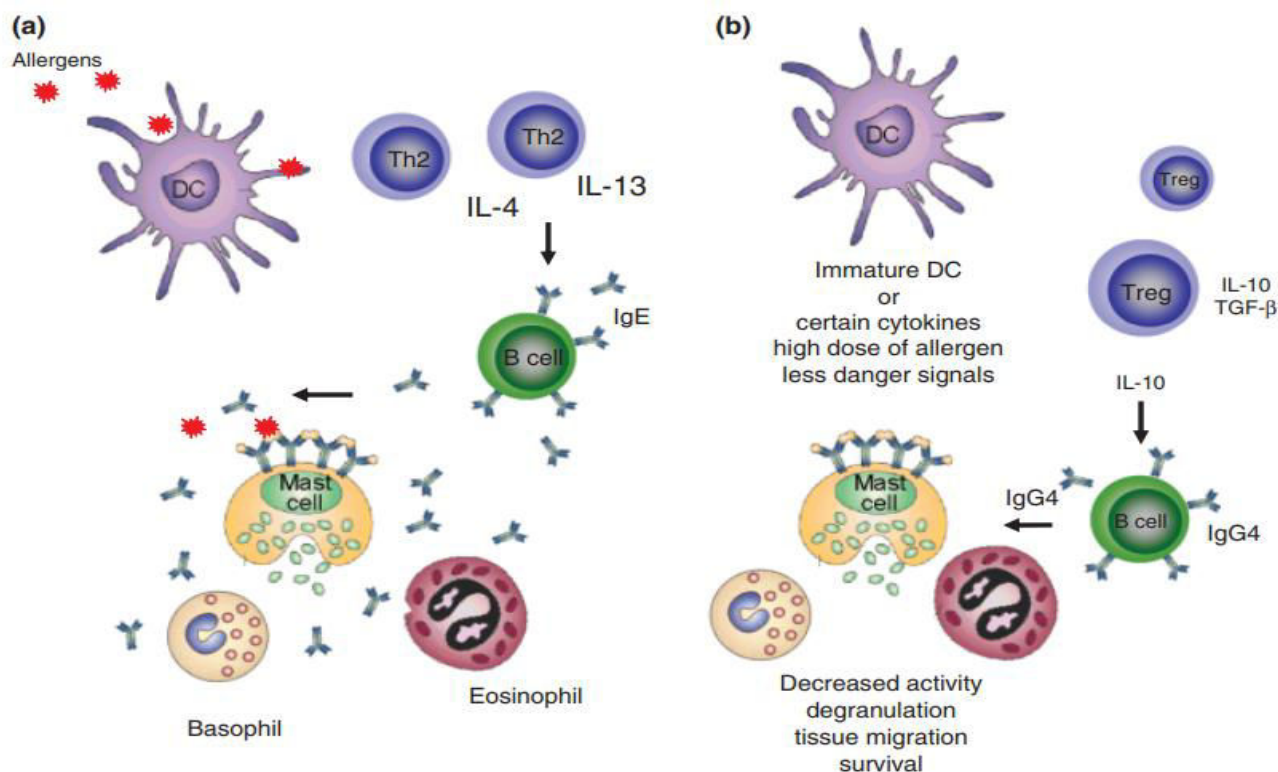


Figure 12 : Mécanismes d'allergie impliquant les cellules Th2.

a) Les cellules Th2 sont induites suite à la présentation d'allergène par les cellules dendritiques (DC). Les cellules Th2 produisent les cytokines IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13. Les cellules B produisent ensuite des IgE qui se lient sur des récepteurs Fcε de haute affinité sur les mastocytes et les basophiles. C'est la sensibilisation.

b) Les réactions allergiques peuvent être régulées par les lymphocytes T régulateurs (Treg). La présentation de l'antigène par des DC partiellement matures induit la formation de cellules Treg qui produisent l'IL-10 et le TGF-β qui suppriment la production d'IgE tout en augmentant simultanément la production d'isotypes IgG4 non-inflammatoires (Extrait de: Ozdemir et al., 2009).

ii. IgA2 : l'IgA la moins abondante du sérum... (l'IgA d'en bas !)

L'IgA est un isotype d'immunoglobuline majoritairement produit au niveau des muqueuses, des intestins et le lait maternel. Elle constitue une première ligne de défense contre les agents infectieux et les toxines qui envahissent l'organisme. Chez l'Homme, il existe deux sous-classes d'IgA : IgA1 et IgA2 qui se distinguent par leur distribution dans l'organisme et par leur structure. En termes de distribution dans l'organisme, les IgA circulantes sont constituées à plus de 85% d'IgA1 (2-3mg/ml) et de seulement 10-15% d'IgA2 (Conley and Koopman, 1983) alors qu'au niveau des muqueuses, les cellules produisant les IgA1 et les IgA2 sont présentes en proportions variées : les cellules IgA1 prédominent au niveau du tractus respiratoire et des muqueuses digestives hautes, les cellules IgA2 sont au contraire abondante au niveau colique (Pabst, 2012). Contrastant avec la domination des IgA1 dans les sérums, les deux sous-classes d'IgA humaines sont ainsi globalement présentes à des taux voisins dans les sécrétions. En termes de structure, la

différence entre ces isotypes se trouve en particulier au niveau de la région charnière qui est plus longue dans l'IgA1 que dans l'IgA2 (délétion de 13 acides aminés dans la région charnière IgA2 par rapport à IgA1) (Woof and Kerr, 2004). Les IgA sériques sont principalement de nature monomère tandis que les IgA dans les sécrétions (IgA sécrétoire ou S-IgA) sont principalement dimériques. Chez l'Homme, l'IgA1 et l'IgA2 sont codées par deux gènes différents. Deux allotypes d'IgA2 sont décrites : IgA2m(1) et IgA2m(2) (m pour monomérique). La différence discrète de séquence entre ces deux allotypes induit un changement des ponts disulfures qui relient les chaînes lourdes et les chaînes légères. Ils sont absents dans la forme IgA2m(1) (dont les interactions entre les deux chaînes lourdes et légères sont assurées par des liaisons non-covalentes) alors qu'ils existent toujours dans la forme IgA2m(2). L'IgA1 et l'IgA2 portent toutes les deux plusieurs sites de glycosylation; la région C-terminale de ces deux Igs comportent 18 acides aminés additionnels par rapport aux Igs qui ne polymérisent pas (cas des IgG) impliquées dans la formation des dimères en s'associant avec la chaîne de jonction (J). Ainsi la dimérisation donne une stabilité et une efficacité plus importantes aux IgA (Woof and Kerr, 2006). Les structures des différentes formes d'IgA sont illustrées dans la **Figure 13**.

La région charnière d'IgA1 contient trois à cinq groupes carbohydrates liés à l'atome oxygène (O-linked carbohydrate) absents dans l'IgA2. En outre, IgA1 a deux sites d'addition de carbohydrates N-liés (lié à l'atome azote N) dans CH2 (Asn₂₆₃) et dans CH3 (Asn₄₅₉). Tous les allotypes d'IgA2 ont deux sites supplémentaires N-glycosylation, dans CH1 (Asn₁₆₆) et dans CH2 (Asn₃₃₇). L'allotype IgA2m (2) a un cinquième site de N-glycosylation dans CH1 (Asn₂₁₁) (**Figure 14**). Les variations de la structure de glycosylation des différentes formes d'IgA peuvent affecter leurs propriétés biologiques. Une clairance plus rapide des IgA2 sériques semble en partie responsable de la plus faible présence de cette sous-classe par rapport aux IgA1 (Rifai et al., 2000). Cette différence de clairance tient surtout à une fixation accrue des IgA2 à des récepteurs aux asialoglycoprotéines (ASGP) intra-hépatiques ; les O-glycosylations présentes dans la région charnière d'IgA1 diminuent sans doute aussi sa clairance car la délétion dans cette région montre une élimination plus rapide que celle de l'IgA1 native (Rifai et al., 2000).

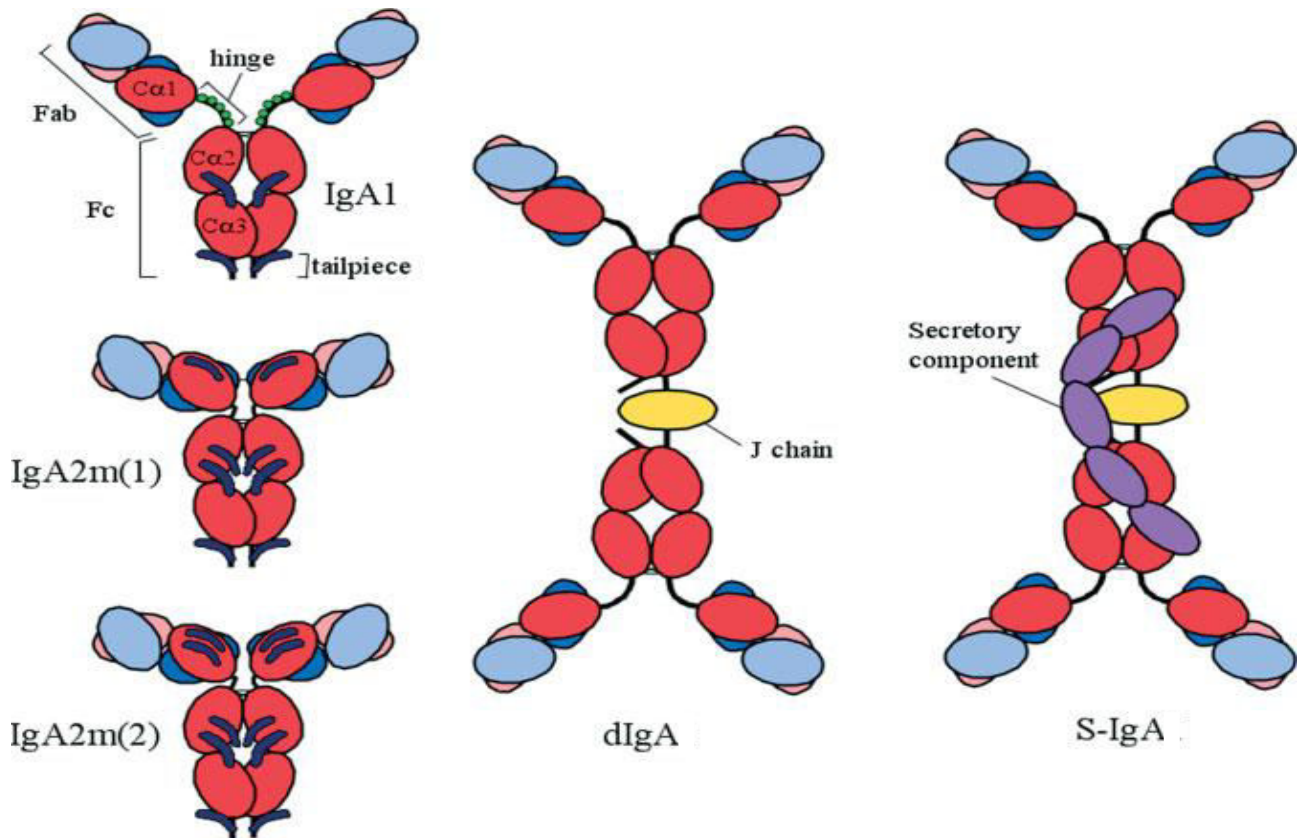


Figure 13: Représentation schématique des différentes formes d'IgA chez l'Homme

Les régions constantes de la chaîne lourde sont représentées en rouge tandis que les régions variables de la chaîne lourde sont en rose. Les régions constantes de la chaîne légères sont indiquées en bleu foncé et les régions variables de la chaîne légères sont en bleu clair. Les chaînes J dans les formes dimériques d'IgA sont en jaune (Woof and Kerr, 2006).

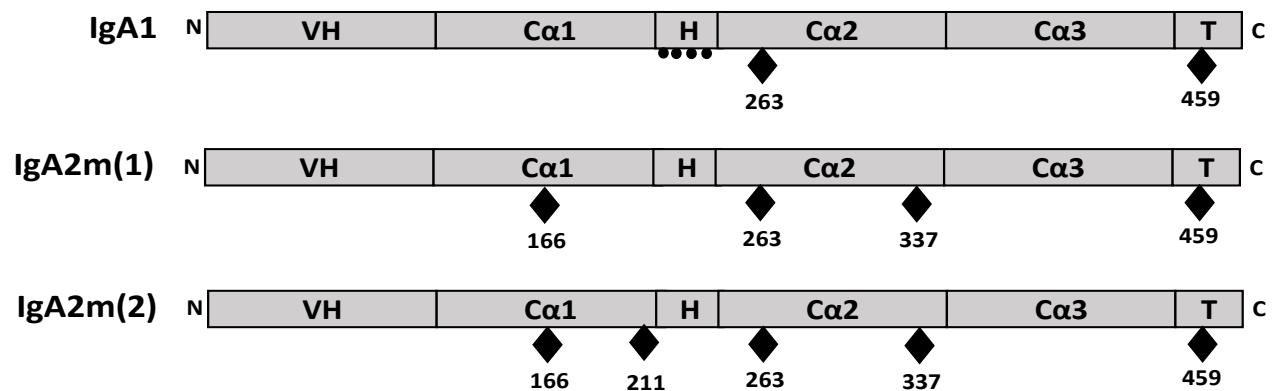


Figure 14 : Sites de glycosylation des chaînes lourdes d'IgA1, IgA2m (1) et IgA2m (2).

Les sites de glycosylations des IgA1, IgA2m(1) et d'IgA2m(2) sont représentés par des losanges noirs (Adapté de Woof, 2013).

Dans les plasmocytes muqueux, l'IgA est plutôt produite sous forme dimérique ou polymérique. Cette forme interagit ensuite avec un petit polypeptide dérivé de cellules plasmatiques appelé Jonction (J) pour former les dimères d'IgA (dIgA) circulants (Lycke et al., 1999). Les IgA dimériques ou polymériques une fois sécrétées dans le milieu intérieur peuvent reconnaître au niveau des muqueuses le récepteur d'immunoglobulines polymériques (pIgR), exprimé sur la surface muqueuse basolatérale des cellules épithéliales intestinales. En traversant ces cellules par le processus de transcytose, pIgR facilite la libération d'IgA sécrétoire (SIgA) sur la surface de l'intestin. La SIgA résultante comprend un polypeptide dérivé de pIgR appelé composant sécrétoire (SC) qui augmente la stabilité de SIgA dans la lumière intestinale et ancre le SIgA dans le mucus (pour revue : Gutzeit et al., 2014). De façon intéressante, il existe pour l'IgA2 seulement, un mécanisme de transport inverse pouvant ramener des complexes Antigène-IgA2 depuis le pôle apical des cellules muqueuses jusqu'au milieu intérieur, notamment en impliquant le récepteur Dectin-1 (Rochereau et al., 2013)

Le récepteur ASGP ou ASGP-R (Asialoglycoprotein Receptor), qui est exprimé par les cellules hépatiques, reconnaît les IgA sériques, il les internalise et les dégrade. Ce mécanisme de clairance permet une élimination plus importante et plus rapide des IgA2 sériques par rapport aux IgA1 par des mécanismes mal connus. La moitié de la quantité d'IgA1 est retirée du sang après 35 min de sécrétion. En revanche, la moitié des IgA2m (1) et des IgA2m (2) (décrit ultérieurement) sont éliminée après 5 et 4 min respectivement (Rifai et al., 2000; Tomana et al., 1988).

L'expression d'IgA dans les lymphocytes B est contrôlée à la fois par des cytokines et par des interactions avec les lymphocytes T.

Régulation de la CSR vers IgA : Les cellules épithéliales, positionnées à l'interface entre la lumière intestinale riche en antigène et la lamina propria riche en cellules B, produisent de nombreux médiateurs qui induisent des IgA, y compris l'IL-10 et du TGF β . Chez l'Homme, les colonocytes expriment BAFF (B-cell activating factor) et APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) qui à leur tour régulent aussi l'expression d'IgA. Associé à l'IL-10, APRIL déclenche la CSR vers IgA2 dans les lymphocytes B, suggérant que les cellules épithéliales sont le centre d'intérêt dans l'induction de la production d'IgA2 au niveau des sites muqueux colonisés par un grand microbiote, comme le côlon. Au niveau de ces sites, les IgA2 peuvent être plus efficaces que les IgA1, peut-être parce que ces IgA2 sont plus résistantes que les IgA1 à la digestion enzymatique par les protéases bactériennes (pour revue : Cerutti, 2008).

Le switch vers les isotypes d'IgA peut être direct ou séquentiel. Des études réalisées sur les lymphocytes B humains ont suggéré que l'engagement du CD40 par le ligand CD40L induit la

production de TGF- β endogène et d'IL-10, l'expression des transcrits I α 1-C α 1 et I α 2-C α 2 ainsi que les transcrits VDJ-C α 1 et VDJ-C α 2 et la sécrétion d'IgA. Ces événements sont associés non seulement au switch direct de S μ -S α mais également à la recombinaison séquentielle S μ -S γ /S γ -S α (Zan et al., 1998).

Alors que des différences de structure et de signalisation ont été antérieurement décrites par l'équipe pour les BCR de classe IgA2 et IgA1 (Leduc et al., 1997), un des objectifs posés au début de cette thèse était de rechercher des propriétés spécifiques des lymphocytes B porteurs de ces 2 classes de BCR, en comparant 2 modèles d'animaux knock-in développés par l'équipe et exprimant des BCR chimériques représentatifs des 2 sous-classes.

iii. Pseudo-IgG : une nouvelle sous-classe d'IgG chez l'Homme ?

Les immunoglobulines G ou IgG sont des anticorps de taille d'environ 150 kDa. Chez l'Homme, il existe quatre sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 ; dont la nomenclature suit l'ordre décroissant d'abondance (60 %, 32 %, 4 % et 4 %, respectivement). Même si leur composition en acides aminés est très similaire (environ 90% de similitude), la demi-vie, la liaison à l'antigène, l'activation des cellules effectrices ainsi que le recrutement de complément varient d'une sous-classe d'IgG à une autre. Les chaînes lourdes de toutes les sous-classes sont constituées de trois domaines constants (CH1, CH2, CH3) (**Figure 15**). Les variations sont trouvées plutôt dans la région charnière qui confère la flexibilité de l'anticorps et dans la partie supérieure du domaine CH2 proche de cette région (CH2 est le domaine de fixation du C1q de complément) (pour revue : Vidarsson et al., 2014).

Ces quatre sous-classes d'IgG sont codées par des gènes C γ 1, C γ 2, C γ 3 et C γ 4. Au niveau génétique un cinquième gène ψ G ou pseudo-IgG est localisé directement après la région 3'RR1 chez l'Homme dont l'expression n'a été jamais détectée et a été postulée comme impossible et nulle, du fait de l'absence d'une région switch adéquate précédant le gène ψ G (Bensmana et al., 1988). Son expression ainsi que son rôle font partir de mon sujet de thèse caractérisant les immunoglobulines rares.

Avant d'aborder le pseudo-IgG, les caractéristiques des autres sous-classes d'IgG seront décrites (Tableau 1).

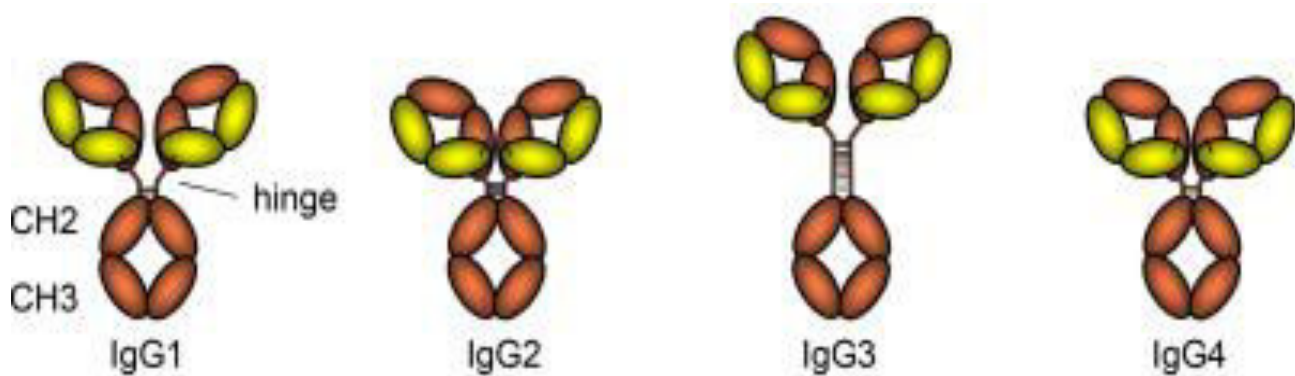


Figure 15: Les différentes sous-classes d'IgG.

Les quatre sous-classes d'IgG: IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4, les différentes chaînes lourdes et légères et la longueur des régions charnières sont représentés (Vidarsson et al., 2014).

- ❖ **IgG1** : Les réponses aux antigènes protéiques solubles et aux protéines membranaires induisent principalement la production d'IgG1 avec des niveaux plus faibles des autres sous-classes. L'IgG1 peut interagir avec tous les récepteurs FcγR (Bruhns et al., 2009) ainsi qu'avec le C1q de complément. Puisque que l'IgG1 est normalement la sous-classe la plus abondante, le manque d'IgG1 peut entraîner une diminution des taux d'IgG totaux (hypogammaglobulinémie) (Ferrante et al., 1990). La région charnière d'IgG1 comprend 15 acides aminés et elle est très flexible. La demi-vie d'IgG1 est de 21 jours (Roux et al., 1997).
- ❖ **IgG2** : Les réponses aux antigènes polysaccharidiques capsulaires bactériens peuvent être presque entièrement restreintes aux IgG2. Cette classe s'associe faiblement aux récepteurs FcγR (IgG2 lie sur FcγRIIA_{H131}, mais aussi avec faible affinité sur FcγRIIA_{R131} et FcγRIIIA_{V1}) (Bruhns et al., 2009) et au complément. IgG2 a une région charnière plus courte que celle d'IgG1, avec 12 résidus d'acides aminés ce qui fait que l'IgG2 possède la charnière la plus courte parmi toutes les sous-classes d'IgG. La demi-vie d'IgG2 est de 21 jours (Roux et al., 1997; Vidarsson et al., 2014).
- ❖ **IgG3** : Les IgG3 sont particulièrement efficaces dans l'induction des fonctions effectrices (Vidarsson et al., 2014). Étant un anticorps pro-inflammatoire puissant, sa demi-vie plus courte que les autres sous-classes (7 jours) est cruciale pour limiter les réponses inflammatoires excessives. Les infections virales sont généralement accompagnées par la production d'IgG1 et d'IgG3 qui apparaissant en premier au cours de l'infection. Cette sous-classe, comme l'IgG1, interagit avec tous les récepteurs FcγR (Bruhns et al., 2009) et avec le complément. L'IgG3 a une région charnière beaucoup plus longue que toutes les

autres sous-classes d'IgG. Environ quatre fois plus longue que la région charnière d'IgG1, elle contient jusqu'à 62 acides aminés. Les fragments Fab d'IgG3 sont relativement loin du fragment Fc, conférant à la molécule une plus grande flexibilité. Cette longue charnière d'IgG3 provient de l'existence de ~ 4 exons charnières répétés en tandem alors que les régions charnières des IgG1, IgG2 et IgG4 sont codées par un seul exon charnière (Roux et al., 1997; Vidarsson et al., 2014).

- ❖ **IgG4** : Les allergènes sont souvent des bons inducteurs des IgG1 et IgG4, en plus des IgE. Les IgG4 sont souvent produites à la suite d'une exposition répétée ou à long terme à un antigène dans un contexte non infectieux. Elle a une affinité intermédiaire concernant la fixation sur le récepteur FcγR (peut lier sur FcγRI, FcγRIIA, IIB et IIC et FcγRIIIA_{V158}) (Bruhns et al., 2009) et elle n'active pas le système de complément. De même, la région charnière de l'IgG4 contient également 12 acides aminés et est donc plus courte que celle de l'IgG1. Sa flexibilité est intermédiaire entre celle d'IgG1 et IgG2. La demi-vie d'IgG4 est de 21 jours (Roux et al., 1997).
- ❖ **Pseudo-IgG** : Chez l'Homme, les cinq classes d'immunoglobulines sont disposées au niveau du locus IgH sur le chromosome 14 dans l'ordre suivant : 5'-Cμ-Cδ-Cγ3-Cγ1-Cψε-Cα1-Cψγ-Cγ2-Cγ4-Cε-Cα2- 3' (**Figure 3**). En 1982, Takahashi et ses collègues ont pu démontrer, par des méthodes de clonage et de séquençage qu'il existe un cinquième gène gamma localisé entre les gènes Cα1 et Cγ2, directement après la région régulatrice 3'RR1 ; ce gène, dépourvu d'une vraie région switch (S) à l'opposé des autres gènes constants, a donc été appelé pseudo-gamma. Par contre, ils ont trouvé une séquence hautement répétitive dans la région 5' adjacente où la région S devrait être. Ce même groupe a essayé de montrer que le gène γ1 et le pseudogène γ évoluent à partir d'un même ancêtre puisque des délétions dans la région charnière ont été repérées dans le gène γ1 en comparaison avec le pseudogène γ (Takahashi et al., 1982). Ces données suggèrent que la distinction majeure entre le γ1 et le pseudogène γ résident dans la région charnière. En 1988, Bensmana et ses collègues ont décrit qu'il n'y a pas de défaut structural dans le gène pseudo-IgG lui-même, mais ils ont noté seulement qu'il existe une délétion de trois nucléotides qui chevauchent deux codons ce qui entraîne la perte d'un acide aminé en position 15 de l'exon CH3 et le changement de l'acide aminé suivant sans modifier le cadre de lecture ouvert. Les sites d'épissage et de polyadénylation sont conservés; par conséquent, l'absence de la région switch semble être le seul défaut responsable de l'absence d'une protéine codée par le gène IGHGP (Bensmana et al., 1988).

Jusqu'à aujourd'hui, il n'existe pas des données qui montrent la probabilité de trouver une forme protéique de ce pseudo-IgG. Pour ces raisons et parce que le laboratoire s'intéresse par ailleurs à des cassures du locus IgH survenant en dehors des régions switch (lors des recombinaisons suicides, ou lors du « switch IgD » (Péron et al., 2012; Rouaud et al., 2014)), nous avons essayé pendant ma thèse de traquer l'expression éventuelle du gène ψ G. Nous nous sommes ainsi employés à répondre à la question de la stabilité éventuelle de la « pseudo-IgG » sous forme recombinante et de son existence naturelle tant au niveau des recombinaisons d'ADN et du répertoire des transcrits matures qu'au niveau protéique.

Les récepteurs des différentes classes d'IgG humaines

Les cellules myéloïdes humaines, les cellules NK ainsi que les lymphocytes B sont équipées par une variété de récepteurs appelés FcR qui permet leur interaction avec le domaine Fc des immunoglobulines. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires composées d'une sous-unité alpha permettant la liaison aux ligands et d'une chaîne γ responsable de la signalisation intracellulaire.

Neuf types de récepteurs pour les IgG (Fc γ R) ont été décrits: Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIC, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB, FcRn, TRIM21 et FcRL5 qui diffèrent par leur distribution cellulaire et leur affinité (**Figure 16**). Les récepteurs de haute affinité (tel que le Fc γ RI) permet la fixation des IgG monomériques alors que ceux de faible affinité (Fc γ RII et Fc γ RIII) ne fixent que les complexes immuns à IgG ou les agrégats d'immunoglobulines. A l'exception de TRIM21 (une E3-ubiquitine ligase liant le Fc des IgG et des IgM et guidant les complexes immuns vers le protéasome et la dégradation) et de FcRn (récepteur de recyclage ou de transport actif des IgG)lient des IgG internalisées, les autres récepteurs sont dédiés à la fixation des IgG à la surface cellulaire (pour revue : Gillis et al., 2014).

Une distinction majeure peut être faite entre les IgG1 / IgG3 qui interagissent efficacement avec la plupart des Fc γ R et les IgG2 / IgG4, qui présentent une affinité réduite pour un certain nombre de Fc γ R. En outre, l'IgG3 monomère se lie plus efficacement que l'IgG1 monomère au Fc γ RIIA, au Fc γ RIIIA et au Fc γ RIIIB, et l'efficacité de liaison de l'IgG3 à tous les FcRns dépasse celle de l'IgG1.

Les récepteurs Fc γ R participent à de nombreuses fonctions effectrices (ou régulatrices) du système immunitaire, telles que la phagocytose (ADCP), la libération de médiateurs inflammatoires et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) (processus permettant la sécrétion des protéases par des cellules effectrices tel que les cellules NK permettant

la destruction des cellules cibles ; généralement ce processus est activée via la l'interaction avec le récepteur FcγRIIA). Ils peuvent être divisés en récepteurs activateurs ((hFcγRI, hFcγRIIA, hFcγRIIC et hFcγRIIA) et inhibiteurs ((hFcγRIIB) (Bruhns, 2012). Les récepteurs Fcγ s'associent à la même région de l'anticorps, c'est-à-dire entre la fin de la région charnière et les domaines CH2 (Hanson and Barb, 2015). Le niveau de glycosylation influe aussi sur l'interaction des IgG avec leur récepteur FcγR (Kaneko et al., 2006).

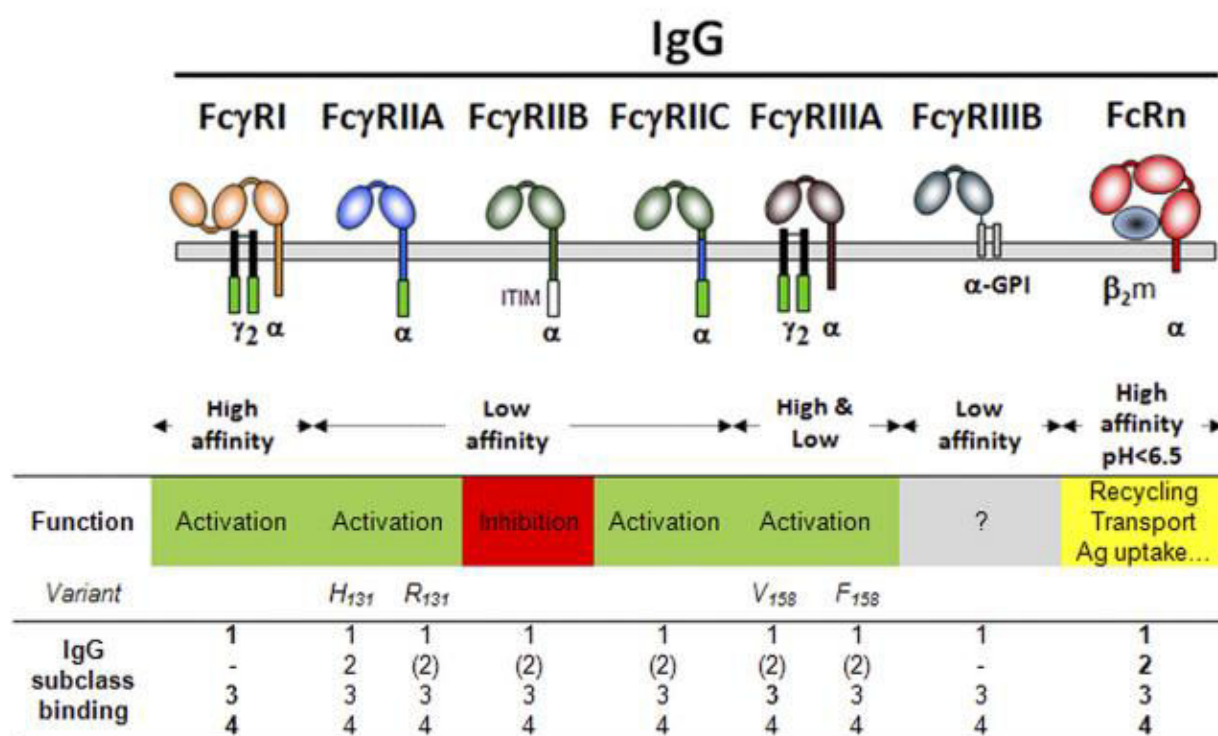


Figure 16 : Les récepteurs d'IgG humaines (FcγR)

Représentation schématique des récepteurs d'IgG humaines à la membrane cellulaire (barre grise) et association ou non à la chaîne γ (noir). La liaison d'une sous-classe d'IgG humaine est indiquée en caractères gras (haute affinité), caractère normal (faible affinité) ou entre parenthèses (très faible affinité). - indique pas de liaison (Bruhns, 2012).

II) Les stades de différenciation des lymphocytes B

• Dans la moelle osseuse

La lignée cellulaire B se développe dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) en passant par plusieurs étapes bien caractérisées. Ces CSH se divisent de manière asymétrique en donnant des cellules qui vont se différencier en cellules progénitrices multipotentes (MPP) qui à leur tour se différencient progressivement en LMPP (pour Lymphoid-primed Pluripotent Progenitors) puis en précurseurs lymphoïdes communs CLP (pour Common Lymphoid Precursors) qui, à leur tour s'engagent dans la différenciation vers les lignées T, NK,

cellules dendritiques ou B. Après s'être dirigées vers la lignée B, les cellules passent par les étapes de cellules pro-B, pré-B et enfin en cellules B immatures (pour revue: Ichii et al., 2014).

Pour que les CLP se différencient vers le lignage B, plusieurs facteurs de transcriptions doivent s'exprimer, parmi eux: E2A (*E box protein Binding 2A*), Ikaros, EBF1 (*Early B cell Factor-1*), PU.1 (*Purine box factor-1*) et le Pax5 ou BSAP (*B cell Specific Activator protein*) (Nutt et al., 1997). Pax5 est le facteur principal qui aide à maintenir les progéniteurs dans la lignée B, son action se termine lors de la différenciation des cellules B en plasmocytes (Cobaleda et al., 2007).

Stade pré-pro B : Pendant ce stade, les premiers précurseurs B prennent naissance à partir des cellules CLP. Seule l'expression de certains marqueurs de surface et de facteurs de transcription permet de les distinguer des autres précurseurs hématopoïétiques. Parmi les marqueurs de surface exprimés à ce stade figurent B220 (CD45R), CD43 (S7) et c-Kit (CD117) alors que le CD19 est absent à ce stade (Hardy et al., 2007). Les loci d'Igs à ce stade sont dans une configuration germinale non réarrangée donc non encore fonctionnelle, mais subissant déjà un remodelage chromatinien et une transcription germinale.

Stade pro-B : Dans ce stade commence les premiers réarrangements VDJ sur le locus IgH. Dans les cellules pro-B, les réarrangements D_H à J_H sont initiés d'abord, suivis par des réarrangements de V_H à D_HJ_H. Il est maintenant clair que dans presque toutes les cellules pro-B le réarrangement D_H à J_H se produit sur les deux allèles suggérant que les deux sont accessibles pour les réarrangements V_H à D_HJ_H (Zhang et al., 2004). Les molécules CD79a (Igα) et CD79b (Igβ) ainsi que le cluster de différenciation CD19 sont exprimés à la surface des cellules pro-B (Pelayo et al., 2012).

Stade pré-B : C'est le stade des réarrangements qui touchent les loci des chaînes légères d'immunoglobulines. A ce stade, les cellules n'expriment plus le CD43 à leur surface cellulaire. Ainsi, l'expression du pré-BCR à ce stade est nécessaire pour la progression du développement des précurseurs de cellules B. Le pré-BCR est composé d'une chaîne μH fonctionnelle qui, une fois produite dans les cellules, sera transportée vers la surface des cellules pré-B (sous forme d'un récepteur immature). La chaîne μH sera ensuite associée à une pseudo chaîne légère appelée SLC (Surrogate Light Chain) codée sous forme de deux peptides disjoints par les deux gènes: VpréB et λ5, et à l'hétérodimère Igα/ Igβ (Karasuyama et al., 1993; Otero and Rickert, 2003). Une fois que le pré-BCR est exprimé sur la surface cellulaire, la signalisation pré-BCR induit la prolifération des cellules pré-B servant à augmenter le nombre de cellules qui ont un gène IgH recombiné avec succès. Ainsi il exerce un rétrocontrôle négatif sur les gènes VpréB et λ5 et

l'induction des réarrangements des gènes VJ des loci des chaînes légères (Herzog et al., 2009). Tous ces événements permettent aux cellules pré-B de passer au stade des cellules B immatures.

Stade de B immature : A ce stade les cellules B expriment un BCR fonctionnel à leur membrane. Ces cellules sont capables de quitter la moelle osseuse pour envahir les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques...). Avant de passer en périphérie, certains contrôles sont mis en place pour éliminer des cellules B ayant des BCR auto-réactifs (reconnaissant les antigènes du soi). Ainsi, elles sont éliminées par une sélection des cellules exprimant un BCR auto-réactif, et ceci par apoptose: c'est le mécanisme de tolérance exercé par les cellules B (Russell et al., 1991). Les cellules B auto-réactives peuvent échapper à l'apoptose grâce à un phénomène de re-édition du BCR dans lequel plusieurs tours de réarrangements touchent les régions variables des chaînes légères permettant de remplacer le BCR auto-réactif. Mais si toutefois la cellule garde son auto-réactivité, elle deviendra anergique (diminution d'expression de BCR et de la prolifération cellulaire) (Luning Prak et al., 2011). Alors, seules les cellules B de bonne qualité quitteront la moelle osseuse pour migrer vers les organes lymphoïdes périphériques.

- **A l'extérieur de la moelle osseuse**

Les lymphocytes B immatures vont enfin quitter la moelle osseuse et rejoindre la circulation sanguine en stade B transitionnels pour arriver aux organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques périphériques, plaques de Peyer) où ils continuent leur maturation et rencontrent l'antigène. Plusieurs types de cellules caractérisent cette phase tardive du développement des cellules B.

Les lymphocytes B transitionnels :

Loder et ses collègues ont proposé la partition des cellules B transitoires en deux sous-populations distinctes, appelées cellules B transitionnelles 1 (T1) et transitionnelles 2 (T2), en fonction de leur phénotype de surface et de leurs caractéristiques fonctionnelles (Loder et al., 1999). Ensuite une troisième sous-population a été aussi proposée appelé cellules B transitionnelles 3 (T3) ; mais il semblerait que ces cellules T3 sont auto-réactives et donc font partie des cellules anergiques (Merrell et al., 2006).

Les lymphocytes B matures : Les lymphocytes B matures sont caractérisés par une double expression d'une IgM et d'une IgD sur la membrane cellulaire. Ils peuvent être divisés en deux catégories : cellules B1 et cellules B2. Les premières (B1) sont impliquées dans les réactions immunitaires naturelles, elles sont indépendantes de cellules T. Les secondes (B2) appelées aussi cellules B conventionnelles sont impliquées dans les réponses spécifiques à un antigène donné.

Les cellules B1 sont d'abord produites dans le foie fœtal avant la naissance. Après elles sont trouvées dans les cavités péritonéales et pleurales. Cette population cellulaire peut être divisée en deux sous-populations selon l'expression de CD5 sur leur surface : B1a (CD5⁺) et B1b (CD5⁻) (Martin and Kearney, 2001). Les progéniteurs B-1a se trouvent principalement dans le foie fœtal, la rate néonatale et la moelle osseuse néonatale, alors que les progéniteurs B-1b se trouvent principalement dans la moelle osseuse adulte. Les cellules B1a sont définies comme étant IgM^{high}, IgD^{faible}, CD11b⁺, CD5⁺, B220^{faible/+} tandis que les cellules B1b sont IgM^{fort}, IgD^{faible}, CD11b⁺, CD5⁻, B220^{faible/+} (Esplin et al., 2009; Stall et al., 1992).

Les lymphocytes B2 sont regroupés en deux sous-ensembles : les cellules B de la zone marginale (MZ) et celles de la zone folliculaire (FO). (Les caractéristiques des cellules MZ ont été décrites plus haut). La majorité des cellules B dans la rate est représentée par les lymphocytes B folliculaires (FO). Ces cellules B expriment des taux élevés d'IgM, d'IgD et de CD23; des niveaux faibles de CD21; et pas de CD1 ni de CD5. Elles s'organisent en follicules primaires dans les pulpes blanches des organes lymphoïdes périphériques tels que la rate et les ganglions lymphatiques. Elles sont impliquées dans les réponses dépendantes des lymphocytes T dans les follicules (pour revue : Pillai and Cariappa, 2009). Suite au contact avec un antigène, l'interaction entre les lymphocytes B folliculaires et les lymphocytes T dans la zone interfolliculaire induit la formation d'un centre germinatif ou GC (pour Germinal Center) qui est organisé en deux zones principales: les zones sombres (ou DZ pour Dark Zone) et claires (ou LZ pour Light Zone) (**Figure 17**). C'est dans les GC que les cellules B matures prolifèrent, différencient et diversifient le

répertoire des anticorps par hypermutation somatique et par commutation de classe (Klein and Dalla-Favera, 2008).

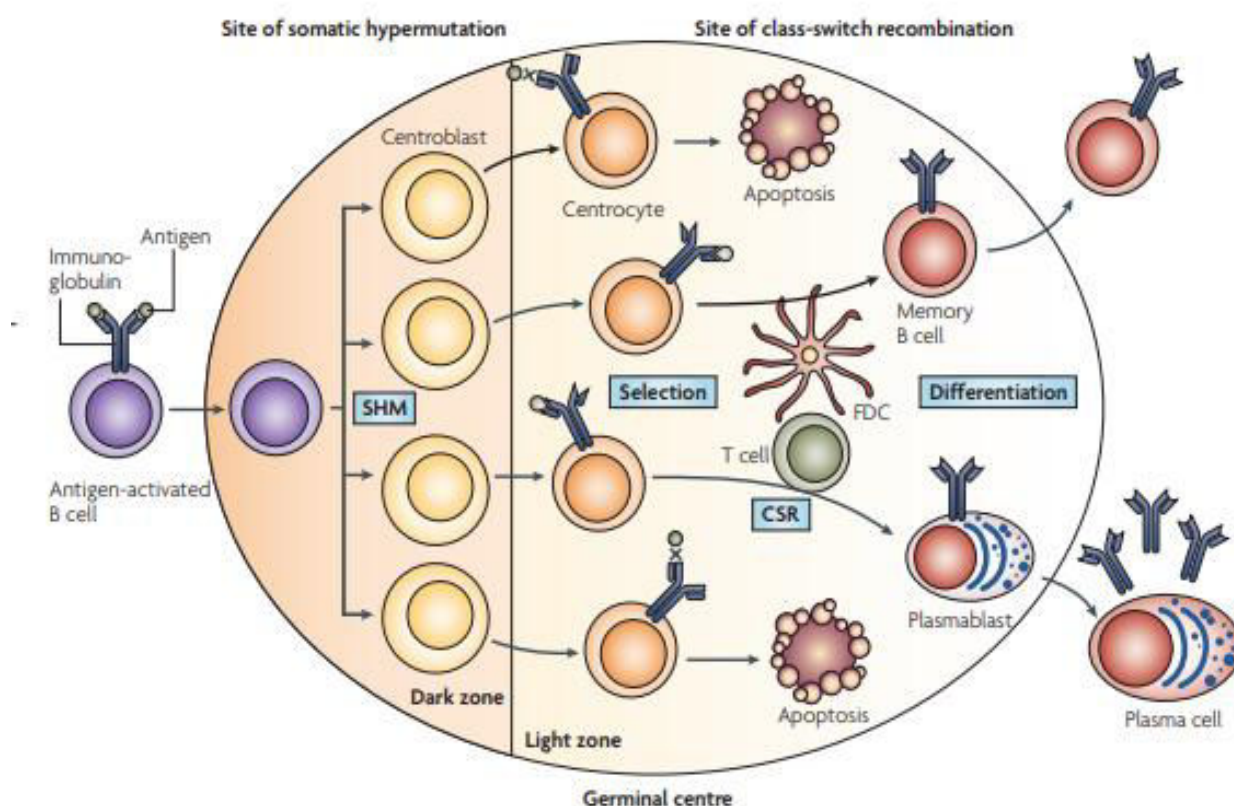


Figure 17: Le microenvironnement du centre germinatif.

Les cellules B activées par l'antigène se différencient en centroblastes subissant ainsi une expansion clonale et la SHM dans la zone sombre du centre germinatif. Les centroblastes se différencient ensuite en centrocytes et se déplacent vers la zone claire, où le récepteur antigénique modifié par SHM ou hypermutation somatique, avec l'aide de cellules immunitaires comprenant des cellules T et des cellules dendritiques folliculaires (FDC), est sélectionné pour une meilleure liaison à un antigène donné. Un sous-ensemble de centrocytes subit une commutation de classe ou CSR. Les centrocytes spécifiques pour un antigène se différencient finalement en cellules B mémoire ou en plasmocytes (Extrait de la revue: Klein and Dalla-Favera, 2008).

Stade des plasmocytes : L'anticorps est produit durant la phase terminale de différenciation des cellules B appelées plasmablastes et plasmocytes. Leur formation est associée à des altérations marquées de la morphologie, du profil d'expression génique et de la durée de vie des cellules sécrétrices d'anticorps ou ASC (pour Antibody-Secreting Cells) par rapport aux cellules B dont elles sont issues. Récemment il était décrit la construction d'une souche de souris dans laquelle le gène codant pour la GFP (Green Fluorescent protein) a été ciblé dans le locus *Blimp1*, cette protéine Blimp1 est souvent décrite comme "le régulateur principal" de la différenciation

cellulaire plasmique. La première réaction d'anticorps à certains agents pathogènes est fournie par des anticorps «naturels» préexistants sécrétés par les cellules B1 (Shapiro-Shelef and Calame, 2005). Les premières cellules B à répondre à un antigène étranger en se différenciant en plasmocytes sont les cellules B de la zone marginale (Lopes-Carvalho and Kearney, 2004). Les plasmocytes formées à partir des cellules B marginales durant une réponse précoce ne possédant pas des gènes d'immunoglobulines somatiquement mutées, elles sont de courte durée de vie et subissent une apoptose in situ (Smith et al., 1996). Cependant, ces cellules fournissent une réponse initiale rapide aux pathogènes. Les cellules plasmiques sont caractérisées par l'expression de CD138, CD45 et le récepteur d'IL6 (Interleukine 6) à leurs surfaces cellulaires. Chez l'Homme, le CD27 est un bon marqueur pour les cellules plasmiques. Le marqueur de surface CD138 (syndécan-1) est aussi exprimé à des niveaux élevés (Liu et al., 2012).

Stade des cellules B mémoires : Les cellules B mémoires sont un sous-type de cellules B qui se forment dans les centres germinaux suite à une infection primaire et sont importantes pour générer une réponse immunitaire accélérée et plus robuste à médiation humorale en cas de réinfection (également appelée réponse immunitaire secondaire). Les anticorps produits ont une affinité plus importante que ceux produits pendant la réaction immunitaire primaire. Les cellules B mémoires murines (réactions T-dépendantes) sont caractérisées par les marqueurs CD38 et B220 sur leurs membranes cellulaires. Les cellules mémoire B1b récemment décrites chez la souris (réponse T-indépendantes) expriment des grandes quantités d'IgM et de CD19 mais peu de B220 et d'IgD (pour revue : Tarlinton, 2006).

Chapitre II. Effets de certaines drogues sur le locus IgH et sur la CSR

I. Cas des quadruplexes de guanine (facteur cis)

Guidés par des images de la molécule d'ADN évoquant une double hélice, obtenues par Rosalind Franklin par diffraction des rayons X, Watson et Crick ont proposé en 1953 un modèle de la structure d'ADN : une hélice droite formée de deux brins antiparallèles appariés par des liaisons hydrogène (H) entre les bases azotées : $A \leftrightarrow T$ et $C \leftrightarrow G$ (Watson and Crick, 1953).

Chaque nucléotide peut avoir plusieurs sites donneurs et accepteurs des liaisons hydrogène. Des liaisons dites "Hoogsteen" sont un type d'appariement qui impliquent les purines trouvées dans les acides nucléiques (Adénine et Guanine) (Hoogsteen, 1963).

Plus tard, d'autres structures particulières des acides nucléiques ont été identifiées et notamment des structures dites « G-quadruplex » (G4) susceptible d'une part de stabiliser l'un des brins d'ADN sous une forme simple brin, et d'autre part d'être reconnus par un certain nombre de ligands (un prototype de ligand synthétique étant la molécule RHPS4).

1. Structure et caractéristiques des G-quadruplexes

Le G-quadruplexe (G4) est une structure secondaire d'ADN, formée de quatre brins, riches en résidus guanines. Les appariements Hoogsteen au sein de cette structure participent dans la formation d'un plateau de quatre guanines appelé "G-quartet". L'empilement d'au moins de deux quartets forme le G4-DNA. La stabilisation de cette structure est assurée par des cations monovalents (Na^+ , K^+ ...) (**Figure 18**). Les guanines peuvent se trouver sur la même molécule d'ADN, on parle ici de *G4 intramoléculaire*. Dans le cas où les guanines se situent sur des molécules d'ADN différentes, on parle de *G4 intermoléculaire*. Ils peuvent aussi se former dans les molécules ARN jouant alors un rôle dans l'expression génétique et la traduction en protéine (pour revue: Rhodes and Lipps, 2015; Sundquist and Klug, 1989).

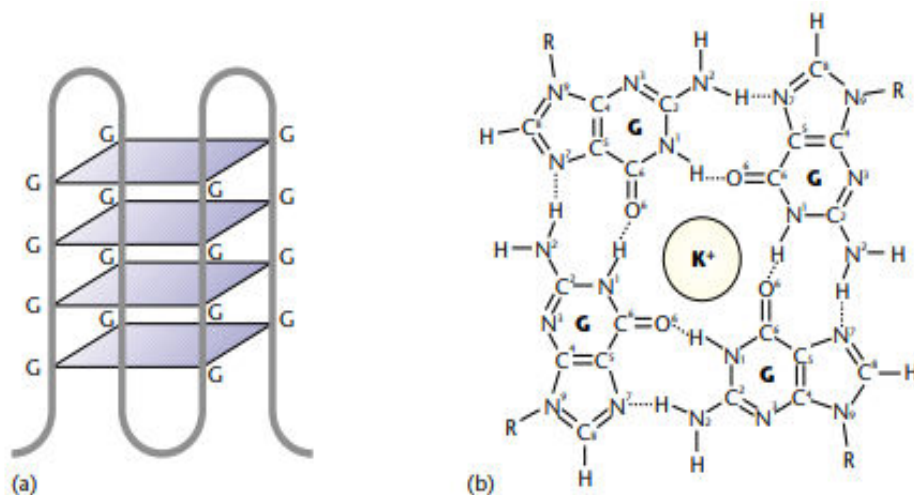


Figure 168: Représentation schématique d'un G-quartet.

- a) Aperçu général ; la ligne noire est le brin d'ADN et les rectangles violets sont les G-quartets empilés.
b) Structure d'un G-quartet (Extrait de: Mirkin, 2001).

2. Rôles biologiques des G-quadruplexes

Les G4 sont impliqués dans diverses voies cellulaires, y compris la réplication de l'ADN, l'expression des gènes, le maintien des télomères, la transcription, la traduction et la recombinaison (Sundquist and Klug, 1989; pour revue : Cree and Kennedy, 2014; Rhodes and Lipps, 2015). La plus grande occurrence d'ADN G4 survient au niveau des régions télomériques. L'ADN G4 est aussi fortement enrichi dans les promoteurs de certains gènes, à la frontière entre introns et exons. Avec un intérêt spécifique pour les cellules B, l'ADN G4 est notoirement abondant au niveau du brin « non template » des régions switch du locus IgH, pouvant faire évoquer un rôle dans la commutation de classe (CSR) (Maizels and Gray, 2013a; Rhodes and Lipps, 2015). Une étude récente a montré que le gène AICDA codant l'AID a aussi une structure génique riche en G-quadruplexes potentiels (Qiao et al., 2017).

Promoteurs de gènes : En 1994 Woodford et ses collègues sont les premiers ayant découvert des G-quadruplexes dans le promoteur du gène β -globine (Woodford et al., 1994). La formation des G4 dans les promoteurs de proto-oncogènes semble liée à la répression de la transcription, en raison de l'incapacité de la polymérase à progresser à travers les G4. Parmi ces promoteurs identifiés chez l'Homme nous pouvons citer les promoteurs de VEGF, BCL2, TP53, c-KIT, PDGF. Ces gènes sont souvent associés au développement des cancers en cas de leur sur-expression. Le promoteur le plus connu comme formant de l'ADN G4 est celui du gène c-Myc (dont la dérégulation caractérise de nombreuses tumeurs), l'identifiant donc comme une cible

potentielle pour les ligands (ou des drogues) stabilisant les G-quadruplexes, diminuant ainsi la transcription et présentant donc un intérêt anti-tumoral (pour revue: Cree and Kennedy, 2014).

Régions télomériques: L'ADN télomérique humain est constitué de répétitions en tandem riches en guanines. Ces répétitions de guanines pourraient potentiellement adopter des configurations en G4. L'ADN G4 se forme naturellement au niveau des télomères chez les eucaryotes (Paeschke et al., 2005; Smith et al., 2011). Contrairement aux cellules normales, 80-85% des cellules tumorales humaines ont une télomérase fonctionnelle qui allonge les télomères. Ainsi, les ligands qui reconnaissent et se lient aux G-quadruplexes dans les télomères sont des médicaments anticancéreux prometteurs en induisant ou stabilisant les G4 et inhibant la télomérase (**Figure 19**) (Yaku et al., 2012).

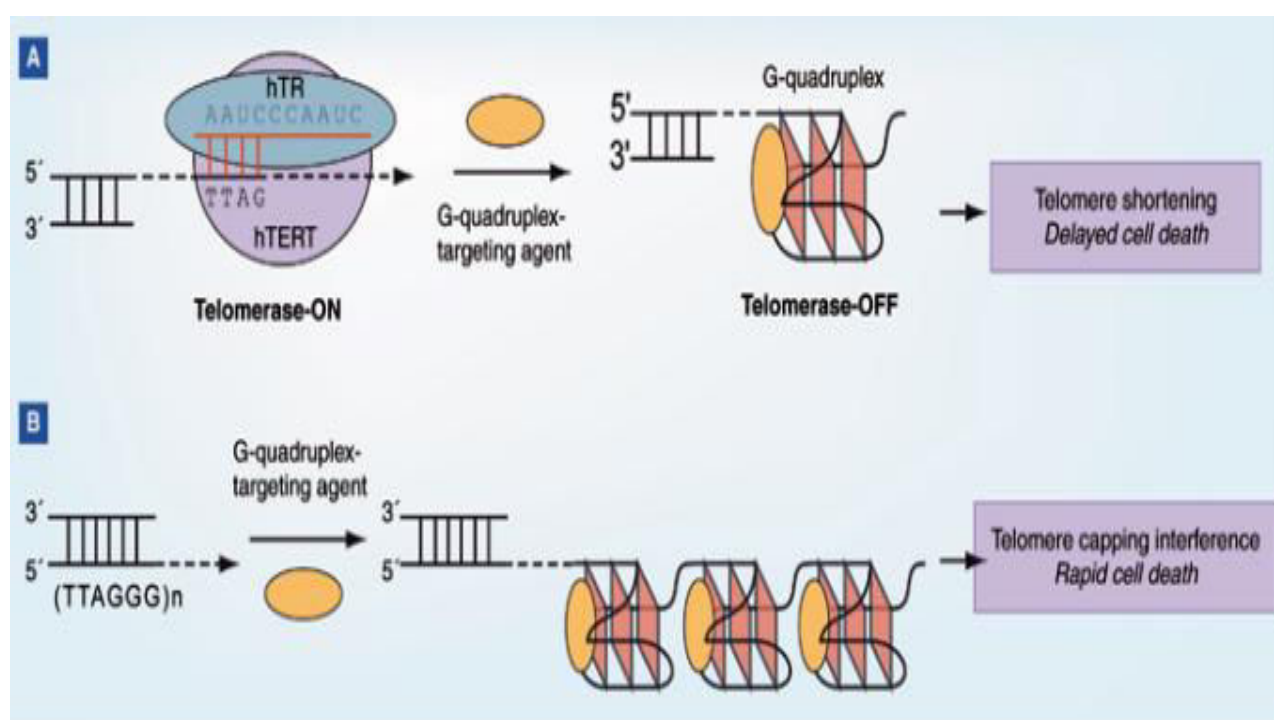


Figure 179: Les structures lors de la transcription de régions switch portant des motifs G4.

A. Mécanisme d'inhibition de la télomérase par des composés ciblant les G4.

B. Mécanisme de l'interférence médicamenteuse des télomères par des G4-ligands (Extrait de la revue: Yang and Okamoto, 2010).

Régions de commutation de classe des immunoglobulines: Le phénomène de CSR implique spécifiquement les régions switch (S), cibles essentielles pour l'enzyme AID et sites de ces recombinaisons. En 1988, Sen et Gilbert ont montré que ces régions peuvent former des G-quadruplexes intermoléculaires in-vitro (Sen and Gilbert, 1988).

L'examen le plus détaillé de la fonction biologique d'une structure spécifique de G4 au niveau des régions switch a été effectué au cours de la définition du mécanisme de la pathogenèse de *Neisseria gonorrhoeae* (bactérie responsable de la blennorragie chez l'Homme). Chaque région S possède un promoteur dédié activant la transcription, accompagné par la formation d'une boucle (G-loop) contenant un hybride stable ARN / ADN sur le brin transcrit alors que les G4 se forment sur le brin non transcrit (Duquette et al., 2004; Maizels and Gray, 2013a). Un certain nombre de travaux récents ont documenté le mode d'intervention probable de l'ADN G4 au niveau de l'ADN ou de l'ARN des régions switch, où il pourrait agir de multiples façons. Les structures G4 pourraient d'une part favoriser le recrutement d'AID au niveau de zones d'ADN possédant une structure tertiaire bien définie, ou bien au niveau de l'ARN G4 situé dans les lariats d'épissage des introns contenant les régions switch (recrutant ainsi indirectement AID au niveau des R-loops) (Qiao et al., 2017; Zheng et al., 2015); l'action sur l'ARN G4 semble passer par leur ciblage par l'hélicase DDX1, initiant la formation des R-loops avant d'exposer ces régions aux attaques d'AID (**Figure 20**) (Ribeiro de Almeida et al., 2018).

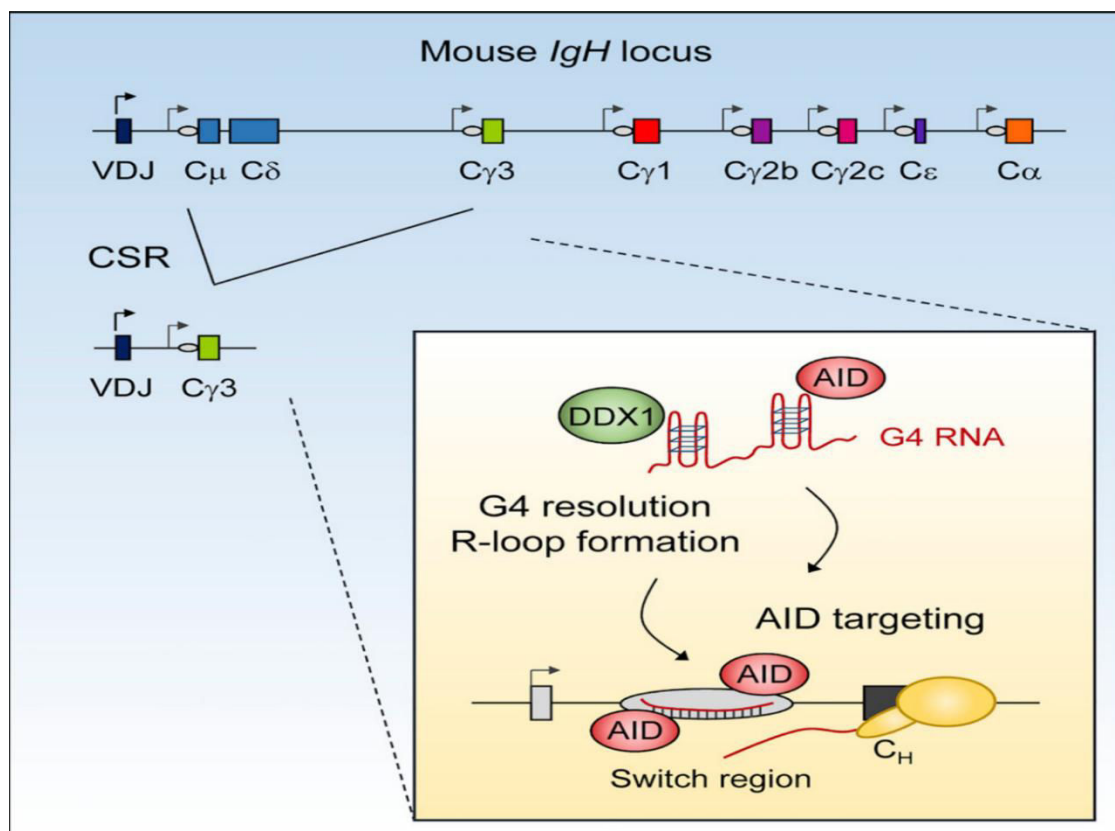


Figure 20: Les G4 au niveau du locus IgH.

L'ARN hélicase DDX1 est nécessaire pour le mécanisme de la CSR au niveau du locus IgH. DDX1 se lie aux structures G-quadruplex présentes dans les ARNs non codant des régions switch et favorise la formation de boucle R à ce niveau, ciblant ainsi AID au locus IgH (Extrait de: Ribeiro de Almeida et al. 2018).

3. Ligands des G-quadruplexes

Les structures G-quadruplexes dans les régions promoteurs des oncogènes et de l'ADN télomérique peuvent servir de cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement du cancer. En conséquence, plusieurs types de petites molécules organiques qui stabilisent les structures G-quadruplexes et inhibent l'activité de la télomérase ont été décrites.

L'ADN sous forme de G-quadruplex est une macromolécule chargée négativement. Alors, le choix des ligands chargés positivement (H⁺) paraît raisonnable. La charge positive des molécules assure une bonne affinité pour les G4 tout en limitant les interactions non spécifiques avec les autres structures secondaires d'ADN et les intercalations entre les paires de bases. La première molécule identifiée ayant le pouvoir de se lier aux G4 est le bromure d'éthidium (BET), intercalant d'ADN (Guo et al., 1992). Des années plus tard, d'autres molécules sont identifiées comme ligands des G-quadruplexes. Ces composés peuvent être d'origine naturelle tels que la cryptolépine, la berbérine et la télomestatine, ou synthétique tel que le RHPS4 (De Cian et al., 2007). Dans la partie suivante de cette thèse, je détaillerai le RHPS4 en tant que stabilisant des G4.

3.1) Le RHPS4

3.1.1) Caractéristiques

Egalement appelé 3,11- Difluoro-6,8,13-triméthyl-8H-quino[4,3,2-kl]acridinium methosulfate. C'est une acridine pentacyclique synthétique fabriquée en 2001. Il est bien connu comme un inhibiteur puissant des télomérases via l'intercalation et la stabilisation des G-quadruplexes télomériques (Cookson et al., 2005; Gowan et al., 2001).

3.1.2) Effets biologiques

L'acridine pentacyclique RHPS4 est un ligand des G4 très puissant et spécifique, initialement proposé comme un simple inhibiteur de la télomérase. Il est une des molécules de liaison au G-quadruplexe les plus intéressantes en raison de son efficacité élevée dans l'inhibition de la croissance des cellules tumorales à la fois dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

L'exposition à long terme des cellules à une faible concentration de RHPS4 provoque un arrêt irréversible de la croissance et de l'érosion des télomères montrant que ce composé possède des propriétés inhibitrices classiques de la télomérase par une stabilisation des structures G-quadruplexes (Gowan et al., 2001). Leonetti et collègues ont montré que le RHPS4, à court terme, provoque une inhibition marquée de la prolifération cellulaire (lignée cellulaire de mélanoma

humaine) et que cet effet est principalement dû à un dysfonctionnement des télomères témoigné par la présence des cellules polynucléées (marqueurs du dysfonctionnement des télomères) (Leonetti et al., 2004). De plus, les effets biologiques de RHPS4 ne sont produits que dans les cellules malignes mais pas dans leurs homologues normaux, suggérant que cet agent tuerait préférentiellement les cellules cancéreuses *in vitro* et dans des xénogreffes de cellules UXF1138L (Leonetti et al., 2008; Phatak et al., 2007). L'effet antiprolifératif du RHPS4 est observé après 15 jours de traitement de la lignée cellulaire ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) GM847 marqué par un arrêt de la croissance cellulaire (Gowan et al., 2001). Ce même effet est observé dans les cellules tumorales du cerveau (PFSK-1, DAOY, U87) traduit par des altérations du cycle cellulaire avec une accumulation cellulaire dans le stade G1/S (Lagah et al., 2014).

Une étude réalisée sur des lignées de mélanome (M14, PLF2, JR1, JR8, SBCL1 et SAN) montre que l'altération du cycle cellulaire induite par le RHPS4 est irréversible même à faibles doses entraînant la mort des cellules par apoptose (Leonetti et al., 2004).

II) Cas des protéines à bromodomaines (facteur *trans*) et de leurs ligands

1. Définition

Un bromodomaine est un domaine protéique, d'approximativement 110 acides aminés, qui se lie aux résidus de lysine acétylés, tels que ceux sur les extrémités N-terminales des histones. Son affinité est plus élevée pour les régions où plusieurs sites d'acétylation existent à proximité. Le domaine lui-même adopte un repliement protéique, c'est un faisceau de quatre hélices alpha (Z, A, B et C) séparées chacune par des boucles inter-hélicoïdales ZA et BC de longueur et de séquence variables formant une poche hydrophobe reconnaissant la lysine acétylée et servant à stabiliser la structure (**Figure 21**) (Muvva et al., 2014; Owen et al., 2000).

Ainsi, les bromodomaines, en tant que "lecteurs" de l'acétylation de la lysine, sont responsables de la transduction du signal porté par les résidus de lysine acétylés dans les histones et dans d'autres protéines (non histones) et de leur traduction en divers phénotypes normaux ou anormaux. La famille la plus remarquable de protéines à bromodomaines est la famille « Bromo et Extra-Terminal » (BET), qui comprend la BRD2, BRD3 et BRD4 (bromodomain-containing protein). Leur importance dans le domaine de la cancérologie et de l'immunologie est bien mise en évidence grâce à la découverte des inhibiteurs spécifiques tels que iBET et JQ1 permettant de mieux comprendre leurs fonctions dans la biologie du cancer, les infections virales et l'inflammation mais aussi dans la régulation de la chromatine, le contrôle transcriptionnel et la transduction du signal (Ntranos and Casaccia, 2016).

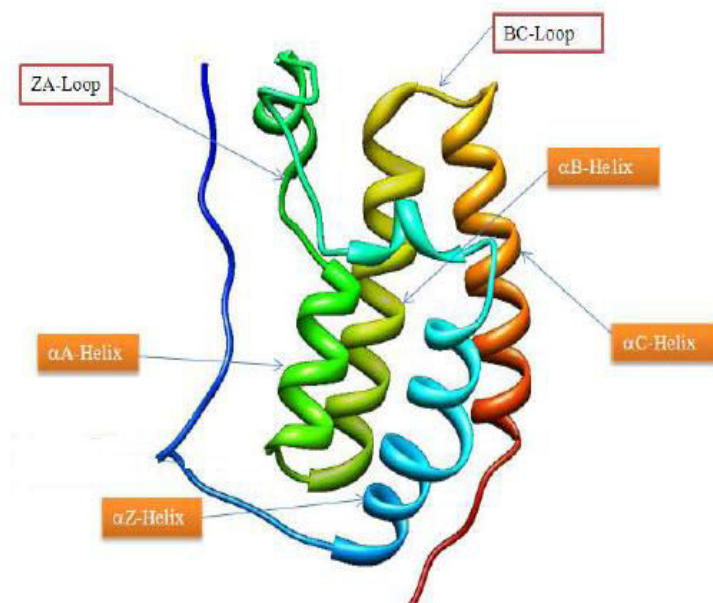


Figure 21: Représentation schématique de la structure d'un bromodomaine.

Ruban de bromodomaine montrant les quatre hélices α (A, B, Z et C) et les boucles internes ZA et BC. Le ruban est coloré du bleu (côté N-terminale) jusqu'à la couleur orange (côté C-terminale) (Adapté de Muvva et al., 2014).

2. Rôles biologiques

Les protéines bromodomaines ont diverses fonctions physiologiques, seules ou en tant que parties de certains complexes protéiques. Tout d'abord, elles peuvent être impliquées dans le remodelage de la chromatine et dans les modifications des histones y compris l'acétylation et la méthylation. Elles peuvent également réguler la transcription par la reconnaissance spécifique des histones en contrôlant le recrutement d'autres régulateurs transcriptionnels à la chromatine (**Figure 22**) (pour revue : Fujisawa and Filippakopoulos, 2017).

BRD en tant que composants des complexes de remodelage de la chromatine : Les protéines BRD sont fréquemment présentes dans des grands complexes qui ciblent la chromatine contrôlant son compactage et sa décompaction. Par exemple, la protéine BAZ1A (bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1A) et la protéine BAZ2A assemblent respectivement les complexes ACF–WSTF (ATP-utilizing, chromatin remodelling and assembly factor–Williams syndrome transcription factor) et NoRC (nucleolar remodelling complex) favorisant ainsi la compaction de la chromatine et l'inhibition d'expression des gènes. D'autre part, d'autres complexes formés des BRD font aussi partie des composants de complexes de remodelage de la chromatine qui favorisent la décompaction de la chromatine et ils améliorent ainsi la transcription; Parmi ceux-ci: la protéine SMARCA2 (SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of

chromatin subfamily A member 2), SMARCA4 et la protéine BRWD1 (BRD and WD repeat-containing protein 1) faisant partie d'un complexe SWI-SNF (switch/sucrose non-fermenting); BAZ1B est aussi un composant du complexe WICH (WSTF-ISWI chromatin remodelling complex) permettant la décompaction de la chromatine (**Figure 22a**).

Participation des BRD dans les modifications d'histones : Dans ce cas, ces protéines affectent la structure de la chromatine en provoquant directement l'acétylation et la méthylation sur les histones. Elles peuvent faire partie des complexes plus importants impliqués dans divers processus physiologiques comme la stabilité génomique, le développement, la formation de la mémoire, la plasticité neuronale et la croissance cellulaire. Mais elles sont aussi impliquées dans la méthylation des protéines. Exemples des complexes protéiques modifiant les histones directement à travers leur acétyltransférase sont : CREBBP (CREB-binding protein) et EP300 (E1A-associated protein p300). Exemples des complexes protéiques modifiant les histones directement à travers leur méthyltransférase incluent : MLL ((mixed-lineage leukaemia) et ASH1L (absent from small and homeotic disks protein 1-like) (**Figure 22b**).

BRD comme *scaffolds* reconnaissant les histones : Elles semblent jouer un rôle important en tant qu'échafaudages qui, grâce à la reconnaissance des histones acétylées, régulent le recrutement et la ségrégation des composants de la machinerie transcriptionnelle dans des locus particuliers. Les bromodomaines et BET recrutent des composants de la machinerie transcriptionnelle qui régulent positivement les gènes favorisant la croissance alors que la protéine ZMYND8 (zinc-finger MYND domain-containing protein 8) recrute le complexe NuRD (nucleosome remodelling and deacetylase) ou KDM5C (lysine-specific demethylase 5C) conduisant à la répression transcriptionnelle (**Figure 22c**).

BRD comme modulateurs de la transcription : Les BRD possèdent également diverses autres activités grâce auxquelles elles peuvent réguler l'expression des gènes en jouant le rôle de co-régulateurs transcriptionnels. Par exemple, ils peuvent agir comme co-activateurs des protéines SP (speckled protein) et de TRIM24 (tripeptide motif-containing 24). Ils peuvent également agir comme co-répresseurs; par exemple, les protéines TRIM28 peuvent s'associer avec les protéines HP1 (heterochromatin-associated proteins) conduisant à la compaction de la chromatine et par conséquent à la répression transcriptionnelle (**Figure 22d**).

Delmore et collègues ont démontré aussi que le gène MYC, transloqué au niveau du locus IgH au cours de certains types de cancer (lymphome de Burkitt par exemple) est lui-même régulé par les protéines à bromodomaines BET. Ils ont montré par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) que BRD4 est fortement enrichi au niveau des activateurs "enhancers" de la chaîne lourde (IgH)

des immunoglobulines dans les cellules MM (Multiple myeloma cells) portant un réarrangement de Myc au locus l'IgH (Delmore et al., 2011).

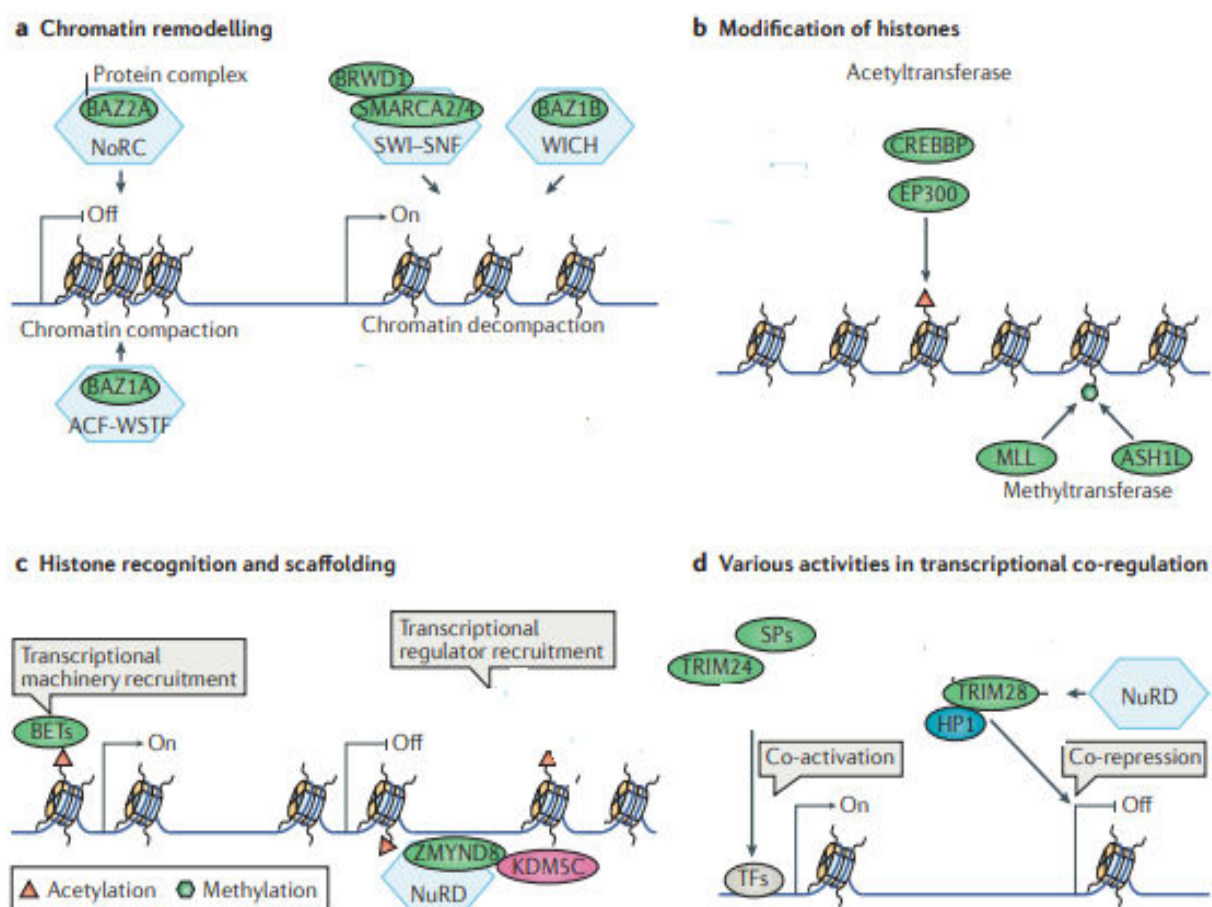


Figure 22: Rôles des bromodomaines dans la régulation des gènes.

BRD régulent l'expression des gènes à travers diverses activités et mécanismes.

a) Elles sont trouvées associées aux complexes de remodelage de la chromatine.

b) Elles s'engagent dans l'acétylation et la méthylation des histones.

c) Elles peuvent jouer des rôles importants dans la transcription en activant des facteurs reconnaissant les histones ce qui favorisent l'assemblage de complexes transcriptionnels.

d) Elles peuvent également servir de co-régulateurs transcriptionnels. TFs : transcription factors (Adapté de Fujisawa and Filippakopoulos, 2017).

3. Petites molécules modulant les fonctions biologiques des bromodomaines

Le site de liaison à la séquence acétyl-lysine dans un bromodomaine contient une cavité structurale préformée entre les boucles ZA et BC, ce qui la rend appropriée pour la liaison à des petites molécules qui bloquent les interactions protéine-protéine. Ainsi des ligands chimiques capables de bloquer sélectivement la liaison du bromodomaine à sa cible protéique ont été développés. Parmi ces ligands, on peut citer NP1 (N1-4-methyl-2-nitro-phenyl-propane-1,3-diamine) et MS7972 (9-acetyl-2,3,4,9-tetrahydro-carbazol-1-1) qui peuvent se lier à l'entrée de la poche de

liaison acétyl-lysine en interagissant avec des résidus d'acides aminés dans la boucle ZA bloquant ainsi l'interaction de la bromodomaine avec sa protéine cible (pour revue: Mujtaba et al., 2007).

La découverte des petits inhibiteurs puissants et hautement spécifiques de la famille BET des protéines à bromodomaines, tels que le JQ1, montre que ces molécules sont capables de perturber l'interaction des BET avec les histones affectant ainsi leur rôle de régulateurs transcriptionnels. Nous nous concentrerons pour la suite sur la molécule JQ1 qui sera détaillée dans la suite de ce paragraphe, puisque nous avons souhaité l'utiliser afin de mesurer l'impact des protéines à bromodomaines (connues pour leur affinité envers les superenhancers) sur des phénomènes B-intrinsèques que nous considérons par ailleurs comme étroitement liés à des interactions physiques entre le super-enhancer IgH 3'RR et un certain nombre de sites cibles du locus IgH, au niveau desquels le super-enhancer promeut à distance le recrutement d'AID.

- **La molécule JQ1**

JQ1 est un thieno-triazolo-1,4-diazépine et un puissant inhibiteur de la famille BET des protéines de bromodomaines. Il a des propriétés antitumorales directes bien remarquées. Ce petit inhibiteur peut cibler BRD4 qui se lie aux résidus de lysine acétylés dans la chromatine, et recrute le facteur P-TEFb, l'ARN polymérase II (ARN PolII) et divers *super-enhancers* impliqués dans la transcription. JQ-1 empêche l'interaction de BRD4 avec la lysine acétylée par compétition inhibant ainsi la transcription (pour revue : Bid and Kerk, 2016). Dans le myélome multiple (MM), une maladie fréquemment associée à une activité dérégulée de BET, BRD4 est fortement enrichie au niveau des activateurs (*enhancers*) de la chaîne lourde (IgH) des immunoglobulines réarrangée avec le gène MYC. JQ1 en bloquant cette interaction supprime la transcription du MYC accompagnée avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Delmore et al., 2011).

En outre, le traitement par JQ1 diminue le nombre de cellules pré-B, immatures et matures alors que le nombre de cellules pro-B précoces reste constant. De plus, il augmente l'apoptose des lymphocytes T conduisant à une cellularité réduite dans le thymus, la moelle osseuse et la rate. D'autre part, JQ1 induit à long terme la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. En raison de l'augmentation de leur nombre, les cellules souches hématopoïétiques traitées par JQ1 sont les meilleures cellules potentielles d'être greffées aidant à repeupler le système hématopoïétique de manière nettement plus rapide après une myéloablation sublétales (Wroblewski et al., 2018).

Pendant les réactions inflammatoires, JQ1 réduit également la production des cytokines et perturbe l'interaction entre les protéines BET et les gènes cibles dans les macrophages stimulés

par LPS protégeant les souris contre les chocs endotoxémiques (une complication grave liée à la transfusion d'un produit contaminé par une bactérie qui libère des endotoxines) (Belkina et al., 2013). Une expression élevée de BRD4 est trouvée dans les lymphocytes B de la GC pendant la différenciation. Son inhibition par la molécule JQ-1 supprime la formation du GC et la production d'IgG1 alors que la production d'IgM n'est pas affectée (Gao et al., 2015). Étonnamment le rôle en physiologie des protéines BRD dans les interactions entre super-enhancer IgH et cibles endogènes présentes au sein du locus, et la possibilité de perturber ces interactions par JQ1 (si elles existent), restent à ce jour non étudiées.

Objectifs et Problématiques

L'objectif principal de ma thèse était de contribuer à l'étude des mécanismes du switch des immunoglobulines, en ciblant des classes d'immunoglobulines minoritaires telles que les IgE (qui ne sont quasi-jamais exprimées en tant que BCR par les cellules B *in vivo*), les IgA2, dont l'expression parmi les anticorps sérique est généralement minime par rapport à celle des IgA1, ou encore comme les pseudo-IgG (pour lesquelles le challenge était d'en identifier ou non une expression, fut-ce à bas niveau). A côté de ces situations où le switch semble physiologiquement restreint (voire nul), j'ai ainsi initié ma thèse par un travail concernant l'intérêt de l'induction du switch IgE afin d'induire l'élimination des cellules B concernées.

Outre ce travail sur des classes d'Ig spécifiques, j'ai aussi travaillé sur des projets explorant des stratégies pharmacologiques de restriction du switch, soit globalement, soit plus spécifiquement vers certains isotypes d'Ig. Bien entendu, des stratégies optimales en termes d'applications médicales seraient celles qui inhiberaient le mieux les Ac impliqués dans des réactions immunitaires graves (telles les réactions allergiques... par atténuation de la production d'une immunoglobuline rare mais dangereuse, IgE). J'ai tout d'abord testé si un ligand de l'ADN G4 (RHPS4) peut moduler la CSR, réduisant ainsi la production d'anticorps spécifiques de l'antigène et l'inflammation pulmonaire allergique chez la souris (**article 1 publié**). Ensuite nous sommes intéressés à tester un autre ligand (JQ1), inhibiteur des protéines de bromodomaines qui lient les super-enhancers. Nous avons montré qu'un tel ligand peut agir de façon B-intrinsèque et réguler la CSR, notamment la production d'IgG et d'IgE. Cependant nous avons aussi observé que les effets « B-intrinsèques » s'associent comme il est prévisible à des effets très larges sur les différents sous-compartiments du système immunitaire et sont aussi fortement immunomodulateurs du versant T des réponses immunes (**article 2 en de préparation**).

J'ai aussi mis en évidence pendant cette thèse l'existence (jusqu'ici ignorée et masquée par les 4 autres sous-classes plus abondantes) d'une cinquième sous-classe d'IgG humaine, l'IgG5 codée par le gène pseudo-gamma. J'ai travaillé sur des formes recombinantes de cette IgG5. J'ai caractérisé ainsi sa fonctionnalité à partir d'un variant du rituximab artificiellement switché IgG5. J'ai pu en parallèle montrer l'existence de cassures « switch-like » en amont du gène pseudo-gamma dans des cellules B humaines normales, et mettre en évidence un répertoire diversifié des ces IgG5 (**article 3 en préparation**).

Finalement j'ai aussi travaillé sur un autre projet visant à comprendre les mécanismes qui amènent à la sous-expression des IgA2 par rapport aux IgA1. J'ai pu ainsi pendant ma thèse étudier un modèle transgénique d'expression d'une immunoglobuline humaine rare : IgA2 dont nous avons

démontré qu'elle convoie un signal membranaire différent de celui de l'IgA1, et pour lesquelles nous disposons de 2 modèles knock-in $\alpha 1$ et $\alpha 2$ dédiés (**article 4 en preparation**).

Résultats

Article 1

G-quadruplex DNA targeting alters class-switch recombination in B cells and attenuates allergic inflammation

Zeinab Dalloul, MSc, Pauline Chenuet, MSc, Iman Dalloul, MSc, François Boyer, PhD, Jean-Claude Aldigier, MD, PhD, Brice Laffleur, PhD, Yolla El Makhour, PhD, Bernhard Ryffel, MD, PhD, Valerie FJ. Quesniaux, PhD, Dieudonnée Togbé, PhD, Jean-Louis Mergny, PhD, Jeanne Cook-Moreau, PhD, Michel Cogné, MD, PhD.

Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2018. (**Article publié**)

L'ADN G-quadruplex (G4) constitue une structure d'ADN régulatrice potentiellement importante dans les cellules B. Il peut maintenant être ciblé par des ligands pharmacologiques spécifiques récemment introduits dans des essais de traitement du cancer. La densité G4 a également été remarquée sur le brin non-codant des régions switch précédant les gènes constants de la chaîne lourde, avec un rôle suspecté dans la recombinaison de classe (CSR).

Cet article est l'aboutissement d'une étude qui vise à déterminer si le ligand RHPS4 des G4 peut moduler la CSR, réduisant ainsi la production d'anticorps spécifiques de l'antigène et de l'inflammation pulmonaire allergique chez la souris.

Nous avons évalué la CSR par la cytométrie en flux, l'expression génique par qPCR et la production d'IgM, IgG et IgE par ELISA et ELISPOT. L'asthme allergique a été évalué par le recrutement de cellules inflammatoires et les taux de cytokines dans le BALF et les poumons ainsi que par la microscopie et la fonction pulmonaire.

Nous avons rapporté que RHPS4 a réduit de manière significative le CSR pour diverses classes d'Ig et la sécrétion d'Ig par les cellules B *in-vitro*. En outre, *in vivo*, RHPS4 a augmenté les quantités de cellules exprimant des IgM non switchées tout en réduisant les cellules switchées. Il a également réduit la production d'IgG, IgE et IgM spécifiques à l'OVA dans le sérum. D'une façon importante, l'atténuation de l'asthme allergique par RHPS4 chez les souris est associée à un recrutement réduit des cellules lymphocytaire, des neutrophiles et des monocytes dans le BALF ainsi qu'à une baisse des taux de cytokines et du recrutement de cellules inflammatoires dans les poumons.

Ce travail est d'une part une indication de plus de l'implication des structures type G4 dans le recrutement d'AID et dans la mécanistique du switch des gènes IgH, il montre aussi pour la première fois qu'un ciblage pharmacologique du mécanisme de CSR pourrait être envisagé et représenter une nouvelle opportunité thérapeutique pour les pathologies dysimmunitaires impliquant des anticorps switchés, telles que les allergies.

Accepted Manuscript

G-quadruplex DNA targeting alters class switch recombination in B cells and attenuates allergic inflammation

Zeinab Dalloul, MSc, Pauline Chenuet, MSc, Iman Dalloul, MSc, François Boyer, PhD, Jean-Claude Aldigier, MD, PhD, Brice Laffleur, PhD, Yolla El Makhour, PhD, Bernhard Ryffel, MD, PhD, Valerie FJ. Quesniaux, PhD, Dieudonnée Togbé, PhD, Jean-Louis Mergny, PhD, Jeanne Cook-Moreau, PhD, Michel Cogné, MD, PhD.



PII: S0091-6749(18)30895-9

DOI: [10.1016/j.jaci.2018.06.011](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.06.011)

Reference: YMAI 13486

To appear in: *Journal of Allergy and Clinical Immunology*

Received Date: 31 January 2018

Revised Date: 30 May 2018

Accepted Date: 12 June 2018

Please cite this article as: Dalloul Z, Chenuet P, Dalloul I, Boyer F, Aldigier J-C, Laffleur B, El Makhour Y, Ryffel B, Quesniaux VF, Togbé D, Mergny J-L, Cook-Moreau J, Cogné M, G-quadruplex DNA targeting alters class switch recombination in B cells and attenuates allergic inflammation, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2018), doi: 10.1016/j.jaci.2018.06.011.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

G-quadruplex DNA targeting alters class switch recombination in B cells and attenuates allergic inflammation

Zeinab Dalloul^a , MSc Pauline Chenuet^b, MSc, Iman Dalloul^a, MSc, François Boyer^a, PhD, Jean-Claude Aldigier^a, MD, PhD, Brice Laffleur^a, PhD, Yolla El Makhour^c, PhD, Bernhard Ryffel^b, MD, PhD, Valerie FJ Quesniaux^b, PhD, Dieudonnée Togbé^b, PhD, Jean-Louis Mergny^{d, e}, PhD, Jeanne Cook-Moreau^a , PhD & Michel Cogné^{a,f}, MD, PhD.

^a Limoges University, CNRS UMR 7276, INSERM U1162, :Control of the B cell Response & Lymphoproliferation, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France

^b INEM - UMR7355, CNRS, 3b rue de la Férollerie, F-45071 Orléans - Cedex 2. / ArtImmune SAS, 13 Avenue Buffon, 45100, Orléans

^c Immunology Unit MICSU and Lebanese University, Faculty of sciences, Beirut, Lebanon.

^d Bordeaux University, INSERM U1212, UMR CNRS 5320, ARNA, 33600 Pessac, France.

^e Institute of Biophysics of the CAS, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic.

^f Address correspondence to Michel Cogné, MD, PhD, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France. Fax # (33) 555 435 897, Phone (33) 519 564 200, mail: cogne@unilim.fr

The authors declare no conflict of interest.

Capsule summary: Targeting immunoglobulin *switch* regions with a G4-DNA binding drug offers a novel immunomodulatory strategy reducing class-switched antibody secretion.

Keywords: Allergic asthma model ; immunoglobulin class switch ; B lymphocytes ; G-quadruplex ; immunopathology

Abbreviations: AID, Activation-induced deaminase. BALF, Bronchoalveolar lavage fluid.

CSR, Class-switch recombination. G4, G-quadruplex. RHPS4, 3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8*H*-quino[4,3,2-*kl*]acridinium methosulfate.

G-quadruplex DNA targeting alters class switch recombination in B cells and attenuates allergic inflammation

To the Editor

G-quadruplex (G4) DNA abundance in immunoglobulin (Ig) switch (S) regions (see Fig E1 and the Methods section in this article's Online Repository at www.jacionline.org) might promote transcriptional pausing and occurrence of DNA nicks¹. *In vitro*, such structured DNA favors oligomerization and activity of Activation-Induced Deaminase (AID)². Orientation-dependent CSR optimally occurs with G-rich DNA on the non-template strand³. However, AT-rich *Xenopus laevis* S-regions support CSR in an orientation-independent manner and it was rather proposed that palindromes forming stem loops are mandatory for CSR, the role of G4-DNA remaining controversial⁴.

Pharmacological G4-stabilizing agents are potential anticancer drugs with telomerase inhibitory activity and potential to slow expression of some oncogene promoters⁵. Their effect on CSR is unknown. We hypothesized that if G4-DNA promotes AID recruitment onto S-regions, G4-stabilizing agents should then affect CSR. We evaluated non-toxic doses of the prototypic G4-ligand, 3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8*H*-quino[4,3,2-*kl*]acridinium methosulfate (RHPS4) both *in vitro* on cultured B-lymphocytes and *in vivo* in mice, with regards to CSR and B-cell terminal differentiation.

While 5 to 50 μ M RHPS4 can target cancer cells, we used doses in the 0.1 to 2 μ M range *in vitro*, and 10 mg/kg/day for *in vivo* assays. Such low doses neither decreased B-cell growth in cultures nor triggered apoptosis but somehow impacted plasma cell differentiation (see Fig E2A-C in this article's Online Repository at www.jacionline.org). Splenocytes recovered from mice treated for 9 days with RHPS4 also showed unaltered viability (see Fig E2D in this article's Online Repository at www.jacionline.org). We validated that such RHPS4

concentrations indeed more strongly bound oligonucleotides homologous to S μ rather than control (see Fig E3 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

To evaluate whether RHPS4 modulated class-switching, splenocytes were stimulated *in vitro* by lipopolysaccharide (LPS) +/- cytokines, and followed for cell-surface BCR expression. This yielded a 3-fold reduction of class-switched cells at 0.5 μ M RHPS4 and a 5-fold reduction at 1 μ M (by either specifically monitoring cells switched to IgG1 or globally evaluating IgM^{neg} CD19⁺ class-switched cells (**Fig 1A**). IgM secretion in supernatants was barely influenced at 0.5-1 μ M RHPS4 (and cut by 1/3 at 2 μ M), while class switched Ig decreased more than ten-fold (*i.e.* IgG2b & IgG3 with LPS alone, IgG2a with LPS + interferon γ , IgG1 & IgE with LPS+ IL-4) (at any dose over 0.5 μ M RHPS4) (**Fig 1B**). While B-cell counts in such cultures did not vary, decreased differentiation into CD138⁺ plasmablasts (cut by about one-third) (**Fig. E2C**) might contribute to globally reduced Ig secretion.

We quantified I γ -C γ and I μ -C μ germline transcripts specific for the “pre-CSR” stage and I μ -C γ “post-CSR” transcripts in LPS/IL-4-stimulated B-cells. Upon RHPS4 treatment, “pre-CSR” transcripts increased (**Fig 1C, left panels**), indicating that IgH locus transcription preceding CSR accessibility was maintained. By contrast, class-switched transcripts decreased (**Fig 1C, right panels**), indicating a blockade of the CSR step itself.

Although AICDA gene transcription was unaffected by RHPS4, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments confirmed a drastic reduction in AID-recruitment to S μ , S ϵ as well as S γ 1 in stimulated cells (**Fig 1D, E**).

S μ -S γ CSR junctions sequenced by NGS from cells treated with RHPS4 featured a 4-fold decrease in number, with slightly increased proximity of breaks to cytosines of RGYW/WRCY motifs, while the balance of non-homologous-end joining *versus* microhomology-mediated-end joining was unchanged (see Fig E4 in this article's Online Repository at www.jacionline.org).

After primary immunization by ovalbumin of mice receiving RHPS4, we observed that specific anti-OVA unswitched IgM-producing cells increased (as evaluated by ELISPOT), while IgG secreting cell number was cut by half, and serum circulating anti-OVA-specific IgG (and IgE) accordingly decreased (**Fig 2A**). To a lesser extent, serum anti-OVA specific IgM also decreased, suggesting that on a “per-cell” basis, IgM secretion also tended to be lower.

We followed secondary responses in mice booster-immunized at Day 7 and 14 and kept for 25 days under either steroids or RHPS4. This indicated a prolonged decrease in specific IgG and delayed production of IgE (decreased at Day 9 but not Day 25) (**Fig 2B**).

In mice sensitized to OVA, allergic manifestations triggered by intra-nasal immunization were explored under treatment by RHPS4 or steroids. Following the attenuated systemic OVA-specific IgG1 and IgE responses mentioned above, some aspects of airway allergy were alleviated in lungs of mice receiving RHPS4: inflammation scores and cell infiltration decreased in lungs (**Fig 2C, D**). Cell-numbers were reduced for all cell types in broncho-alveolar fluid (BALF), in comparison to mice only receiving ovalbumin (most significantly for macrophages and lymphocytes), and RHPS4 significantly reduced total protein levels in BALF (**Fig 2E**). Most of these biological markers of RHPS4-mediated immunomodulation reached levels similar to those achieved with steroids and were most likely related to the attenuated humoral response, since in parallel, T-cell parameters such as cytokine levels were improved as expected by steroids but unaffected by RHPS4 treatment (see Fig E5 in this article’s Online Repository at www.jacionline.org). Consequently, some but not all functional aspects of airway allergy (airway compliance and lung eosinophil peroxidase activity) improved under RHPS4 treatment (see Fig E6 in this article’s Online Repository at www.jacionline.org).

Inappropriate humoral immune responses involving pro-inflammatory class-switched Igs frequently result in immunopathology, and are then treated with broad anti-inflammatory

strategies. Few compounds currently target B-cell function and none directly target CSR. It would therefore be of considerable interest to identify drugs directly modulating CSR, thus lessening production of the most pro-inflammatory class-switched Ig. CSR in B-cells is modulated by multiple *cis*-regulatory elements, notably 3' IgH enhancers promoting AID recruitment^{6,7}. Convergent data suggest that CSR is favored by G-rich S-region transcripts forming RNA/DNA hybrids on the template strand, exposing single-stranded R-loops on the non-template strand, and differentially recruiting AID to initiate double-strand breaks instead of mutations³. G4-DNA defining “G-loops” on the non-template strand may also help recruit CSR factors⁸. AID binding to G4-containing transcripts, might finally confer *trans* activity to such transcripts⁹.

We now show that low doses of a G4-DNA stabilizing agent documented for anti-cancer activity, directly dampen CSR *in vitro*. Despite broader effects expected *in vivo* due to the presence of G4-DNA in many genes, RHPS4 lowered numbers of switched B-cells after immunization, impacted production of class-switched Ig and attenuated manifestations of allergy in a mouse model of airway sensitization (see graphical abstract as Fig E7 in this article's Online Repository at www.jacionline.org). This report thus shows CSR as a “druggable” process, with G4-stabilizing agents such as RHPS4 both inhibiting CSR and decreasing Ig secretion, both of which might be of interest in auto-immune or immuno-allergic conditions.

Zeinab Dalloul^a, Pauline Chenuet^b, Iman Dalloul^a, François Boyer^a, PhD, Jean-Claude Aldigier^a, MD, PhD, Brice Laffleur^a, PhD, Yolla El Makhour^c, PhD, Bernhard Ryffel^b, MD, PhD, Valerie FJ Quesniaux^b, PhD, Dieudonnée Togbé^b, PhD, Jean-Louis Mergny^d,^e, PhD, Jeanne Cook-Moreau^a, PhD & Michel Cogné^{a,f}, MD, PhD.

^a Limoges University, CNRS UMR 7276, INSERM U1162, :Control of the B cell Response & Lymphoproliferation, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France

^b INEM - UMR7355, CNRS, 3b rue de la Férollerie, F-45071 Orléans - Cedex 2. / ArtImmune SAS, 13 Avenue Buffon, 45100, Orléans

^c Immunology Unit MICSU and Lebanese University, Faculty of sciences, Beirut, Lebanon.

^d Bordeaux University, INSERM U1212, UMR CNRS 5320, ARNA, 33600 Pessac, France.

^e Institute of Biophysics of the CAS, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic.

^f Correspondence: cogne@unilim.fr

Acknowledgements: This work was supported by grants from ARC (PGA120150202338), ANR (grant 16-CE15-0019-01), INCa (grant #9363), Ligue Nationale contre le Cancer, European FEDER n°2016-00110366, Biotarget Région Centre. SYMBIT Région Nouvelle Aquitaine (CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000477) and ERDF. ZD was supported by a fellowship from Fondation Française pour la Recherche contre le Myélome et les Gammopathies monoclonales (F.F.R.M.G.). We thank Dr. P. Gearhart for anti-AID antibodies.

REFERENCES

1. Vallur AC, Maizels N. Activities of human exonuclease 1 that promote cleavage of transcribed immunoglobulin switch regions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:16508–12.
2. Qiao Q, Wang L, Meng F-L, Hwang JK, Alt FW, Wu H. AID Recognizes Structured DNA for Class Switch Recombination. *Mol Cell*. 2017;67:361-373.e4.
3. Shinkura R, Tian M, Smith M, Chua K, Fujiwara Y, Alt FW. The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat Immunol*. 2003;4:435–41.
4. Tashiro J, Kinoshita K, Honjo T. Palindromic but not G-rich sequences are targets of class switch recombination. *Int Immunol*. 2001;13:495–505.
5. Balasubramanian S, Hurley LH, Neidle S. Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10:261–75.
6. Saintamand A, Rouaud P, Saad F, Rios G, Cogné M, Denizot Y. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat Commun*. 2015;6:7084.
7. Le Noir S, Boyer F, Lecardeur S, Brousse M, Oruc Z, Cook-Moreau J, et al. Functional anatomy of the immunoglobulin heavy chain 3' super-enhancer needs not only core enhancer elements but also their unique DNA context. *Nucleic Acids Res*. 2017;45:5829–37.
8. Duquette ML, Handa P, Vincent JA, Taylor AF, Maizels N. Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev*. 2004;18:1618–29.
9. Zheng S, Vuong BQ, Vaidyanathan B, Lin J-Y, Huang F-T, Chaudhuri J. Non-coding RNA Generated following Lariat Debranching Mediates Targeting of AID to DNA. *Cell*. 2015;161:762–73.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Figure 1. RHPS4 decreases CSR in stimulated primary mouse B cells.

(A) Primary B cells stimulated with LPS/IL-4 were treated with 0, 0.5, and 1 μ M RHPS4, collected after 4-day culture and stained for flow cytometry. Histograms represent mean % $\pm$ SEM for 6 mice. *** P <0.001 compared with untreated cells.

(B) Supernatants from adequately stimulated splenocytes were quantified by ELISA for the production of IgM, IgG2b and IgG3 (*top*), IgG2a, IgG1 and IgE (*bottom*).

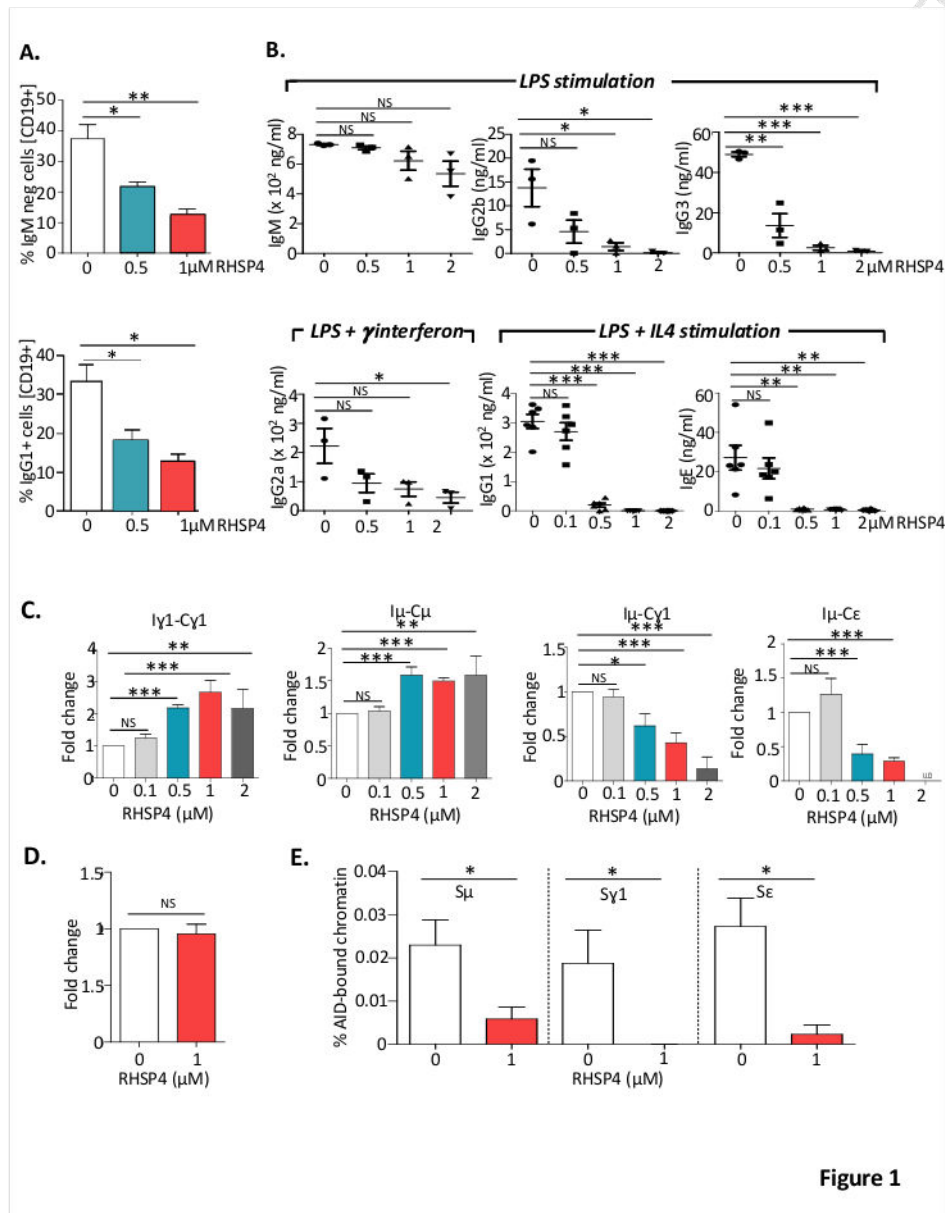
(C) Germline C γ 1 and C μ transcripts (*left*) and post-switch (*right*) I μ -C γ 1 and I μ -C ϵ transcripts from LPS+IL4 stimulated B-cells. Histograms represent mean fold change $\pm$ SEM for 6 mice. (D) AICDA expression from LPS-stimulated cells. (E) ChIP experiments showing AID-recruitment to S μ , S ϵ and S γ 1-regions in LPS+IL-4 stimulated cells (*right*).

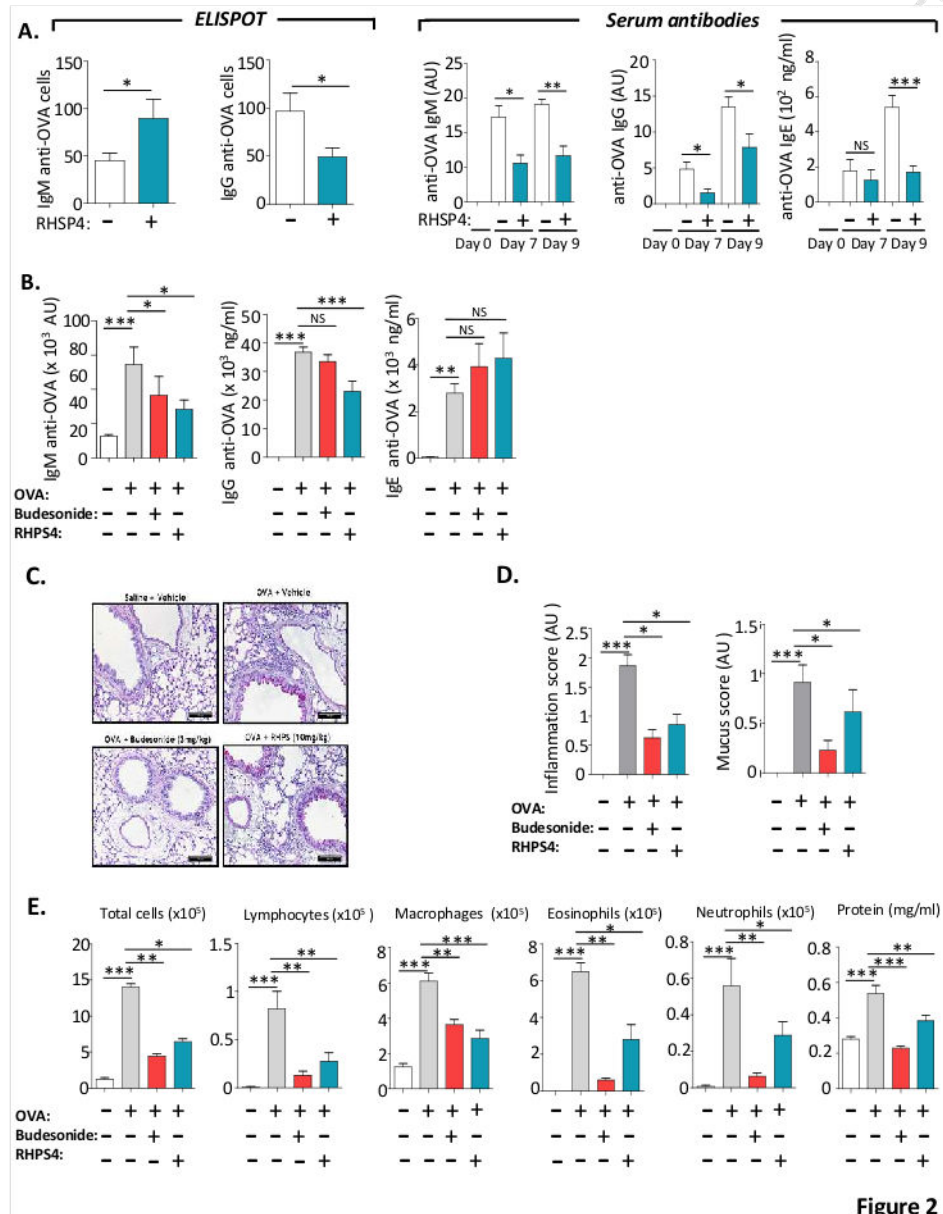
NS: not significant. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared with the control untreated cells.

Figure 2. RHPS4 inhibited class-switching *in vivo* and decreased production of specific antibodies.

(A) Ag-specific IgM or IgG producing cells by ELISPOT in mice after primary immunization (left panels), and levels of Ag-specific Abs (right panels). (B). Ag-specific IgG1 and IgE Abs after 25 days i.p. and i.n. ovalbumin immunization.

(C) In an allergic asthma model after repeated Ag administration, mice receiving RHPS4 displayed less abundant cell infiltration of lung, (D) lower inflammation and mucus scores and (E) lower counts of total cells, lymphocytes, macrophages, eosinophils, and neutrophils, together with lower protein levels, in bronchoalveolar fluid (BALF).





METHODS

Mice

WT mice were used in all experiments and maintained in our animal facilities, at 21–23°C with a 12-h light/dark cycle. Our research was approved by the local ethics committee review board. Three to five month old BALB/c or C57BL/6 mice were used for the *vitro* culture experiments. Six to eight weeks old SV129 and BALB/c mice were used for *in vivo* treatment trials.

Cell cultures

Splenocytes were collected, red blood cells were lysed and CD43⁺ cells were depleted using CD43 microbeads (Miltenyi Biotec). B cells were cultured for 4 days (for ELISA, qPCR and flow cytometry assays) and for 2 days (for ChIP experiments), in RPMI containing 10% FCS with LPS (20 µg/mL) (Invivogen), LPS + IL-4 (40 ng/mL) or LPS + IFNγ (2 ng/mL) (Peprotech) with or without RHSP4 (TOCRIS). RHSP4 was used at concentrations of 0.1, 0.5, 1 and 2 µM depending on the experiment.

Proliferation Assay (MTS)

B cells isolated from 6 mice were seeded into 96-well plates at a density of 1×10^5 per well with a total volume equal to 100 µL, stimulated with LPS + IL-4 and treated with the following concentrations of RHSP4: 0.1, 0.5, 1 and 2 µM. Control cells were stimulated with LPS+IL-4 but not treated. The experiment was stopped at Day 4. For the MTS assay, the CellTiter 96H Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega) was used following the manufacturer's instructions. Briefly, at 3 h before the desired time point, 20 µl

MTS reagent was added to each well and cells were incubated at 37 °C for 3 h. Absorbance was detected at 492 nm with a Microplate Reader (ThermoScientific ; Morti).

Class-specific ELISA

ELISA was performed on sera and supernatants from *in vitro* stimulated and RHPS4 (0.1, 0.5, 1 and 2 μ M) treated and untreated primary B cells for the detection of IgM, IgG1, IgE, IgG2a, IgG2b and IgG3 secretion. Plates were coated with monoclonal antibodies specific for IgM (Southern Biotech), IgG1 (Southern Biotech) or IgE (Southern Biotech) overnight. Sera or supernatants were added and incubated for 2h at 37°C. After washing, alkaline phosphatase (AP)-conjugates of goat anti mouse IgM (Southern Biotech), IgG1 (Southern Biotech) and IgE (Southern Biotech) were incubated 1h at 37°C. After washing and addition of AP substrate (Sigma), absorbance was measured at 405 nm.

Anti-Ova specific antibodies produced *in vivo* after immunization were evaluated in sera from RHPS4 treated or untreated mice (10 mg/kg). Briefly, plates were coated with 10 μ g/mL ovalbumin overnight. Sera were then incubated for 2h at 37°C and plates were treated as above.

ELISPOT

Specific IgG and IgM BCR anti-OVA antibody secreting cells were quantified by ELISPOT using splenocytes from mice sacrificed 9 days after immunization. Splenocytes were seeded in duplicate at a density starting at 5×10^5 /well, followed by 2-fold serial dilutions in culture medium in a 96-well MultiScreen HTS plate (Millipore) coated with 200 μ g /well OVA. Cells were incubated overnight at 37 °C and then removed by washing with PBS/0.01 % Tween. Plates were incubated for 1 h at 37 °C with 1 μ g/well of alkaline phosphatase-coupled anti-IgG or anti-IgM. After washing, 100 μ L BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate

(Millipore) was added. Plates were washed, dried, and images were taken with a NI-E microscope (Nikon) and analyzed for spot numbers using Nis-Ar software (Nikon).

Flow cytometry

Antibodies for staining were anti-mouse IgM-APC (Clone II/41, eBiosciences), CD19-APC-H7 (Clone 1D3, BD Biosciences), IgG1-BV421 (Clone A85-1, BD Biosciences), CD138-APC (Clone 281-2, BD Biosciences), B220-BV421 (Clone RA3-6B2, BD Biosciences). Apoptosis was evaluated using AnnexinV-FITC (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions and 20 μ L 7AAD (BD Pharmingen) was added 5 min prior to analysis.

Data were acquired on a Beckton Dickinson LSRII Fortessa cytometer and analyzed with the BD FACSDiva 6.1.3 and Infinicyt softwares.

Transcription analysis (RT-qPCR)

I μ -C μ , and I γ 1-C γ 1 germline transcripts and I μ -C γ 1, I μ -C ϵ post switch transcripts were quantified. 4-day *in vitro* stimulated and RHPS4 treated B cells were collected and RNA was extracted for evaluation of post switch and germline transcripts. RNA was prepared using standard techniques. cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR was performed using power SYBR green (Applied Biosystems) and specific oligonucleotides (I γ 1 forward primer: 5' - GGCCCTTCCAGATCTTTGAG-3'; C γ 1 reverse primer: 5' - ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCA-3'. I μ forward primer: 5' -ACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTT-3'. C μ reverse primer 5' -TCTGAACCTTCAAGGATGC TCTTG-3'. C ϵ reverse primer: 5-AGCGATGAATGGAGTAGC-3').

All transcripts were normalized to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) transcripts (reference Mm99999915-g1).

Binding of RHPS4 to S-region sequences.

Ability of RHPS4 (1 μ M or 2 μ M) to bind S-region derived DNA sequences was tested by fluorescence emission quenching. Various single-stranded oligonucleotides (1 μ M) mimicking G-rich portions of the S γ 1 region were compared to an oligothymidylate negative control (dT30). All measurements were performed in duplicate; fluorescence was collected in the 510-600 nm region on a TECAN Infinite M1000 Pro 96-well plate reader. Dye emission was normalized at each dye concentration by the intensity collected in the absence of DNA, partially (50-70%) quenched by binding to the G-rich S μ sequences, as previously described with other quadruplex-prone oligonucleotides^{E1}. All experiments were performed at room temperature in a lithium cacodylate buffer (pH 7) supplemented with 100 mM KCl to favor quadruplex formation. The DNA sequences are as follows (with G-blocks shown in color):

dT30	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
Smu2	TGGGGCAGGACTGCAGGGAAGTGGGGTATCAAGTAGAGGGA
Smu345	TGGGCTGAGCTGGGCAGGGCTGGGC
Smu381	TGGGCTGGGCTGAGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGAGCGGGTCTGAGCGGGGC
Smu641	AGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGAGCGGGGCTGAGCGGGGC
Smu1266	TGGGTTGGGCAGGGCTGGGCTGGGC
Smu1656	TGGGTTGGGCAAGGCTGGGCTGGGTTGAGTTGGGC

Amplification of S μ /S γ junctions and Ion torrent next generation sequencing NGS

DNA from LPS+IL-4 stimulated cells (treated with or without 1 μ M RHPS4) was extracted using classical phenol/chloroform protocol. S μ /S γ junctions were amplified in triplicate by

nested PCR with 100 ng DNA (Phusion HF polymerase; BioLabs) using the following primers: PCR1: Forward 5'- AGA GAC CTG CAG TTG AGG CC-3' and reverse 5'- TCA GGG AAR TAV CCY TTG ACC AGG CA-3', PCR 2: forward 5'-CCA GCC ACA GTA ATG ACC CAG-3' and reverse: 5'-CCA RKG GAT AGA CHG ATG GGG-3'. Each library was prepared using 200 ng PCR2 product. Barcoded libraries with 200-pb read lengths were prepared using Ion Xpress plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Each barcoded library was mixed in equal amounts and diluted to 100 pM. Libraries were run on an Ion PI v3 chip on the Ion Proton sequencer (Life Technologies). Data analysis was performed using CSReport^{E3}.

ChIP experiments

ChIP experiments were done on LPS+IL-4 stimulated CD43^{neg} spleen cells incubated with or without 1 μ M RHPS4. Briefly, 15×10^6 B-cells were cross-linked at room temperature for 15 min in 15 mL PBS with 1% formaldehyde. The reaction was quenched with 2.125M glycine. After lysis, chromatin was sonicated to 0.5–1 kb using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher Scientific). Following dilution in ChIP buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 167 mM NaCl), chromatin was precleared by rotating for 2h at 4 °C with 50 mL of 50% protein A/G slurry (0.2 mg / mL sheared salmon sperm DNA, 0.5 mg/ mL BSA, and 50% protein A/G; Sigma). Cell equivalents (1×10^6) were saved as input, and the remaining cell equivalents were incubated overnight with anti-AID rabbit polyclonal antibodies (kindly provided by Dr. P. Gearhart) or control antibodies. Immune complexes were precipitated by the addition of protein A/G. Cross-linking was reversed by overnight incubation (70 °C) in TE buffer with 0.02% SDS and chromatin was phenol/chloroform extracted. QPCR assays used for evaluating precipitated DNA from $\Sigma\mu$, $\Sigma\gamma 1$ and $\Sigma\epsilon$ used the following primers:

- $\Sigma\mu$ Fw: 5'-TCTAAAATGCGCTAAACTGAGG-3'

- S_μRev: 5'-AGCGTAGCATAGCTGAGCTC -3'
- S_γ1Fw: 5'- GGGGGAGGAGATATCCAAGA -3'
- S_γ1Rev: 5'- CAGCTCTTTTGCAGGTCTTG-3'
- S_εFw: 5'- CTTGACCACCGAATGTCCTT -3'
- S_εRev: 5'- GATTCCTCTCCAGCCTCTCC-3'

Ovalbumin (OVA) induced allergic asthma

BALB/c female mice at 8 weeks of age were immunized i.p. on days 0, 7 and 14 with 20 μg ovalbumin grade V (Sigma France) emulsified in 2 mg aluminium hydroxide gel in a total volume of 200 μL. For control mice, 200 μL saline was injected.

Mice were challenged at days 21-24 with 10μg OVA by intra-tracheal administration to provoke allergic asthma with analysis of the allergic response at day 25. Control mice received saline.

Bronchoalveolar Lavage (BAL) and differential cell counts

BAL was performed by washing the lungs four times with 0.5 mL saline solution at room temperature. After centrifugation at 400 x g for 10 min at 4°C, the supernatant of the first lavage (cell-free BAL fluid) was stored at -80°C for cytokine analysis.

Cells were diluted with Turk's solution, counted and 200,000 cells were centrifuged onto microscopic slides (cytospin at 1,000 rpm for 10 min, at RT). Air-dried preparations were fixed and stained with Diff-Quik (#130832, Medion Diagnostics AG, Merz & Dade, Germany). Differential counts were made by oil immersion light microscopy. Two hundred cells were observed to determine the relative percentage of each cell type and absolute number of the differential cell count.

Lung homogenization and EPO activity

After bronchoalveolar lavage, the entire lung was perfused with isotonic solution through the right heart ventricle to flush the vascular content and lungs were frozen at -20°C until use. Lungs were homogenized in 0.05M Tris-HCl, pH 8 with an Ultra Turrax T18 apparatus (Ultra Turrax, IKA), centrifuged and the supernatant was aliquoted. Following centrifugation, EPO activity was determined in the supernatant from lungs by colorimetric assay.

Following centrifugation, 100 µL of supernatants were placed in a plate with 50 µL of substrate solution, corresponding to 11 mL Tris HCl + 200mM O-phenylenediamine dihydrochloride pellets + 100 µL 30% H₂O₂). After 1 hour incubation at 37°C in a shaker, EPO activity was determined as absorbance at 490 nm against medium.

Lung histology

After BAL and lung perfusion, the left lobe was fixed in 4% buffered formaldehyde (#15225582, Fisher Scientific) for minimum 24h for standard microscopic analysis (Leica microscope). 3-µm sections were stained with Haematoxylin & Eosin (H&E) and Periodic Acid Schiff (PAS) using standard techniques.

Inflammatory cell including eosinophil infiltration was assessed by a semi-quantitative score on H&E sections (0-5), while mucus production was assessed on PAS stained sections with mucopolysaccharide at the apical pole of goblet cells of the bronchioles by comparable semi-quantitative score (0-5) by two observers independently.

Cytokine measurement

Th1/Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 and IFN-γ) cytokines concentrations in BALF and lung homogenate were determined by Luminex immunoassay (Millipore) by using MagPix system (BioRad) according to manufacturer's instructions.

Sequence analysis:

Position of G4 DNA in the endogenous IgH locus was evaluated on the template and the non-template DNA strand from the C μ region to the 3' end of the locus, using the G4-hunter algorithm <http://bioinformatics.cruk.cam.ac.uk/G4Hunter/>.^{E2}

Sequence data from amplified CSR junctions were analyzed using CSReport^{E3}.

Statistical analysis:

Statistical tests were performed using GraphPad Prism (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

REFERENCES TO METHODS

- E1. Cheng, M.-K. et al. Antitumor polycyclic acridines. 20. Search for DNA quadruplex binding selectivity in a series of 8,13-dimethylquino[4,3,2-kl]acridinium salts: telomere-targeted agents. *J. Med. Chem.* 51, 963–975 (2008).
- E2. Bedrat, A., Lacroix, L. & Mergny, J.-L. Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Res.* 44, 1746–1759 (2016).
- E3. Boyer, F. et al. CSReport: A New Computational Tool Designed for Automatic Analysis of Class Switch Recombination Junctions Sequenced by High-Throughput Sequencing. *J. Immunol.* 198, 4148–4155 (2017).

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure E1. Occurrence of G4 DNA along mouse IgH constant locus.

Position of G4 DNA was evaluated on the non-template (positive scores) and the template (negative scores) DNA strand from the C_μ region to the 3' end of the locus, using the G4-hunter algorithm (<http://bioinformatics.cr.uk.cam.ac.uk/G4Hunter/>)^{E2}.

Figure E2. Effect of RHPS4 on cell growth and viability of mouse primary B cells.

(A) Mouse primary B cells stimulated *in vitro* by LPS-IL-4 for 4 days and treated with 0.1, 0.5, 1 or 2 μ M RHPS4. Proliferation was measured by MTS assay. (B) Cell survival and death were analyzed by staining with AnnexinV-7AAD after 4 days *in vitro* culture as in A and in the presence of 1 μ M RHPS4. Data represent mean % cells $\pm$ SEM for 6 mice. (C) Absolute numbers of plasmablasts in 4-day LPS-stimulated cultures, with or without RHPS4 treatment. Data represent mean % cell growth $\pm$ SEM for 5 mice. (D) Splenocyte viability from groups of mice injected *in vivo* daily with 10 mg/kg RHPS4 i.p. NS: not significant. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared with untreated cells.

Figure E3. Binding of RHPS4 to S-region sequences tested by fluorescence emission quenching.

RHPS4 was tested at 1 μ M (hatched bars) and 2 μ M (grey bars) concentrations, in the absence ("0") or presence of various oligonucleotides (1 μ M) mimicking G-rich portions of the S_μ region or a single-stranded oligothymidylate control (dT30). All measurements were performed in duplicate. Fluorescence (collected in the 510-600 nm region) was collected on a TECAN Infinite M1000 Pro plate reader with 96-well plates. The emission of the dye was normalized at each dye concentration by the intensity collected in the absence of DNA partially (50-70%) quenched by binding to the G-rich S_μ sequences.

Figure E4. RHPS4 impeded CSR and affected AID-induced break localization.

CSR junctions from stimulated primary mouse B cells were amplified by PCR and sequenced by next generation sequencing. Counts of identified junctions (**A**), junction structures (**B**) and relative position of breaks in Sγ1 to AID hotspots (**C**) were obtained from CSReport sequence analysis. Data represent mean ± SEM for 6 mice (A, C right panels) or one representative sample (B, C left panels). *P<0.05, **P<0.01 compared with untreated control cells.

Figure E5. Th cytokines and EPO activity in mice with OVA-induced allergic lung inflammation.

In an allergic asthma model after repeated *i.p.* and *i.n.* antigen administration, mice administered daily with steroids, and to a lesser extent mice receiving RHPS4, displayed (**A**) lower levels of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN-γ in bronchoalveolar fluid (BALF) and (**B**) lower levels of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN-γ in lung tissue.

Figure E6. Functional parameters of asthma and EPO activity in mice with OVA-induced allergic lung inflammation.

After repeated *i.p.* and *i.n.* antigen administration triggering allergic lung inflammation, mice receiving steroids or RHPS4 daily showed significantly improved (**A**) airway compliance (with both drugs) and (**B**) airway resistance (only significantly improved with steroids) by comparison to mice simply receiving antigen, and (**C**) had significantly lower lung eosinophil peroxidase activity (with both drugs).

Figure E7. Graphical abstract recapitulating the effects of RHPS4.

ACCEPTED MANUSCRIPT

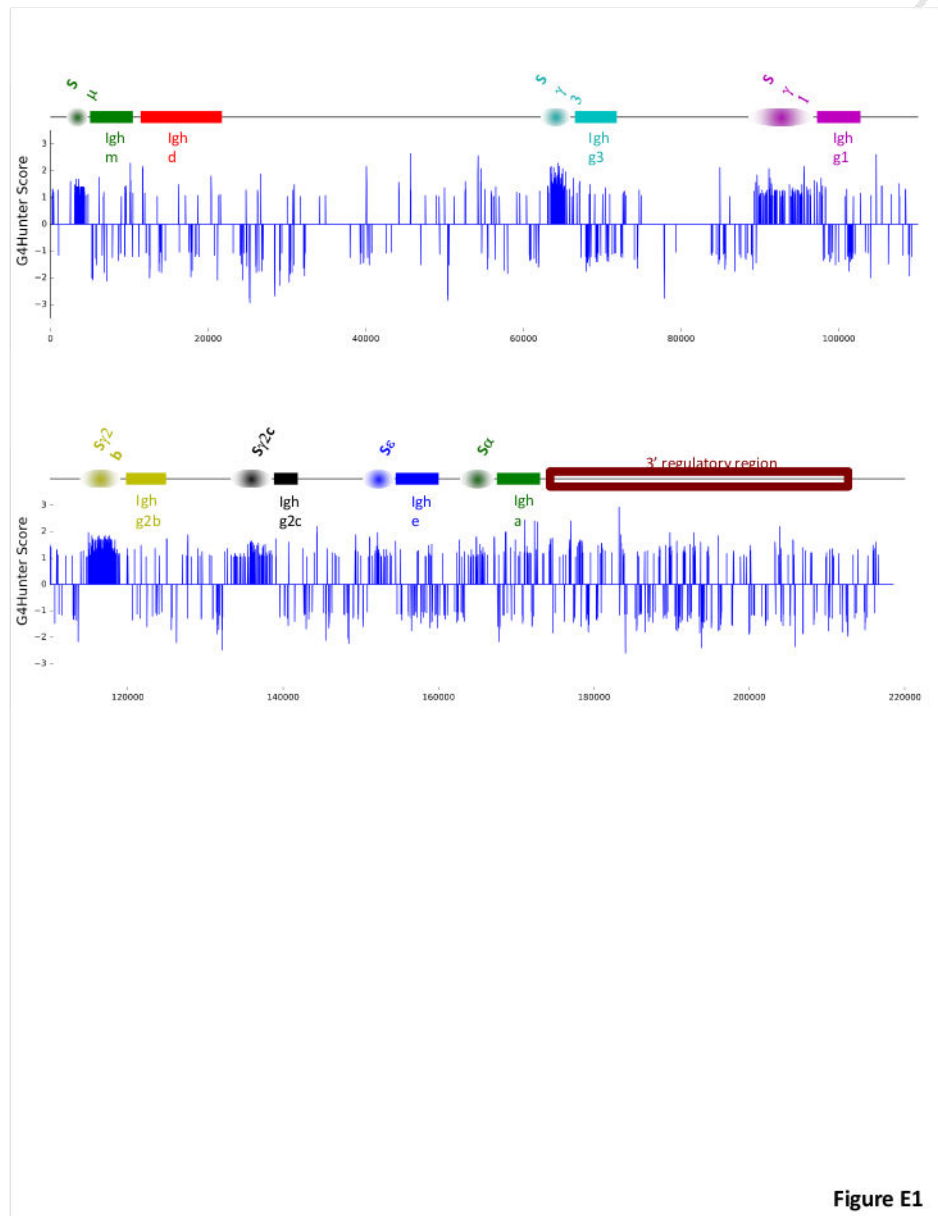


Figure E1

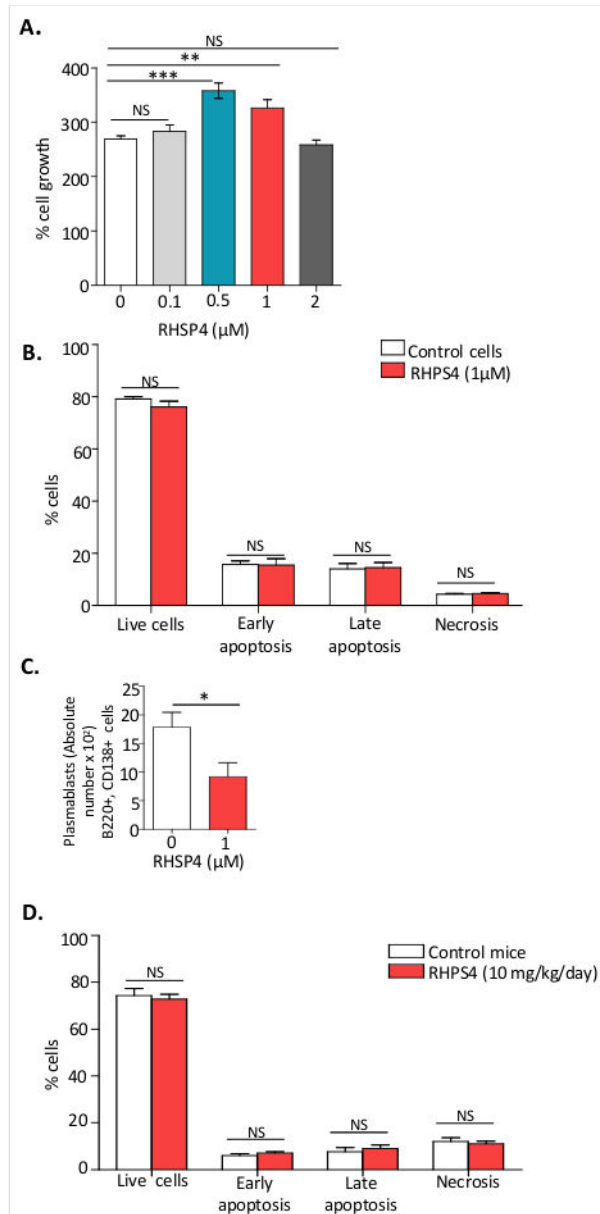


Figure E2

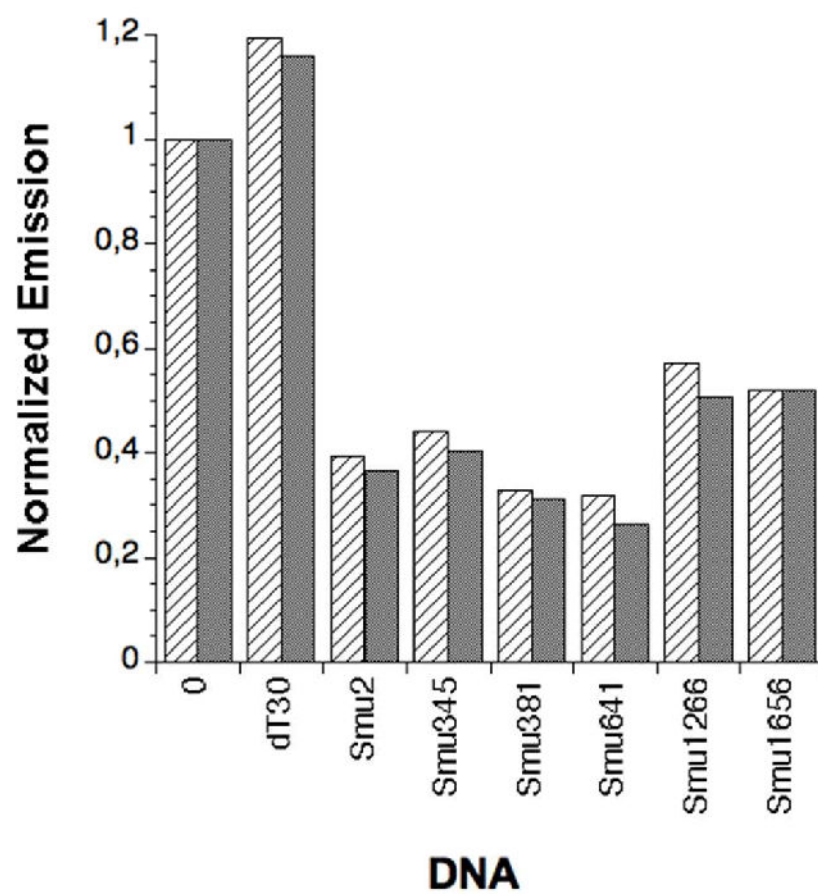


Figure E3

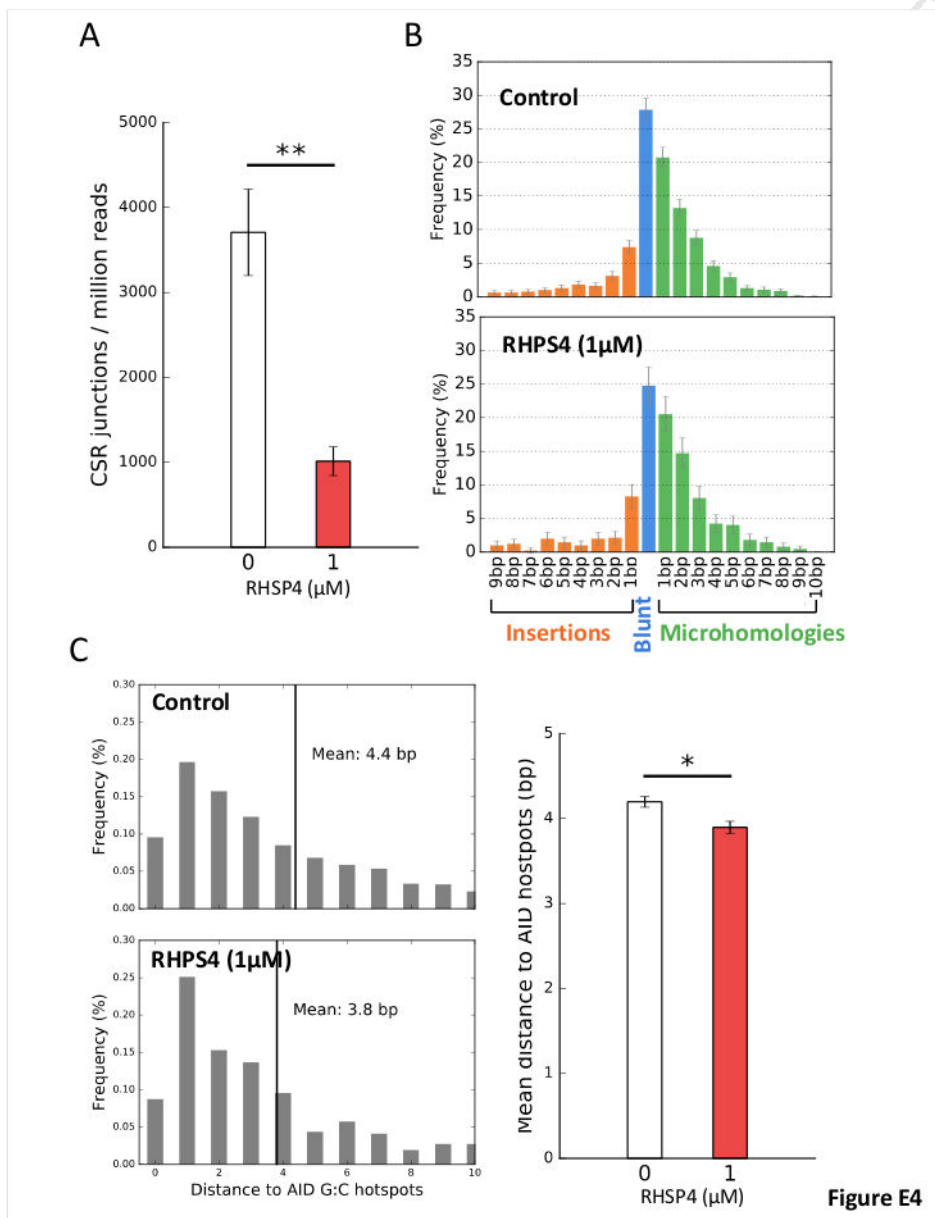
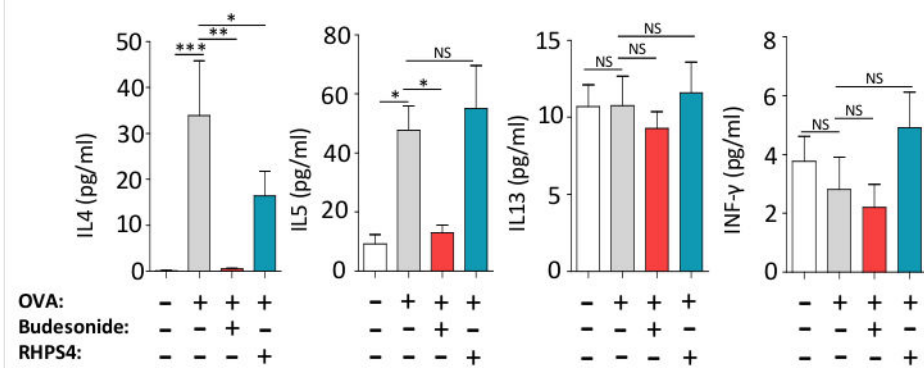


Figure E4

A. Cytokines in BALF



B. Cytokines in lung

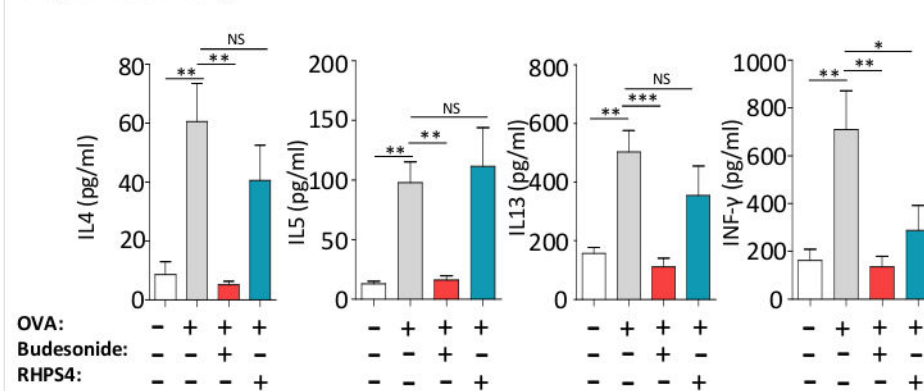
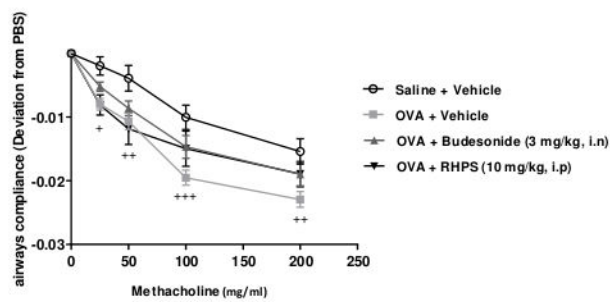
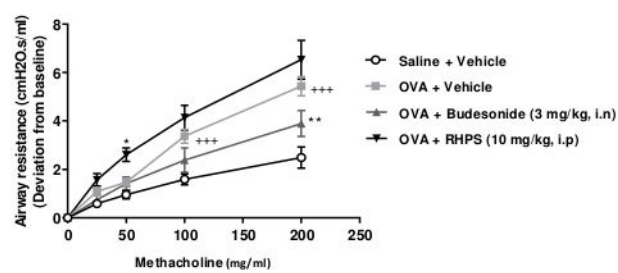


Figure E5

A. Airway compliance by plethysmography



B. Airway resistance by plethysmography



C. Lung eosinophil peroxidase activity

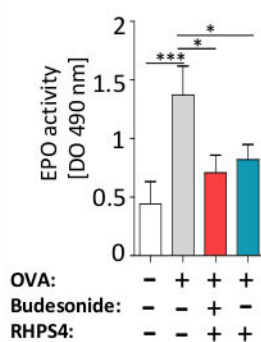
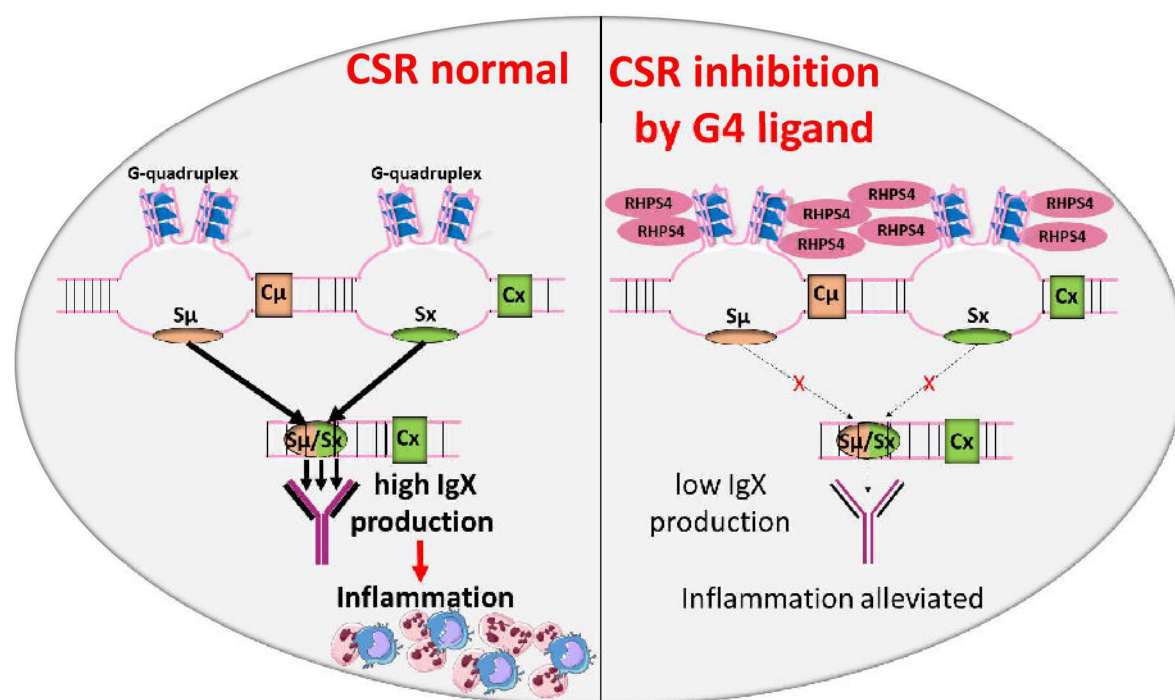


Figure E6



Article 2

BET bromodomain inhibition affects immune humoral responses both by direct inhibition of B-cell class switching and by modulating T cell help

Zeinab Dalloul¹, Marie Best², Pauline Chenuet^{3,4}, Sandrine Lenoir¹, Dieudonnée Togbé⁴, Mylène Gador², Bernhard Ryffel³, Valerie FJ Quesniaux³, Yolla El Makhour⁵, François Boyer¹, Jean-Claude Aldigier¹, Nicolas Fazilleau², Jeanne Cook-Moreau¹ & Michel Cogné¹

(Article en préparation)

Les protéines incluant des « bromodomaines » sont des lecteurs spécifiques des lysines acétylées des histones. Elles contribuent à la force transcriptionnelle des éléments cis-régulateurs organisés en cluster dans les *superenhancers* (SE). La région régulatrice 3' du locus de la chaîne lourde (IgH) de l'immunoglobuline (3'RR) est un SE majeur, stimulant non seulement la transcription, mais aussi le recrutement de l'AID, l'apparition de cassures double brin et la synapse des DSB durant la commutation de classe (CSR).

L'objectif de ce travail est de déterminer si l'inhibition des BET par un inhibiteur classique de cette famille de protéines, la molécule JQ1, a un impact sur des fonctions de la lignée B que notre laboratoire a par ailleurs précédemment démontrées comme « superenhancer-dépendantes » (CSR, SHM et autres aspects des réponses immunitaires humorales), avec alors la possibilité d'une voie de modulation pharmacologique des réponses des anticorps spécifiques à l'antigène.

Nous avons donc évalué les réponses immunes en présence ou en absence de JQ1, en monitorant un certain nombre de paramètres *in-vitro* et *in-vivo* (évaluation de la CSR par ELISA, ELISPOT, RT-qPCR, expériences de séquençage de nouvelle génération (NGS) et ChIP, altérations des cellules T par cytométrie de flux, inflammation pulmonaire *in-vivo* par recrutement de cellules inflammatoires, taux de cytokines dans BALF et évaluation de la fonction pulmonaire).

Une dose non toxique de JQ1 a réduit la CSR *in-vitro* et *in-vivo* chez des souris immunisées à l'OVA, tant au niveau de la sécrétion d'Ig que de l'expression à la surface des cellules B. Cela résulte d'une expression plus faible et du recrutement de l'AID au niveau du locus IgH, et d'une recombinaison plus faible des gènes constants IgH malgré des transcrits de la lignée germinale IgH pré-switchés préservés. Des niveaux plus faibles d'ARNs IgH 3'RR ont aussi indiqué une

activité réduite du *superenhancer* qui contrôle la CSR. Dans un modèle d'inflammation pulmonaire allergique, JQ1 a diminué le recrutement des lymphocytes, des macrophages et des éosinophiles dans le BALF, mais a augmenté les taux de certaines cytokines TH2 dans le BALF et la résistance des voies aériennes. La diminution drastique des nombres de TFH a également marqué des réponses d'Ag chez des souris immunisées par OVA, avec une polarisation accrue vers la production de cytokines Th2.

Au total, ces données suggèrent que l'inhibition de la bromodomaine peut avoir des effets immunomodulateurs majeurs sur les cellules B et T notamment en diminuant la CSR et pourrait donc aider à contrôler les troubles impliquant à la fois des anticorps transgéniques et des cytokines Th1, où les cytokines Th2 sont bénéfiques...). Avant d'aller plus loin, il importe cependant d'analyser complètement les répercussions sur la polarisation T car celles-ci sont à l'évidence complexe. Par rapport à l'effet simple d'inhibition du switch observé *in vitro*, l'effet global de la molécule JQ1 sur la globalité du système immunitaire *in vivo* pourrait donc être protéiforme voire paradoxal.

BET bromodomain inhibition affects immune humoral responses both by direct inhibition of B-cell class switching and by modulating T cell help

Zeinab Dalloul¹, Marie Best², Pauline Chenuet^{3,4}, Sandrine Lenoir¹, Dieudonnée Togbé⁴, Mylène Gador², Bernhard Ryffel³, Valerie FJ Quesniaux³, Yolla El Makhour⁵, François Boyer¹, Jean-Claude Aldigier¹, Jeanne Cook-Moreau¹, Nicolas Fazilleau² & Michel Cogné¹

¹Limoges University, CNRS UMR 7276, INSERM U1162, Control of the B cell Response & Lymphoproliferation, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France.

²Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan, Toulouse F-31300, France.

INSERM, U1043, BP 3028, 31024 Cedex 3, Toulouse F-31300, France.

Immunology Unit MICSU and Lebanese University, Faculty of Sciences, Beirut, Lebanon.

³INEM - UMR7355, CNRS, 3b rue de la Férollerie, F-45071 Orléans - Cedex 2.

⁴ArtImmune SAS, 13 Avenue Buffon, 45100, Orléans.

Correspondence: cogne@unilim.fr

Conflict of interest: D. Togbe and L. Fauconnier are employees at ArtImmune. All the authors have no conflict of interest related to this study.

Funding sources: This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), by French Institute of Health and Medical Research (INSERM), European Regional Development Fund (FEDER n°2016-00110366) and Biotarget (Region Centre).

Keywords: B lymphocytes, T lymphocytes, class switch recombination, bromodomain inhibition, JQ1, allergic inflammation

Abstract

Inhibitors of bromodomain and extra terminal domain (BET) proteins show promising clinical activity in cancer most likely by targeting superenhancers and oncogene expression. By contrast, analysis of their impact on immune responses is still incomplete. We found that JQ1 treatment mechanically depresses class switch recombination (CSR) by decreasing AID loading onto IgH switch regions, in line with CSR dependency on the activity of the IgH locus 3'RR superenhancer. JQ1 also affected AID expression and had complex immunomodulatory effects on T-cells, altogether quantitatively and qualitatively affecting humoral immune responses.

Background: BET proteins are chromatin readers which accumulate at broken DNA ends before repair and bind superenhancers (SE) thus contributing to their transcriptional strength. The immunoglobulin heavy chain (IgH) locus 3'RR is a major SE, stimulating not only transcription but also recruitment of AID, occurrence of double-strand breaks (DSBs) and synapsis of DSBs during class-switch recombination (CSR).

Objective: To determine whether BET bromodomain inhibition by JQ1 impacts CSR upstream of the repair step, and globally impacts antigen specific responses in mice.

Methods: We measured *in-vitro* & *in-vivo* CSR by immunochemical and molecular biology assays, T-cell alterations by flow cytometry, lung inflammation by functional assays, inflammatory cell quantitation and cytokine levels in broncho-alveolar fluid (BALF).

Results: A non-toxic dose of JQ1 reduced CSR *in vitro* and *in-vivo* in OVA immunized mice, both at the level of Ig secretion and expression on B-cell surfaces. This resulted from lower expression and IgH recruitment of AID, and lower IgH recombination despite preserved abundant pre-switch IgH germline transcripts. Lower levels of IgH 3'RR eRNAs indicated decreased activity of the SE which controls CSR. In an allergic lung inflammation model, JQ1 decreased lymphocyte, macrophage, and eosinophil recruitment in BALF but increased cytokine levels in BALF and airway resistance. Drastic depression of T_{FH} numbers also marked Ag responses in OVA immunized mice, with increased polarization towards production of Th2 cytokines.

Conclusion: Altogether, these data suggest that bromodomain-inhibition has major immunomodulatory effects in B-cells, notably by decreasing multiple mechanistic aspects of CSR and antibody secretion, as well as in T-cells. It might thus help control disorders involving both class-switched antibodies and Th1 cytokines, such as auto-immune disorders affecting the central nervous system where Th2 cytokines are beneficial).

KEY MESSAGES:

Pharmacological targeting of humoral immune responses is possible via BET bromodomain inhibition and can alleviate specific antibody production and recruitment of inflammatory cells in models of antigen-induced inflammation.

Class-switch recombination is down-regulated *in vivo* and *in vitro* in a B-cell intrinsic manner by a drug targeting the binding of BET bromodomain factors to superenhancers.

During *in vivo* humoral immune responses, antigen-specific T-cells are quantitatively inhibited by BET treatment but also show major qualitative changes including increased production of TH2 cytokines.

Capsule summary: Targeting immunoglobulin class switching by BET-inhibition offers a novel immunomodulatory strategy which can reduce and modulate class-switched antibody production.

Keywords: Bromodomain inhibition, immunoglobulin class switch, B lymphocytes; immunopathology

Introduction

Bromodomain and extraterminal (BET) family proteins tightly bind acetylated lysine residues on the N-termini of histones and play important roles in gene expression, either alone or as part of protein complexes [1]. These factors are mostly enriched at positions of *cis*-regulatory elements such as active promoters, enhancers and to a higher extent superenhancers (SE), where they promote the recruitment of the Mediator complex and Polymerase II [2]. Hyperactivity of BET proteins contributes to the development of multiple diseases and notably cancer. Several small molecule BET inhibitors have thus entered into cancer therapy trials.

In malignant B-lineage cells, the BET protein BRD4 down-regulates translocated oncogenes associated with immunoglobulin heavy chain (IgH) locus regulatory elements [3]. In normal activated B-cells, BRD4 controls expression of Bcl-6, the master regulator of germinal center (GC) formation, and recruits non-homologous end joining (NHEJ) factors for repair of AID-initiated DNA breaks during class switch recombination (CSR) [4, 5]. It was however suggested that, before CSR, BET proteins do not contribute to the initiation of AID-mediated lesions in IgH genes [5].

CSR crucially regulates the production of pro-inflammatory antibodies such as IgG and IgE, which are major actors of adverse immune reactions. In addition to AID, IgH accessibility to CSR requires T-cell derived cytokines promoting germline transcription (GT) of given constant (C) genes [6]. CSR is additionally governed by the IgH 3' regulatory region (3'RR), a large (> 20kb-long) SE flanking the 3' end of the locus, the strength of which is optimal after B-cell activation [7, 8, 9]. The 3'RR also promotes somatic hypermutation (SHM) and it is directly implicated and targeted by locus suicide recombination (LSR) [10]. We thus wished to evaluate whether, in addition to their role in NHEJ repair, BET proteins might impact early steps of CSR such as AID loading or synapsis between broken DNA ends. Such aspects of IgH locus physiology are indeed major aspects of its 3'RR/SE-dependent control. We thus checked whether a low, non-toxic, dose of the BET inhibitor JQ1 might affect 3'RR function and its impact on the mechanisms of CSR. We also tested whether JQ1, known as an anti-inflammatory and

anti-cancer agent [11, 12], might cumulate B-cell intrinsic effects as seen *in vitro*, with more global effects on humoral responses *in vivo* and then positioning it as a potential immunomodulatory agent capable of modifying or attenuating Ag-specific or allergic reactions.

Materials and Methods

Mice

WT mice were used in all experiments and maintained in our animal facilities, at 21–23°C with a 12-h light/dark cycle. Our research was approved by the local ethics committee review board. Three to five month old BALB/c or C57BL/6 mice were used for the *vitro* culture experiments. Six to eight week old BALB/c mice were used for *in vivo* treatment trials.

Cell cultures

Splenocytes were collected, red blood cells lysed and CD43⁺ cells depleted using CD43 microbeads (Miltenyi Biotec). B cells were cultured for 4 days (for ELISA, qPCR and flow cytometry assays) and for 2 days (for ChIP experiments), in RPMI containing 10% FCS with lipopolysaccharide (LPS) (1 µg/mL) + IL-4 (40 ng/mL) with or without JQ1 (TOCRIS). JQ1 was used at concentration of 5, 10, 20, and 40 nM depending on the experiment.

Proliferation Assay (MTS)

B cells isolated from 6 mice were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^5 per well in 100 µL total volume, stimulated with LPS + IL-4 as above and treated with the following concentrations of JQ1: 5, 10, 20 and 40 nM. Control cells were stimulated with LPS+IL-4 but not treated. The experiment was stopped at day 4. For the MTS assay, the CellTiter 96H AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit (Promega) was used following the manufacturer's instructions. Briefly, at 3 h before the desired time point, 20 µL MTS reagent was added to each well and cells were incubated at 37 °C for 3 h. Absorbance was detected at 492 nm with a Motti microplate reader (ThermoScientific).

Class-specific ELISA

ELISA was performed on sera and supernatants from *in vitro* stimulated and JQ1 (10, 20 and 40 nM) treated and untreated primary B cells for the detection of IgM, IgG1 and IgE, secretion. Plates were coated with monoclonal antibodies specific for IgM, IgG1 or IgE (all from Southern Biotech) overnight. Sera or supernatants were added and incubated for 2h at 37°C. After washing, alkaline phosphatase (AP)-conjugates of goat anti mouse IgM, IgG1 and IgE (Southern Biotech) were incubated 1h at 37°C. After washing and addition of AP substrate (Sigma), absorbance was measured at 405 nm.

Anti-ovalbumin (OVA) specific antibodies produced *in vivo* after immunization were evaluated in sera from JQ1 treated or untreated mice (50 mg/kg). Briefly, plates were coated with 10 µg/mL ovalbumin overnight. Sera were then incubated for 2h at 37°C and plates were treated as above.

ELISPOT

Specific IgG and IgM anti-OVA antibody secreting cells were quantified by ELISPOT using splenocytes from mice sacrificed 9 days after immunization and JQ1 treatment. Splenocytes were seeded in duplicate at a density starting at 5×10^5 /well, followed by 2-fold serial dilutions in culture medium in a 96-well MultiScreen HTS plate (Millipore) coated with 200 µg /well OVA. Cells were incubated overnight at 37 °C and then removed by washing with PBS/0.01 % Tween. Plates were incubated for 1 h at 37 °C with 1 µg/well alkaline phosphatase-coupled anti-IgG or anti-IgM. After washing, 100 µL BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate (Millipore) were added. Plates were washed, dried, and images were taken with a NI-E microscope (Nikon) and analyzed for spot numbers using Nis-Ar software (Nikon).

Flow cytometry

Antibodies for staining were anti-mouse IgM-APC, CD19-APC-369 H7, IgG1-BV421, CD138-APC, B220-BV421 (all from BD Biosciences). Apoptosis was evaluated using AnnexinV-FITC (BD Biosciences) according to the manufacturer's instructions and 20 µL 7AAD (BD Pharmingen) was added 5 min prior to analysis.

Data were acquired on a Beckton Dickinson LSRII Fortessa cytometer and analyzed with the BD FACSDiva 6.1.3 and Infinity softwares.

Transcription analysis (RT-qPCR)

I μ -C μ , and I γ 1-C γ 1 germline transcripts and I μ -C γ 1, I μ -C ϵ post switch transcripts were quantified. Four day *in vitro* stimulated and JQ1 treated B cells were collected and RNA was extracted for evaluation of post switch and germline transcripts. RNA was prepared using standard techniques. cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR was performed using power SYBR green (Applied Biosystems) and specific oligonucleotides (I γ 1 forward primer: 5' -GGCCCTTCCAGATCTTTGAG-3'; C γ 1 reverse primer: 5' -ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCA-3'. I μ forward primer: 5' -ACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTT-3'; C μ reverse primer 5' -TCTGAACCTTCAAGGATGCTCTTG-3'. C ϵ reverse primer: 5-AGCGATGAATGGAGTAGC-3').

All transcripts were normalized to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) transcripts (reference Mm99999915-g1).

For Hs1.2 and Hs4 amplification the following primers were used: Hs1.2 forward: 5'-ATCAGTACCAGAAACAAGGC-3'; Hs1.2 reverse: 5'-TTGGGGTGAACCTGCAGC-3'; Hs4 forward: 5'-TTAGTCTCAGCAAGACCC-3' and Hs4 reverse: 5'-AATGGGGCTTTCCACGCC-3'.

Amplification of S μ /S γ junctions and Ion torrent next generation sequencing NGS

DNA from LPS+IL-4 stimulated cells (with or without 40 nM JQ1) was extracted using a classical phenol/chloroform protocol. S μ /S γ junctions were amplified in triplicate by nested PCR with 100 ng DNA (Phusion HF polymerase; BioLabs) using the following primers: PCR1: Forward 5'-AGA GAC CTG CAG TTG AGG CC-3' and reverse 5'-TCA GGG AAR TAV CCY TTG ACC AGG CA-3', PCR 2: forward 5'-CCA GCC ACA GTA ATG ACC CAG-3' and reverse: 5'-CCA RKG GAT AGA CHG ATG GGG-3'. Each library was prepared using 200 ng PCR2 product. Barcoded libraries with 200-pb read lengths were prepared using Ion Xpress plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Each barcoded library was mixed

in equal amounts and diluted to 100 pM. Libraries were run on an Ion PI v3 chip on the Ion Proton sequencer (Life Technologies). Data analysis was performed using CSReport [13].

ChIP experiments

ChIP experiments were done on LPS+IL-4 stimulated CD43neg spleen cells incubated with or without 40 nM JQ1. Briefly, 15×10^6 B-cells were cross-linked at room temperature for 15 min in 15 mL PBS with 1% formaldehyde. The reaction was quenched with 2.125M glycine. After lysis, chromatin was sonicated to 0.5–1 kb using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher Scientific). Following dilution in ChIP buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 167 mM NaCl), chromatin was precleared by rotating for 2h at 4 °C with 50 mL of 50% protein A/G slurry (0.2 mg / mL sheared salmon sperm DNA, 0.5 mg/mL BSA, and 50% protein A/G; Sigma). Cell equivalents (1×10^6) were saved as input, and the remaining cell equivalents were incubated overnight with anti-AID rabbit polyclonal antibodies (kindly provided by Dr. P. Gearhart) or control antibodies. Immune complexes were precipitated by the addition of protein A/G. Cross-linking was reversed by overnight incubation (70 °C) in TE buffer with 0.02% SDS and chromatin was phenol/chloroform extracted. QPCR assays used for evaluating precipitated DNA from $S\mu$, $S\gamma 1$ and $S\epsilon$ used the following primers:

- $S\mu$ Fw: 5'-TCTAAAATGCGCTAAACTGAGG-3'
- $S\mu$ Rev: 5'-AGCGTAGCATAGCTGAGCTC -3'
- $S\gamma 1$ Fw: 5'- GGGGGAGGAGATATCCAAGA -3'
- $S\gamma 1$ Rev: 5'- CAGCTCTTTTGCAGGTCTTG-3'
- $S\epsilon$ Fw: 5'- CTTGACCACCGAATGTCCTT -3'
- $S\epsilon$ Rev: 5'- GATTCCTCTCCAGCCTCTCC-3'

Ovalbumin (OVA) induced allergic asthma

BALB/c female mice at 8 weeks of age were immunized intraperitoneally (i.p.) on days 0, 7 and 14 with 20 µg ovalbumin grade V (Sigma France) emulsified in 2 mg aluminium hydroxide gel (total volume 200 µL). For control mice, 200 µL saline was injected. Mice were challenged at days 21-24 with 10µg OVA by intra-tracheal administration to

provoke allergic asthma with analysis of the allergic response at day 25. Control mice received saline.

Bronchoalveolar Lavage (BAL) and differential cell counts

BAL was performed by washing the lungs four times with 0.5 mL saline solution at room temperature. After centrifugation at 400 x g for 10 min at 4°C, supernatant from the first lavage (cell-free BAL fluid) was stored at -80°C for cytokine analysis. Cells were diluted with Turk's solution, counted and 200,000 cells were centrifuged onto microscopic slides (cytospin at 1,000 rpm for 10 min, at RT). Air-dried preparations were fixed and stained with Diff-Quik (#130832, Medion Diagnostics AG, Merz & Dade, Germany). Differential counts were made by oil immersion light microscopy. Two hundred cells were observed to determine the relative percentage of each cell type and absolute number of the differential cell count.

Lung homogenization and EPO activity

After bronchoalveolar lavage, the entire lung was perfused with isotonic solution through the right heart ventricle to flush the vascular content and lungs were frozen at -20°C until use. Lungs were homogenized in 0.05M Tris-HCl, pH 8 with an Ultra Turrax T18 apparatus (UltraTurrax, IKA), centrifuged and the supernatant was aliquoted. Following centrifugation, EPO activity was determined in supernatants from lungs by colorimetric assay. Following centrifugation, 100 µL supernatants were placed in a plate with 50 µL substrate solution, corresponding to 11 mL Tris HCl + 200mM O-phenylenediamine dihydrochloride pellets + 100 µL 30% H₂O₂). After 1 hour incubation at 37°C in a shaker, EPO activity was determined as absorbance at 490 nm against medium.

Lung histology

After BAL and lung perfusion, the left lobe was fixed in 4% buffered formaldehyde (#15225582, Fisher Scientific) for a minimum 24h for standard microscopic analysis (Leica microscope). Sections (3-µm) were stained with haematoxylin & eosin (H&E) and Periodic Acid Schiff (PAS) using standard techniques. Inflammatory cell infiltrate including eosinophils was assessed by a semi-quantitative score on H&E sections (0-5), while mucus production was assessed on PAS stained sections with mucopolysaccharide

at the apical pole of goblet cells from bronchioles by comparable semi-quantitative score (0-5) by two independent observers.

Cytokine quantification

Th1/Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- γ) cytokines concentrations in BALF and lung homogenate were determined by Luminex immunoassay (Millipore) by using MagPix system (BioRad) according to manufacturer's instructions.

T cell assessment

Immunization and reagents: C57BL/6 (CD45.2⁺) mice were purchased from Centre d'Élevage Janvier (Genest Saint Isle, France). All mice were bred in UMS006 and only 8-12 week old females were used for experimental procedures. Alum was from Thermo Scientific. 1W1K (EAWGALANKAVDKA)-OVA was from Genecust. Mice were either immunized sc (subcutaneous) at the tail base or i.p. with 40 μ g 1W1K-OVA in the indicated adjuvant. 50 mg/kg JQ1 was injected i.p. daily.

ELISA: ELISA plates (Thermo scientific) were coated with 10 μ g/ml OVA. IgG, IgG1 and IgM were detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG (Southern Biotech). The HRP substrate o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) was purchased from Sigma-Aldrich.

Flow cytometry analysis: Cell suspensions were prepared in PBS/2% FCS, 5mM EDTA. For Ag-specific Th and B cell analyses, organs were dissociated, filtered and treated with 2.4G2 for 10 minutes. To track antigen-specific CD4⁺ T cells, cells were incubated with PE-1W1K-IAb tetramer (7 μ g ml⁻¹) and APC anti-CXCR5 (REA 215, Miltenyi Biotec, 1:10) or BV421 anti-CXCR5 (2G8, BD, 1:50) for 2 hours at room temperature. The tetramer 1W1K-IAb was obtained from NIH Tetramer core facility. To track antigen-specific B cells, cells were stained for 60 minutes with OVA-Alexa488 (Invitrogen) at a final concentration of 1 μ g /mL. Cells were then incubated on ice for 45 min with fluorophore labeled mAbs. The following mAbs purchased from BD Biosciences were used: anti-CD4 (RM4-5, 1:200), anti-CD138 (281-2, 1:500), anti-CD95 (Jo2, 1:500), anti-GL7 (GL-7, 1:500), anti-B220 (RA3-6B2, 1:500), anti-GATA3 (L50-823, 1:200), anti-IL-4 (11B11, 1:100), anti-IL-10 (JES5-16E3, 1:200). The following mAbs purchased

from eBioscience were used: anti-PD1 (J43, 1:500), anti-Foxp3 (JFK-16s, 1:200), anti-IFN γ (XMG1.2, 1:100), anti-CD4 (RM4-5, 1:1000), anti-Tbet (4B10, 1:200), anti-IL-13 and anti-CD44 (IM7, 1:800), anti-IgD (11-26c, 1:1000) from Biolegend was used. For IFN γ , IL4, IL13 and IL10 intracellular staining cell suspensions were incubated either for 4 hr at 37°C in the presence of Golgi Plug (BD Bioscience), 4 μ M Monensin, 50 ng/ml PMA and 2 μ M Ionomycin, or with 1W1K (10 μ g/ml) overnight and with Golgi Plug for 1 hr at 37°C. Then, cell suspensions were fixed and permeabilized using Invitrogen Fixation/Permeabilisation kit. Fixable Viability Dye eFluor506 (eBioscience) was used for dead cell exclusion. Data were collected on a BD LSRII-Fortessa (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Statistical analysis

Statistical tests were performed using GraphPad Prism (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001).

Results

Evaluation of JQ1 toxicity

JQ1 has been widely tested as an anti-cancer agent. It proved effective *in vivo* against mouse tumors, with a maximum tolerated dose of 50 mg/kg/day, and showed anti-proliferative effects *in vitro*. To assess its role on B-cells while minimizing non-specific effects, we used low doses in the 5 to 40 nM range for *in vitro* assays, and chose the non-toxic dose of 50 mg/kg/day for *in vivo* assays. We validated *in vitro* that the latter low doses did not significantly affect B-cell growth in cultures stimulated by LPS+IL-4 for 4 days (Fig.1A). In these cultures, the percentage of apoptotic cells did not vary when cells were cultured alone or with 40 nM JQ1 (Fig.1B).

Evaluation of *in vitro* CSR by cell cytometry and ELISA

To evaluate whether JQ1 modulated class-switching, mouse splenocytes were stimulated for four days *in vitro* by LPS + IL4 known to boost CSR and further expression of class-switched IgG1 and IgE.

Direct evaluation of class switching in B-lymphocytes, by following cell-surface BCR expression after LPS+IL-4 stimulation, showed a strong reduction in the amount of class-switched cells observed, with a 1-fold reduction at 20 nM JQ1, a 3-fold reduction at 40 nM JQ1, and a reciprocal increase in IgM+ CD19+ un-switched cells (Fig. 2A).

Parallel ELISA evaluation of Ig secretion in cell supernatants showed no reduction in IgM levels. By contrast and to a much stronger extent than for BCR expression, secretion of class-switched Ig produced in such conditions (*i.e.* IgG1 and IgE with LPS+ IL-4), decreased at all concentrations of JQ1 (Fig. 2B).

Beside these variations in BCR class-switching and Ig secretion, we confirmed that B-cell counts, *i.e.* absolute numbers of CD19+ cells obtained after *in vitro* stimulation, were not significantly changed in 4 day- *in vitro* cultures stimulated with or without JQ1 (as expected from the preliminary evaluation of cell viability in similar conditions) (Fig. 3A). In contrast, differentiation into CD138+ plasmablasts was decreased by 50%, thus likely contributing to a global reduction in Ig secretion (Fig. 3B).

CSR blockade occurs downstream from IgH germline transcription

We measured AID loading of on target S-regions by ChIP experiments in chromatin prepared from cells stimulated for CSR, and observed a drastic reduction in AID-recruitment to S μ , S γ 1 as well as S ϵ regions in LPS+IL-4 stimulated B-cells (Fig 3C). Compared to this drastic reduction, transcription of the AICDA gene encoding AID was also affected by JQ1 in LPS+IL4-stimulated cells (Fig 3D).

Thus, we quantified, two types of IgH constant gene transcripts in LPS/IL-4 stimulated B cells, respectively specific for the “pre-CSR” B-cell stage (I γ 1-C γ 1 and I μ -C μ germline transcripts originating from un-switched B-cells) and the “post-CSR” stage (*i.e.* I μ -C γ 1 and I μ -C ϵ switched transcripts). Upon JQ1 treatment, we observed an increase in the “pre-CSR” transcripts” which are the usual hallmarks of accessibility of the IgH locus to CSR. This also indicated that IgH gene transcription was not globally decreased in cells treated with JQ1. By contrast, a specific decrease in IgG1 and IgE class-switched transcripts was observed (Fig. 3E). This precisely situated the blockade in-between the stages of “pre-

CSR” transcription (increased) and “post-CSR transcription” (decreased) and pointed to a direct alteration of the recombination step itself.

Positions and structure of CSR junctions

CSR junctions from S μ to S γ 1 were amplified by PCR with specific primers, sequenced by NGS and analyzed as previously described according to their positions in the S region and their nature. The most striking change in junctions sequenced after JQ1 treatment of B cells was a dramatic ~ 4-fold decrease in number (Fig 4A). The repair process after the occurrence of DSBs was by contrast unchanged with regard to the use of non-homologous-end joining (NHEJ) pathway *versus* the alternate- microhomology-mediated-end joining (MMEJ): the strong predominance of NHEJ-mediated blunt junctions which is usual in CSR was thus maintained (Fig 4B). Regarding the location of breakage, a modest difference induced by JQ1 treatment was increased proximity of breaks to AID-targeted cytosines of RGYW/WRCY motifs, indicating that while AID loading was decreased in the presence of JQ1, breaks were then somehow more focused on canonical AID target sites (Fig 4C).

3'RR transcription

As for other enhancers, accessibility and activity of the IgH 3'RR can be assessed by evaluating transcription of core enhancer elements into eRNA. Comparison of untreated and treated cells after 4-days stimulation by LPS+IL4 revealed a major dose-dependent reduction in eRNA transcripts from the 3'RR Hs1,2 and, to a lesser extent, Hs4 core enhancer elements (Fig 5).

Specific antibody secretion and *in vivo* CSR after mouse immunization

Mice were immunized by ovalbumin in order to follow primary and secondary responses. Nine days after primary i.p. immunization, mice receiving JQ1 showed a significant decrease ($\approx$ 4-fold) in specific anti-OVA IgG secreting cells, as evaluated in splenocytes by ELISPOT (Fig. 6A up left). Parallel serum evaluation of circulating antibodies detectable at day 9 showed a significant decrease in specific anti-OVA IgG (Fig 6A up right). As a counterpart of the decreased counts of cells secreting IgG, the number of anti-OVA specific unswitched (IgM) splenocytes by ELISPOT was increased ($\approx$ 1-fold; Fig

6A down left). The latter increase, however, was associated with decreased anti-OVA specific IgM detectable in sera (Fig 6A down right) (although less markedly than for IgG), suggesting that on a “per-cell” basis, IgM secretion also tended to be lower in animals receiving JQ1.

Since secondary responses involve multiple factors in addition to B-cells, we wished to evaluate JQ1 effects over a longer term, in groups of mice kept for 25 days under daily JQ1 administration after primary OVA immunization and further booster-immunized at days 7 and 14. In such conditions, mice receiving JQ1 showed decreased specific Abs (Fig 6B), again simultaneously correlated with a CSR defect and a partial defect in plasma cell differentiation affecting IgG and IgE.

Modulation of B-cell intrinsic aspects in a model of Ag-induced asthma in mice

Using BALB/c mice that had been repetitively immunized *i.p.* with OVA, we explored whether the occurrence of allergic manifestations triggered by further *i.n.* administration of the immunizing Ag could be modulated by JQ1. Four groups of mice received either saline, ovalbumin, or ovalbumin + steroid known to prevent the occurrence of allergic asthma (budesonide 3 mg/kg, *i.n.*), or ovalbumin + JQ1 (50 mg/kg, *i.p.*).

In such settings, T-cell activation parameters (secretion of IL-4/IL-5, IL-13 and IFN- γ in BALF and lung) were suppressed more strongly by steroids than by JQ1 administration (Fig 8A, 8B). Consequently, functional improvement of asthma (airway resistance and compliance measured by plethysmography (Fig 9A), eosinophil peroxidase activity in lung was unaffected by JQ1 treatment (Fig 9B).

Despite persistent T-cell activation, we observed a significant *in vivo* effect of JQ1 on the biological parameters monitoring antibody-dependent responses. Following the reduced systemic OVA specific IgG1 and IgE response mentioned above (Fig 6B), other biological aspects of airway allergy were locally alleviated in lungs of mice receiving JQ1 compared to mice just receiving ovalbumin: cell infiltration decreased in lung, with reduced numbers of all cell types (except for neutrophils) in broncho-alveolar fluid (BALF) (Fig 7A, B). Moreover, JQ1 reduced total protein levels in BALF. Most of these biological markers of JQ1-mediated immunomodulation reached levels very similar to

those achieved with the standard steroid medication for asthma (budesonide). That this occurred with only marginal changes in cytokine levels suggests that the inhibitory effects of JQ1 on B-lineage cells *in vivo* were direct (similar to those described above *in vitro*) and indirect resulting from defective T-cell help.

Modulation of T cell aspects in a model of Ag-immunized mice

Based on the observation that JQ1 treatment alters cytokines level in asthmatic mice, we assessed its effect *in-vivo* on C57BL/6 mice that had been immunized s.c and i.p with 1W1K1-OVA to explore whether T cells could be modulated by JQ1. Two groups of mice received either 1W1K1-OVA with vehicle or 1W1K1-OVA with JQ1 (50 mg/kg, *i.p*) were assessed. Antigen specific Th cells were assessed by 1W1K1-I pMHCII tetramer staining together with CD44 expression.

In such conditions, draining lymph nodes (dLN) showed less T cellularity in the JQ1 treated group. Regarding Ag-specific T lymphocytes, results showed no global differences in the percentage of Tetra+ cells between the two groups. However, total activated T follicular helper cells (CXCR5+ cells) also were significantly decreased in JQ1 treated cells. In parallel, specific T lymphocyte sub-populations showed a significant increase in GATA3 (Th2 markers), while FOXP3 (T regulatory markers) and Tbet (Th1 markers) were slightly increased (Fig 10).

In spleen, as for dLN, total T cell, absolute W1K1 specific T cells and Tfh numbers were significantly decreased following JQ1 administration. Furthermore, the percentage of antigen-specific Th2 cells was significantly higher following JQ1 injection. Closer examination of the GATA3+ CXCR5 population did not reveal significant differences although there was a tendency towards an increased percentage of Th2 and Th2 like Tfh cells (Fig 11). These results from both dLN and spleen show that JQ1 can differentially impact GATA3+ cells and antigen-specific Tfh while not affecting the Tfr subpopulation. To assess functional consequences of JQ1 BET bromodomain inhibition, levels of cytokine production after T cells activation were studied. Nine days after s.c and i.p 1W1K1-OVA immunization and i.p JQ1 treatment, spleen CD44+CXCR+ cells were purified and re-stimulated *in vitro* either with PMA/Ionomycin (Fig 12A) or Ea2

(Fig 12B). Splenic T cells shown a significant decrease of cells producing CXCR5 and INF- γ by intracellular staining in the JQ1 condition after activation using PMA/Ionomycin. In contrast, no significant changes for these two cytokines were seen with Ea2. IL4 production did not show any change neither with PMA/Ionomycin nor Ea2 stimulation. These results show that JQ1 can alter Th1 and Th2 but not Th17 cytokine production.

Finally, to evaluate the impact of JQ1 on the outcome of B cells in vivo, OVA immunized mice were assessed, dLN (Fig 13A) and splenic B cells (Fig 13B) were first counted and specific B220⁺ CD138⁺ OVA⁺ cells were analyzed by flow cytometry. We showed a significant increase in dLN and splenic B cellularity in mice treated with JQ1. No significant change in OVA-specific BCR was shown.

Overall, this series of experiments showed that JQ1 induces and modulates T cell responses toward a specific antigen and then alters B cell responses and class switching.

Discussion

Inappropriate or exacerbated humoral immune responses are major contributors to immunopathology, notably in conditions where highly pro-inflammatory class-switched Igs such as IgG or IgE are secreted in excess. In addition some of these antibodies can themselves behave as natural adjuvants for Th cells [14], [15], with the risk of immune response runaway. Current therapy of human immunopathology and notably of IgE-mediated allergy relies on a variety of drugs mostly acting through T-cells with broad anti-inflammatory and/or immunosuppressive effects. Besides the drastic use of monoclonal antibodies eliminating B-cells, few compounds can target B-cell function and none are able to directly affect the CSR process. It would thus be of considerable interest to identify drugs acting at the level of CSR and more specifically controlling the production of the most pro-inflammatory class-switched Ig.

CSR in B-cells is modulated by their interactions with other cell lineages, mostly T-cells and by multiple *cis*-regulatory elements, notably 3' IgH enhancers which locally promote AID recruitment [10], [16]. Convergent data have indicated that the molecular process of

CSR is favored by the specific occurrence of single-stranded DNA structures in S-regions. This would notably differentially recruit AID to generate double-strand DNA breaks in S-regions rather than simply mutations as effected in V-regions. On the other hand, several *trans*-regulatory elements are known to promote CSR by regulating germinal transcription and Ig production such as bromodomain protein chromatin readers. These factors might thus have a dual role both on one hand by interacting with enhancers and super-enhancers and on the other hand by participating in the repair complex of broken DNA ends [5].

Based on these elements, we wished to evaluate whether a drug known to inhibit the function of bromodomain proteins, and notably to alter their role in the process of repair of CSR breaks [5], might directly impact the mechanistic of CSR by acting on the 3'RR superenhancer. BET inhibitors, have been studied in detail for their ability to inhibit tumor growth, they were never explored for their potential impact on immune humoral responses by modulating T cells.

In the present study, we showed that JQ1, a BET inhibitor previously documented for anti-cancer activity [3], can be used at doses up to 40nM without severe toxicity on cultured B cells *in vitro*, or can be administered to mice at the dose of 50mg/kg/day without major toxic effects. Under these conditions we confirmed a direct effect of JQ1 on CSR by following BCR expression on cell membranes of *in vitro* stimulated B-cells. The same was true *in vivo* immunized mice when specific Ig producing cells were quantified by ELISPOT, showing an increase in IgM producing cells vs a decrease in IgG producing cells. Consistently, an Ig secretion defect was seen *in vitro* as well as *in vivo* for class-switched Ig.

We showed that IgH constant gene transcripts specific for the pre-CSR stage were globally increased while switched transcripts decreased. Noticeably, AID loading on S-regions was also clearly decreased, supporting that not only the repair step, but also the initiation of DNA lesions was affected, while CSR junctions globally occurred in DNA recovered from activated B-cells. The positions of breaks within S regions also became

more closely dependent on AID consensus motifs. This altogether indicated a specific B-cell maturation defect targeting CSR.

To evaluate the functional effects of this CSR blockade, we followed specific Ag responses in mice in the ovalbumin sensitization scheme classically used for inducing allergic airway inflammation. Importantly, objective biological markers of allergic asthma triggered by intranasal administration of the Ag in ovalbumin-immunized mice were significantly reduced in mice receiving JQ1, with a global efficiency close to that of steroids, and a notable reduction in all inflammatory cell counts in BALF. Importantly, markers from the T-cell branch of inflammation were in parallel affected.

To better understand the overall impact of bromodomain inhibition on the immune response, and also on T cells, we also performed immunizations of animals receiving doses of 50 mg/kg/day JQ1. The final analyses showed strong modulation of T responses, modifying their equilibrium in favor of Th2 polarization. These data suggest that the decrease in CSR following inhibition of bromodomain proteins is related to B-intrinsic modifications with a decrease in accessibility of the switch regions due to a functional alteration of the 3'RR superenhancer, but also integrates modulation of interactions with TFH cells during the development of the immune response.

However, both *in vivo* and *in vitro* experiments concur to demonstrate that BET contributes to CSR in intact cells. The CSR defect imposed by JQ1 *in vitro*, translated *in vivo* with lowered numbers of cells undergoing CSR after immunization, defective secretion of class-switched Ig, and reduced development of allergy biological parameters.

The present study with JQ1 indicates that bromodomain ligands can decrease the functional interactions of AID with S-regions and with the 3'RR SE which controls CSR. Looking for bromodomain ligands with improved specificity for immune cells and CSR now appears as a promising goal in order to lower toxicity and more specifically target the production of class-switched Ig, an option that would be of interest in many diseases such as in auto-immune or immuno-allergic conditions.

References

- [1] T. Fujisawa and P. Filippakopoulos, “Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 18, no. 4, pp. 246–262, 2017.
- [2] J.-E. Lee *et al.*, “Brd4 binds to active enhancers to control cell identity gene induction in adipogenesis and myogenesis,” *Nat Commun*, vol. 8, no. 1, p. 2217, Dec. 2017.
- [3] J. E. Delmore *et al.*, “BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc,” *Cell*, vol. 146, no. 6, pp. 904–917, Sep. 2011.
- [4] F. Gao, Y. Yang, Z. Wang, X. Gao, and B. Zheng, “BRAD4 plays a critical role in germinal center response by regulating Bcl-6 and NF- κ B activation,” *Cell. Immunol.*, vol. 294, no. 1, pp. 1–8, Mar. 2015.
- [5] A. Stanlie, A. S. Yousif, H. Akiyama, T. Honjo, and N. A. Begum, “Chromatin reader Brd4 functions in Ig class switching as a repair complex adaptor of nonhomologous end-joining,” *Mol. Cell*, vol. 55, no. 1, pp. 97–110, Jul. 2014.
- [6] Z. Xu, H. Zan, E. J. Pone, T. Mai, and P. Casali, “Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 12, no. 7, pp. 517–531, Jun. 2012.
- [7] E. Pinaud *et al.*, “The IgH locus 3’ regulatory region: pulling the strings from behind,” *Adv. Immunol.*, vol. 110, pp. 27–70, 2011.
- [8] B. K. Birshstein, “Epigenetic Regulation of Individual Modules of the immunoglobulin heavy chain locus 3’ Regulatory Region,” *Front Immunol*, vol. 5, Apr. 2014.
- [9] B. Chapuy *et al.*, “Discovery and Characterization of Super-Enhancer Associated Dependencies in Diffuse Large B-Cell Lymphoma,” *Cancer Cell*, vol. 24, no. 6, pp. 777–790, Dec. 2013.
- [10] S. Péron *et al.*, “AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells,” *Science*, vol. 336, no. 6083, pp. 931–934, May 2012.
- [11] A. C. Belkina, B. S. Nikolajczyk, and G. V. Denis, “BET protein function is required for inflammation: Brd2 genetic disruption and BET inhibitor JQ1 impair mouse macrophage inflammatory responses,” *J. Immunol.*, vol. 190, no. 7, pp. 3670–3678, Apr. 2013.
- [12] C.-W. Chung *et al.*, “Discovery and characterization of small molecule inhibitors of the BET family bromodomains,” *J. Med. Chem.*, vol. 54, no. 11, pp. 3827–3838, Jun. 2011.
- [13] F. Boyer *et al.*, “CSReport: A New Computational Tool Designed for Automatic Analysis of Class Switch Recombination Junctions Sequenced by High-Throughput Sequencing,” *J. Immunol.*, vol. 198, no. 10, pp. 4148–4155, 15 2017.
- [14] A. Getahun, F. Hjelm, and B. Heyman, “IgE enhances antibody and T cell responses in vivo via CD23+ B cells,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 3, pp. 1473–1482, Aug. 2005.

- [15] B. Heyman, “Antibodies as natural adjuvants,” *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, vol. 382, pp. 201–219, 2014.
- [16] E. Pinaud *et al.*, “The IgH Locus 3’ Regulatory Region,” in *Advances in Immunology*, vol. 110, Elsevier, 2011, pp. 27–70.

Figures

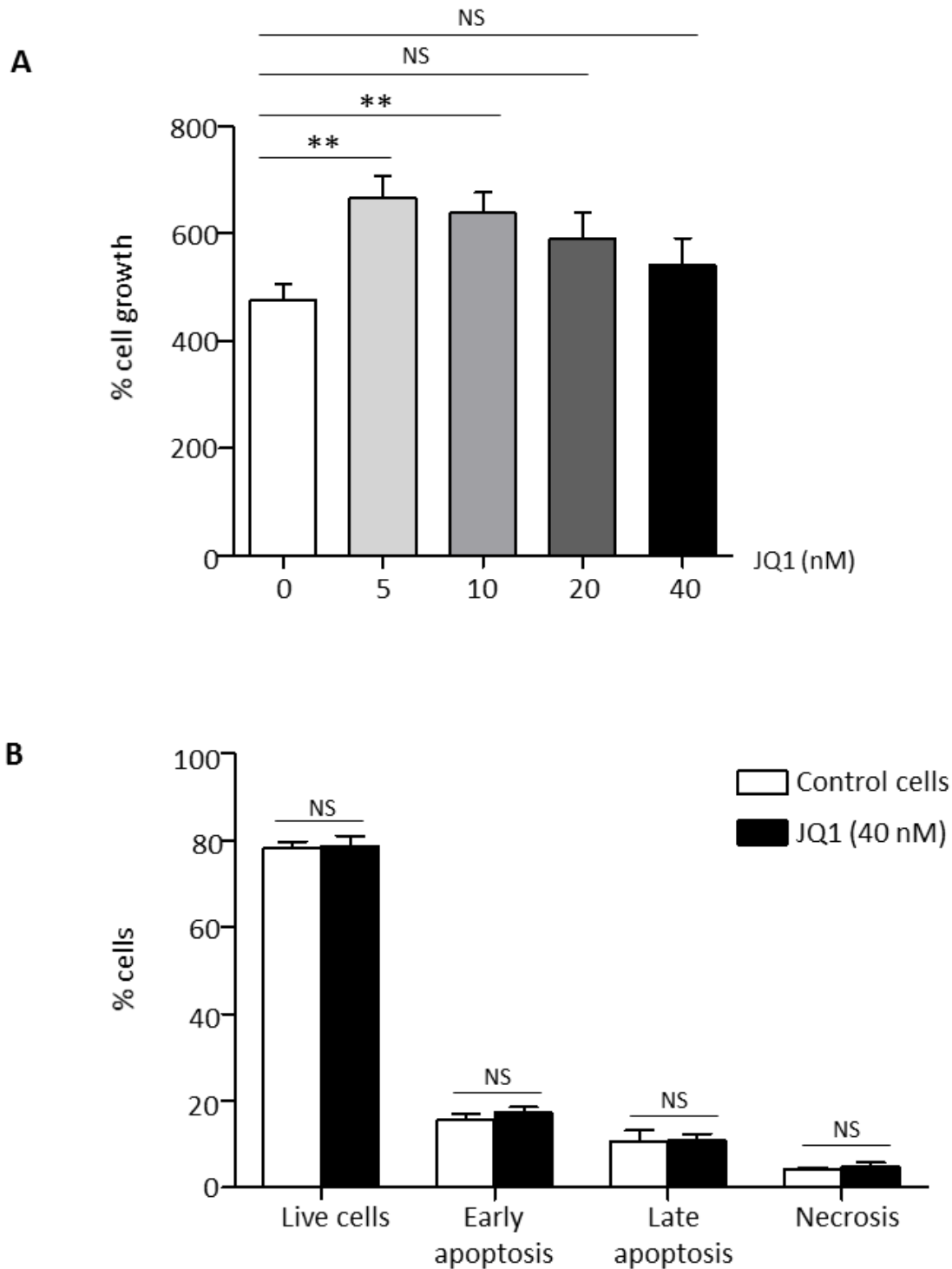


Figure 1: Effect of JQ1 on cell growth and viability of mouse primary B cells in vitro.

(A) Mouse primary B cells stimulated by LPS-IL-4 for 4 days and treated with 0, 5, 10, 20 or 40 nM JQ1. Proliferation was measured by MTS assay. (B) Cell survival and death were analyzed by staining with AnnexinV-7AAD after 4 days culture as in A and in the presence of 40 nM JQ1. Data represent mean % cell growth $\pm$ SEM for 6 mice. NS: not significant. $**P < 0.01$ compared with untreated cells.

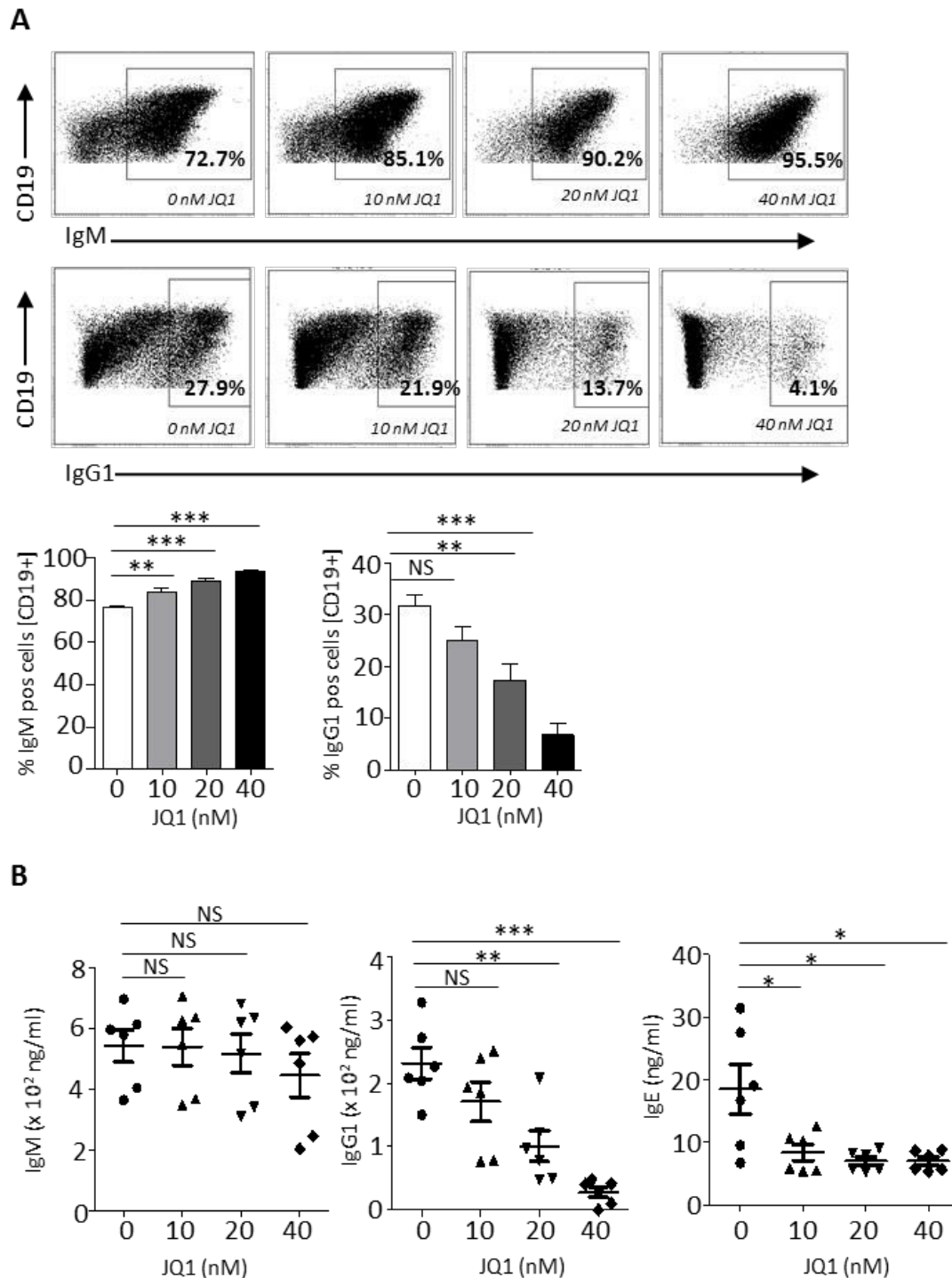


Figure 2: JQ1 decreases CSR in stimulated primary mouse B cells.

(A) Primary mouse B cells were stimulated with LPS and IL-4 and treated with 10, 20 and 40 nM JQ1. Cells were collected after 4 days culture and stained for IgM, IgG1 and CD19 for flow cytometry analysis. Histograms (bottom) represent mean % $\pm$ SEM for 6 mice. ** P <0.01, *** P <0.001 compared to untreated cells. Gates from a representative cytogram are shown (Top). (B) Supernatants from *in vitro* stimulated splenocytes (treated 4 days with LPS and IL4 in the presence of 10, 20 or 40 nM JQ1) were quantified by ELISA for the production for IgM, IgG1 and IgE secretion. Data represent mean % cell growth $\pm$ SEM for 6 mice. NS: not significant. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared with untreated cells.

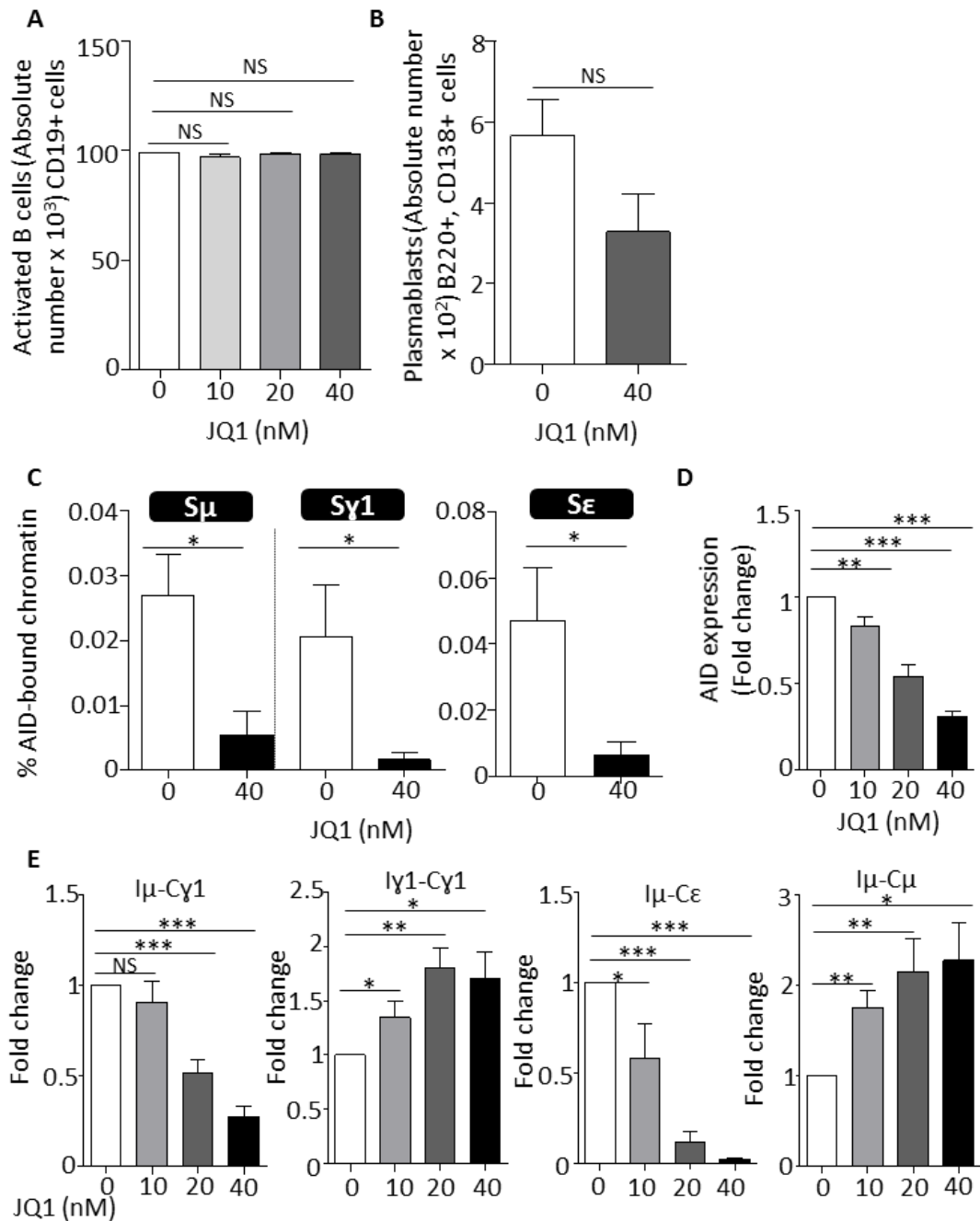


Figure 3: JQ1 decreases post switch IgG1 and IgE heavy chain transcripts while increasing IgM and IgH germline transcripts in primary mouse stimulated B cells

(A) Absolute numbers of B lymphocytes in day 4 LPS-stimulated cultures and of (B) plasmablasts, with or without JQ1 treatment. (C) ChIP experiments with anti-AID Ab and DNA evaluation by specific QPCR, showing AID-recruitment to $S\mu$, $S\epsilon$ and $S\gamma 1$ -regions in cells stimulated with LPS+IL-4. (D) AICDA gene expression (encoding AID) by splenocytes stimulated by LPS+IL4 for 3 days and treated with 10, 20 and 40 nM JQ1. (E) Germline $C\gamma 1$ and $C\mu$ transcripts and post-switch IgG1 and IgE ($I\mu-C\gamma 1$ and $I\mu-C\epsilon$) transcripts were analyzed by RT-qPCR in B cells stimulated by LPS-IL-4 for 4 days in the presence of 10, 20 or 40 nM JQ1. Histograms represent mean fold change $\pm$ SEM for 6 mice. NS: not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with the control untreated cells.

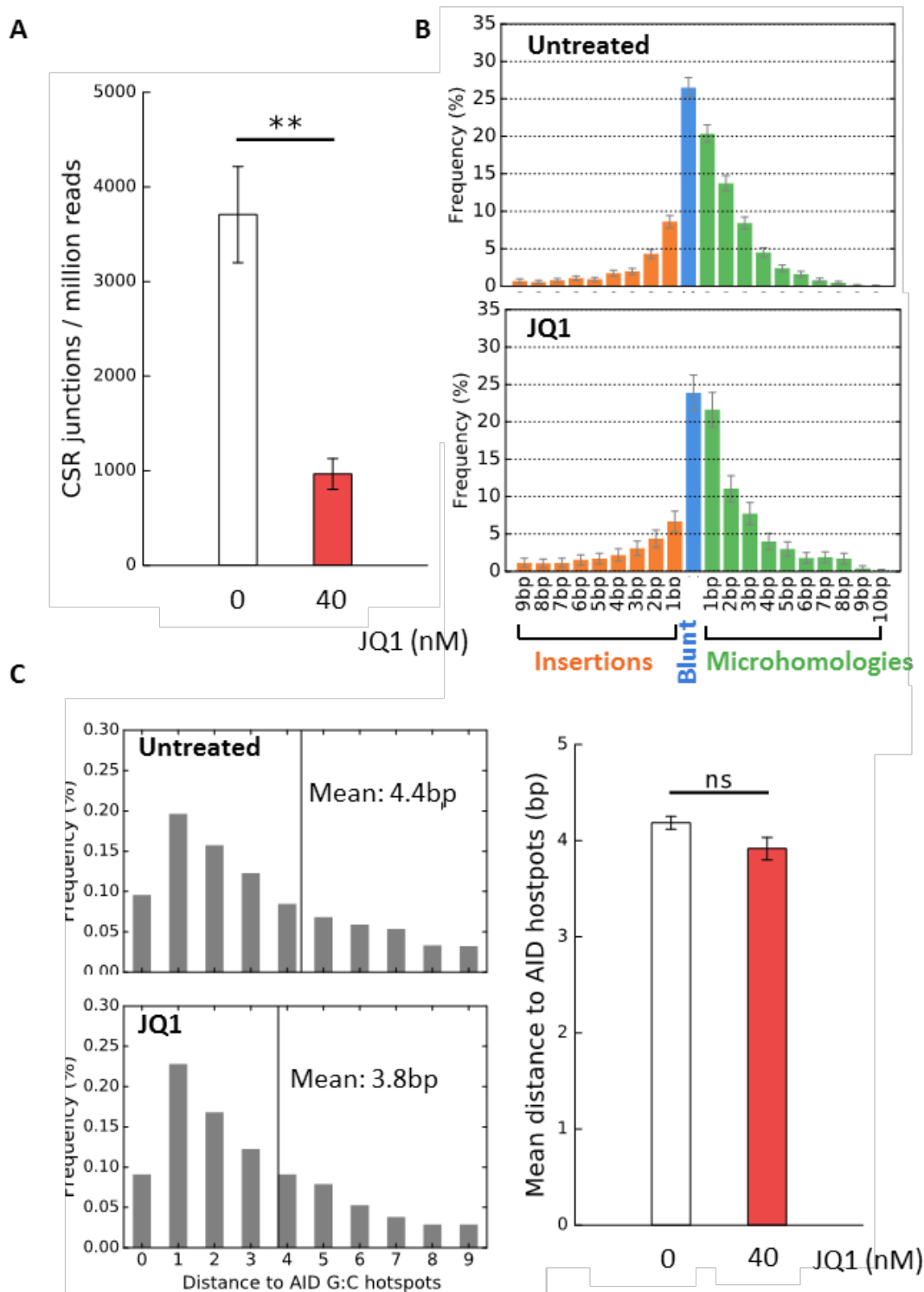


Figure 4: JQ1 impeded CSR and affected AID-induced break localization.

CSR junctions from stimulated primary mouse B cells were amplified by PCR and sequenced by NGS. Counts of identified junctions (A), junction structures (B) and relative position of breaks in Sy1 to AID hotspots (C) were obtained from CSReport sequence analysis. Data represent mean $\pm$ SEM for 6 mice (A, C) or one representative sample (B, C). NS: not significant, ** $P < 0.01$ compared with untreated control cells.

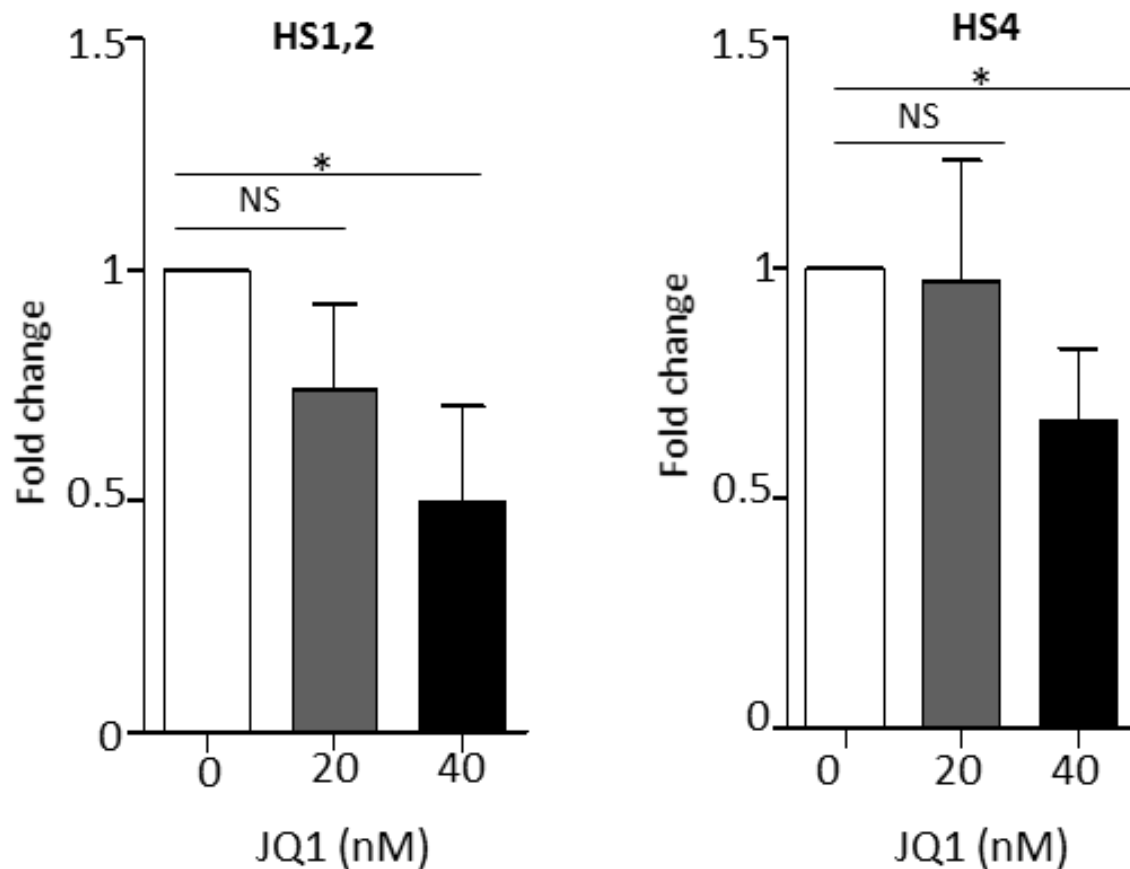


Figure 5: JQ1 affected 3'RR transcription.

Hs1,2 and Hs4 transcripts were evaluated by RT-qPCR of RNA from splenocytes stimulated with LPS and IL4 for 4 days. (Data represent mean signal $\pm$ SEM from 6 mice. NS: not significant, $*P<0.05$).

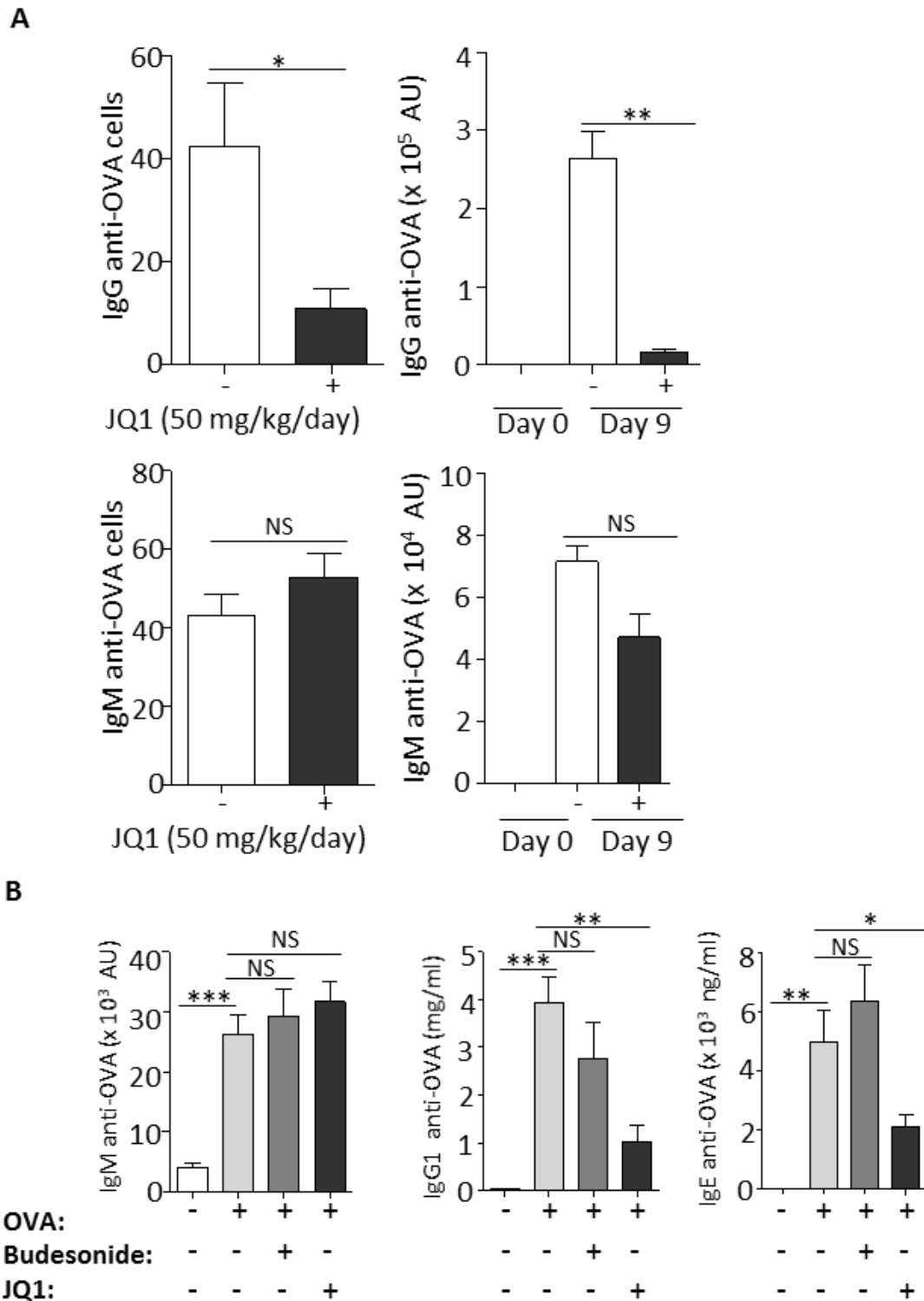


Figure 6: JQ1 inhibited class-switching *in vivo* and decreased production of specific antibodies.

(A) Mice administered daily with 50 mg/kg JQ1 were assayed after primary immunization for numbers of splenocytes producing Ag-specific IgM or IgG cells (upper and lower left panels) in ELISPOT assays, and for levels of Ag-specific Abs (upper and lower right panels) in ELISA assays. (B) Mice administered daily with JQ1 were assayed after repeated rounds of i.p. and i.n. immunization by ovalbumin for levels of Ag-specific IgM, IgG1 and IgE Abs after 25 days. NS: not significant. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

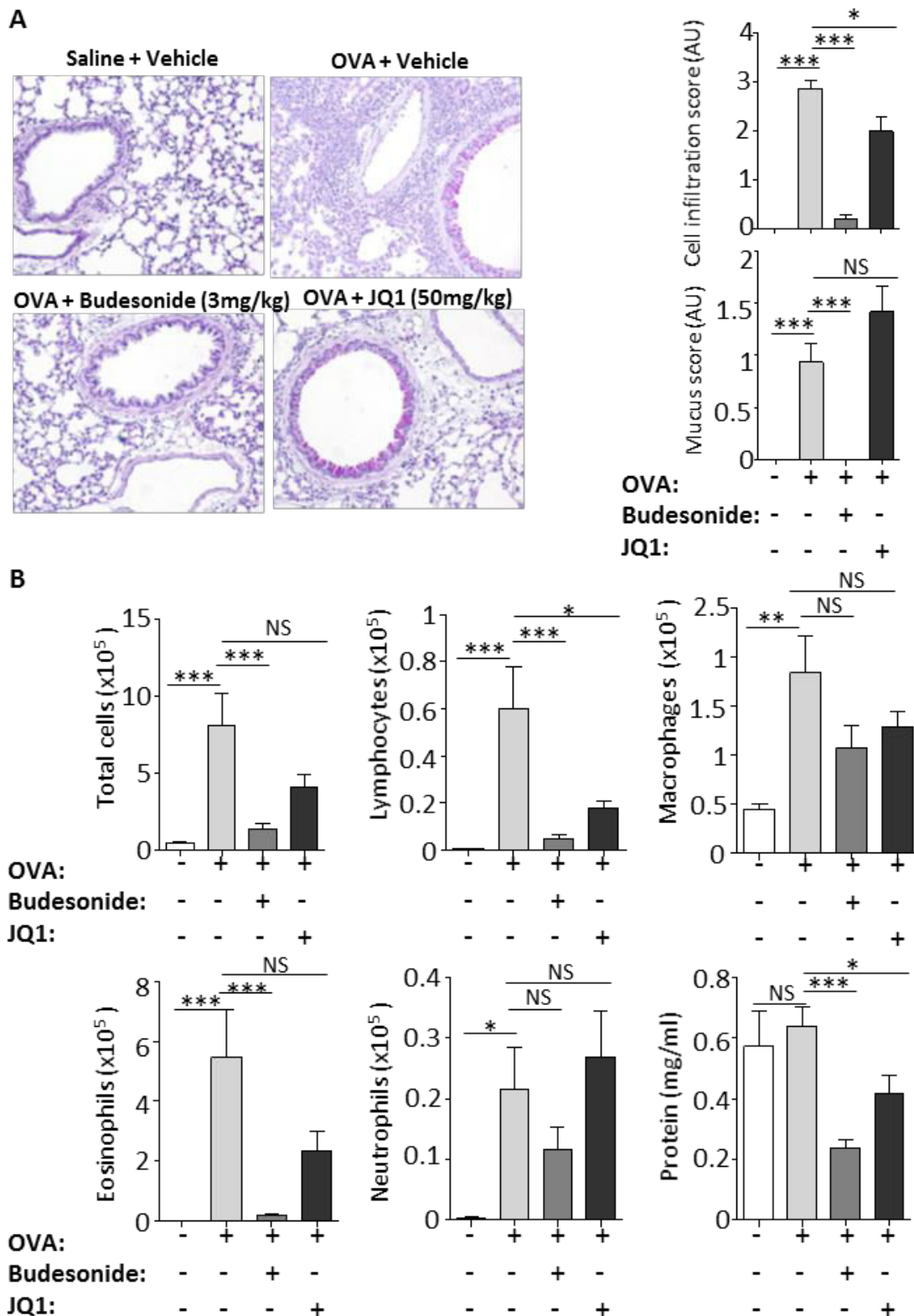


Figure 7: Lung tissue inflammation is lowered by JQ1 in mice with OVA-induced allergic asthma.

In an allergic asthma model after repeated *i.p.* and *i.n.*; antigen administration, mice administered daily with 50 mg/kg JQ1 for 4 weeks displayed (A) a less abundant cell infiltration of lung, lower inflammation and (B) lower counts of total cells, macrophages, eosinophils and lymphocytes, together with lower protein levels, in broncho-alveolar fluid (BALF).

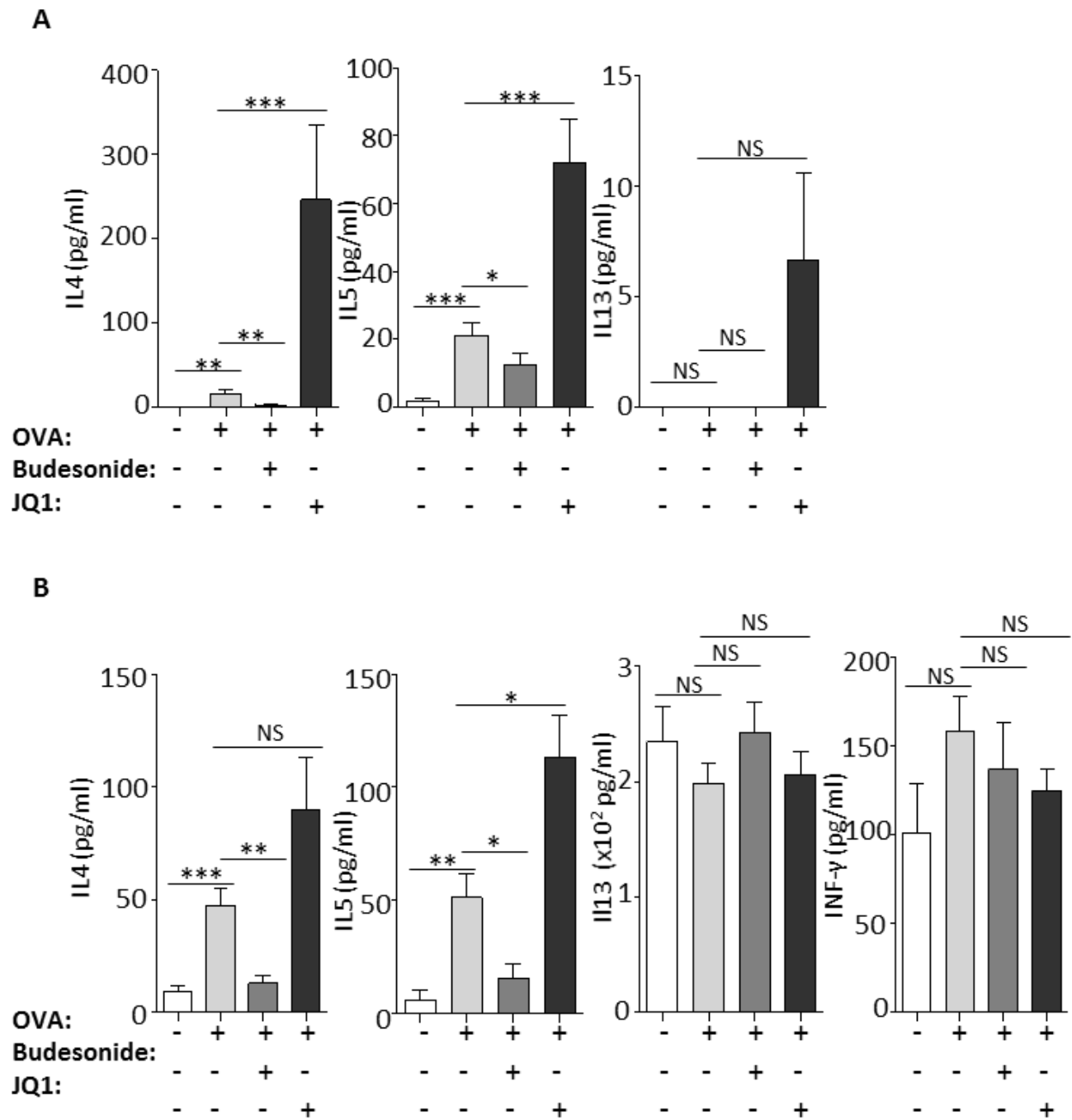


Figure 8: Th cytokines in mice with OVA-induced allergic asthma.

In an allergic asthma model after repeated *i.p.* and *i.n.* antigen administration, mice administered daily with steroids, and to a lesser extent mice receiving JQ1, displayed (A) higher levels of IL-4, IL-5, and IL-13 in broncho alveolar fluid (BALF), and (B) higher levels of IL-4 and IL-5 but no significant change IL-13 and IFN- γ in lungs.

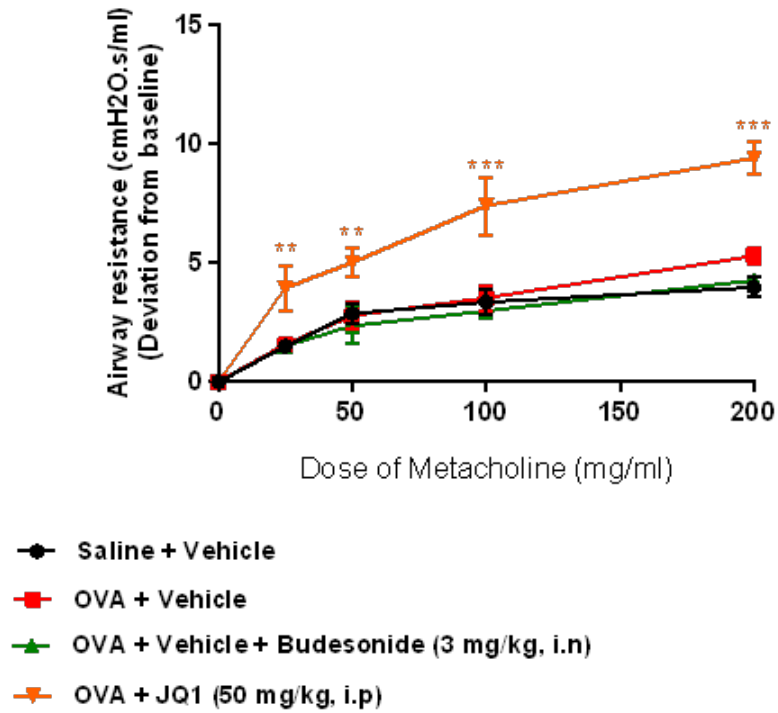
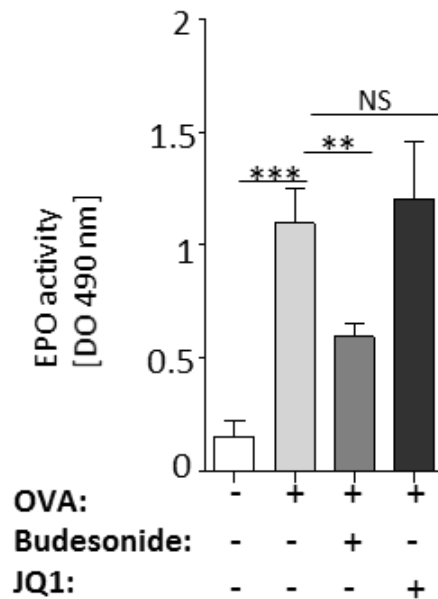
A**B**

Figure 9: Functional parameters of asthma and EPO activity in mice with OVA-induced allergic asthma.

After repeated *i.p.* and *i.n.* antigen administration triggering allergic asthma and in comparison to those simply receiving antigen, mice receiving daily steroids showed significantly improved (A) airway resistance (no effect of JQ1 on airway resistance).(B) JQ1 had no effect on lung eosinophil peroxidase activity while steroids improved EPO activity.

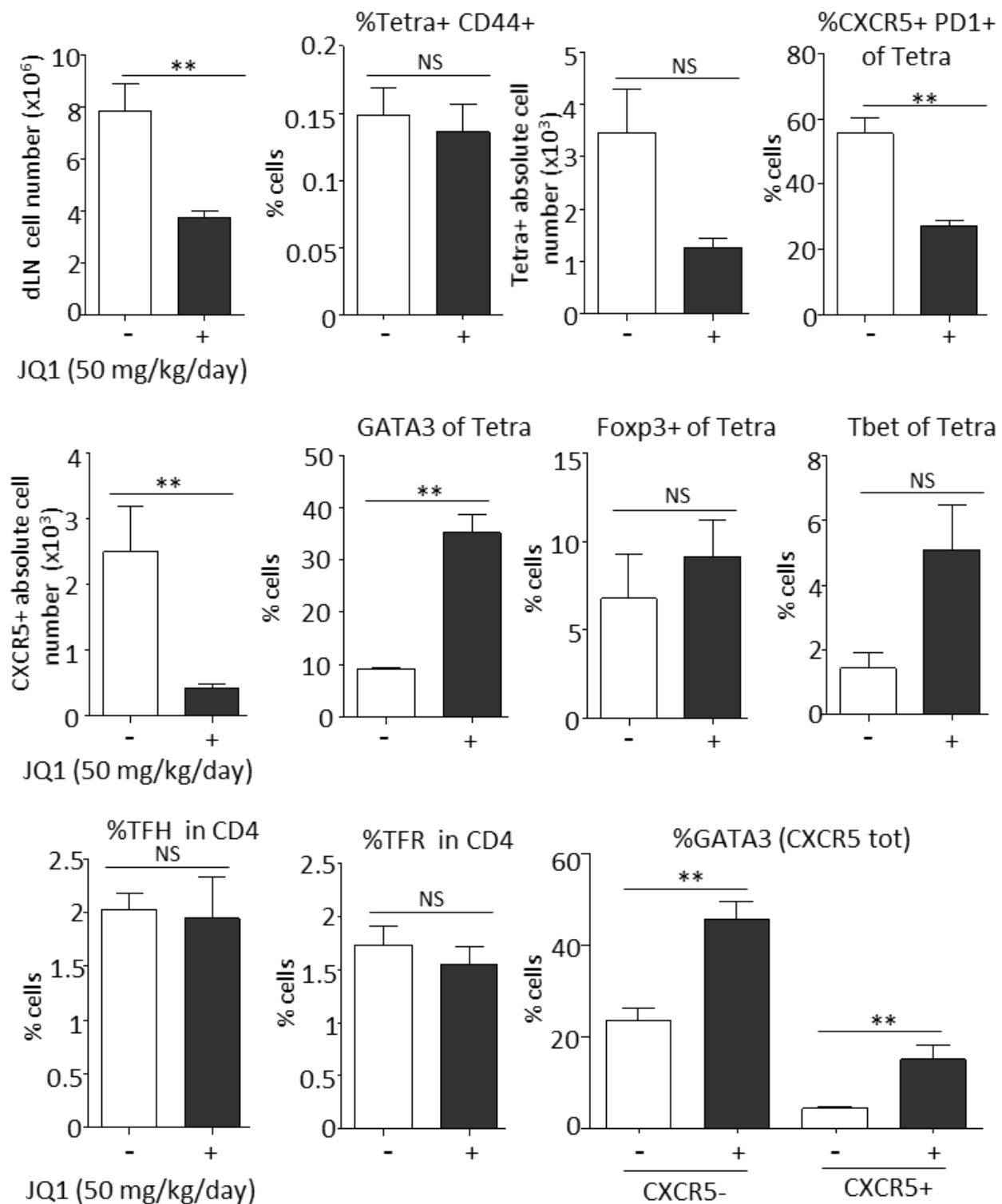


Figure 10: Effect of JQ1 on T cells in mice draining lymph nodes (dLN).

Total cell number in dLN was determined. Expression of T cell markers (GATA3, Foxp3, Tbet, CXCR5, TFH, TFR) were assessed by flow cytometry. NS: not significant. ** $P < 0.01$ compared with control mice.

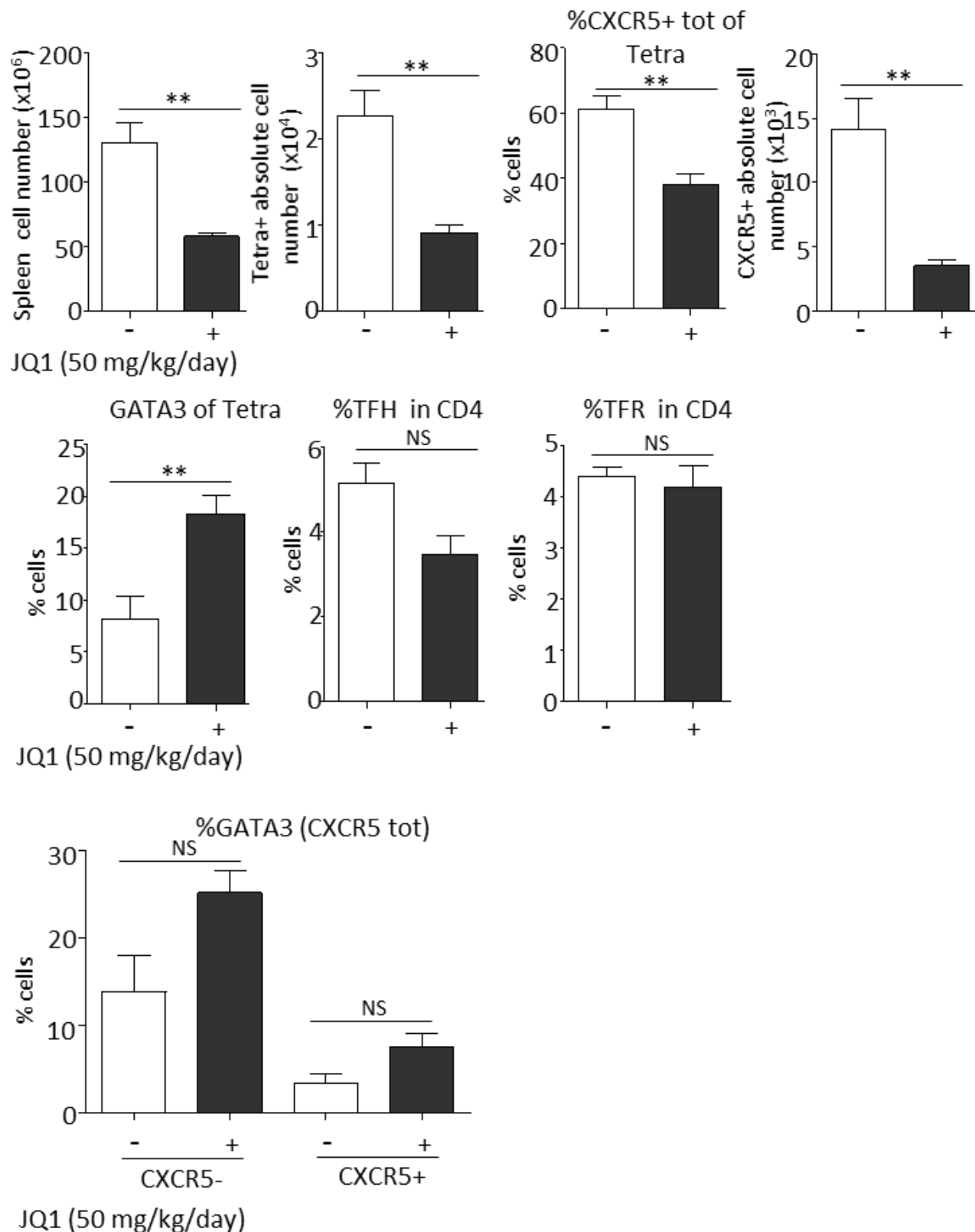


Figure 11: Effect of JQ1 on T cells in mice spleen.

Total cell numbers in mouse spleens were determined. Expression of T cell markers (GATA3, CXCR5, TFH, TFR) were assessed by flow cytometry. NS: not significant. ** $P < 0.01$, compared with control mice.

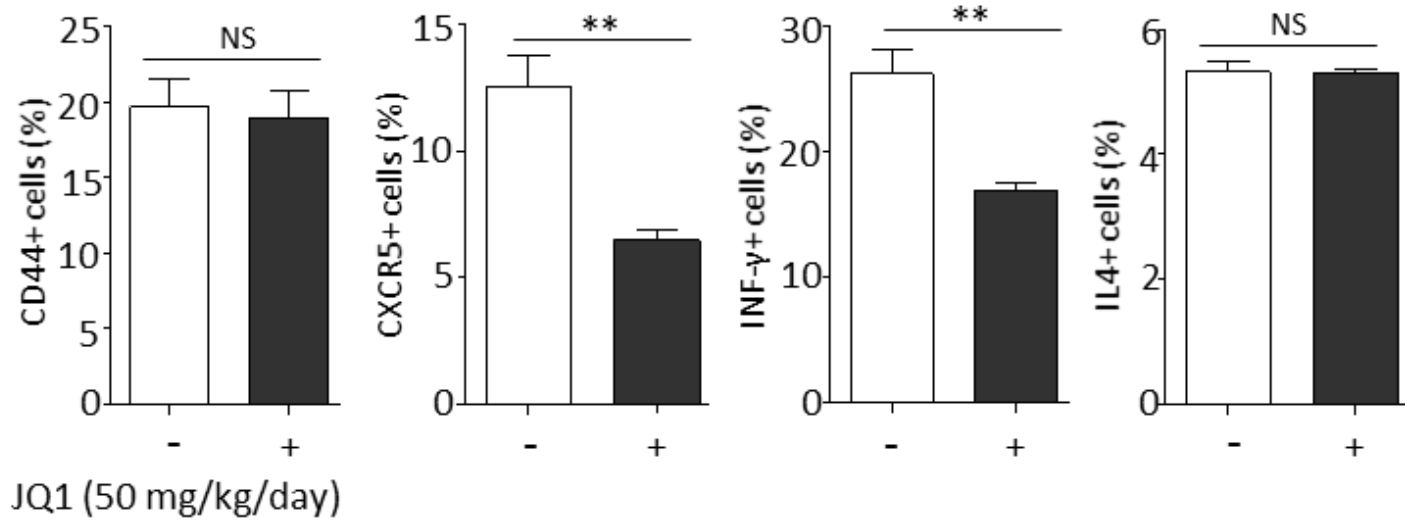
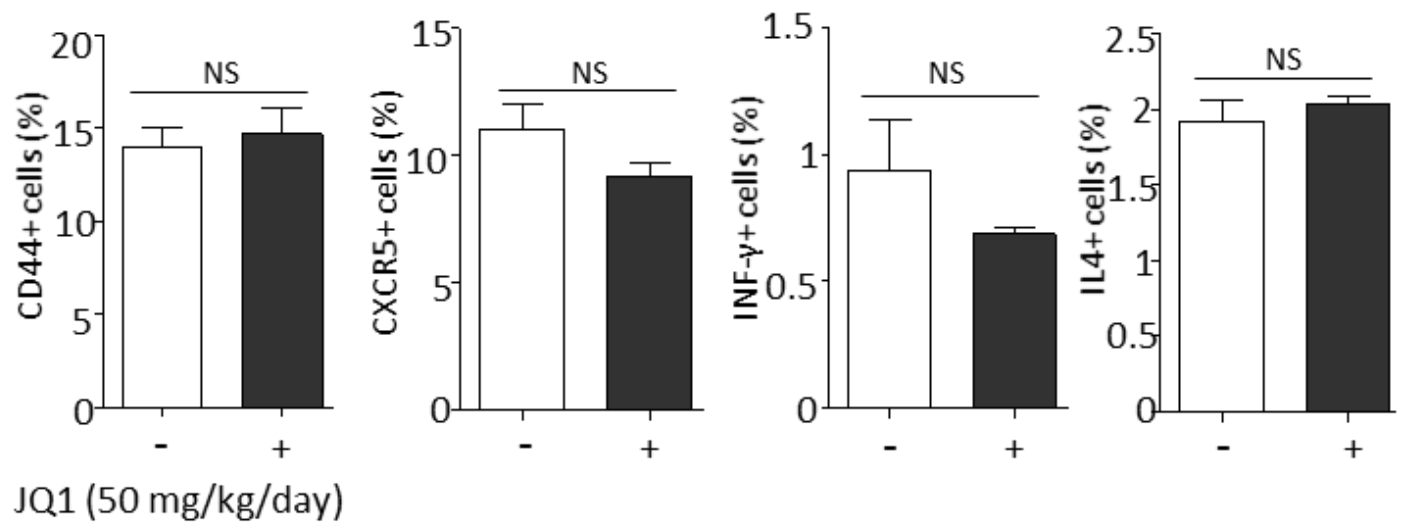
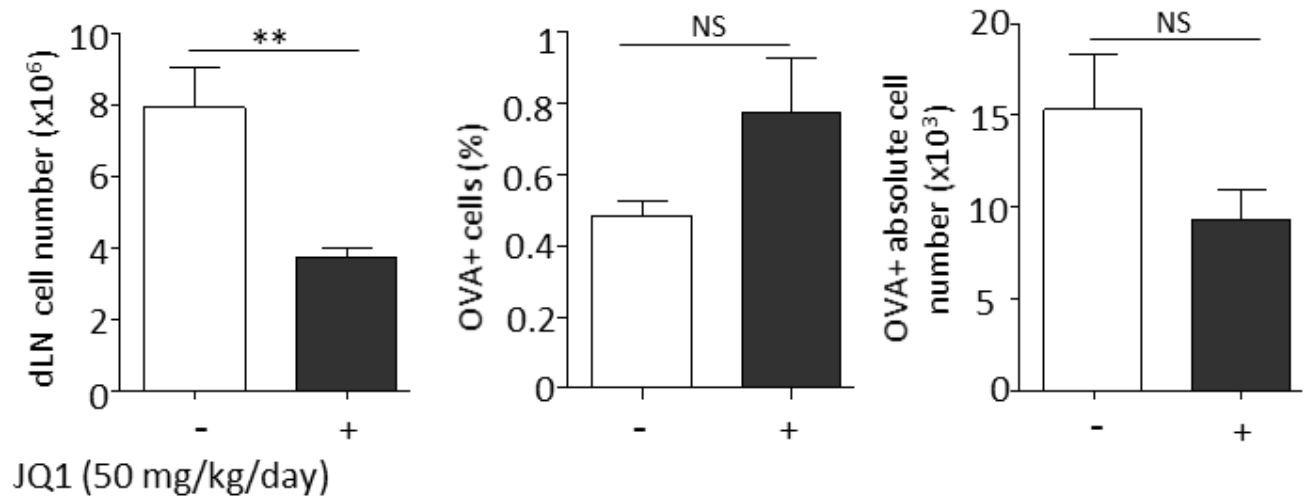
A**B**

Figure 12: Effect of JQ1 on T cell cytokines.

T cell cytokines were measured after PMA Ionomycin (A) and Ea2 (B) stimulation. CD44, CXCR5, INF- γ and IL4 were assessed by flow cytometry. NS: not significant. ** $P < 0.01$ compared with control mice.

A



B

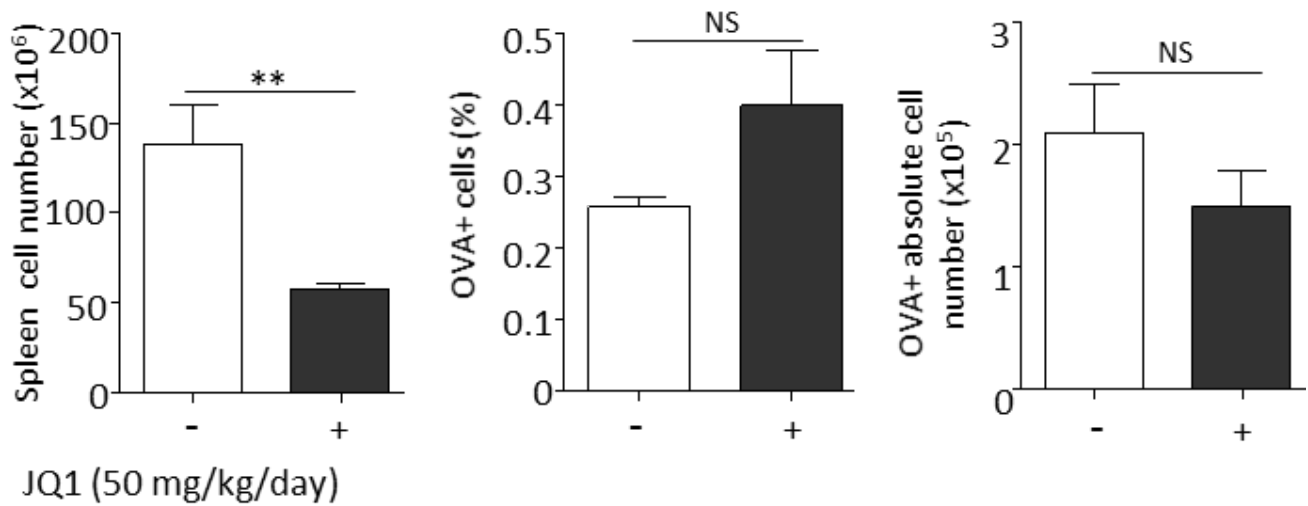


Figure 13: Effect of JQ1 on B cells.

dLN (A) and spleen (B) B cells were assessed for cellularity and OVA specific cells in mice treated or not with JQ1 50 mg/kg/day. NS: not significant. ** $P < 0.01$ compared with control mice.

Article 3

IgG5, the Tenth Member of the Human Immunoglobulin Family

Zeinab Dalloul¹, Iman Dalloul¹, Christelle Oblet¹, Virginie Pascal¹, Alexis Saintamand¹, François Boyer¹, Brice Laffleur, Stéphanie Durand-Panteix¹, Jean-Claude Aldigier¹, Yannic Danger², Yolla El Makhour, Jeanne Cook-Moreau¹ & Michel Cogné¹

(Article en préparation)

Les immunoglobulines constituent des éléments clés de l'immunité adaptative. Outre les IgM et IgD ancestrales, un répertoire de régions constantes étendues, avec les propriétés effectrices supplémentaires des anticorps IgG, IgA et IgE, a évolué chez les mammifères. Ceci s'est terminé chez l'Homme avec 9 classes et sous-classes différentes: IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 et IgA2. La structure et la fonction des sous-classes d'IgG varient fortement en raison de changements de séquence au niveau des résidus importants pour l'activation du complément, du recrutement de la cytotoxicité cellulaire et du repliement de la molécule.

Les cassures chromosomiques qui permettent le switch chez l'Homme se situent dans une région relativement proche du gène constant concerné, la longueur du fragment ciblé par les recombinaisons étant inférieure à 10kb (la plus longue région « switch » humaine, S γ 1, mesure 5 kilobases) et se termine à quelques centaines de bases de la séquence codante du CH1 de C γ 1. Le gène $\Psi\gamma$ est très particulier car aucune séquence répétitive n'est observée au sein des 10 kilobases qui le précèdent. Cette absence de région switch « canonique », et l'absence d'évidence de son expression l'ont ainsi fait classer parmi les pseudogènes, alors que l'ensemble de sa structure exon/intron semble pourtant conforme à celle d'un gène fonctionnel. Ce gène C $\Psi\gamma$ est précédé par le *super-enhancer* 3'RR1 qui se trouve à environ 16 kb du début de l'exon CH1 $\Psi\gamma$. Des cassures affectent ce superenhancer 3'RR du locus IgH lors de recombinaisons suicides du locus (LSR), mais la distance importante qui les sépare du gène $\Psi\gamma$ n'autorise sans doute pas un épissage normal de l'exon VDJ sur le gène $\Psi\gamma$ après une recombinaison de ce type. Comme le laboratoire s'intéresse aux recombinaisons LSR, nous avons décidé d'explorer aussi la présence de cassures éventuelles affectant la région située immédiatement en amont de $\Psi\gamma$. En effet, tels événements créeraient un locus recombiné très voisine de celle d'un switch classique vers les gènes C γ 1, 2, 3 ou 4. Nous avons donc recherché des événements de type « CSR $\Psi\gamma$ » joignant S μ à des sites

accepteurs situés dans les 10 kb immédiatement flanquant en 5' de $\Psi\gamma$ (dans une région cible donc située entre le superenhancer 3'RR et le gène $\Psi\gamma$). Cette exploration nous a en effet permis d'identifier une certaine diversité et une fréquence non négligeable de telles jonctions. Notre méthode de recherche a reposé sur plusieurs essais de PCR avec différents oligonucléotides, soit situés dans la région spécifique en amont de $\Psi\gamma$, soit en utilisant une stratégie consensuelle ancrée sur une séquence conservée au sein de la région constante des 5 gènes $C\gamma$ humains. Parmi toutes les ruptures en amont d'un gène $C\gamma$, nous évaluons globalement à environ 10^{-5} la fréquence de celles survenant dans les 10 kb adjacents en amont de $\Psi\gamma$.

La question suivante était de savoir si telles recombinaisons peuvent permettre la production de transcrits fonctionnels $V_HDJ_H-C\Psi\gamma$. Afin de les rechercher malgré leur « dilution » parmi tous les abondants transcrits $V_HDJ_H-C\gamma$ fonctionnels, nous avons fait le design d'un essai de RACE-PCR dédié à l'amplification et la validation spécifiques de la séquence $\Psi\gamma$. Grâce à cet essai, nous avons pu caractériser un certain nombre de transcrits. Leur existence est également retrouvée au sein de données RNAseq. Par les 2 méthodes, l'abondance de ces transcrits est bien inférieure (avec un facteur de l'ordre de 10^5) à celle des transcrits classiques $V_HDJ_H-C\gamma$ de chaîne IgH. Le répertoire de ces transcrits $V_HDJ_H-C\Psi\gamma$ se révèle cependant diversifié et l'utilisation de VH ne diffère pas de manière significative de celle des autres transcrits $C\gamma$. Il est à noter que dans notre analyse, le niveau de SHM dans ces transcrits était inférieur à celui des transcrits $C\gamma$ classiques. Par rapport à un faible nombre de transcrits fonctionnels VDJ- $\Psi\gamma$, des transcrits non fonctionnels (non épissés) provenant de cette région du locus IgH ont également été identifiés, ce qui indique que les méthodes capables de détecter les rares transcrits fonctionnels nous imposent de descendre à un tel niveau de sensibilité que le bruit de fond des transcrits germinaux du locus non réarrangés devient conséquent. Ceci révèle donc aussi bien sur le fait que le gène $\Psi\gamma$ est le siège d'une transcription germinale non réarrangée (comme tous les gènes constants du locus IgH). On notera d'ailleurs avec intérêt que d'autres gènes « classiques » du locus IgH sont dans le même cas de figure, comme le gène $C\epsilon$, pour lequel les transcrits non épissés (a priori donc « germinaux ») sont abondants au sein des données RNAseq issus de cellules B mémoires humaines activées, alors que les transcrits fonctionnels VDJ- $C\epsilon$ y sont dans notre expérience indétectables. L'abondance relative des transcrits germinaux $C\Psi\gamma$ a clairement l'inconvénient de rendre plus difficile la détection des transcrits fonctionnels VDJ- $C\Psi\gamma$ en les « diluant » encore un peu plus parmi tous les transcrits humains $C\gamma$.

Nous nous sommes aussi intéressés à la protéine « IgG5 » qui résulte de la traduction des transcrits fonctionnels VDJ-C Ψ γ . Nous avons identifié sa signature au sein des données de spectrométrie de masse correspondant à différents fluides biologiques humains (plasma, urine). Nous avons aussi produit des formes recombinantes de cette IgG5 dont les propriétés se sont révélées tout à fait surprenantes. En effet cette IgG partage avec les autres IgG des capacités effectrices d'activation du complément ou de l'ADCC, mais elle montre par contre une faculté unique à s'autocliver en fragments Fc + Fab. La faible quantité d'IgG5 produite peut faire douter de son rôle sous forme circulante, alors que son taux est vraisemblablement inférieur d'au moins 10⁵ fois aux autres IgG, soit de l'ordre de 100 μ g/l (ce qui reste quand même un taux équivalent à celui de l'IgE humaine). Par contre, à proximité d'une cellule ayant « switché » vers Ψ γ puis différenciée en plasmocyte, la présence d'une IgG5 auto-clivable en segments Fc+Fab serait attendue comme compétitrice de l'action effectrice des autres IgG, et donc immunosuppressive.

En résumé, nous montrons maintenant qu'une cinquième sous-classe d'IgG, IgG5, est exprimée à un faible niveau chez l'Homme, avec un switch « non canonique » et un répertoire VDJ diversifié, plutôt moins muté que celui des IgG classiques. Son expression résulte d'événements de changement de classe atypiques en aval de la première région régulatrice IgH 3' (3'RR1) au sein du locus IgH. Pour vérifier davantage la fonctionnalité de l'IgG5 correspondante, des versions adaptées des anticorps thérapeutiques rituximab et trastuzumab ont été construites. Sous sa forme complète, cette molécule d'anticorps partage la plupart des propriétés fonctionnelles des quatre premières sous-classes d'IgG, y compris l'activation du complément et la cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps. De plus, il porte une région charnière de séquence inhabituelle et spécifique, lui conférant une capacité unique de clivage spontané en fragments Fab + Fc. L'IgG5 apparaît comme la classe d'anticorps la plus rare produite chez l'Homme et sa contribution aux réponses immunitaires est surtout susceptible d'être régulatrice.

IgG5, the Tenth Member of the Human Antibody Family

Zeinab Dalloul¹, Christelle Oblet^{1*}, Iman Dalloul^{1*}, Virginie Pascal¹, François Boyer¹, Alexis Saintamand¹, Brice Laffleur¹, Stéphanie Durand-Panteix¹, Jean-Claude Aldigier¹, Emilie Pinault³, Yannic Danger², Yolla El Makhour⁴, Jeanne Cook-Moreau¹ & Michel Cogne¹

¹Limoges University, CNRS UMR 7276, INSERM U1262, Control of the B Cell Response & Lymphoproliferation, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France.

²INSERM U1236, Etablissement Français du Sang Bretagne, 35000 Rennes, France.

³Service Commun de Recherche et d'Analyse des Biomolécules de Limoges, Université de Limoges, Limoges, France.

⁴Lebanese University, Immunology Unit MICSU, Faculty of Sciences, Beirut, Lebanon.

*These authors equally contributed to this work

Correspondence: cogne@unilim.fr

Around 500 million years, immunoglobulins evolved as master elements of adaptive immunity in jawed vertebrates. Beside ancestral IgM and IgD already present in cartilaginous fishes, mammals developed an extended repertoire of constant regions and effector properties shaping the IgG, IgA and IgE antibody classes. Until now, 9 different human classes and subclasses have been described (IgG1, G2, G3, G4, A1, A2, M, D and E), varying in function after structural changes affecting folding of the molecule, its flexibility, polymerization, complement activation, cytotoxicity, recycling and catabolism. We now show that a fifth IgG sub-class, IgG5, is expressed at low levels in humans, with a diversified VDJ repertoire. Its expression results from atypical class-switching events downstream from the first IgH 3' regulatory region (3'RR1) within the IgH constant gene cluster. In its complete form, this antibody shares some functional properties of the other IgG subclasses, including complement activation and antibody-dependent cell cytotoxicity. By contrast, it harbors an unusual hinge region and a unique ability to spontaneous cleavage into Fc and Fab fragments. This peculiar hinge sequence is conserved in non-human old-world primates. By naturally yielding antigen-binding Fab fragments which lack the main IgG effector properties, its potential contribution to immune responses might then rather be regulatory or tolerogenic. IgG5 thus appears as the rarest antibody class produced in humans. It remains to be explored whether the complete antibody or the resulting cleaved fragments might confer an immunoregulatory role, or whether switching to expression of the $\gamma 5$ gene merely constitutes a dead end terminating the participation of some activated B-cells in the immune response.

Introduction

In addition to the enormous diversity of their binding domains, immunoglobulins (Ig) have evolved in jawed vertebrates and diversified their functions under the format of different classes ^{1,2}. Mammalian IgG further diversified with probably at least two different subclasses in early mammals, resulting in four in the mouse as well as in humans ¹. Besides duplication of genes and divergence of their sequences as for other multigene families, gene conversion events also likely maintained some patches of homology between family members. Human IgG is a 150 to 170kDa protein equilibrating in intravascular and extravascular fluids. Due to variegated binding to Fc γ R receptors, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 differ in cytophily and hence in ability to mediate antibody-mediated cell cytotoxicity or phagocytosis. The same is true for FcRn binding and IgG recycling determining antibody half-life in body fluids. Efficacy of IgG subclasses for complement recruitment decreases from IgG3 to IgG4 (IgG3 > IgG1 > IgG2 > IgG4) ³. While amino acid composition is 90% similar, the highest level of divergence occurs in the hinge region and the upper CH2 domain ⁴. IgG3 exhibits the longest hinge region (62 amino acids), compared to 15 amino acids for IgG1, and 12 for IgG2 or IgG4 ⁵. Exon shuffling accounts for this elongated IgG3 hinge region, hence encoded by a variable number of repeats of a prototypic 15 codon-long γ -hinge exon⁶. Origin of the other γ subclasses relates to an ancient partial duplication of the constant gene cluster within the IgH locus ^{7,8}, thus split in two units: an upstream [μ , δ , γ 3, γ 1, $\Psi\epsilon$, α 1], followed by a downstream [$\Psi\gamma$, γ 2, γ 4, ϵ and α 2] set. Each of these clusters is flanked by a 3' regulatory region (3'RR)⁹, and four well-known γ heavy chain genes present in the locus encode the four human IgG subclasses. Little attention has been given to a fifth homologous gene, $\Psi\gamma$, which was classified as a pseudogene due to the lack of a switch region and any evidence for its expression ¹⁰. However, its global exon-intron organization, open reading frame and polyadenylation sites are completely super-imposable to functional γ genes¹¹. We thus wished to re-challenge the pseudogene status of $\Psi\gamma$ using multiple means. We tracked rare rearrangement events at the DNA level and corresponding functional

transcripts in human primary B-cells and we explored the functional properties of the encoded antibody product. Altogether and also based on mass spectrometry analyses of human body fluids, our data demonstrate that the $\Psi\gamma$ gene is expressed in humans, constituting the tenth immunoglobulin subclass and deserving to be renamed C γ 5. IgG5 additionally shows unique properties including an unusual fragile hinge domain, rapidly cleaved upon secretion and spontaneously yielding low molecular mass monovalent Fab fragments.

MATERIALS AND METHODS

Amplification of S μ / $\psi\gamma$ junctions and Ion torrent next generation sequencing NGS

S μ / $\psi\gamma$ junctions were amplified in triplicate from 100 ng DNA of human tonsil DNA by using nested PCR (Phusion HF polymerase; BioLabs) with the following specific primers:

PCR1: S μ -forward1 5'-CCAGGTAGTGGAGGGTGGTA-3' / $\psi\gamma$ -reverse1 5'-GCGGCTGTGATTGGATTTA-3';

PCR2: S μ -forward2 5'-CAGGGAAGTGGGGTATCAAG-3' / $\psi\gamma$ -reverse2: 5'-CGCCCCTACCATTGAAGTAG -3'.

For global amplification of CSR junctions to S γ 1, γ 2, γ 3 and γ 4, the same S μ forward primers were combined with the following consensus reverse primers:

PCR1: S γ consensus-rev1 5'-GGTCACCACGCTGCTGAG -3',

PCR2: S γ consensus-rev2: 5'-CTTGACCAGGCAGCCCAG-3'.

Each library was prepared using 200 ng PCR2 product. Barcoded libraries with 200-pb read lengths were prepared using Ion Xpress plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Each barcoded library was mixed in equal amounts and diluted to 100 pM. Libraries were run on an Ion PI v3 chip on the Ion Proton sequencer (Life Technologies). Data were analyzed using CSReport¹².

Next-generation sequencing for repertoire analysis

Repertoire analysis was carried out on RNA from human tonsils after 5'RACE, PCR and library preparation.

RACE was performed on 500ng RNA using SMARTer RACE 5'/3' kit (Clontech) following the manufacturer's instructions and incubated at 72°C for 3 min and at 42°C for 2 min with a specific human CH2 ψ γ -reverse downstream primer: 5'-CCAGGGGTTTCAGTTGTTGCA-3'.

Libraries were prepared on RACE products using an upstream CH1 ψ γ -reverse specific biotinylated primer (5'-TTGTGTCACAACATGGGGTT-3'). For PCR, DNA was denatured 30 s at 98°C and then submitted to 30 cycles consisting of 98°C for 10 s, 70°C for 30 s, 72°C for 30 s and 72°C for 5 min. PCR products were purified using MyOne C1 Streptavidin microbeads (Invitrogen). Streptavidin purified PCR products were used to perform another PCR round using the following primers: two forward primers (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' and 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') and two CH1 ψ γ -reverse specific primers: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCGCTGTGCC -3' and 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATCGCCGCTGTGCC-3'.

For γ 1, γ 2, γ 3 and γ 4 the following consensus primers were used: Hs C γ consensus Race: 5'-GTGTTGCTGGGCTTGTGAT-3' and Hs C γ consensus PCR1: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGGTTCGGGGAAGTAGTCC-3'.

Amplification was performed with Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) according to the following program: DNA was denatured 30 s at 98°C and then submitted to 30 cycles consisting of 98°C for 10 s, 65°C for 30 s and 72°C for 30 s, and 1 cycle at 72°C for 10 min. Adapters were added and the resulting amplicons were sequenced on an Illumina Miseq sequencer.

RNAseq on activated human B-cells

Memory B-cells were purified and activated for 4 days with IL-2. RNA was extracted and libraries were prepared for sequencing on an Illumina NextSeq 500 using 75-bp single-

end reads. After quality control and filtering, reads were aligned on the GRCh38 human genome using STAR 2.4.2a, and blasted for the occurrence of reads containing correctly spliced JH to CH1 and CH1 to Hinge exon.

Production and characterization of recombinant antibodies of the IgG5 subclass

Vectors were constructed which associated the VDJ coding regions of either rituximab (anti-human CD20) or trastuzumab (anti-human HER2) to the $\Psi\gamma/\gamma 5$ constant coding exons. The corresponding Ig expression vector also included the corresponding κ light chain coding region in order to conserve antigen-recognition. The final complete gene expression vectors G5K-CD20 or G5K-HER2 were transfected either into CHO or HEK293 cells using the ExpiCHO Expression System (Gibco) (maintained in DMEM medium, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin) following the manufacturer's instructions. Anti-CD20 IgG5 secreted in transfected cell supernatants was chromatographically purified using protein A/G Prepacked columns (Pierce). Concentrations of purified antibodies were determined by 280nm UV adsorption.

Western Blots

The integrity of the purified IgG5 antibody preparations was determined by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis under reducing and non-reducing conditions using 12% StainFree gel (Biorad). After transfer, PVDF-membranes (GE Healthcare) were blocked with 5% non-fat milk, followed by incubation for 1h with goat anti-human IgG antibody (Southern Biotech). After washing with TBS, 0.1% Tween buffer, secondary horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat antibody (Dako) was added. After washing, blots were revealed with ECL substrate (Immobilon, Millipore).

Various other antibodies were used for characterizing blotted proteins and their degradation products, including anti-human Igk chain (Southern Biotech), anti-Ig Fd

fragment (Millipore), anti-Fc fragment (Invitrogen), anti-idiotypes specific for variable domain of either rituximab (R&D Systems) or trastuzumab (R&D Systems).

Flow cytometry

Binding of recombinant antibodies to their cognate antigen was evaluated by cell cytometry using target cells expressing human CD20 (human B lymphoma cell line DHL-4, hCD20-expressing variant “EL4-CD20”), or untransfected CD20neg EL4 cells as negative control. The MCF7 cell line expressing human HER2 was used to test trastuzumab IgG5 binding capacity.

Identical amounts of the anti-CD20 IgG5 preparation or control IgG antibodies (10µg/ml) were incubated with target cells for 30 min. For anti-HER2 IgG5, an excess amount of supernatant was used. Cells were then stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibodies, which were either rabbit anti-human IgG antibodies (Dako), rabbit anti-human κ light chain (Dako), mouse anti-human IgG Fd (Millipore) or anti-idiotypes specific for variable domains of either rituximab (R&D Systems) or trastuzumab (R&D Systems), and then analyzed by flow cytometry.

Immunofluorescence

EL4-CD20 cells and HER2 MCF7 cells were first washed, resuspended in culture medium, deposited on polysine pre-treated slides (ThermoFisher) and then incubated overnight at 37°C. Spots of adhered cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Spots were washed three times with PBS, 5 min each then blocked with PBS 1% BSA (Bovine Serum Albumin) for 30 min at 37°C in humidified chamber. Cells were then incubated with either identical amount of anti-CD20 antibodies (10µg/ml) or supernatants containing anti-HER2 antibodies for 1h at room temperature. After three washes, either unlabeled human anti-kappa (Southern Biotech) or anti-Fd (Millipore) antibodies were added and incubated for 1h at room temperature in a humidified chamber. Cells were washed and incubated with secondary anti-goat Alexa 488 antibody for 1h at room

temperature. After three washes, nuclei were stained with Dapi before mounting with Mowiol 4-88 solution (Sigma). Sections were then observed under a confocal microscope.

Cell aggregation in the presence of anti-CD20 antibodies

Cells were plated at 2.5×10^3 cells/well in flat-bottomed 96-well plates in the presence of 10 $\mu\text{g/mL}$ IgG5_{Rituximab}, IgG1_{Rituximab} or control IgG antibodies. Cell adhesion was assessed 24 h later by examination under an optical microscope.

Cell proliferation

An MTS assay (Promega) was used to analyze the effect of anti-CD20 antibodies on B-cell growth *in vitro*. DHL-4 cells were cultured at 37°C in 96-well plates (10^4 cells in 100 μL /well). Proliferation was assessed after 48 h under various concentrations of specific or control monoclonal antibodies. The amount of viable cells was determined (in triplicate) by measuring the absorbance (490 nm) after addition of MTS for 3 h. Cells incubated in medium without antibodies were used as a control. Growth inhibition is expressed as follows: $100 - (\text{Mean OD}_{\text{experimental group}} - \text{Mean OD}_{\text{medium}}) / (\text{Mean OD}_{\text{control}} - \text{Mean OD}_{\text{medium}}) * 100$.

Complement-mediated cytotoxicity (CDC)

DHL4 cells (2×10^5) were re-suspended in 50% normal human serum or heat inactivated normal human serum with or without anti-CD20 antibodies. Non-CD20 IgG antibody (0.01, 1 and 10 $\mu\text{g/mL}$) was used as a negative control. After incubation for 4 h at 37°C, dead and viable cells were differentially stained by addition of 0.5 mg/mL propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry. The percentage of specific cytolysis was calculated from cell counts using the following formula: % of specific lysis = $(\% \text{ PI+ experimental} - \% \text{ PI+basal}) / (100 - \% \text{ PI+basal}) * 100$.

Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)

Blood samples from healthy volunteers were collected in EDTA tubes for preparation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by density gradient centrifugation using

Lymphocyte Cell Separation Media (Cedarlane). After washing, human leukocytes containing potential effector cells were adjusted to 10×10^6 cells/ml in serum free RPMI medium (Lonza). Target DHL4 cells were resuspended at 5×10^5 , labeled with $0.5 \mu\text{M}$ CFSE (Invitrogen) and incubated 20 min at 37°C . Labeled DHL4 target cells were washed twice and mixed with leukocytes at a 1:20 ratio (Target: Effector). Anti-CD20 IgG5 (0.01, 1 or $10 \mu\text{g/ml}$) or control antibodies were added and cells were incubated 4h at 37°C . Dead and viable cells were stained by 0.5 mg/mL propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry. The percentage of specific cell lysis was calculated from cell counts using the following formula: % of specific lysis = $(\% \text{ PI+ experimental} - \% \text{ PI+basal}) / (100 - \% \text{ PI+basal}) * 100$.

In-house mass spectrometry

Peptide samples were purified on 1CC 30 mg HLB Cartridge and filtered on a $0.22 \mu\text{m}$ spin column. Resulting peptides were analyzed with a nanoLC 425 in micro-flow mode (Eksigent, Dublin, CA, USA) coupled to a TTOF5600+ mass spectrometer (SCIEX, Framingham, USA) in the Information-Dependent Acquisition mode. The MS/MS data were used to query an in-house database containing the IgG1-5 sequences using the Protein Pilot software (Sciex) with Mascot software (version 2.2, Matrix Science, England). Proteins were validated if at least 2 peptides were identified with a confidence above 99%.

Identification of peptides in mass spectrometry databanks of human samples

Tryptic peptides for the predicted C γ 5 protein were compared to all those from the four classical IgG subclasses (and all their known allelic variants, as deposited in the IMGT database <http://www.imgt.org/>). were then searched for their occurrence in Deposited mass spectrometry databanks were queried for uniquely specific C γ 5 peptides using the PeptideAtlas algorithm <https://db.systemsbiology.net/sbeams/cgi/PeptideAtlas/Search> (from the Institute for Systems Biology, Seattle, WA, USA).

RESULTS

Position and structure of S μ / $\Psi\gamma$ junctions in human tonsil B cell DNA.

We designed a nested PCR assay based on an upstream S μ forward primer and consensus reverse primers specific for any human C γ gene CH1 exon and thus susceptible to amplify a switching event towards a C γ gene. After Next generation sequencing (NGS), junctions were analyzed by the CSReport algorithm ¹² in order to score γ gene usage. Within the bulk of all CSR junctions detectable in human tonsil cells and besides a majority involving the C γ 1-4 genes, diversified junctions from S μ to $\Psi\gamma$ also occurred (Figure 1A). The frequency of such junctions compared to all S μ -S γ junctions was around 3/10000. $\Psi\gamma$ breakpoints were scattered within a large 5' flanking fragment and mostly located between 6 and 8 kb upstream of the $\Psi\gamma$ 5 gene CH1 exon but some also occurred in the immediate vicinity of CH1 (Figure 1B).

In comparison to junctions with classical C γ genes, the mean distances of breaks to AID sites as well as breaks to APOBEC sites were longer for breaks upstream of $\Psi\gamma$ than for those in S γ 1 (Figure 1C). Those breaks involving $\Psi\gamma$ featured a higher level of microhomology, a likely indication that the alternate end joining (A-EJ) pathway is more often involved in junctional repair of $\Psi\gamma$ -CSR double strand breaks, while non-homologous end-joining (NHEJ) dominates in classical junctions towards C γ 1-4 (Figure 1D).

We conclude that, although rare and likely involving a distinct pattern of DNA repair, switch junctions do occur upstream of the human $\Psi\gamma$ gene.

Occurrence and repertoire of mature VDJ- $\Psi\gamma$ transcripts

The putative repertoire diversity of functional VDJ- $\Psi\gamma$ transcripts was determined in RNA extracted from human tonsil cells by RACE-PCR and high-throughput repertoire sequencing using $\Psi\gamma$ gene-specific reverse primers, followed by validation of sequence identity of the amplified upstream portion of CH1- $\Psi\gamma$. Rare, but diversified, normally

spliced and in-frame, $\Psi\gamma$ transcripts were found in 5 different individuals. Altogether, we characterized a total of 80 unique functional VDJ regions joined to C $\Psi\gamma$, while in parallel >21854 VDJ-C γ 1-4 junctions were identified with classical C γ reverse primers. Distribution of the $\Psi\gamma$ repertoire was similar to that of classical C γ transcripts sequenced from the same individuals with more frequent use of IgHV4 (Figure 2A) and IgHJ4 (Figure 2B).

By contrast, the SHM load was significantly lower, with an overall 4.64% mutation rate for $\Psi\gamma$ compared to 6.35% for the other IgGs (Figure 2C). 6.3% of these transcripts were virtually germline (below 1% of mutations) instead of 0.8% for γ 1-4 transcripts.

Among all transcripts identified from human memory B-cells by RNAseq, a parallel unbiased search of correctly spliced $\Psi\gamma$ transcripts (correct JH-CH1 junctions, or correctly spliced hinge exons) revealed rare occurrences of mature functional $\Psi\gamma$ transcripts with a ratio to the equivalent mature γ 1 transcripts ranging from 1/5923 to 1/400000 in different samples analyzed.

Therefore, several methods concur to demonstrate the existence of functional transcripts originating from the $\Psi\gamma$ gene, thus deserving to be considered as a functional γ 5 gene from which a diversified repertoire of VDJ- γ 5 transcripts is found.

Analysis of the $\Psi\gamma/\gamma$ 5 coding sequence

Comparing the $\Psi\gamma/\gamma$ 5 gene coding sequence to the γ 1- γ 4 subclasses shows its strongest similarity with C γ 1 with a noticeable conservation of several features required for IgG function (referenced below with numbering according to Edelman et al^{13,14}). Notably, γ 5 is identical to γ 1, γ 2 and γ 3 for all C_H2 positions which are considered to be important for recruiting C1q (notably Ala330-Pro331, the substitution of which by serine residues in γ 4 suppresses complement activation)¹⁵. Residues responsible for FcRn binding (*Ile*253 and *His*310 in C_H2, *His*435 in C_H3) are also preserved. Some C_H2 residues binding to Fc γ R1 are preserved (*Leu* 235 and *His* 268), but not all (*Val/Leu* 234 replaced by *Pro* in C γ 5).

We noticed the conservation of the major IgG N-glycosylation site, known for its role in binding to FcγRIIa, IIb and IIIa (at Asn297, in the D-E turn of the C_H2 β-pleated sheet structure).

The homologous position in the γ5 C_H3 D-E turn carried a unique additional N-glycosylation site (with Asn401 instead of Asp in other IgG subclasses), at a position identical to the C_H3 N-glycosylation sites of IgM and IgE (Figure 3A).

Besides this additional glycosylation, the major peculiarity of the Ψγ/γ5 coding sequence concerned the hinge region. This region is 17AA-long instead of 15AA for γ1, 12AA for γ2 and γ4, and 62AA for γ3 (one 17 bp motif followed by 3 repeats of 15bp). The γ5 hinge is most closely related to γ1 and to the first hinge motif of γ3, with 12 out of 17 identical residues in both cases. It might thus originate from a common ancestor of these two genes. A phylogenetic tree of the 5 human γ genes is shown in Figure 3B, and additionally shows interspecies conservation of the human Ψγ gene with the orthologous chimpanzee and gorilla Ψγ genes, the coding sequences of which appear as functional as that of humans.

Identification of IgG5 peptide signatures by mass spectrometry

We first analyzed tryptic peptides obtained by digestion of human serum Igs for the presence of IgG5 specific peptides. No specific peak appeared above background level. We then decided to analyze normal human urine samples, which are almost free of high molecular mass protein but are known to be enriched in low molecular mass protein or protein fragments, and notably contain low amounts of Ig fragments. Several IgG5 specific tryptic fragments and mostly mapping to the Fc region C_H3 domain were then detected at low frequencies (Fig 3C). Querying the PeptideAtlas mass spectrometry public databank (<http://www.peptideatlas.org/>) confirmed that these specific γ5 tryptic peptides have been previously identified in several human data sets corresponding to human samples and most notably human plasma.

Structural characteristics of recombinant IgG5 antibodies

Functional $\gamma 5$ heavy chains with V regions identical to the therapeutic antibodies rituximab and trastuzumab were cloned into GK or pVitro vectors together with the corresponding κ light chain coding sequence and used for antibody preparation after transfection into CHO or HEK cell lines (Figure 4A). Anti-hCD20 IgG5 specificity was checked by flow cytometry on hCD20 EL4 transfected cells using anti-IgG Fc chain antibody and confirmed specific binding to hCD20 at 10 $\mu\text{g/ml}$ IgG5. The mean fluorescence signal obtained with 10 $\mu\text{g/ml}$ IgG5 remained, however, weak and equivalent to that of 0.01 $\mu\text{g/ml}$ of standard IgG1 rituximab antibody (Figure 4B).

The integrity of the purified antibody was assessed by Western blot. Although poorly efficient, only production by stable B-cell transfectants yielded intact IgG5. SDS-PAGE analysis showed the expected full-length 150 KDa assembled IgG in native conditions and normal size 50kDa heavy chain and 25kDa light chain in reducing conditions.

All production conditions usually yielding high concentrations of recombinant IgG by transient transfection of CHO or HEK293 cells generated minute amounts of intact IgG5 together with massive amounts of short sized fragments in non-reducing conditions. These fragments were identified as Fab and Fc fragments by Western blot analysis using anti-human IgG (Fc) and Fd (Figure 4C). Accordingly, SDS-PAGE analysis in reducing conditions demonstrated the presence of low amounts of the 50 KDa full-length $\gamma 5$ heavy chain, together with abundant additional H chain fragments of shorter sizes and abundant 25 KDa full-length light chains.

Functional characteristics of anti-CD20 IgG5

Direct anti-proliferative effects of anti-hCD20 IgG5 were measured by an MTS assay on the DHL4 lymphoma cell line (Fig 5A). IgG5 inhibited cell growth at 10 $\mu\text{g/ml}$ and to a lesser extent with concentrations of 1 and 0.01 $\mu\text{g/ml}$ in comparison to IgG control antibody.

We next examined whether IgG5 antibody also activated indirect cytotoxic pathways against lymphoma cancer cells, and first evaluated anti-CD20 antibodies for their capacity to trigger CDC against the DHL4 cell line (Figure 5B). IgG5 showed significant CDC at 10 µg/ml (>80% cells killed in the presence of human serum), while this effect was lost when using heat-inactivated serum in a control experiment. An intermediate effect was seen at 1 µg/ml (>50% cytotoxicity) but CDC rapidly disappeared at lower concentrations, in contrast to anti-hCD20 IgG1 which still displayed strong CDC at a 0.01 µg/ml concentrations.

The ability of IgG5 to recruit human effector cells was also evaluated against target DHL4 cells. For this purpose, CFSE-DHL4 labeled cells were incubated with anti-hCD20 IgG5 or IgG1, and compared to an irrelevant control IgG antibody in the presence of human effector cells (Figure 5C). IgG5 only induced minor cell lysis (~8%) at the saturating antibody concentration of 10 µg/ml, whereas IgG1 showed high activity at 10, 1 and 0.01 µg/ml.

DISCUSSION

The human IgH constant gene cluster has long been considered to be made up of nine functional genes and two pseudo-genes, $\Psi\gamma$ and $\Psi\epsilon$. While $\Psi\epsilon$ is clearly a pseudogene lacking a large part of the constant domains, $\Psi\gamma$ surprisingly carries an almost fully functional sequence, except for the fact that it is not preceded by a classical S region, as are the four other $C\gamma$ genes and was thus supposedly not expressed in humans¹¹.

Since we previously studied breaks occurring outside S regions (during atypical class switching events to the $C\delta$ gene and during LSR^{16,17}), and since $\Psi\gamma$ is strikingly preceded by the 3'RR1 super-enhancer which is a target for LSR, we decided to explore the occurrence of CSR-like events joining $S\mu$ to the 5' flanking region of $\Psi\gamma$. We indeed identified such breaks using a consensus strategy anchored on a conserved sequence of human $C\gamma$ genes. Among all breaks upstream of a $C\gamma$ gene, about $0.1^{0/00}$ occurred upstream of $\Psi\gamma$.

It was thus questionable whether such breaks could indeed allow expression of functional mature transcripts joining an in-frame VDJ exon with the $\Psi\gamma$ gene coding sequences. Using both RNAseq data and a RACE-PCR assay designed for specific amplification and validation of a spliced CH1 $\Psi\gamma$ sequence, we were able to characterize a number of such functional transcripts, which deserve consideration as $\gamma 5$ mature transcripts. Their occurrence was considerably less than that of classical mature γ IgH chain transcripts, with a ratio compared to $\gamma 1$ in the range of a 10^4 to 10^5 lower abundance. The repertoire of these $\gamma 5$ transcripts was, however, diversified and the VH usage did not significantly differ from that of other VDJ-C γ transcripts. The level of SHM in $\gamma 5$ transcripts was slightly lower than in classical VDJ-C γ transcripts. Compared to the low number of functional VDJ- $\gamma 5$ transcripts, unspliced or non-functional transcripts were also identified with a relative higher abundance, and indicated that the $\Psi\gamma/\gamma 5$ gene also undergoes a significant level of germline transcription.

While the abundance of $\Psi\gamma/\gamma 5$ transcripts relative to $\gamma 1$ is low, it should be noticed that classical IgG are major products of B-lineage cells which are abundantly distributed in human body fluids and usually reach a concentration of about 10g/liter in plasma. A fifth IgG class expected to be one hundred thousand fold lower than IgG1 would still be present at levels around 100 μ g/liter and might be detectable as a rare component of some body fluids by MS.

Notwithstanding the difficulty of using MS in order to distinguish a rare antibody within an abundant mixture of proteins notably made up of classical and plentiful IgG, we looked for the signature of $\Psi\gamma/\gamma 5$ tryptic peptides in various types of human samples and data sets. Several of these peptides (more specially those included in the Fc portion of the potential $\Psi\gamma/\gamma 5$ gene product) were found, notably in human urine samples. Exploration of public databases of MS experiments also identified the occurrence of $\Psi\gamma/\gamma 5$ -encoded peptides in multiple samples.

Because adequate rearrangements were found together with functional transcripts and identification of the corresponding peptides, we thus think that the $\Psi\gamma$ gene can no longer be considered as a pseudo gene but rather as the C γ 5 gene.

To further check functionality of the corresponding IgG5, adapted versions of the therapeutic human IgG1 antibodies rituximab and trastuzumab were constructed.

γ 5-rituximab (and γ 5-trastuzumab) revealed both conventional IgG functions and unique properties. While assembled Ig were produced by stably transfected plasma cells, transient transfection of CHO and HEK293 cells in conditions providing high-rate production of IgG1 or IgG4 only yielded minute amounts of intact IgG5, together with abundant Fab and Fc fragments. The full-length IgG5 and the Fab fragments maintained antigen-recognition and expression of the idiotype, some level of complement activation and ADCC but to a much lower extent than with IgG1, was also detected. The most surprising property of IgG5 was in fact its unique propensity for auto-cleavage in conditions where IgG1 is perfectly stable such as cell culture supernatants. Even after addition of protease inhibitors, IgG5 indeed rapidly split into Fc and Fab fragments; the latter retained antigen-binding but were of small molecular weight.

Since human body fluids are rich in various proteases, it is thus clear that the *in vivo* half-life of IgG5 in its complete form is likely to be very short, making it most likely a precursor of low-size Ag-binding “mini-bodies”. The small size of such expected proteins also likely explains why we more easily detected IgG5 tryptic fragments in the analysis of human urine proteins than from purified plasma Ig. In urine, proteins with a mass less than 50KDa can pass freely, in contrast to full-size Ig and fragmented Ig are thus likely to be enriched. By contrast, in serum, micrograms of IgG5 or IgG5 fragments are most likely to be masked by the abundance of large serum proteins and notably of classical IgG representing grams per liter.

Interestingly from a functional point of view, monovalent Fab fragments devoid of effector function might bind antigen and contribute to tolerance. Fc fragments released by IgG proteolysis are indeed known for anti-inflammatory properties^{15,18}. Partial nicking

of the IgG hinge by microbial proteases or tumor associated metalloproteases has also been demonstrated to yield monovalent antibodies with suppressive properties¹⁹. From an evolutionary point of view, it is noteworthy that the $\Psi\gamma/\gamma 5$ gene is present with a functional coding sequence not only in humans but also in other old-world primates. The available gorilla and chimpanzee sequences notably show perfect preservation of the unique hinge region sequence which joins the Fab and Fc fragments and which appears to promote spontaneous cleavage in humans.

Altogether, IgG5 appears as the tenth subclass of human antibodies. It is clearly the least abundant IgG subclass, but the expected amount indicated by our experiments is close to or lower than the observed concentrations of IgE and IgD (around 100 and 40 μ g/L, respectively), other rare human Igs but with dramatically important functional effects in both protection and allergy. A next step will be to design specific assays capable of differentiating IgG5 production from that of the other antibodies and determine how IgG5 antibodies are regulated in health and disease. Such explorations will help understand the status of this long hidden member of the human “antibody planetary system”. They will help ascertain if IgG5 is either an emerging protein encoded by a nascent gene, or already a protein with a significant specific immune function (likely immunosuppression), or is simply a remnant or phantom, encoded through random gene duplication with progressive accumulation of mutations before finally being inactivated over time.

References

1. Hayashida, H. *et al.* Concerted evolution of the mouse immunoglobulin gamma chain genes. *EMBO J* **3**, 2047–2053 (1984).
2. Hirano, M., Das, S., Guo, P. & Cooper, M. D. The evolution of adaptive immunity in vertebrates. *Adv. Immunol.* **109**, 125–157 (2011).
3. Garred, P., Olsen, J., Mollnes, T. E., Bilde, T. & Glahn, B. E. Biocompatibility of urinary catheters. Effect on complement activation. *Br J Urol* **63**, 367–371 (1989).
4. Schur, P. H. IgG subclasses. A historical perspective. *Monogr Allergy* **23**, 1–11 (1988).
5. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* **5**, 520 (2014).
6. Michaelsen, T. E., Frangione, B. & Franklin, E. C. Primary structure of the ‘hinge’ region of human IgG3. Probable quadruplication of a 15-amino acid residue basic unit. *J. Biol. Chem.* **252**, 883–889 (1977).
7. Ellison, J. & Hood, L. Linkage and sequence homology of two human immunoglobulin gamma heavy chain constant region genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 1984–1988 (1982).
8. Flanagan, J. G. & Rabbitts, T. H. Arrangement of human immunoglobulin heavy chain constant region genes implies evolutionary duplication of a segment containing gamma, epsilon and alpha genes. *Nature* **300**, 709–713 (1982).
9. Pinaud, E. *et al.* The IgH locus 3’ regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* **110**, 27–70 (2011).

10. Takahashi, N. *et al.* Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of a gene family. *Cell* **29**, 671–679 (1982).
11. Bensmana, M., Huck, S., Lefranc, G. & Lefranc, M. P. The human immunoglobulin pseudo-gamma IGHGP gene shows no major structural defect. *Nucleic Acids Res* **16**, 3108 (1988).
12. Boyer, F. *et al.* CSReport: A New Computational Tool Designed for Automatic Analysis of Class Switch Recombination Junctions Sequenced by High-Throughput Sequencing. *J. Immunol.* **198**, 4148–4155 (2017).
13. Edelman, G. M. *et al.* The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **63**, 78–85 (1969).
14. Bruhns, P. & Jönsson, F. Mouse and human FcR effector functions. *Immunol. Rev.* **268**, 25–51 (2015).
15. Vafa, O. *et al.* An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations. *Methods* **65**, 114–126 (2014).
16. Rouaud, P. *et al.* Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region. *J. Exp. Med.* **211**, 975–985 (2014).
17. Cogné, M. *et al.* Locus Suicide Recombination actively occurs on the functionally rearranged IgH allele in B-cells from inflamed human lymphoid tissues. *bioRxiv* 430215 (2018). doi:10.1101/430215
18. Blumberg, R. S., Lillicrap, D. & IgG Fc Immune Tolerance Group. Tolerogenic properties of the Fc portion of IgG and its relevance to the treatment and management of hemophilia. *Blood* **131**, 2205–2214 (2018).

19. Brezski, R. J. *et al.* Tumor-associated and microbial proteases compromise host IgG effector functions by a single cleavage proximal to the hinge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 17864–17869 (2009).

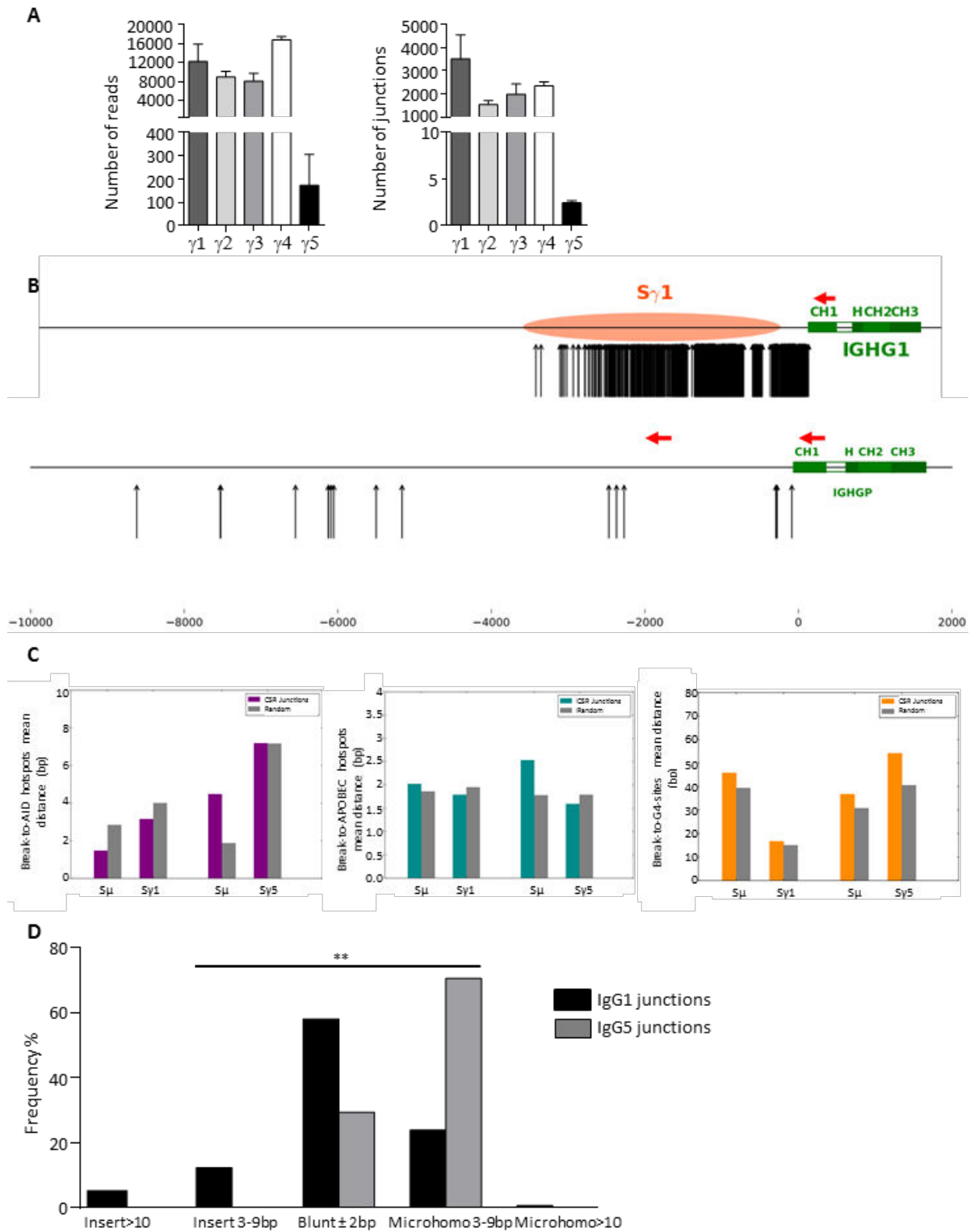


Figure 1: Number, position of breaks and structure of human repaired S μ - ψ γ junctions.

(A) CSR reads (left) and junctions (right) of S γ regions and 5' flanking regions of ψ γ were studied in human tonsil B cells from different individuals. Data represent mean numbers (reads or junctions) $\pm$ SEM. (B) Maps reporting breaks observed in sequenced S μ -S γ 1 compared to S μ - ψ γ junctions. (C) Mean distance to AID target sites (left), APOBEC3 (middle) and G-quadruplex (right) sites. (D) Structure of repaired junctions with regards to mean number of inserted nucleotides and length of microhomology (microhomo) between broken ends for S μ -S γ 1 and S μ - ψ γ 5.

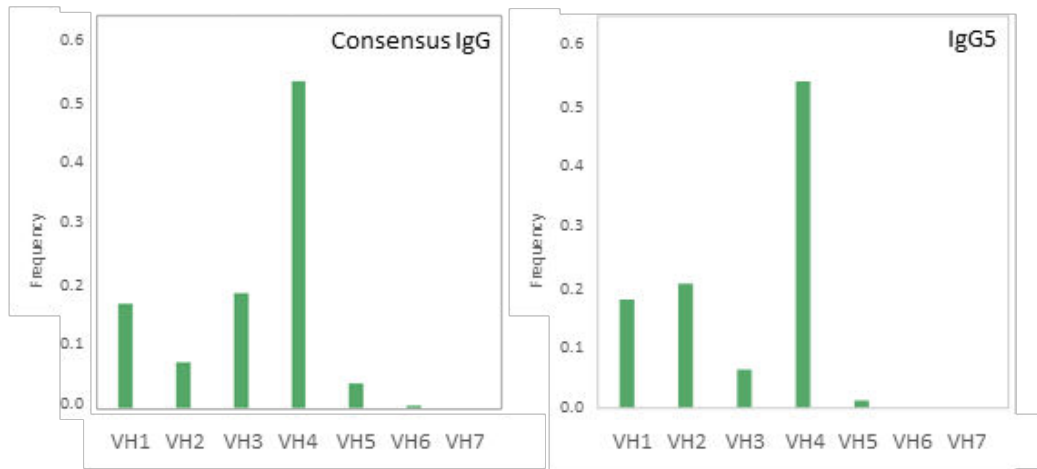
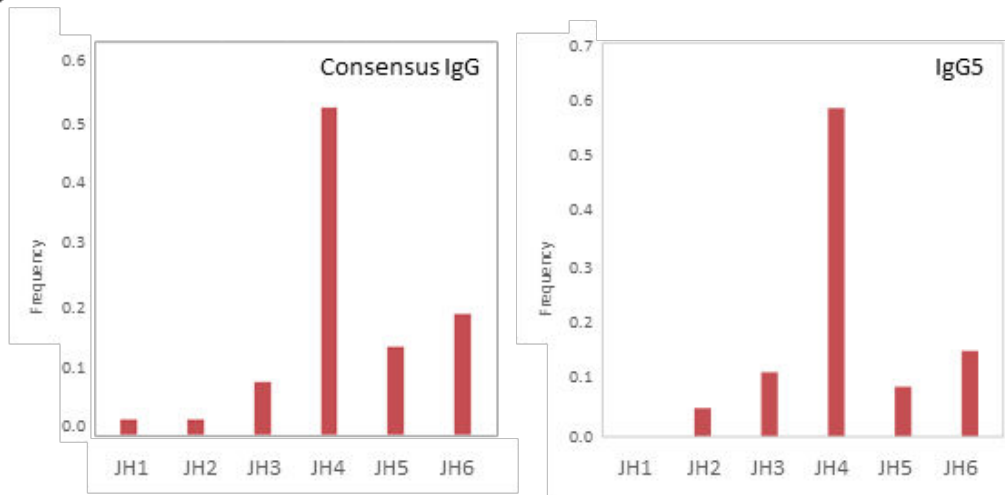
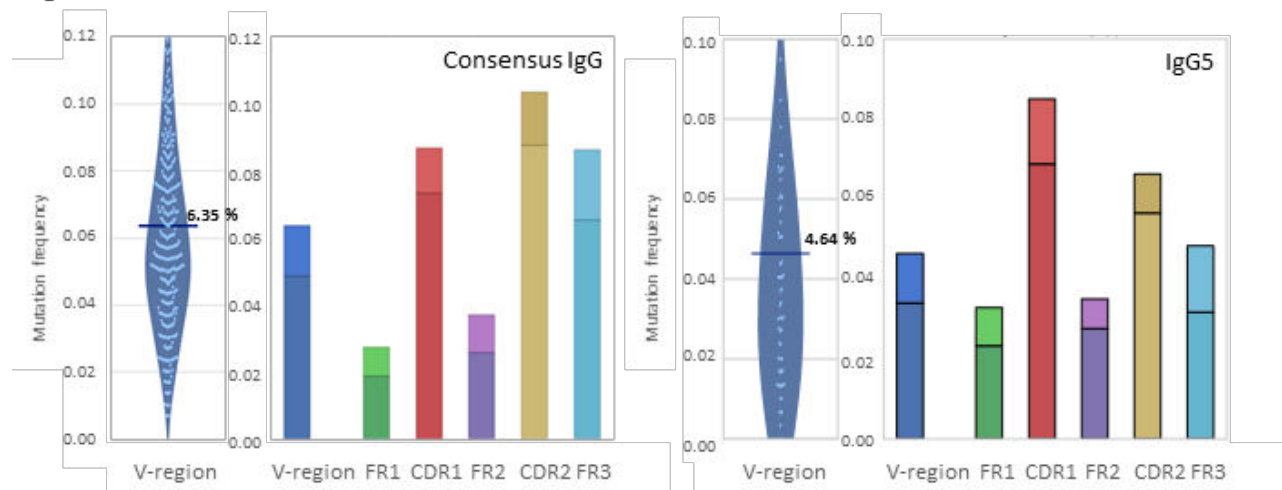
A**B****C**

Figure 2: IgG5 VDJ repertoire and mutations.

VDJ repertoire was studied in tonsil B cells after NGS sequencing of RACE products generated using either Cy consensus (left) or Cy5 (right) specific reverse primers. (A) Usage of VH and JH gene segments is shown. (B) Mutation frequencies in the full V region and in the various subdomains (FR1, CDR1, FR2, CDR2 and FR3) are shown.

A

CH1
 IgG1 RSTNGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPSPNTRVDRKV
 IgG2 A-----C-R--ES-----T--NF--T--D-----T--
 IgG3 A-----C-R-----T-----R--
 IgG4 A-----C-R--ES-----K--T--D-----R--
 IgG5 A-----V--R-V-E-----RS-----T--D-----T--

HINGE
 IgG1 EPKSC..DKTHICPPCP
 IgG2 -R-C-VE.....
 IgG3 -L-TPLG-T----R--EPKSCDTFPFCPRCPPEPKSCDTFPFCPRCPPEPKSCDTFPFCPRCP
 IgG4 -S-YGFP.....S--
 IgG5 ---TPCC-T-----A

CH2
 FcγRI binding FcγRn binding FcγRn binding N-glycosylation FcγRn binding
 IgG1 APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 IgG2 --FVA-----Q--M-----F--F-----V-----G-----T--
 IgG3 -----Q-K-----F-----F-----T-----
 IgG4 --F-----Q--Q-----F-----G--SS-----
 IgG5 TT-F-----W-----H-----V-N-----R-----G-----T--

CH3
 N-glycosylation FcγRn binding
 IgG1 GQPREPQVYTLPPSRDELTRNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
 IgG2 -----E-M-----M-----I-----RF-----
 IgG3 -----E-M-----S-----N-----M-----E-----L--
 IgG4 -----QE-M-----T-----M-----N-----G-----
 IgG5 -----QR.M-----T-----M-----N-----G-----

M1M2
 IgG1 ELQLEESCAEAQDGLDGLWTTITITIFITLFLSVCYSATITFFKVKWIFSSVVDLQQTIIIPDYRNMIQGA
 IgG2 -----V-----R-----
 IgG3 -----V-----R-----
 IgG4 -----V-----R-----
 IgG5 -----V-----V-----

B

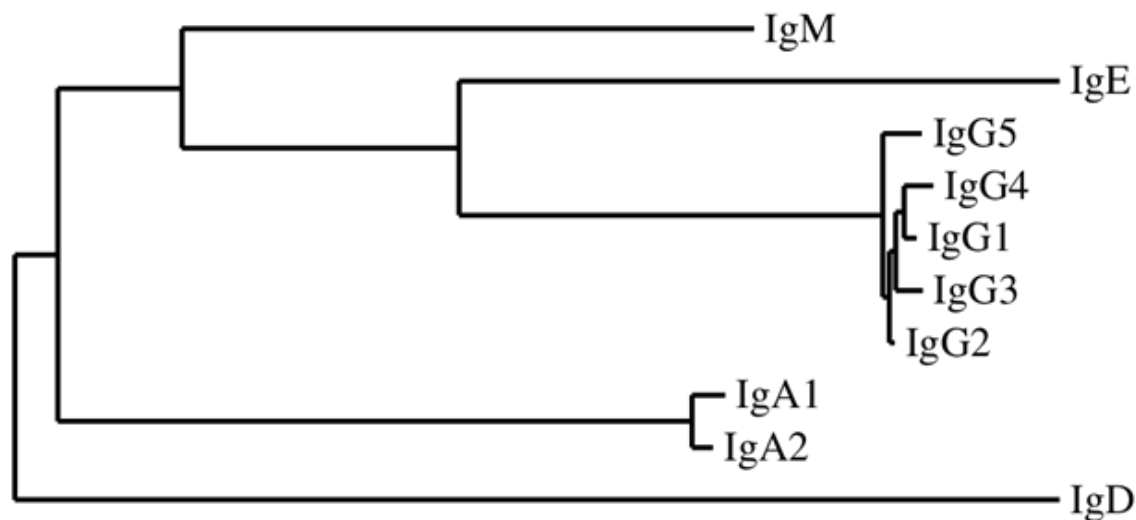


Figure 3: $\Psi\gamma$ coding sequence.

(A) Comparison of the $\Psi\gamma/\gamma 5$ gene coding sequence to $\gamma 1$ - $\gamma 4$ subclasses. N-glycosylation sites are boxed. Specific $\gamma 5$ peptides identified by MS are underlined in grey. (B) Phylogenetic tree.

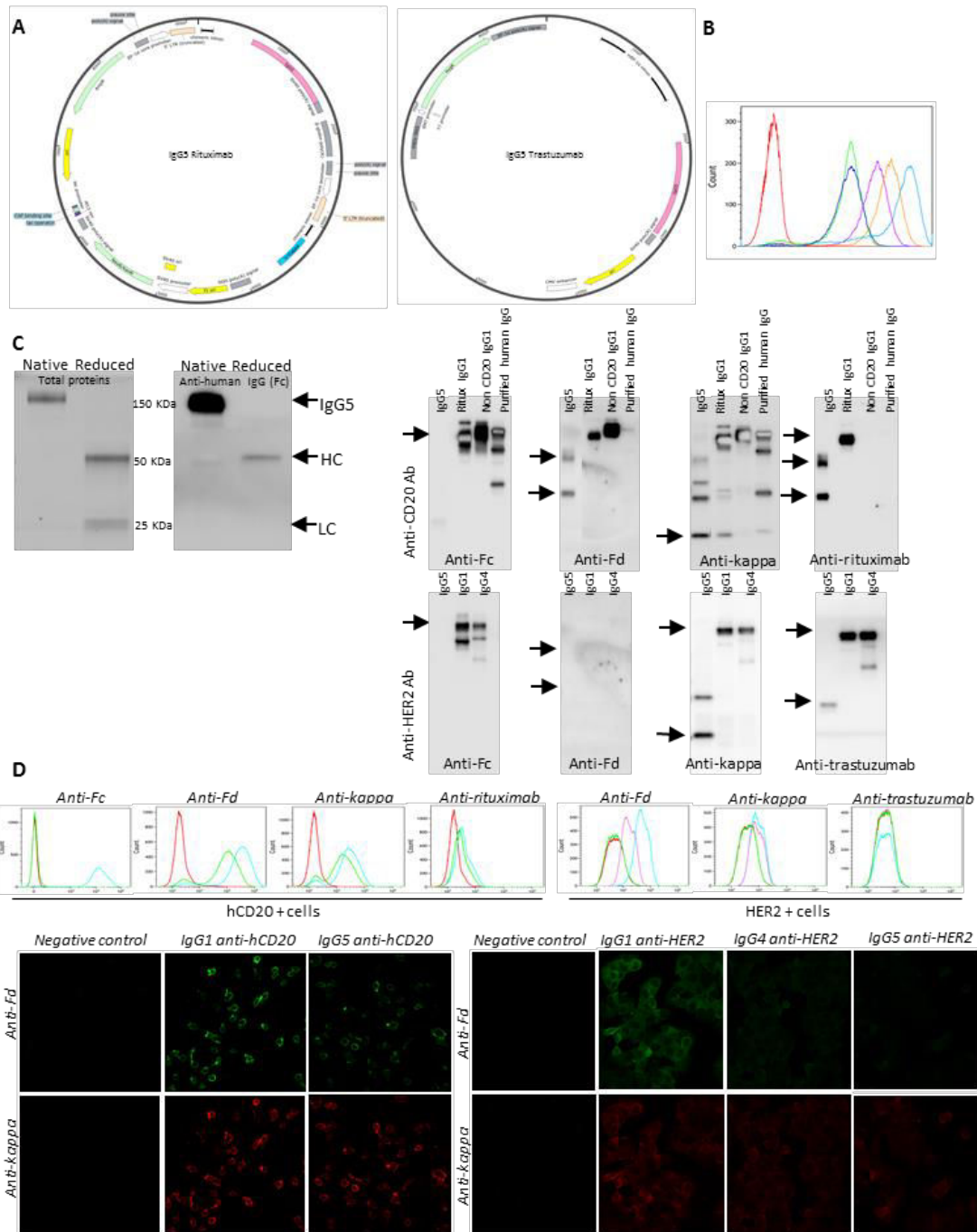


Figure 4: Production of recombinant specific IgG5 mAbs.

(A) Maps of vectors encoding IgG5 versions of rituximab (left) and trastuzumab (right). (B) Binding characteristics of anti-CD20 antibody measured by flow cytometry on hCD20-expressing variant (EL4-CD20). Red curves represent negative control, green curves represent 10 μ g/ml IgG5 anti-hCD20. Other curves represent IgG1 anti-hCD20 at 10 μ g/ml (light blue), 0.1 μ g/ml (orange), 0.05 μ g/ml (purple) and 0.01 μ g/ml (dark blue). (C) Western blot analysis of recombinant IgG5 Abs produced either in stably transfected plasma cells (left) or in transiently transfected Expi-CHO cells (right). Fc, Fd, rituximab and kappa regions from IgG5, IgG1 and control antibodies were analyzed. (D) Analysis of specific binding to target cells (hCD20+ DHL4 cells, or HER2+ MCF7 cells) for spontaneously released Ig fragments upon *in vitro* IgG5 production. Red curves represent negative controls, light blue curves represent IgG1 anti-hCD20 (10 μ g/ml) or anti-HER2, purple curves represent IgG4 anti-HER2, green curves represent IgG5 anti-hCD20 (10 μ g/ml) or anti-HER2.

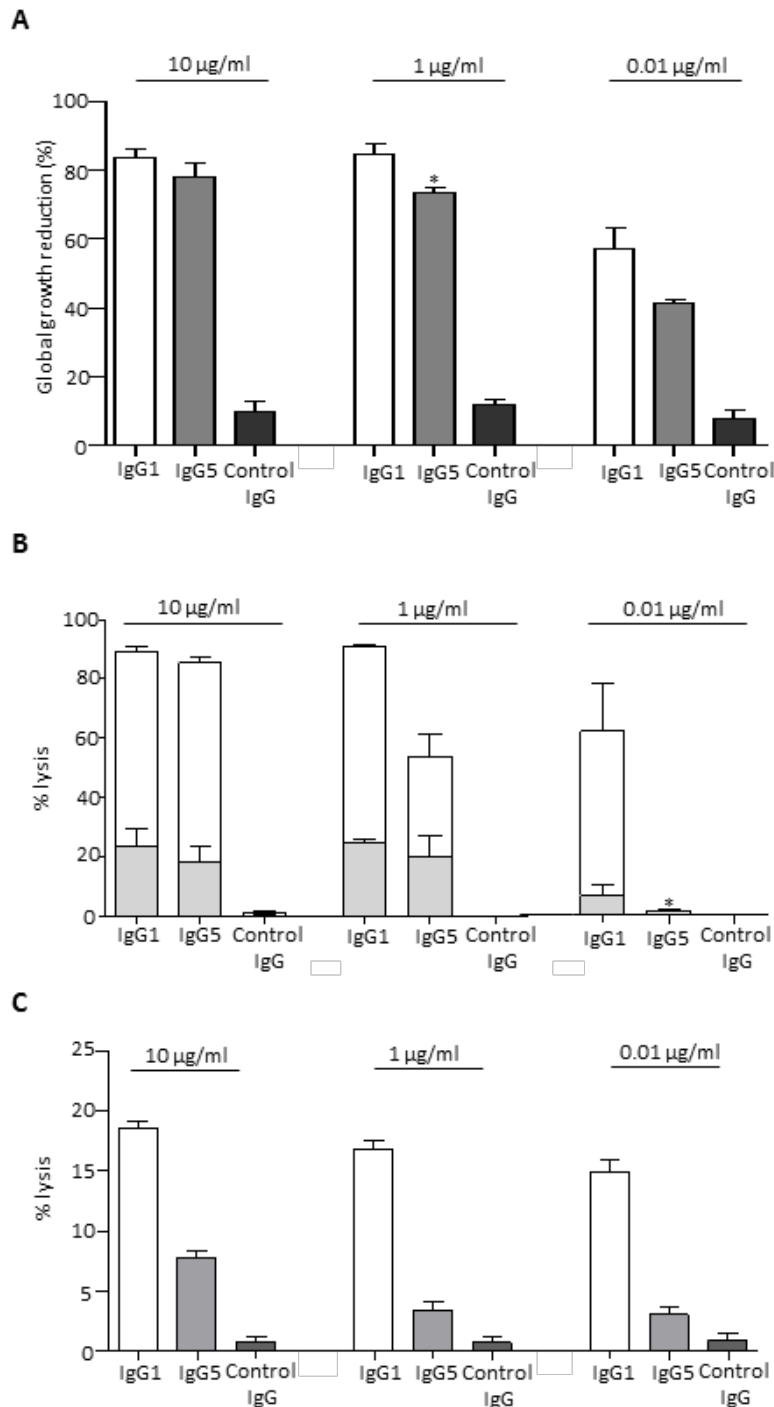


Figure 5: Functional evaluation of anti-CD20 IgG5 mAb.

Evaluations were carried out with IgG5 mAb produced *in vitro* in the standard Expi-CHO system, and thus included a low amount of full-size IgG5 together with a large amount of cleaved IgG5. (A) Direct effects of anti-CD20 mAb preparations (10 µg/mL, 1 µg/mL or 0.01 µg/mL) were measured by MTS assay on DHL4 cells. (B) Anti-CD20 mediated complement-dependent cytotoxicity evaluated against human DHL4 target cells incubated with various mAb concentrations (10 µg/mL, 1 µg/mL or 0.01 µg/mL) in the presence of either active (open bars) or heat-inactivated human serum (grey bars). Late apoptotic cells were evaluated by cell cytometry. (C) ADCC induced by anti-CD20 antibodies in DHL4 cells (10 µg/mL, 1 µg/mL or 0.01 µg/mL).

Article 4

Discreet structural and functional differences between the membrane forms of human IgA1 and IgA2

Zeinab Dalloul¹, Batoul Wehbi^{1,2}, Stéphanie Durand-Panteix¹, Mylène Brousse³, Christelle Oblet¹, Florence Glaudet⁴, Jean-Claude Aldigier¹, Yolla El Makhour², Jeanne Cook-Moreau¹ & Michel Cogné

(Article en préparation)

La survie et la fonction des lymphocytes B requièrent l'expression d'immunoglobulines (Ig) sous la forme du récepteur membranaire B (BCR), qui transmet par lui même un signal de survie tonique et favorise également l'activation cellulaire lors de la liaison spécifique à un antigène permettant ainsi l'initiation des réponses humores. La transduction du signal est fournie par les parties intracytoplasmiques des CD79a et CD79b qui possèdent des motifs ITAM (motif d'activation à base de tyrosine d'immunorécepteur). La phosphorylation d'ITAM par les kinases associées au BCR après l'activation du BCR induit la cascade de signalisation dans les lymphocytes B.

Il existe de multiples indications selon lesquelles ce signal varie entre les formes membranaires des différentes classes d'Ig. Parmi les cinq classes d'Ig humaines, l'IgA est l'isotype le plus abondant au niveau des muqueuses et il est divisé en deux sous-classes d'IgA: IgA1 prédominantes et IgA2, qui diffèrent dans leur structure et leur distribution dans l'organisme. Afin de vérifier les différences entre ces deux populations de cellules B, nous avons exploré différents paramètres parmi les lymphocytes B circulants humains produisant des IgA et en comparant deux modèles de knock-in spécifiques de souris mis au point pour favoriser l'expression d'IgA1 ou IgA2 humaines sur les lymphocytes B de souris. Ces modèles ont été obtenus en introduisant l'un des gènes humains α à la place de la région switch endogène μ ($S\mu$) dans le locus IgH. Des différences frappantes apparaissent dans ces modèles où l'IgA2 s'est révélée beaucoup moins efficace que l'IgA1 pour soutenir la survie des cellules B, permettant alors seulement la production d'IgA2 dans les cellules B produisant en plus un BCR de substitution (ce que nous avons réalisé par l'expression de la protéine virale LMP2A).

Découvrant une faible production d'IgA2 chez les souris hétérozygotes pour le knock-in du gène $C\alpha 2$, et son absence totale chez les animaux homozygotes, nous nous sommes demandés si l' $\alpha 2$

HC humain s'assemblait correctement avec la chaîne légère ? Nous avons croisé des souris hétérozygotes avec les «souris knock-in Kappa Switch» qui expriment une chaîne légère fonctionnelle d'immunoglobuline humaine (hLC afin obtenir une IgA dont les régions constantes soient entièrement humaines (notamment CH1 et C κ qui doivent s'apparier). Les souris α 2KI / + KIKS / KIKS ont montré une population de B accrue par rapport aux souris α 2KI homozygotes. De plus, ces souris ont présenté une augmentation significative de la synthèse plasmatique d'IgA2. Plus tard, nous voulions améliorer la production d'IgA2. Nous avons donc essayé d'améliorer le développement des cellules B chez les souris α 2KI / + en croisant des souris hétérozygotes avec des souris DHLMP2A-KI, où la protéine LMP2A du virus d'Epstein-Barr est connue pour son rôle de soutien du développement lymphocytaire B et différenciation des cellules plasmocytaires. Dans ces conditions double-hétérozygotes, les signaux de survie donnés par LMP2A exprimé par un allèle IgH permettent une maturation B..., et un peu d'expression d'IgA2 humaine via le second allèle IgH α 2KI.

Malgré tout, ces conditions d'expression d'un BCR IgA « passager », n'ont pas permis de produire d'IgA2 spécifiques en réponse à une immunisation, et ce modèle garde des limitations intrinsèques, même si un petit contingent d'IgA2 circulantes est finalement obtenu.

Enfin, l'exploration du modèle de souris α 2KI a permis d'identifier des différences fonctionnelles entre les sous-classes d'IgA1 et d'IgA2 humaines. Ce modèle peut être utile pour l'étude et la compréhension des mécanismes des maladies liées aux dépôts passifs d'IgA, qui impliquent en règle chez l'homme des IgA1.

Discreet structural and functional differences between the membrane forms of human IgA1 and IgA2

Zeinab Dalloul¹, Batoul Wehbi^{1,2}, Stéphanie Durand-Panteix¹, Mylène Brousse³, Christelle Oblet¹, Florence Glaudet⁴, Jean-Claude Aldigier¹, Yolla El Makhour², Jeanne Cook-Moreau¹ & Michel Cogné¹

¹Limoges University, CNRS UMR 7276 and INSERM U1262, CRIBL, Faculty of Medicine, Limoges, France.

²Lebanese University, Immunology Unit MICSU, Faculty of Sciences, Beirut, Lebanon.

³B-cell design, Limoges, France.

⁴CHU Dupuytren, Limoges, France.

Correspondence author: cogne@unilim.fr

ZD and BW contributed equally to this work

Abstract

B lymphocyte survival and function require expression of immunoglobulins (Ig) under the membrane B Cell Receptor (BCR) form, which by itself conveys a tonic survival signal, and also supports cell activation upon specific antigen binding at the initiation of antibody responses. There are multiple indications that this signal varies between membrane forms of the various Ig classes. Among the five human Ig classes, IgA is the most abundant isotype mainly produced at the mucosal sites, and further diversified into two IgA sub-classes: a predominant IgA1 and IgA2, which differs in both structure and body distribution. In order to check for differences between these two B-cell populations, we explored various parameters among human circulating B-cells producing IgA, and by comparing two dedicated mouse knock-in models set up in order to promote expression of either human IgA1 or IgA2 on mouse B-lymphocytes. These models were obtained by knocking-in either of the human α genes in place of the endogenous switch μ ($S\mu$) region in the IgH locus. Striking differences appear in these models where IgA2 proved much less efficient than IgA1 to support B-cell survival, then only allowing IgA2 production in B-cells additionally producing a surrogate BCR, i.e. through expression of the LMP2A protein.

Keywords: IgA2, BCR, B cells, α 2KI model.

Introduction

B-lymphocytes express several types of receptors on their cell surface including the B cell receptor or BCR. This receptor is composed of an immunoglobulin associated with the disulfide-linked Ig α /Ig β (or CD79a/CD79b) heterodimer complex. Signal transduction is provided by the intracytoplasmic parts of the CD79a and CD79b which possess ITAM motifs (immunoreceptor tyrosine-based activation motif). ITAM phosphorylation by BCR-associated kinases after BCR activation induces the signaling cascade within the B lymphocytes (Reth and Wienands, 1997). In humans, there are five classes of immunoglobulins: IgM, IgD, IgG, IgE and IgA. IgA is the main immunoglobulin produced in the mucosa constituting a first line of defense against infectious agents and toxins that invade the organism (Brandtzaeg, 2007). Monomeric, dimeric and polymeric forms of IgA have been identified. These forms are responsible for different functions during the immune response (Woof and Kerr, 2006). Two IgA subclasses are present in humans: IgA1 and IgA2. Circulating IgA only includes IgA1 whereas in the mucosa IgA1 and IgA2 coexist. The main structural difference between IgA1 and IgA2 is the absence of an 18 amino acid sequence in the IgA2 hinge region (compared to IgA1) (Woof and Kerr, 2004). The hinge region of IgA1 contains three to five O-linked carbohydrates which are absent in IgA2 (Rifai et al., 2000a). IgM-to-IgA switch is regulated by multiple cytokines (such as TGF- β and IL-10) and by interaction with T cells (Cerutti, 2008; Defrance et al., 1992).

As previously reported, μ replacement by the human $\alpha 1$ gene ($\alpha 1$ KI mice) showed a supportive role for humoral immune responses albeit a reduced number of B lymphocytes. Data also showed that IgA1 promotes activation and differentiation of plasma cells (Duchez et al., 2010a). To date, little is known about the role of IgA2 in conferring specific features to mIgA2⁺ cells compared to mIgM⁺ and mIgA1⁺ cells.

In this study, we checked whether, similarly to $\alpha 1$ HC, $\alpha 2$ HC substitution supported lymphopoiesis and modified B cell fate. For this purpose, we generated $\alpha 2$ KI mice by knocking-in the human C $\alpha 2$ gene downstream of JH (joining gene).

Results

Generation of $\alpha 2$ KI mice

$\alpha 2$ KI mice were generated using the targeting strategy depicted in **Figure 1** and primers are listed in **Table 1**. The secreted and membrane forms of the human $\alpha 2$ HC coding genes were inserted in place of the $S\mu$ gene. The *Neo^R* cassette inserted downstream of the $\alpha 2$ gene and flanked by loxP sites was removed by mating $\alpha 2$ KI mice with E1a Cre transgenic mice.

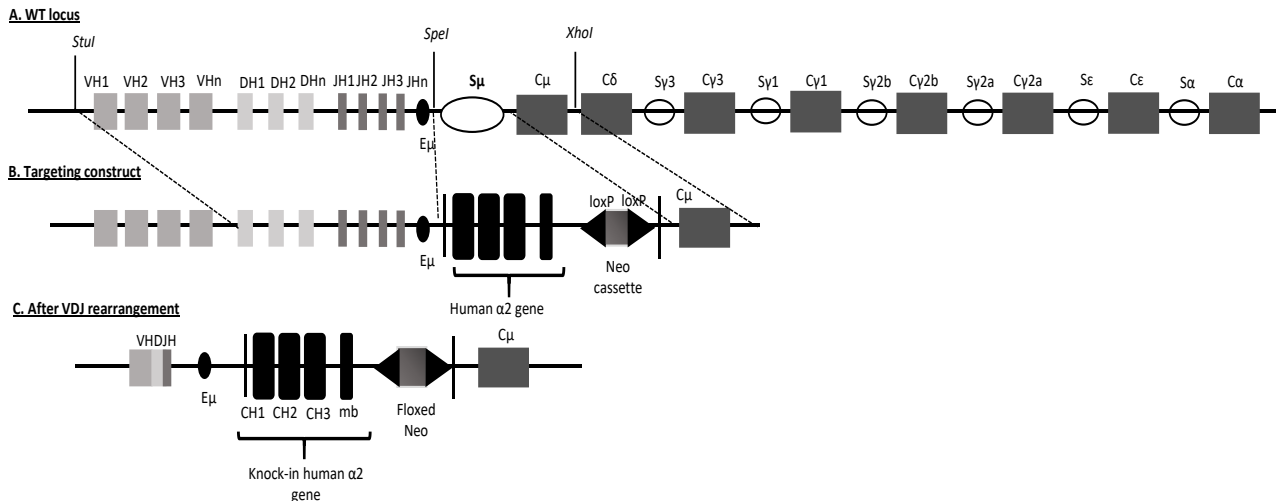


Figure 1: A. Unrearranged WT IgH locus structure. B. Structure of the targeting construct showing the ha2 gene with the floxed neo cassette. C. IgH locus after VDJ recombination and $S\mu$ replacement by ha2 gene in $\alpha 2$ KI mice.

Abnormal B cell development in $\alpha 2$ KI mice

To test $\alpha 2$ HC expression in mutant mice, flow cytometry analysis was conducted on bone marrow and spleen lymphocytes. Results showed that in homozygous $\alpha 2$ KI mice, the percentage of bone marrow B cell was severely decreased whereas it remained normal in heterozygous mice compared to WT. In addition, an expansion in relative percentage of proB/preB cells was observed while immature B cells were largely reduced in number. This can indicate a blockade at the proB/preB to immature B cell transition. Surprisingly, B220+ cells were barely detected in the spleen showing a 16-fold decrease in percentage in homozygous mice but only 2-fold decrease in $\alpha 2$ KI/+ mice. This reduction similarly affected the transitional, follicular and marginal zone B compartments. Consistent with the abolishment of B cell compartments, circulating hlgA2 was barely detectable in $\alpha 2$ KI/+ mice serum but totally absent in $\alpha 2$ KI homozygous mice (data not shown). Due to this low IgA2 production in heterozygous mice and its total absence in homozygous animals, we wondered whether the human $\alpha 2$ HC did not assemble correctly with the murine light chain and consequently BCR density and functionality were affected. We crossed heterozygous mice with the “knock-In Kappa Switch mice” which expresses a functional human

immunoglobulin light chain (hLC) to obtain a fully human IgA. Interestingly, $\alpha 2\text{KI}/+$ KIKS/KIKS mice had increased spleen B populations compared to homozygous $\alpha 2\text{KI}$ mice. In addition, these mice showed a significant increase in plasma IgA2 synthesis. Later, we wished to ameliorate IgA2 production, so we tried to improve B cell development in $\alpha 2\text{KI}/+$ mice by crossing heterozygous mice with $\text{D}_\text{H}\text{LMP2AKI}$ mice, where the Epstein-Barr virus LMP2A protein, as a constitutively active BCR, is known to drive B cell development and plasma cell differentiation as previously described (Casola et al., 2004a). As a result for LMP2A survival signals on B cells, progenitor B cells can differentiate into mature B cells (**Table 1**).

Table 1: Percentage of different B cells populations in bone marrow and spleen analyzed by flow cytometry.

	WT	$\alpha 2\text{KI}/+$	$\alpha 2\text{KI}/\alpha 2\text{KI}$	$\alpha 2\text{KI}/+;$ KIKS/KIKS	$\alpha 2\text{KI}/+;$ DHLMP2A/+	$\alpha 1\text{KI}/\alpha 1\text{KI}$
Bone marrow						
B cells (B220+ CD19+)	44,96	44,58	22,54	40,52	16,54	21,38
Early	5,19	8,95	5,60	3,27	43,27	4,70
Pro-B/pre-B cells (CD43+B220+)	8,66	14,30	88,55	13,08	38,79	90,00
Large PreB	16,12	6,61	5,79	41,06	17,03	5,24
Small PreB	24,94	11,25	0,06	4,59	0,91	0,05
Immature B cells (B220lowIgMlow)	45,09	58,89	0,00	38,00	0,00	0,00
Spleen						
B cells (CD19+)	32,73	40,22	1,16	12,47	9,08	3,08
Transitional B cells (AA4.1+B220+)	19,25	21,34	13,12	10,18	0,00	0,00
FO B cells (CD23+CD21+B220+)	66,73	66,38	40,01	46,68	0,00	0,00
MZ B cells (CD23-/low CD21+B220+)	11,67	9,74	7,95	40,39	98,32	19,81
B1b cells (CD5lowB220+)	1,57	1,61	1,31	2,34	0,00	0,00
Breg (CD23-/CD21high)	0,27	0,27	0,22	0,22	0,50	46,47
B1a (CD23-/ CD21low)	0,51	0,67	37,39	0,20	1,17	33,72

Immunoglobulins production by $\alpha 2\text{KI}$ mice

Concerning endogenous Ig production, similarly to $\alpha 1\text{KI}$ mice, homozygous $\alpha 2\text{KI}$ lacked IgM production as a consequence of $\text{S}\mu$ replacement with $\text{h}\alpha$ chains, whereas normally plasma IgM levels were detected in heterozygous mice (300-400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Figure 2A**). Excepted for the homozygous $\alpha 2\text{KI}$ mice, murine IgG and IgA secretion was not abolished in all αKI mice (**Figure 2B and 2C**). Neither homozygous $\alpha 2\text{KI}/\alpha 2\text{KI}$ nor $\alpha 2\text{KI}/+$ KIKS/KIKS mice produced human IgA2. In contrast, hIgA2 levels successfully increased about 45x in heterozygous $\alpha 2\text{KI}/+$ crossed with $\text{D}_\text{H}\text{LMP2AKI}$ mice in comparison with the $\alpha 2\text{KI}$ mice with a mean titer of 28 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figure 2D**).

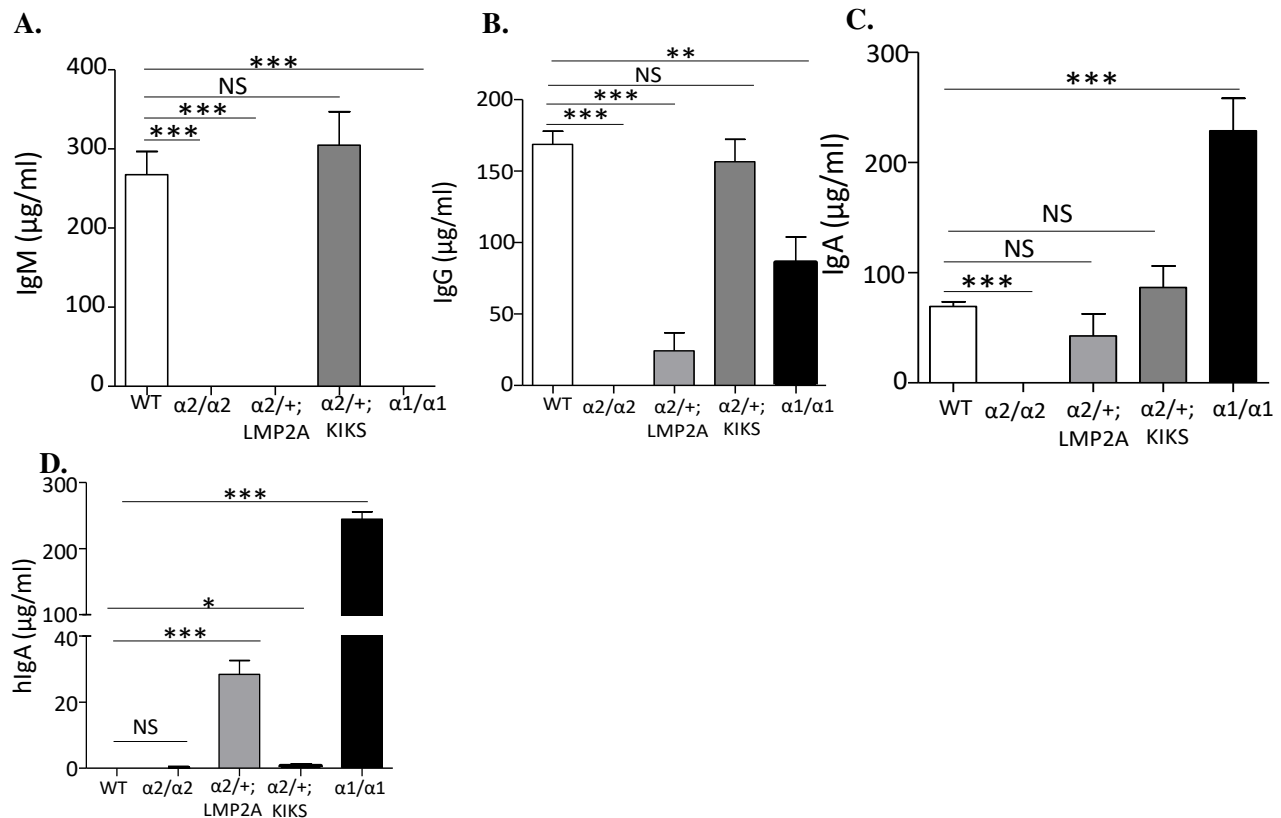


Figure 2: Plasma mIgM (A), mIgG (B), mIgA (C) and hIgA (D) production in different mouse models

hIgA2+ plasma cell functionality

In order to study mutant B cell functionality and activation, we first investigated their presence in primary and peripheral lymphoid organs. Immunofluorescence on lymphoid tissue sections showed antibody secreting cells (ASCs) in the spleen as well as in the enteric lamina propria with hIgA2 deposits along intestinal crypts of α2KI/+ D_HLMP2AKI mice (**Figure 3A**). We next conducted serial *i.p.* immunization of mice with ovalbumin. Despite a slight increase in total hIgA2 plasma levels compared to homozygous mice, no ova-specific IgA2 was found in heterozygous α2KI/+ LMP2AKI mice. These data indicate that in these mice, B cells can produce normal IgA2 molecules but they seem to be unable to undergo normal differentiation and to yield antigen-specific hIgA2 (**Figure 3B**).

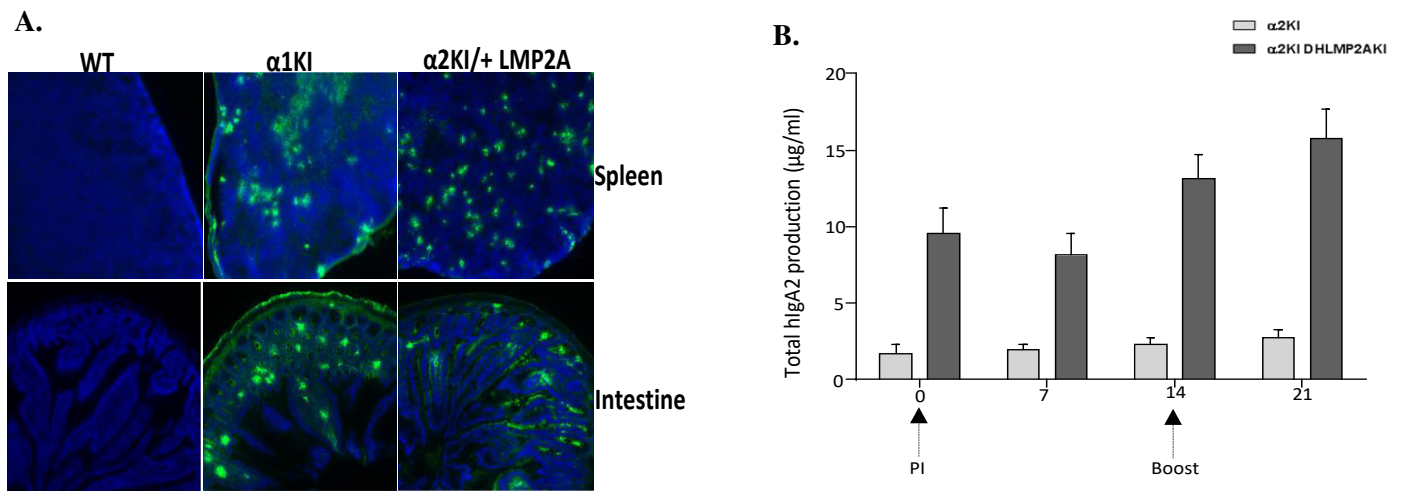


Figure 3: A. Immunofluorescence showing hlgA secreting cells in primary and peripheral lymphoid organs in WT, $\alpha 1KI$ and $\alpha 2KI/+$ D_HLMP2AKI mice. **B.** Total hlgA2 plasma production after *i.p.* ovalbumin immunization of $\alpha 2KI$ and $\alpha 2KI/+$ D_HLMP2AKI mice.

hlgA2 membrane and secreted forms

The membrane anchored α -chain of human IgA exists in two different forms, type I or type II isoforms (220 bp and 238 bp respectively) which are generated after alternative splicing of α -chain mRNA. It has already been reported that isoform type can differ between cells depending on the IgA isotype they produce (Leduc et al., 1997a). We studied the differential expression of type I and type II membrane α -mRNA by RT-PCR on splenocyte mRNA from $\alpha 1KI$ and $\alpha 2KI$ mice.

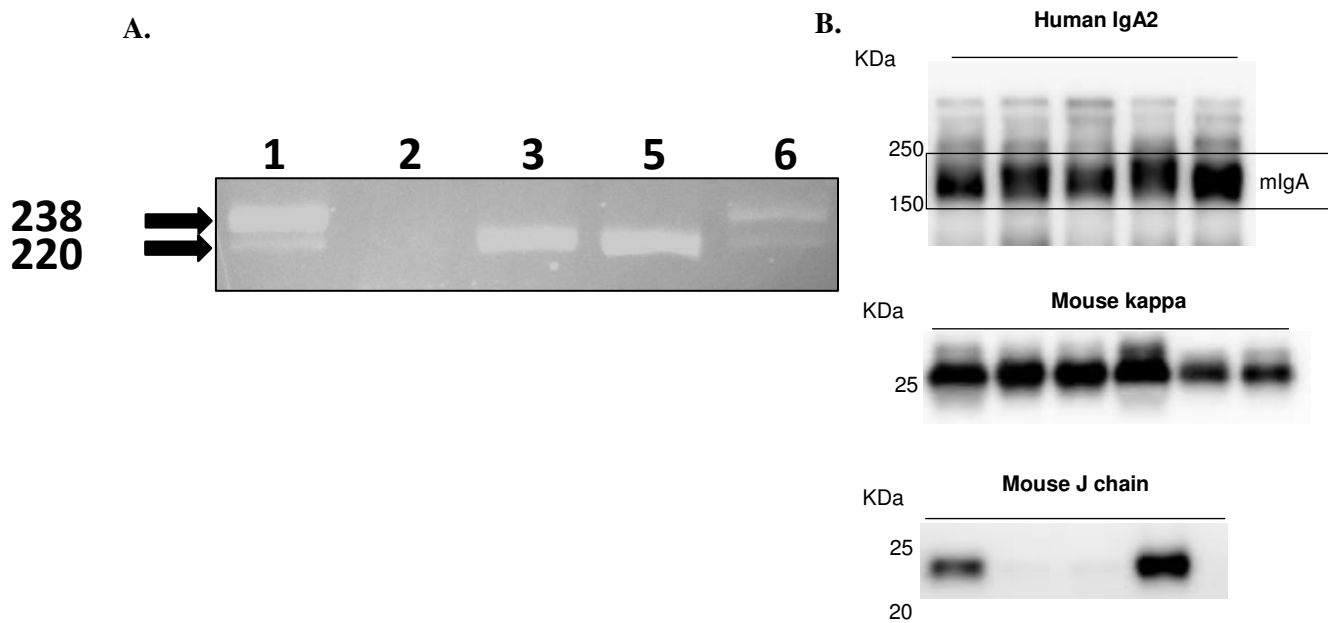


Figure 4: A. RT PCR showing 220bp band for hlgA isoform I and 238 bp for hlgA isoform II in different mouse models (2: WT; 3: $\alpha 2DHLMP2A$; 4: $\alpha 2KIKS$ et 5: $\alpha 1KI$). Human tonsil extracts were used as positive control (1). **B.** Human IgA2, mouse kappa-light chain and J chain in $\alpha 2KI/+$ D_HLMP2AKI mice plasma assessed by western blot.

Human tonsils used as a positive control showed both type I and type II isoforms. $\alpha 1$ KI mice carried both transcript isoforms with slight predominance of the type II whereas the $\alpha 2$ KI mice carried exclusively the type I isoform (**Figure 4A**). On the other hand, western blot analysis allowed us to identify IgA2 monomeric, dimeric and polymeric forms in the plasma of $\alpha 2$ KI mice. These immunoglobulins were normally assembled to kappa-light chain and with J chain in their oligomeric forms (**Figure 4B**). Interestingly, these data are consistent with previously reported findings.

Repertoire analysis of human $\alpha 1$ and $\alpha 2$

The repertoire diversity of both human IgA1 and IgA2 was investigated by Illumina high-throughput sequencing. Total RNA was extracted from patients' peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Results showed that during VDJ recombination, there was no significant difference in V usage by both $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes. In addition, IgHV3 and IgHV4 families seem to be the most frequently used by both α genes (**Figure 5A**). At the same time, V-region hypermutation was assessed; data demonstrated that hypermutation frequency was similar in both $\alpha 1$ and $\alpha 2$ V region. As expected mutational frequency was higher in the CDR than in the framework region (**Figure 5B**).

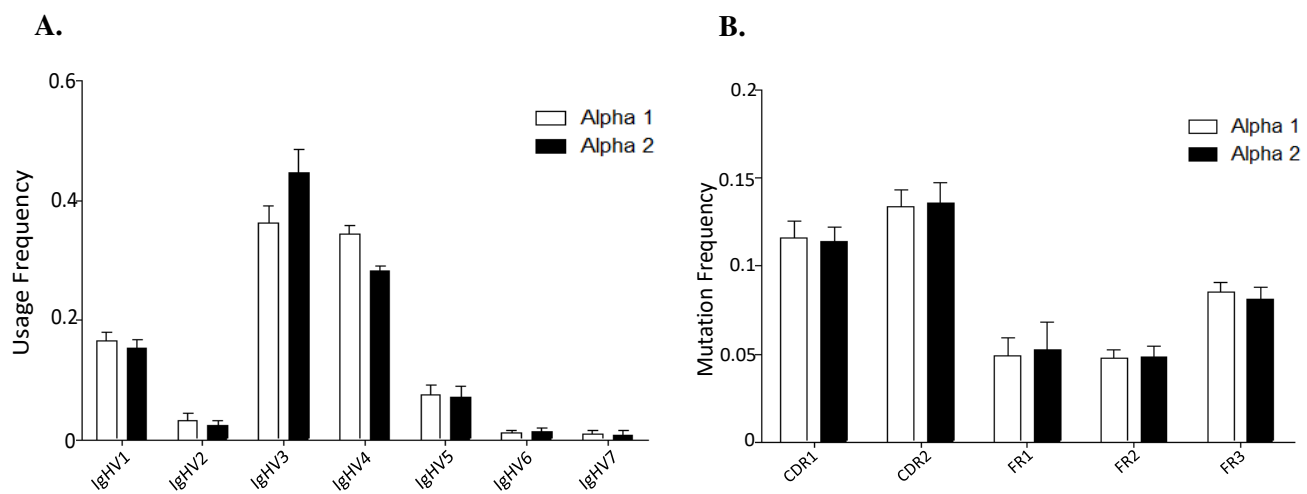


Figure 5: A. V usage and **B.** somatic hypermutation frequency in $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes assessed by Illumina sequencing.

Discussion

IgA is the predominant synthesized immunoglobulin in mammals. Human serum is 90% IgA1 but only 10% IgA2, whereas in external secretions, IgA2 can be increased up to 50% (Rifai et al., 2000b). Regulation of differential synthesis of the two IgA subclasses, which can reveal different functionalities, remains poorly understood. In a previous study, we demonstrated that there is differential signaling between IgA1 and IgA2 BCRs (Leduc et al., 1997b). Later, we examined the impact of forced IgA1 expression throughout murine B cell differentiation by knocking in the human C α Ig gene in place of the S μ region (Duchez et al., 2010b). Concerning IgA2 BCR effector functions, little is known about IgA2+ cell characteristics compared to IgA1+ and IgM+ cells. Similarly to α 1KI mice, we recently generated an α 2 knock-in mouse model in which the S μ region was replaced by an C α 2 Ig gene in order to distinguish transgenic IgA2 expression from endogenous murine class switching. In this study, we compared both α 1KI and α 2KI models for membrane and secretory forms of IgA and explored IgA2 BCR contribution to early B cell development and peripheral antigen-dependent maturation.

Homozygous α 2KI mice rapidly revealed a major defect in B cell development in comparison to WT or α 1KI littermates, suggesting that during early B lymphopoiesis, IgA2 pre-BCR or BCR exerts a toxic effect, or delivers insufficiently strong signals for B cell survival. Alternatively low IgA2 production by heterozygous mice and its total absence in homozygous mice could be due to mis-association of human heavy chain constant domains and the endogenous mouse light chains. Since the primary question in these mice might be stability of the Ig molecule where human constant regions are paired with mouse constant domains, we crossed α 2KI mice with Knock-In Kappa Switch (KIKS) mice which express a functional human C κ light chain domain (Bonaud et al., 2015a). IgA2 secretion was improved in heterozygous α 2KI/ KIKS compared to homozygous and heterozygous α 2KI animals. Later, we checked whether, similarly to IgG4, IgA2 would be able to undergo Fab arm exchange (Rispen et al., 2014; vanderNeutKolschoten et al., 2007) and thus support B cell development. This light chain exchange can cause non-covalent linkage of the heavy chain with the light chain. Our results showed that the human IgA were unable to spontaneously form hybrid antibodies (Data not shown).

It was previously reported that the Epstein-Barr virus protein LMP2A supports B cell survival and differentiation as a constitutively active BCR (Casola et al., 2004b). In order to understand whether IgA2 BCR signaling strength was insufficient to support cell survival, we bred α 2KI mice with D μ LMP2A mice. Double heterozygous mice showed improved B cell development despite a partial early blockade reducing B cell numbers compared to WT mice. IgA2 secretion was also enhanced albeit with an altered ability to produce specific anti-ovalbumin antibodies. Interestingly, our results revealed that, in these mice, plasma IgA2 were normally associated with kappa light chains and J chains.

Consistent with previously published data (Leduc et al., 1997b), we reported that IgA2 exclusively carried the type I membrane isoform in α 2KI mice, in contrast to α 1KI mice which produce both type I and type II membrane isoforms.

Repertoire analysis of human B cells showed no difference in V usage or in hypermutation frequencies between IgA1 and IgA2 isotypes.

Finally, exploration of the α 2KI mouse model identified functional differences between human IgA1 and IgA2 subclasses. This model can be useful in the characterization of IgA2-related diseases.

Materials and Methods

Mice

Mouse experiments followed European regulations applied in France by decree no 2013-118 in February 2013. All wild type (WT) and transgenic mice used in this study were maintained in the Limoges University animal facilities at 21–23 °C with a 12-h light/dark cycle. Ella-Cre transgenic mice were a kindly gift from Dr. H. Westphal (Bethesda, MD). α 1KI and KIKS mice were generated as previously described (Duchez et al. 2010 and Bonaud et al., 2015). DH-LMP2A mice (Casola et al. 2004) were a gift from Dr. Rajewsky.

α 2KI generation

The α 2KI construct included a 4.2-kb α 2 genomic fragment amplified from the DHL4 cell line (from a ClaI site added 150 bp upstream of CH1 to a ClaI site added downstream from the last polyadenylation signal). The construct is flanked by a ~5-kb long 5' arm (a StuI-SpeI fragment located upstream of mouse S μ) and a ~5-kb long 3' arm (the C μ gene cloned as an XhoI fragment). A 1.3-kb ClaI-SalI Neo^R gene flanked by loxP sites was also inserted between the α 2 gene and the 3' arm, as previously described (Duchez et al., 2010a). CK35 embryonic stem (ES) cells were transfected with 8 μ g linearized targeting vector by electroporation and selected using G418 (400 μ g/mL). Recombinant clones were identified by PCR (primers listed in **Table1**). After germline transmission, mice were bred with Ella cre mice to delete the Neo^R cassette.

Table1: Names and sequences of the primers used in this study.

Primers	Sequence 5' -> 3'	Use
5' Arm 1	GAAAGGACTAAGACCCAGG	ES cells and agouti mice screening (5' arm)
5' Arm 2	GCAGCATGGGGGAGGTG	
3' Arm 1	CATAGCGTTGGCTACCCG	ES cells and agouti mice screening (3' arm)
3' Arm 2	TTCTCTCTCATGCCCTGCTT	
Screening For mutant allele	CCCTATGTGGTGCTGGACTT	Mice screening
Screening Rev mutant allele	GCGAGGTGGCTAGGTACTTG	
Screening For wild type allele	CAGGTCGGCTGGACTAACTC	Mice screening
Screening Rev wild type allele	CATCTCACCCCATCTCAGCTA	
5' ClaI α 2	TAATCGATCACCTGTCCTCCTGGGGACATGGCAT	α 2 ClaI amplification and construction
3' ClaI α 2	TGATCGATTAGCCTCAGCCTCATTCAAGATCA	

Mouse immunization

8-week-old mice $\alpha 2\text{KI}$ and $\alpha 2\text{KI}/+$ LMP2AKI were intraperitoneally primo-immunized with 50 μg ovalbumin (Sigma) per animal in 50% complete Freund adjuvant (Sigma). Mice were boosted 14 days later using antigen in 50% incomplete Freund adjuvant. Blood samples were collected during the protocol and serum was analyzed for the presence of total and ovalbumin-specific IgA2.

Isotype-specific ELISA

ELISA was performed on serum for the detection of murine IgM, IgG, IgA and human IgA2 secretion. Plates (Nunc) were coated with specific monoclonal antibodies for mIgM (Southern Biotech), mIgG (Southern Biotech), mIgA (Southern Biotech), hIgA1 and hIgA2 (Southern Biotech) overnight. After blocking with 3% PBS BSA, serum was added and incubated for 2h at 37°C. After washing, alkaline phosphatase (AP)-conjugates of goat anti-mIgM (Southern Biotech), anti-mIgG (Southern Biotech), anti-mIgA (Southern Biotech), goat anti-hIgA1 or hIgA2 (Southern Biotech) were incubated 1h at 37°C. After washing and addition of AP substrate (Sigma), absorbance was measured at 405 nm. Anti-Ova specific antibodies produced *in vivo* were evaluated in serum from immunized mice. Briefly, plates were coated with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ovalbumin overnight. Serum was then incubated for 2h at 37°C and plates were treated as above.

Immunofluorescence on tissue sections

Mice were euthanized by CO_2 and spleens and intestines were collected immediately. Organs were snap-frozen in isopentane using SNAPFROST (Excilone) and stored at -80°C until use. Frozen 8 μm tissue sections were cut by using cryostat (Leica). After fixation in acetone, sections were incubated 1 hour at room temperature with goat F(ab)'₂ anti-human IgA1 and anti-human IgA2 (Southern Biotech). hIgA was revealed using anti-goat Alexa Fluor 488 secondary antibody (Invitrogen). Washes and antibody dilutions were performed in PBS. Nuclei were stained with Dapi before mounting with Mowiol 4-88 solution (Sigma). Sections were then observed under an epifluorescent microscope (Nikon).

Illumina sequencing for repertoire analysis

Repertoire analysis was performed on RNA extracted from human volunteer (non?) PBMCs. These experiments combined 5'RACE PCR and library preparation. RACE was performed on 500ng RNA using SMARTer RACE 5'/3' kit (Clontech) following the manufacturer's instructions and incubated at 72°C for 3 min and at 42°C for 2 min with a specific human IgA reverse primer: 5'-GGAAGTTTCTGGCGGTCACG -3'. Libraries were prepared on RACE products using two forward primers (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' and 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') and two human IgA reverse specific primers (5'-AAGAAGCCCTGGACCAGGC-3') and (5'-CGTCGAAGAAGCCCTGGACCAGGC-3'). Amplification was performed with Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)

according to the following program: DNA was denatured 30s at 98°C and then submitted to 30 cycles consisting of 98°C for 10s, 65°C for 30s and 72°C for 30s, and 1 cycle at 72°C for 10 min. Adapters were then added and the resulting amplicons were sequenced on an Illumina Miseq sequencer.

Evaluation of hlgA isoforms

Total RNA was extracted from mouse splenocytes using GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma). cDNA was synthesized using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). PCR primers hybridizing to both the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ genes were a 5' forward primer identical to the downstream part of CH3 (5'-CACACAGAAGACCATCGACC-3') and a 3' reverse primer complementary to the membrane exon (5'-ccggctcccgctcagtactg-3') (Leduc et al., 1997a). cDNA was amplified with Taq polymerase (Qiagen) for 25 cycles (94°, 30 seconds; 56°, 30 seconds; 72°, 30 seconds). PCR products were analyzed on 5% agarose gels.

Flow cytometry

In order to study different lymphoid populations in bone marrow and spleen, cells from 8-week old mice were stained with different conjugated antibodies listed in Table 3. After 30 minutes incubation, cells were washed with PBS stained with 7-AAD and then analyzed by flow cytometry using FACS Aria (société). For each sample, 50 000 events were acquired and data analyzed with FACS DIVA software.

Table3: Different conjugated antibodies used for t flow cytometry.

Bone marrow		Spleen	
B cell development	Plasma cell differentiation	Mature B cells	Activated B cells
B220 BV510	B220 BV421	CD19 APC H7	B220 BV510
CD19 APC H7	CD138 APC	IgD BV421	IgD BV 421
C-Kit BV421	IgM PE Cy7	CD5 FITC	CD138 APC
CD43 PE	IgD FITC	CD21 PE	IgM PE Cy7
CD25 APC	CD25 BV605	CD23 PE Cy7	IgG1 PE
CD24 FITC	CD43 PE	IgM APC	GI7 FITC
IgM PE Cy7			

Statistical Analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SEM and overall differences between variables were evaluated by non-parametric Mann-Whitney test. P-value < 0.05 was considered significant.

References

- Bonaud, A., Lechouane, F., Le Noir, S., Monestier, O., Cogné, M., and Sirac, C. (2015a). Efficient AID targeting of switch regions is not sufficient for optimal class switch recombination. *Nature Communications* 6:7613.
- Bonaud, A., Lechouane, F., Le Noir, S., Monestier, O., Cogné, M., and Sirac, C. (2015b). Efficient AID targeting of switch regions is not sufficient for optimal class switch recombination. *Nat Commun* 6, 7613.
- Brandtzaeg, P. (2007). Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 25, 5467–5484.
- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., and Rajewsky, K. (2004a). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat. Immunol.* 5, 317–327.
- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., and Rajewsky, K. (2004b). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nature Immunology* 5, 317.
- Cerutti, A. (2008). The regulation of IgA class switching. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 421–434.
- Defrance, T., Vanbervliet, B., Brière, F., Durand, I., Rousset, F., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* 175, 671–682.
- Duchez, S., Amin, R., Cogne, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., Cortesby, B., and Cogne, M. (2010a). Premature replacement of with immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *PNAS* 107, 3064–3069.
- Duchez, S., Amin, R., Cogne, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., Cortesby, B., and Cogne, M. (2010b). Premature replacement of with immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *PNAS* 107, 3064–3069.
- Leduc, I., Drouet, M., Bodinier, M.C., Helal, A., and Cogné, M. (1997a). Membrane isoforms of human immunoglobulins of the A1 and A2 isotypes: structural and functional study. *Immunology* 90, 330–336.
- Leduc, I., Drouet, M., BODINIER, M.-C., Helal, A., and Cogne, M. (1997b). Membrane isoforms of human immunoglobulins of the A1 and A2 isotypes: structural and functional study. *Immunology* 90, 330–336.

Reth, M., and Wienands, J. (1997). Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 453–479.

Rifai, A., Fadden, K., Morrison, S.L., and Chintalacharuvu, K.R. (2000a). The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes. *J. Exp. Med.* 191, 2171–2182.

Rifai, A., Fadden, K., Morrison, S.L., and Chintalacharuvu, K.R. (2000b). The N-Glycans Determine the Differential Blood Clearance and Hepatic Uptake of Human Immunoglobulin (Ig)a1 and Iga2 Isotypes. *J Exp Med* 191, 2171–2182.

Rispens, T., Davies, A.M., Ooijevaar-de Heer, P., Absalah, S., Bende, O., Sutton, B.J., Vidarsson, G., and Aalberse, R.C. (2014). Dynamics of Inter-heavy Chain Interactions in Human Immunoglobulin G (IgG) Subclasses Studied by Kinetic Fab Arm Exchange. *J Biol Chem* 289, 6098–6109.

vanderNeutKolfschoten, M., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W., Martínez-Martínez, P., Vermeulen, E., and denBleker, T.H. (2007). Anti-Inflammatory Activity of Human IgG4 Antibodies by Dynamic Fab Arm Exchange. *Science* 317, 1554–1557.

Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2004). IgA function--variations on a theme. *Immunology* 113, 175–177.

Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* 208, 270–282.

Discussion

Le mécanisme de CSR fait l'objet de nombreuses études depuis sa découverte. Le détail des événements moléculaires impliqués au niveau du locus IgH lui-même garde cependant des zones d'ombre, notamment en ce qui concerne la structure spécifique des régions ciblées et le rôle des éléments régulateurs en *cis*. Pour approfondir ces questions, mais aussi parce que les anticorps switchés jouent un rôle majeur dans de nombreuses pathologies « immuno-allergiques », nous avons souhaité tester un abord pharmacologique de la CSR. Nous nous sommes attachés à l'étude de 2 agents pharmacologiques dont les propriétés nous laissaient soupçonner un potentiel rôle modulateur potentiel du switch (2 agents jusqu'ici utilisés surtout dans les traitements anti-cancéreux : RHPS4 et JQ1).

Alors que cette thèse avait été plutôt initiée dans le but de nous focaliser sur la CSR vers IgE, nous nous sommes aussi intéressés à d'autres situations rares de switch, et cela nous a permis de découvrir la plus rare des sous-classes d'IgG humaine (que nous avons nommée IgG5) codée par un gène jusqu'ici classé pseudo-gène. Mes travaux de thèse ont été aussi consacrés à l'étude de divers aspects liés à la production d'immunoglobulines de faible ou de moindre abondance dans l'organisme humain telle que l'IgA2.

Nouvelles stratégies de contrôle de la CSR

Dans cette partie de ma thèse, nous avons essayé de chercher si certaines structures du locus IgH qui participent à la commutation de classe pourraient être accessibles à des agents pharmacologiques. En effet, démontrer la CSR comme un phénomène « druggable » ouvrirait potentiellement la voie vers une modulation à façon de la production des Ig switchées. Ceci aurait un intérêt tout particulier pour l'IgE, qui intervient essentiellement dans les réactions allergiques. En effet, les stratégies thérapeutiques actuelles contre l'allergie visent en règle non pas la cellule B et encore moins la CSR, mais plutôt les facteurs libérés par les cellules mastocytaires ou les basophiles, ou encore les cellules T et les cytokines qui modulent les réponses immunes envers des allergènes. Le blocage du switch vers IgE serait clairement une stratégie supplémentaire intéressante pour combattre la pathologie allergique. Une immunothérapie contre l'IgE elle-même a été récemment développée (avec l'anticorps monoclonal anti IgE Omalizumab (Xolair®)) (Deniz and Gupta, 2005). Pour l'instant, aucune approche thérapeutique n'a été développée pour toucher directement le switch des cellules B, ou plus précisément le locus IgH, inhibant ou réduisant ainsi la CSR d'IgM vers l'IgE. Alors il serait donc d'un intérêt considérable d'identifier les médicaments agissant au niveau de la CSR et contrôlant plus spécifiquement la production des

immunoglobulines pro-inflammatoires. Par ailleurs, tester l'influence sur la CSR d'agents chimiques ayant des capacités bien définies à lier certaines structures de l'ADN ou des protéines, constitue aussi au plan fondamental et un moyen indirect d'explorer la mécanistique de la CSR.

Il est bien connu que la CSR est régulée par des interactions avec d'autres lignées cellulaires tels que les lymphocytes T ainsi que par des éléments *en-cis* (surtout la région 3'RR) (Pinaud et al., 2001). Concernant les voies moléculaires de CSR, elle requiert en plus la génération des cassures double brin au niveau des régions switch donneuse et acceptrice (Schrader et al., 2005). Chez les mammifères, ces régions switch sont des endroits riches en base G sur le brin d'ADN non transcrit et la transcription à travers ces régions est essentielle durant la commutation de classe. Un rôle majeur de la transcription au cours de la CSR consiste à induire la formation d'une boucle R dans les régions switch, ce qui permet d'obtenir des substrats d'ADN simple brin, stables pour la désamination de C en U par la déaminase AID (Yu et al., 2003). Il a été montré que le brin non transcrit de la région switch riche en G a la capacité de s'empiler et de former des structures G-quadruplexes. Celles-ci ont été proposé comme des acteurs stabilisant des R-loops durant le mécanisme de la CSR (Duquette et al., 2004; Maizels and Gray, 2013b). Une autre étude suggère au contraire que les G4 ne soient pas requis durant le switch et de ce fait nous ne savons pas à ces jours si la CSR dépend ou non de la présence des G4 dans les régions switch (Zarrin et al., 2004). En outre, il a été démontré que la transcription germinale à travers les régions switch conduit à la génération d'un transcrit stérile mature et d'un « lariat » post-épissage contenant l'ARN de l'intron et donc la région S. Un enzyme débranchante, DBR1 (Debranching RNA Lariats 1), ouvre le lariat, permettant à l'ARN de la région S de se replier en G-quadruplexes. Sous cette forme, l'ARN de la région S pourrait interagir avec l'AID et servir de guide pour le ramener dans la région S complémentaire (**Figure 23**) (pour revue: DiMenna and Chaudhuri, 2016; Zheng et al., 2015).

En se basant sur ces éléments et du fait que la région switch riche en guanine forme des G-quadruplexes, nous nous sommes demandés si la stabilisation de ces structures a un impact sur la CSR. Certains composés stabilisant l'ADN G4, et notamment le prototype RHPS4, ont été étudiés en détail pour leur capacité à inhiber la croissance tumorale via un mécanisme à base de G4 (Salvati et al., 2007), ils n'ont jamais été exploré pour leur impact potentiel sur la CSR.

Dans notre étude, nous avons montré que RHPS4 peut être utilisé à des doses jusqu'à 2 μ M sans toxicité grave sur des cellules B cultivées in vitro, ou peut être administré à des souris à la dose de 10 mg / kg / jour sans effets toxiques majeurs et sans incidence sur la viabilité des splénocytes (dans d'autres études de l'effet anti-tumoral de RHPS4, la dose injectée était de 5 mg/kg/jour (Phatak et al., 2007)) . De telles conditions nous ont permis d'évaluer l'effet direct de RHPS4 sur

le CSR vers l'IgE et l'IgG1 en suivant l'expression du BCR sur la membrane cellulaire de lymphocytes B stimulés *in vitro* ainsi que leur sécrétion. La même chose était testée *in vivo* chez des souris immunisées montrant une augmentation du nombre de cellules productrices d'IgM par rapport à une diminution du nombre de cellules productrices d'IgG. L'accessibilité d'AID sur les régions switch a également nettement diminué. Les effets de RHPS4 sur l'altération de la CSR ont été aussi suivis sur des réponses spécifiques à l'Ag chez la souris ayant développé une inflammation allergique des voies respiratoires.

Ce travail est le premier montrant que les ligands du G4 sont capables de cibler l'immunité humorale et le premier que la CSR peut être ciblé par des drogues pharmacologiques. La complexité des réactions immunitaires *in vivo* nécessitera évidemment de nouvelles études car d'autres cellules pourraient être affectées en même temps que les cellules B, en particulier parce que ce type de traitement pourrait affecter la transcription de divers gènes ayant des promoteurs riches en G. Outre l'activité à large spectre de RHPS4, des médicaments plus sélectifs se liant à G4 peuvent être conçus. Pour des applications plus spécifiques, des efforts de recherche approfondis ont notamment permis d'identifier le CX-3543 / quarfloxine, un dérivé de la fluoroquinolone liant des complexes G4, perturbant leurs interactions avec la nucléoline, inhibant ainsi la transcription de Pol I dans les nucléoles et favorisant l'apoptose dans les cellules cancéreuses (Drygin et al., 2009). Il sera de la même manière intéressant de tester un tel ligand (et d'autres nouveaux ligands) sur la mécanistique de la CSR et une collaboration a été initiée en ce sens entre notre unité et le laboratoire de chimie de Jean-Louis Mergny, à Bordeaux, spécialiste du design des G4-ligands.

Outre la question hypothétique des applications thérapeutiques, nos résultats ont d'une part confirmé un rôle des structures G4 dans la CSR mais d'autre part produit le résultat inverse de ce qui aurait pu être prévisible (puisque nous observons une diminution très significative de l'interaction d'AID avec les régions switch après la stabilisation des G4, alors que ces structures devraient au contraire stabiliser les R-loops et augmenter le recrutement d'AID. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées. A ces jours, il est bien connu que l'hélicase DDX1 capable de se lier sur les introns ARN G4 des régions switchs débranchés après l'épissage du transcrit primaire, favorise la formation des R-loop permettant ainsi l'accès de l'AID et que sa déplétion diminue la CSR (Ribeiro de Almeida et al., 2018). Cette même étude a montré aussi que la stabilisation des structures ARN G4 altère aussi la formation des R-loops en antagonisant l'activité de DDX1 ce qui pourrait expliquer la diminution du recrutement de l'AID au niveau des régions switch obtenu avec le RHPS4.

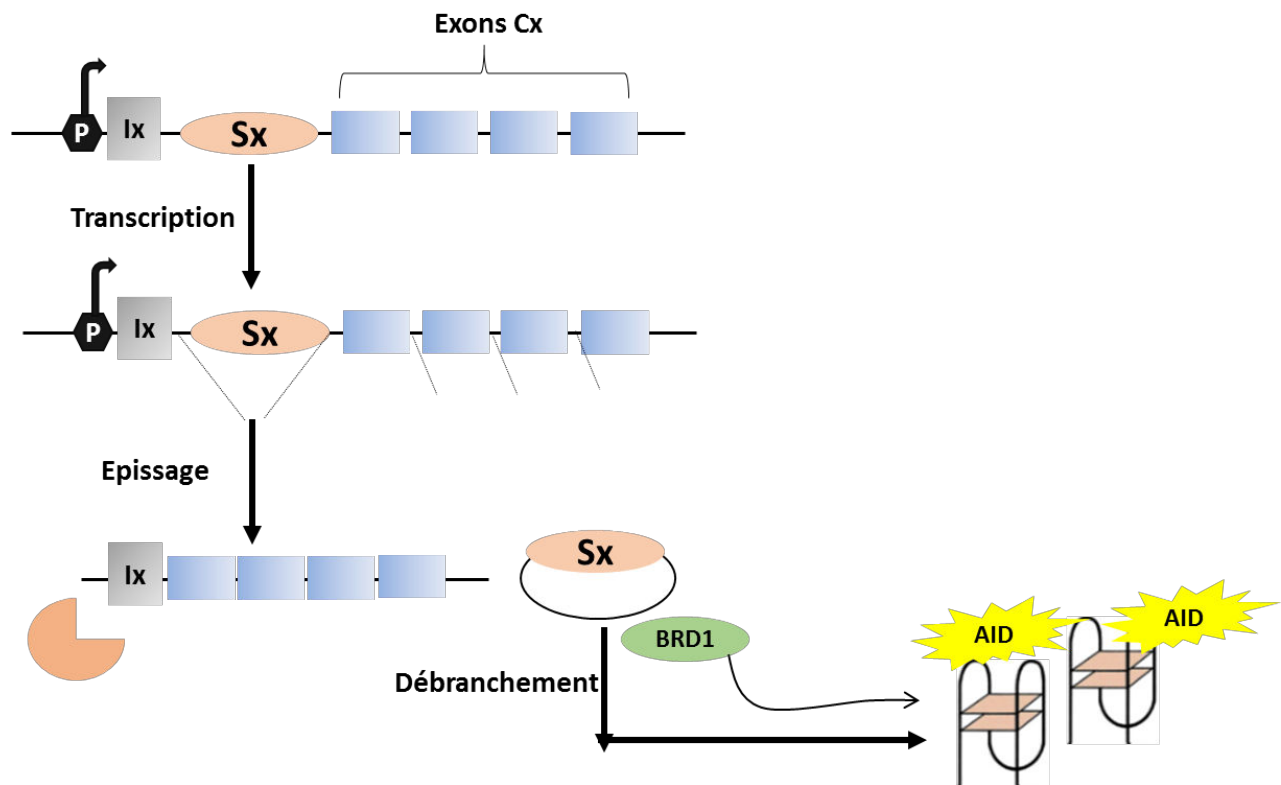


Figure 23 : Mécanisme de ciblage des ARN post-épissés par des AID durant la CSR.

La région S transcrite est épissée, débranchée (par DBR1) et l'ARN switché prend la forme d'une conformation G-quadruplexe qui permet à l'AID de revenir à l'ADN de la région S (Adapté de: Vaidyanathan and Chaudhuri, 2015).

En parallèle, nous avons cherché d'autres facteurs qui peuvent agir sur le locus IgH. Cette question découlait bien sûr la droite ligne du fait que le versant « B » des réponses immunes est aussi étroitement contrôlé par le *super-enhancer* IgH 3'RR. Il nous a donc semblé logique de tester l'effet d'une sorte « d'anti-super-enhancer » sur les réponses B et en particulier sur la CSR. Nous avons souhaité cibler les protéines à bromodomaines (BRD) car il a été montré qu'elles peuvent agir au niveau des *enhancers* E μ du locus IgH humain, et que l'un de leurs inhibiteurs, JQ1, diminue l'expression d'un gène c-myc réarrangé dans ce locus (Delmore et al., 2011). Cette question, ciblée sur la CSR, peut en outre être remise en perspective de travaux récemment publiés, qui ont montré un rôle immunorégulateur des « BET inhibitors » au niveau des cellules T, ainsi que des modifications de la physiologie des cellules B, avec en particulier des modifications d'expression génique spécifiques des cellules B et de la production d'immunoglobulines (Shim et al., 2017). Dans notre étude, nous avons montré que le ciblage des cellules B primaires par le JQ1 même à faibles doses (20 et 40 nM) diminue drastiquement le mécanisme de CSR vers IgG1 et IgE sans altérer la prolifération ni la survie de ces cellules stimulées in vitro par LPS et IL4. Ces mêmes résultats ont été vu par Stanlie qui a aussi inhibé les

BRD4 par JQ1 mais en utilisant une lignée cellulaire qui switche vers IgA (CH12F3-2A) ; il a pu conclure que la diminution de CSR n'impliquerait pas le recrutement d'AID et la survenue des cassures, mais plutôt une diminution de recrutement des protéines impliquées dans la réparation des cassures doubles brins (Stanlie et al., 2014). L'effet des *BET-inhibitors* sur les *super-enhancers* du locus IgH n'a pour sa part jamais été évalué. Nos résultats montrent un effet du *BET-inhibitor* au moins à 2 niveaux sur les cellules B, avec une diminution d'activité du *superenhancer* 3'RR manifestée par une diminution d'expression des core enhancers HS1,2 et HS4. La diminution de CSR observée reflète vraisemblablement des mécanismes multiples, tant directs qu'indirects, B-intrinsèques ou non.

Les résultats in vivo étudié dans un modèle d'induction de réaction allergique respiratoire chez la souris ont aussi confirmé que l'inhibition des protéines de bromodomaines par la molécule JQ1 perturbe aussi la production d'IgG, mais s'associe alors à des perturbations majeures de la production des cytokines par les cellules T et à des phénomènes d'immunomodulation bien plus complexes que ne le laissaient entrevoir les simples tests in vitro. Certains aspects du changement de statut cytokinique induit par JQ1 ont déjà été rapportés dans la littérature : JQ1 a diminué la capacité des cellules Mo-DC (monocyte-derived DCs) à induire une prolifération des lymphocytes T CD4 + et CD8 + et la production de cytokines pro-inflammatoires. De plus, JQ1 entraîne une réduction de la génération de lymphocytes T CD8 + inflammatoires et une diminution de la différenciation Th1 (Toniolo et al., 2015). De façon inattendue, notre travail révèle par contre une augmentation de production d'IL4 et IL13 et un effet pro-TH2 (qui pourrait sans doute en partie s'interpréter comme étant lié à une baisse TH1).

Pour mieux comprendre l'impact global de l'inhibition des protéines à bromodomaines sur la réponse immune, en prenant en compte à la fois les cellules B et T et leurs interactions, il est indispensable d'analyser les réponses in vivo. Nous avons aussi réalisé des immunisations d'animaux recevant des doses de 50 mg/kg/jour de JQ1. Les analyses finales ont montré une modulation forte des réponses T, modifiant leur équilibre au profit de la polarisation TH2. Ces données suggèrent que la diminution de CSR suite à l'inhibition des protéines à bromodomaines est liée : à des modifications B-intrinsèques, non seulement à une certaine baisse d'expression d'AID mais aussi une baisse d'accessibilité des régions switch du fait de l'altération de fonction du *superenhancer* 3'RR ; mais intègre aussi une modulation des interactions avec les cellules TFH pendant le développement de la réponse immune.

Un tel tableau global peut amener à réfléchir à l'intérêt potentiel des BET inhibiteur pour obtenir une immunomodulation dans des situations où la réponse humorale participe à la pathologie mais

où les cellules Th1 sont également impliquées alors que les Th2 seraient plutôt protectrices (une situation notamment vue au cours des modèles de sclérose en plaque et d'encéphalopathies auto-immunes). Les interactions Eμ-3'RR1 dans le cas d'inhibition sont aussi parmi les perspectives à évaluer.

La découverte d'une nouvelle sous-classe d'IgG humaine: IgG5

Chez l'Homme, quatre sous-classes d'IgG humaines ont été décrites (IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4). Ces gènes sont codés par des gènes Cγ1, Cγ2, Cγ3 et Cγ4 respectivement. Les gènes Cγ3 et Cγ1 sont localisés en amont de la région 3'RR1 tandis que les gènes Cγ2 et Cγ4 se situent en aval de cette même région. Un cinquième pseudo-γ dépourvu de région switch se trouve juste en aval de la 3'RR1 humaine (Bensmana et al., 1988; Takahashi et al., 1982). Une fois ce gène ainsi étiqueté, aucune équipe n'a plus jamais remis en cause ce statut de pseudogène. La définition des pseudogènes concerne habituellement des gènes non fonctionnels parce que tronqués de certains exons, ou dont les séquences codantes sont altérées par des codons stop. Ainsi chez l'homme existe un gène pseudo-epsilon dans le locus IgH dont la séquence codante est incomplète. De même, dans une souche de souris (BALB / c), où le locus IGHC a été étudié en détail, deux gènes pseudo-gamma ont également été identifiés entre les gènes γ1 et γ2b et entre les gènes γ2b et γ2a ; un gène, appelé ψγ1, contient l'exon CH1 et l'exon M2, et l'autre gène, appelé ψγ2, ne contient que l'exon CH1 et ils sont ainsi clairement considérés comme non-fonctionnels (Akahori and Kurosawa, 1997).

Mes travaux de thèse ont permis de découvrir des jonctions de Sμ avec la région intervenante qui sépare la 3'RR1 du premier exon CH1 CΨγ. Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré que des recombinaisons suicides surviendraient dans la partie la plus terminale de la 3'RR1 humaine (donc à plus de 16kb en 5' du gène Ψγ) (Dalloul I et al., 2018). Alors nous avons posé la question de savoir si elles pourraient en fait aboutir à un switch fonctionnel vers cet isotype, et si des recombinaisons plus proches de Ψγ ne seraient pas également possibles au sein des 16kb séparant la 3'RR1 du CH1 de Ψγ, malgré que cette région ne contienne aucune séquence répétitive de type région S. Ce questionnement paraissait aussi d'autant plus légitime à l'équipe que celle-ci avait récemment montrer que l'IgD, immunoglobuline exprimée par les cellules B matures en conjonction avec l'IgM, mais parfois aussi seule exprimée dans certains plasmocytes bien qu'elle aussi dépourvue de région switch, peut subir dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses une variante de « δCSR » parfaitement fonctionnelle (via des recombinaisons Sμ-like Sδ) (Rouaud et al., 2014).

En même temps que des recombinaisons vers $\Psi\gamma$, l'existence de transcrits réarrangés fonctionnels et épissés, joignant des régions VDJ fonctionnelles à l'exon CH1 de $\Psi\gamma$ ont pu être mis en évidence en utilisant des primers hautement spécifiques permettant de caractériser simultanément la totalité du VDJ et une portion initiale de l'exon CH1. Cette analyse a pu aussi inclure une analyse de répertoire VDJ dont nous avons pu montrer un épissage correct VDJ avec la CH1 d'IgG5 (et l'utilisation discrètement accrue de la famille de gènes VH4 et du segment JH4). Ce répertoire antigénique ressemble globalement à celui des autres sous-classes d'IgG humaines. L'existence de ces transcrits épissés et fonctionnels suggère fortement qu'une certaine quantité de la forme protéique d'IgG5 est produite *in vivo* chez l'Homme, même si c'est à un niveau bien moindre que celui des autres sous-classes d'IgG.

Ensuite la caractérisation exacte de l'IgG5 a été réalisée sur un variant recombinant ayant une activité anti-CD20 dont nous avons pu montrer une certaine activité effectrice (ADCC et CDC), mais à un niveau très inférieur à celui de l'IgG1.

La réponse immunitaire cellulaire est principalement due aux interactions entre l'anticorps et les récepteurs Fc gamma (Fc γ R). La signalisation intracellulaire à travers les récepteurs d'activation (Fc γ RI, Fc γ RIIa et IIC, Fc γ RIIIa et IIb) est modulée par la phosphorylation de motifs d'activation à base de tyrosine immunorécepteurs (ITAM), ce qui conduit à des fonctions effectrices telles ADCC, une phagocytose cellulaire dépendant des anticorps (ADCP), et inflammation via l'induction de la sécrétion de cytokines. En revanche, la signalisation intracellulaire via le Fc γ RIIb (récepteur inhibiteur) est modulée par la phosphorylation de motifs inhibiteurs à base de tyrosine immunorécepteurs (ITIM), qui recrutent des phosphatases qui contre-balaçent des voies de signalisation activantes (Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Pour l'instant, la capacité d'IgG5 à fixer sur tel ou tel récepteurs n'est pas encore validée et est en cours de découverte. En plus, les interactions d'anticorps avec les récepteurs Fc γ R et C1q dépendent des séquences d'acides aminés dans la partie CH2 d'anticorps et de la région charnière, ainsi que de la glycosylation surtout au niveau de l'acide aminé conservé N297 dans la région CH2 (pour revue : Wang et al., 2018). Les comparaisons des séquences d'acides aminés des différentes sous-classes d'IgG, incluant la séquence prévue d'IgG5 ainsi la localisation des sites de glycosylation nous a permis de conclure qu'il existe une conservation de sites dont l'importance est connue sur les autres IgG, laissant prévoir une conservation des capacités d'activation du complément et d'interaction de l'IgG5 avec les récepteurs Fc γ R. En outre, il a été montré que les IgG1 et IgG3 se lient à tous les hFc γ R, les IgG2 se lient sur Fc γ RIIA, mais aussi avec faible affinité sur Fc γ RIIA et Fc γ RIIIA et les IgG4 se lient Fc γ RI, Fc γ RIIA, IIB et IIC et Fc γ RIIIA. En plus, le récepteur inhibiteur Fc γ RIIb avait une

plus faible affinité pour IgG1, IgG2 et IgG3 en comparaison avec tous les autres hFcγR (Bruhns et al., 2009). La question de l'affinité d'IgG5 sur ces récepteurs activateurs et inhibiteurs restent aussi à découvrir.

Finalement, nous avons observé que l'IgG5 a une structure particulière, qui pourrait à la fois tenir à la présence de son site supplémentaire de N-glycosylation dans le CH3 et la séquence unique de sa région charnière. Au plan fonctionnel, ces spécificités nous ont donné des résultats surprenants lors des productions d'IgG5 recombinante, avec la production d'une IgG assemblée (et de structure classique H2L2) dans les systèmes de transfection stable, mais par contre une production abondante de fragments dans des conditions de transfection transitoire avec hyperproduction, conditions dans lesquelles les mécanismes d'assemblage des cellules transfectées semblent se révéler beaucoup moins capable d'assembler de l'IgG5 que des IgG1 ou IgG4 que nous avons produites en parallèles comme contrôles. Dans ces conditions d'hypersécrétion, les produits de poids moléculaire hétérogènes que nous obtenons évoquent des anomalies d'assemblage de l'IgG5 (demi-Ig H-L ?) et/ou une capacité de cette IgG à se scinder spontanément en fragments Fab (qui continuent à porter correctement l'idiotype des régions variables et gardent la capacité de lier l'antigène). D'un point de vue fonctionnel, des fragments Fab monovalents dépourvus de fonction effectrice pourraient se lier à l'antigène et les fragments Fc libérés par la protéolyse IgG sont en effet connus pour leurs propriétés anti-inflammatoires (Blumberg et al., 2018; Vafa et al., 2014). Il reste bien sûr à déterminer si les deux conditions que nous reproduisons in vitro, de synthèse à bas niveau (dans un transfectant stable) et de d'hypersécrétion (dans un système forcé par une transfection transitoire), sont éventuellement reproduits in vivo, et si l'apparente instabilité ou clivabilité de l'IgG5 au cours même de sa production survient aussi dans les rares cellules qui la sécrètent in vivo.

Les prochaines étapes consisteront à concevoir des tests spécifiques capables de différencier la production d'IgG5 de celle des autres anticorps et à déterminer sa régulation chez le sujet sain (et éventuellement en pathologie). Son expression en tant de BCR à la surface des lymphocytes B sera aussi importante à étudier.

Nouveau modèle murin caractérisant la sous-classe IgA2 humaine

Les IgA2 sont codées par le deuxième cluster des gènes constants IgH et la régulation de leur production différentielle, par rapport aux IgA1, reste mal comprise. Des travaux antérieurs de l'équipe avaient suggéré une signalisation différenciée des deux BCR IgA1 versus IgA2 (Leduc et al., 1997). Afin de faciliter l'étude des lymphocytes B à IgA2, le laboratoire a créé un modèle de souris α2 knock-in qui mime un autre modèle de souris fabriqué préalablement au sein du

laboratoire (modèle $\alpha 1$ KI) (Duchez et al., 2010), dans lequel la région switch μ ($S\mu$) murin était remplacée par les gènes constantes $\alpha 1$ humaine. Ce modèle $\alpha 1$ KI a montré que le BCR IgA1 y favorise l'activation et la différenciation des cellules plasmocytaires. A ce jour, peu étant connu sur le rôle et les caractéristiques attribués aux cellules mIgA2+ par rapport aux cellules mIgM+ et mIgA1+, notre stratégie était donc celle d'une mise en parallèle des deux modèles $\alpha 1$ KI et $\alpha 2$ KI, chacun d'eux permettant spécifiquement l'expression de la forme sécrétoire et membranaire d'IgA1 et d'IgA2 humaine. Dans les deux cas, l'utilisation chez la souris d'un gène C α provenant d'une espèce différente, a l'avantage de permettre un suivi simple de l'expression du transgène α , sans ambiguïté avec la commutation de classe endogène.

Les souris homozygotes $\alpha 2$ KI ont en effet rapidement révélé un défaut majeur de développement des cellules B en comparaison avec des WT ou $\alpha 1$ KI, suggérant ainsi que pendant la lymphopoïèse B précoce, la classe IgA2 du pré-BCR ou du BCR semble soit exercer un effet toxique, soit être insuffisamment pourvoyeuse de signaux de survie cellulaire. Une autre hypothèse concernant la faible production d'IgA2 par les souris hétérozygotes et son absence totale chez les souris homozygotes pouvait être celle d'un défaut d'assemblage des domaines constants de la chaîne lourde humaine et la chaîne légère endogène provenant des souris. Pour améliorer la sécrétion d'IgA2 dans ce modèle, nous avons croisé les souris $\alpha 2/+$ KI avec les souris KIKS d'une part et avec les souris DH-LMP2A KI d'autre part. Des altérations du développement des cellules B dans ce cas rappellent celles des souris présentant une expression prématurée de la chaîne lourde γ membranaire insérée à la place du gène μ / δ (Waisman et al., 2007). La production des anticorps murins (IgG et IgA) par les plasmocytes n'est pas altérée et les cellules B ont même subi un faible taux de CSR en l'absence de répétition de $S\mu$. Ce défaut de CSR partiel était similaire à celui signalé pour les délétions de $S\mu$ complètes (Khamlichi et al., 2004) en contraste avec le $S\gamma 1$, dont sa délétion annule pratiquement la CSR en IgG1 (Shinkura et al., 2003).

En accord avec les données précédemment publiées (Leduc et al., 1997) nous avons observé que l'IgA2 membranaire s'exprime exclusivement comme isoforme de la membrane de type I chez les souris $\alpha 2$ KI, contrairement aux souris $\alpha 1$ KI qui produisent à la fois des isoformes de la membrane de type I et de type II. Notre problème majeur dans notre problème knock-in est cependant le défaut majeur de lymphopoïèse B que nous observons, et qui indique que dans ce système hétérologue, le BCR IgA2 ne donne pas de signaux optimaux au stade pre-B pour soutenir la constitution d'un compartiment B normal.

Le modèle $\alpha 2$ KI ne nous donne donc qu'un modèle partiel pour explorer les spécificités de l'IgA2 en tant que BCR comme en tant qu'immunoglobuline sécrétée. Nos tentatives d'améliorer

l'expression de ce BCR par croisement avec une autre mutation « knock-in » qui permet l'expression de chaînes kappa à domaines constant C κ humain, n'ont pas significativement amélioré l'expression. Le croisement avec des animaux exprimant un substitut de BCR, la molécule LMP2A, a permis une expression un peu plus élevée des IgA2, qui se comportent alors comme un « BCR passager » mais ne permettent pas de donner une réponse antigène-spécifique IgA2 après vaccination. Nous continuons donc à tenter d'améliorer l'expression des IgA2 dans ce modèle et à en extraire le maximum d'informations, notamment en ce qui concerne l'implication des IgA dans certaines maladies néphrologiques que nous avons modélisées chez la souris avec le modèle jumeau « alpha1-knock-in ». Pour l'instant, nous n'avons pas encore répondu à la question du devenir des lymphocytes B exprimant un BCR à IgA2 en comparaison avec celles exprimant l'IgA1. Plus de travail sera aussi demandé pour étudier la signalisation des BCR à IgA2.

Conclusion générale et Perspectives

L'analyse des effets de deux produits RHPS4 et JQ1 nous a permis de mieux comprendre le rôle des structures G4 de l'ADN et des facteurs à bromodomaines dans le mécanisme de CSR survenant dans les lymphocytes B. Nous avons ainsi montré que la CSR, modulée par les interactions avec d'autres lignées cellulaires telles que les cellules T et par des éléments *cis*-régulateurs principalement représentés par le superenhancer IgH 3'RR, dépend d'éléments en *cis* tels que la présence de structures G4 sur le brin d'ADN « non-template » des régions switch et implique des éléments en *trans* tels que l'action des protéines à bromodomaines (sur les « enhancers » et « super-enhancers » de la région 3'RR). Au-delà de l'activité à large spectre du RHPS4 et de JQ1, des médicaments plus sélectifs de liaison aux G4 et aux protéines bromodomaines peuvent vraisemblablement être conçus. La recherche de nouveaux ligands présentant une spécificité améliorée pour le processus de CSR apparaît désormais comme un objectif prometteur afin de réduire la toxicité et de cibler plus spécifiquement la production d'Ig switchée, une option qui serait intéressante pour de nombreuses maladies auto-immunes ou immuno-allergiques.

A côté de l'effet de ces produits pharmacologiques sur la CSR, les travaux réalisés au cours de ces années de thèse m'ont permis aussi d'explorer les mécanismes qui régulent la production de plusieurs classes et sous-classes d'immunoglobulines quantitativement minoritaires (ou précédemment réputées non exprimées !). L'exploration du modèle de souris $\alpha 2$ KI a identifié des différences de structures entre les IgA1 et IgA2 humaines, qui sont probablement ténues mais qui se traduisent cependant par des différences majeures d'expression et de sensibilité à la barrière d'espèce dans un modèle transgénique murin. Outre cet intérêt, ce modèle a ouvert une nouvelle voie d'exploration permettant ultérieurement de caractériser des maladies liées à l'IgA2 (maladies de dépôts...).

D'une façon intéressante, cette thèse a enfin permis de caractériser le produit d'un gène d'Ig fonctionnel là où on ne pensait trouver qu'un pseudogène dépourvu de région switch, ajoutant ainsi une cinquième sous-classe, IgG5, à la diversité des IgG humaines. Cette découverte a permis de montrer qu'il y a, au sein du locus IgH, des recombinaisons atypiques, sans région switch receveuse, contribuant à la génération des jonctions $S\mu-\Psi\gamma$ et à la production d'IgG5 (même si ce doit être en faible quantité).

Des questions restent en cours d'exploration à ce sujet: si l'IgG5 est vraiment produit *in vivo* et relargué dans la circulation humaine, l'est-il à un taux suffisant pour l'identifier parmi les autres

sous-classes d'IgG ? Plus de travaux seront nécessaires pour mieux caractériser l'abondance relative de ce nouvel anticorps, ses propriétés fonctionnelles et son éventuel intérêt fonctionnel et/ou thérapeutique.

Annexes

Annexe 1 : Résultats Préliminaires

L'expression inductible d'un BCR à IgE peut induire la régression d'un lymphome B *in vivo*

Contexte et Objectif de ce projet

Parmi les immunoglobulines (Ig), les IgE peuvent contribuer puissamment à l'immunité contre des parasites. Elles peuvent aussi causer des allergies graves malgré leur faible abondance. Chez les mammifères, les IgE contribuent également à l'immunité contre les venins et les toxines. Un stade de lymphocyte B normal auto-restreint a été décrit, où l'expression des IgE membranaires affecte le phénotype, la forme et la mobilité des lymphocytes B normaux, favorise l'apoptose et raccourcit considérablement la survie des cellules IgE+ B (Laffleur et al., 2015). Dans ce projet, nous avons visé à déterminer si l'induction d'un switch vers l'expression d'IgE membranaires pourrait permettre également d'induire l'apoptose dans les lymphomes à cellules B. Malheureusement, ce travail n'a pas encore pu être réalisé dans des conditions de significativité du fait de la difficulté d'obtenir un nombre suffisant d'animaux développant des tumeurs (au sein d'une cohorte d'animaux triple transgéniques par elle-même difficile à établir et amplifier suffisamment).

Stratégie du travail

Les souris utilisées

Dans cette étude nous avons utilisé un modèle de souris Knock-in fabriqué par notre laboratoire appelé μ εKI (ou InEPS) et qui produit les deux formes sécrétées et membranaires d'IgE humaine (Laffleur et al., 2015). La cassette C μ -Neo-C ϵ humaine est insérée dans la région S μ . Les gènes hC μ et Neo sont entourés par des séquences loxP (**Figure 22**). En les croisant avec les souris transgénique exprimant le gène Cre Recombinase, le gène hC μ est délété (ainsi le gène Neo) permettant ensuite l'expression d'IgE humaine. Ce modèle de souris mime alors le switch classique IgM->IgE au sein des lymphocytes B. Notre équipe a bien montré qu'un BCR à IgE est toxique et entraîne la mort des lymphocytes B. Pour favoriser le développement tumoral, j'ai croisé ce modèle avec un autre modèle de souris transgénique appelé λ -cmyc qui contribue à l'apparition de lymphome de Burkitt agressif chez ces souris (Kovalchuk et al., 2000). Ces souris développent des tumeurs à un âge entre 3 et 6 mois. Pour induire l'expression de la Cre, les souris sont traitées par des injections intrapéritonéale de Tamoxifène (2 μ g) débutant lorsque la taille d'une tumeur arrive à 1 cm.

Les souris ont été divisées en deux groupes :

- Groupe contrôle : IgM+ ; Myc+ ; Cre- : Expriment hIgM
- Groupe d'intérêt : IgM+ ; Myc+ ; Cre+ : Expriment hIgE suite au traitement par le tamoxifène.

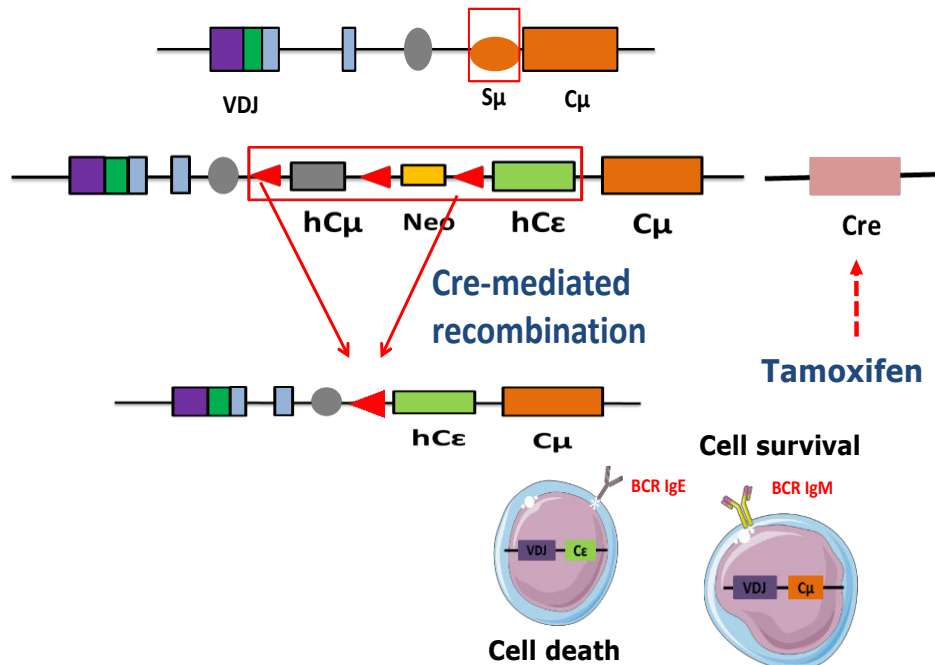


Figure 18: Stratégie de création du modèle $\mu\epsilon$ KI

Remplacement de la région S μ du locus IgH par une cassette composée des gènes C μ -Neo-C ϵ humaine (Laffleur et al, 2015). Le croisement de ces souris avec des souris exprimant le gène Cre permettant la délétion des gènes hC μ et Neo et l'expression de hIgE. Un BCR à IgM maintient la survie des cellules B, par contre un BCR à IgE est toxique et contribue à la mort cellulaire B.

Vérification de l'expression d'IgE humaine

Les niveaux d'IgE humaines ont été évalués par ELISA en utilisant le test « ImmunoCAP total IgE Phadia assay » (Thermo Fisher scientific).

Analyse histologique des tumeurs

Les biopsies du jour 0 et après 1 semaine de traitement au tamoxifène ont été évaluées chez les deux groupes. Les colorations H & E et le marquage KI67 ont été réalisées sur ces tissus.

Analyse transcriptomique (RNAseq)

L'ARN total a été extrait des biopsies de tumeurs de souris Cre + au jour 0 et après une semaine d'induction de Cre par le Tamoxifène. La qualité et la quantité d'ARN ont été vérifiées par les

technologies RNA Agilent. Les bibliothèques ARN-seq ont été préparées et analysées dans la "Plate-forme de Génomique Fonctionnelle" de Nice-France.

Résultats préliminaires et discussion

I. Effet de l'induction d'expression d'IgE sur la survie des souris développant des tumeurs préalablement IgM

Pour tenir compte d'un éventuel effet sur la prolifération tumorale par la simple injection du tamoxifène lui-même, nous avons réalisé une comparaison entre deux groupes de souris Cre+ versus Cre- . Tous les animaux de ces 2 groupes avaient développé des tumeurs axiales et/ou inguinales avec une taille de tumeurs ≥ 1 reçoivent des injections répétées de tamoxifène 3 fois par semaine.

Avant tout, la production d'IgE humaine a été vérifiée dans le sérum des souris prélevées au J0 avant toute injection du Tamoxifène pour les deux groupes Cre+ et Cre-, et après une semaine d'induction de la Cre recombinase (**Figure 1A**). Le dosage simple montre une augmentation significative de la concentration d'IgE humaine chez les souris Cre+ ayant reçu des injections de Tamoxifène.

La survie des souris exprimant l'IgE humaine ou l'IgM humaine est suivie sur 2 groupes de très petits nombres, malheureusement impropres à une analyse statistique (**Figure 1B**). La durée de survie était plus courte chez les souris hIgM + (exception une souris) que chez les souris hIgE+. Cependant dans le groupe Cre+, les souris présentent des durées différentes de survie. Une seule souris du groupe a pu survivre jusqu'au jour 78 après l'expression d'IgE, alors que les autres n'ont survécu qu'une trentaine de jours.

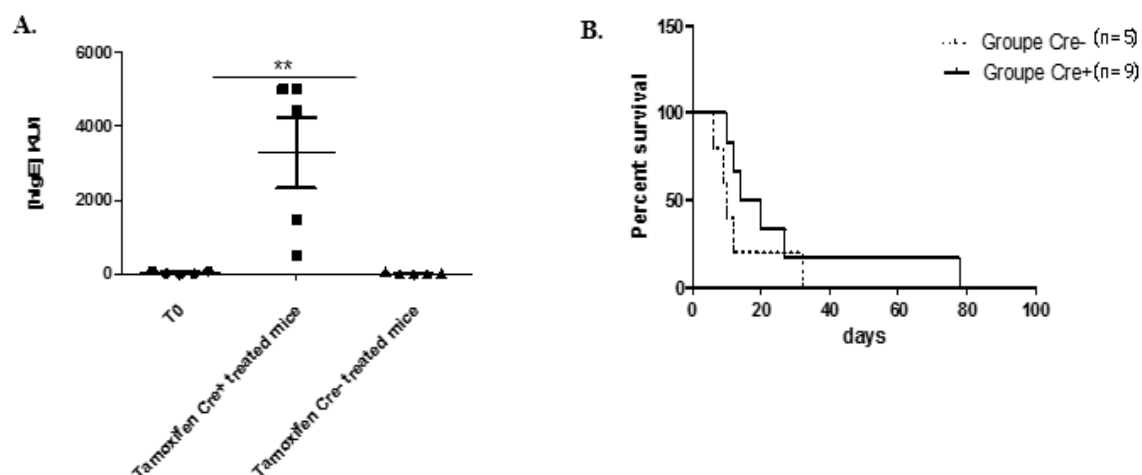


Figure 1 : Production d'IgE et survie des souris ayant des tumeurs.

A. Dosage d'IgE humaine dans le sérum des souris Cre+ et Cre- avant et après traitement au Tamoxifène. Les données représentent la concentration moyenne d'IgE $\pm$ SEM pour 5 souris (** $P < 0.01$)

B. Les souris Cre+ et Cre- ont reçu chaque semaine 3 injections de Tamoxifène (2 µg) en IP. La survie est notée à partir du jour « 0 » correspondant au premier jour du traitement jusqu'au jour de leur mort après traitement au Tamoxifène.

II. Effect d'expression d'IgE sur la regression de la taille des tumeurs et sa morphologie

Nous avons ensuite étudié l'impact d'expression d'IgE humaine sur la réduction de la taille tumorale ainsi que sa morphologie histologique. Les tumeurs étaient mesurées avant toute injection de Tamoxifène (J0) et après des injections répétées (J6 et J10). Les souris exprimant hIgE montrent une regression importante de la tumeur qui est presque totalement disparue après 10 jours (**Figure 2A**) ce qui montre le rôle «anti-tumoral» exercé par l'IgE humaine exprimée en tant que BCR (et non par le Tamoxifène lui-même puisque d'autres souris exprimant le hIgM et recevant la même dose de Tamoxifène n'ont montré aucune régression tumorale).

Dans le même temps, des biopsies tumorales des deux groupes de souris ont été prélevées par une simple ponction pour des études histologiques (marquage H&E) et pour évaluer le taux de prolifération cellulaire avant et après une semaine d'injections de Tamoxifène. Le groupe contrôle montre par le marquage H&E une structure des cellules tumorales condensée sans variations visibles entre J0 et après traitement au Tamoxifène. Ces observations sont compatibles avec le marquage KI67, qui indique que les cellules tumorales IgM+ ont conservées une prolifération normale malgré des injections de Tamoxifène reçues. En revanche, la coloration H&E réalisée sur des coupes tumorales des souris dont les lymphomes expriment l'IgE humaine montre un tissu moins condensé, avec un cytoplasme irrégulier entourant des noyaux endommagés, les tumeurs

en régression sont également accompagnée de fibrose. La prolifération des cellules tumorales a été aussi remarquablement diminuée en termes de marquage KI67 après une semaine de traitement au Tamoxifène (**Figure 2B**).

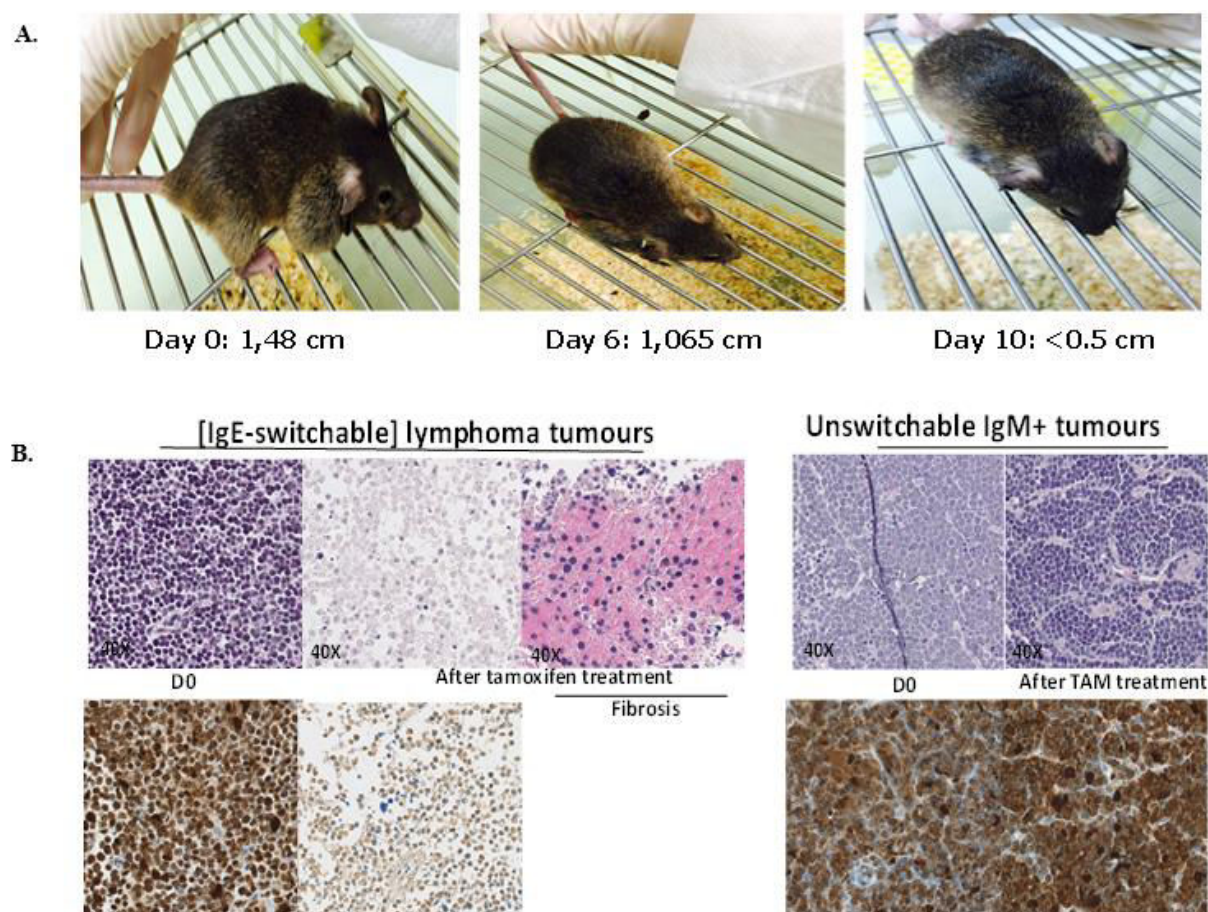


Figure 2 : Regression de la taille de tumeurs et la morphologie tissulaire des souris Cre+.

A. Cette figure montre une réduction de la taille de tumeur d'une souris Cre⁺ après traitement au Tamoxifène mesurée après 6 et 10 jours.

B. Haut : Marquage Hématoxyline et Eosine des coupes des tumeurs prélevées au jour « 0 » avant tout traitement et après une semaine d'injection du Tamoxifène. Bas : Marquage KI67 des coupes des tumeurs prélevées au jour « 0 » avant tout traitement et après une semaine d'injection du Tamoxifène.

III. hIgE introduit des changements d'expression de certains gènes dans les cellules B tumorales

Finalement, nous avons recherché des changements du profil transcriptomique global entre des cellules hIgE⁺ par rapport des cellules B non switchées hIgM⁺. Pour le faire, des biopsies d'une même souris ont été biopsiées à J0 (cellules hIgM⁺) et après une semaine de traitement au Tamoxifène (cellules hIgE⁺). Les modifications observées dans ces conditions sont restées modestes. Les changements les plus remarquables appartiennent aux catégories suivantes :

- Cycle cellulaire : plusieurs gènes sont sous-régulés dans les cellules IgE+ y compris Smc2 (*Structural maintenance of chromosomes protein 2*) requis pour la conversion de la chromatine interphasique en chromosomes condensés de type mitotique, kif11 (*Kinesin-like protein 11*) nécessaire pour établir un fuseau bipolaire pendant la mitose et Casc5 nécessaire pour la fixation des kinétochores aux microtubules du fuseau durant la mitose cellulaire.
- Marqueurs tumoraux : les gènes de cette catégorie sont aussi sous-régulés dans les cellules hIgE+. Parmi eux, RNF213 (*Ring Finger Protein 213*) impliqué dans l'angiogenèse, Vps13a (*Vacuolar Protein Sorting 13 Homolog A*) qui contrôle le transport protéique vers les endosomes, lysosomes et les membranes plasmiques, EGFL6 (*EGF Like Domain Multiple 6*) marqueur potentiel de tumeurs malignes et MALAT1 (*Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1*) en association avec la prolifération et de métastases des cellules cancéreuses.
- Adhésion cellulaire : Les gènes sous-régulés de cette catégorie sont les suivants : CTNNA1 (*Catenin Alpha 1*) qui s'associe au domaine cytoplasmique d'une variété de cadhérines, CD93 qui interagit avec les collagènes et impliqué dans les adhésions intracellulaire et PLXNC1 (*Plexin C1*) induisant de signalisation d'adhésion cellulaire dépendant du calcium.
- Survie cellulaire : Les gènes sous-régulés sont : Pik3ap1 (*Phosphoinositide-3-Kinase Adaptor Protein 1*) adaptateur au cours de développement des cellules B et Bcl11a (*B Cell CLL/Lymphoma 11A*) un proto-oncogène des cellules B.
- Signalisation cellulaire : les gènes de cette catégorie sont sur-exprimés dans les cellules B exprimant le hIgE, comprenant Ms4a4a (*Membrane Spanning 4-Domains A4A*) impliqué dans la transduction des signaux cellulaires et Sh2b2 (*SH2B Adaptor Protein 2*) protéine adaptatrice pour plusieurs membres de la famille de tyrosine kinase.
- Récepteurs : gènes sur-exprimés et compris le Fc gamma R1 récepteur de haute affinité d'IgG, Fc epsilon R1 récepteur de haute affinité d'IgE et Clec4n (*C-Type Lectin Domain Containing 4c*) récepteur fonctionnel des alpha-mannanes.
- Apoptose : plusieurs gènes sont sur-régulés au niveau des B IgE+ incluant ddn qui favorise l'apoptose des podocytes rénaux glomérulaires et Igfbp3 (*Insulin Like Growth Factor Binding Protein 3*) montré à inhiber ou stimuler les effets favorisant la croissance et Lgals3.

- Réponse immunitaire : Des gènes sont aussi sur-exprimés dans cette catégorie ; cd14 impliqué dans la réponse immunitaire innée contre le lipopolysaccharide bactérien (LPS), Slpi (*Secretory Leukocyte Peptidase Inhibitor*) inhibiteur des protéinases modulant les réactions inflammatoires, C1qa le premier composant du système de complément et Ifi30 (*IFI30, Lysosomal Thiol Reductase*) thiol-réductase lysosomale pouvant réduire les liaisons disulfure des protéines et jouant un rôle dans la neutralisation des antigènes.

En résumé, nos résultats préliminaires obtenus sur deux souris ont montré que l'IgE humaine affecte la croissance cellulaire, induit l'apoptose des cellules B cancéreuses et dérégule au plan transcriptionnelle l'activité de plusieurs groupes de gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose, l'adhésion cellulaire ou encore la réponse immune.

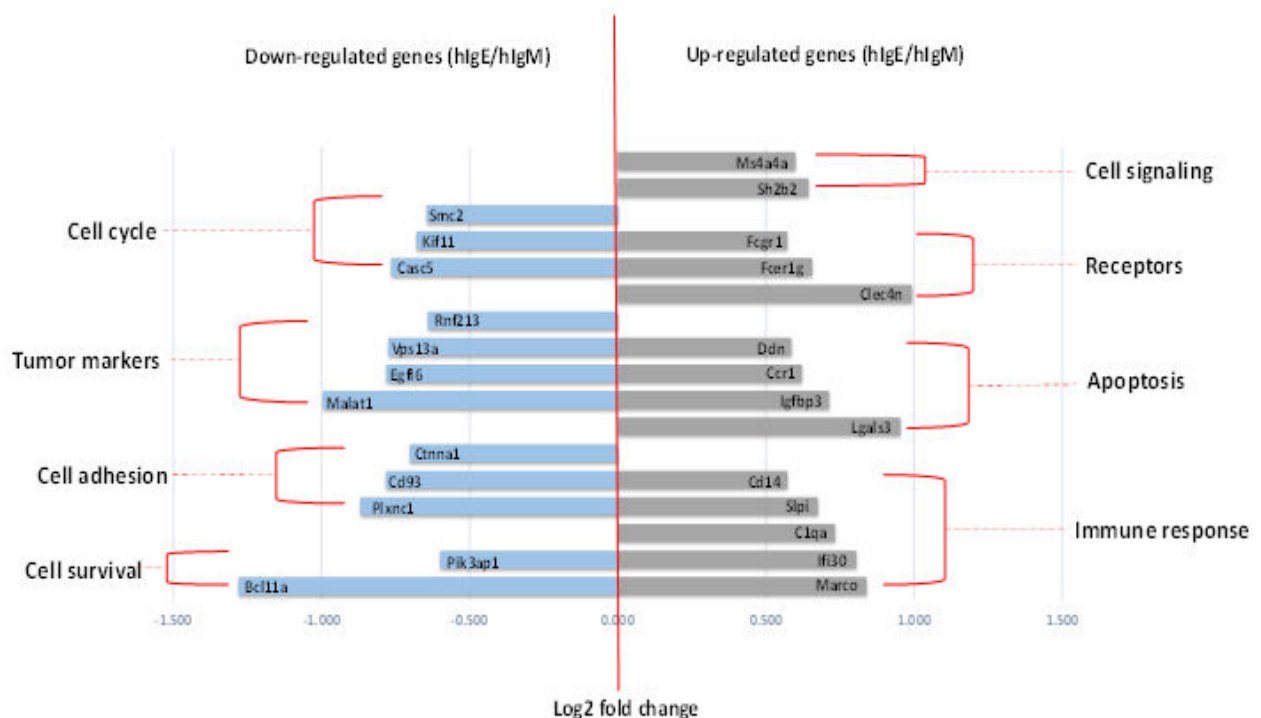


Figure 3 : Analyse transcriptomique des cellules B hIgE+.

Principaux gènes exprimés de manière différentielle dans les biopsies tumorales exprimant l'IgE humaine par rapport avec des cellules B non switchées hIgM+.

Conclusions et perspectives

De nombreuses proliférations malignes de la lignée B ont un phénotype étroitement lié à la classe de BCR produit. Pourtant les modalités selon lesquelles la classe de l'Ig et du BCR influent sur le destin B restent imparfaitement comprises. Nous l'étudions notamment à travers différents modèles transgéniques forcés à l'expression unique ou inductible d'une classe d'Ig fixée. Dans ces modèles, nous avons étudié des cellules B tumorales via une oncogénèse B induite permettant

de disposer d'animaux porteurs de tumeurs primaires. La dérégulation de c-myc par translocation sur des locus d'immunoglobuline (Ig) peut ainsi facilement initier des proliférations malignes des cellules B, avec chez la souris comme chez les patients des phénotypes assez diversifiés (leucémie aiguë, lymphome Burkitt-like, lymphome diffus, plasmocytome). Le récepteur des cellules B (BCR) contrôle la survie B via un signal tonique indépendant du ligand. L'expression d'Ig de classes différentes influence en physiologie la fonction et le destin des lymphocytes B. De ce fait les cellules mIgE+ sont rares en physiologie, comme le sont les lymphoproliférations mIgE+ en pathologie. Ce modèle nous permet aujourd'hui, simplement par switch IgE sous tamoxifène d'induire la régression tumorale de lymphomes myc-induits avec apparition d'une nécrose tumorale rapide ce qui semble accompagnée par une prolongation de la survie de ces souris. En outre, l'expression in vivo BCR d'IgE affecte l'expression de certains gènes dans les tumeurs (mais ne permet en fait que l'analyse de l'expression génique dans les cellules survivant à l'expression d'IgE). Nous cherchons aujourd'hui à valider ces résultats sur des cohortes plus importantes d'animaux tumoraux, afin de disséquer les voies d'induction de mort cellulaire mises en jeu dans ce mécanisme, dans l'espoir que leur compréhension débouche sur un accès à de nouvelles stratégies d'induction de mort de cellules tumorales. En plus des études ex-vivo seront réalisées pour mieux évaluer l'effet des BCR à IgE sur les cellules B tumorales.

Annexe 2 : Le devenir des cellules B hIgE⁺ en présence ou en l'absence du récepteur FcεRI (Projet arrêté faute de résultats préliminaires encourageants et du fait de la difficulté d'obtention de cohortes significatives)

Contexte, Objectif de ce projet et justifications

Le récepteur à haute affinité pour l'immunoglobuline E (désigné par FcεRI) est un membre de la superfamille des récepteurs de l'antigène (Ag) responsable de la liaison des IgE spécifiques d'un agent pathogène ou d'un allergène avec des fonctions immunologiques effectrices au sein des cellules. Afin de mieux caractériser la fonction mIgE dans les lymphocytes B primaires et transfectés, nous avons étudié les cellules B exprimant mIgE humaine (Laffleur et al., 2015) lors de l'induction de creERT2, afin de connaître le destin des cellules B IgE⁺ en présence ou en l'absence de FcεRI in-vitro et in-vivo. Des travaux préliminaires par transduction de la lignée A20 nous avaient montré une corrélation directe entre l'expression d'IgE obtenue par transfection, et l'induction consécutive sur les mêmes cellules A20 de l'expression du récepteur FcεRI.

L'une de nos questions était de savoir si cette induction du récepteur FcεRI, apparemment co-exprimé dans les cellules B exprimant un BCR à IgE au niveau d'une lignée, était un phénomène physiologique d'importance, qui pourrait aussi être observé au niveau de cellules B primaires ? Si oui, cette induction pourrait-elle contribuer au destin particulier des cellules qui l'expriment et notamment à l'activation de voies pro-apoptotiques ?...

Stratégie du travail et résultats obtenus

Nous avons établi une lignée homozygote InEps (expression d'un BCR hIgM floxé, suivi du gène hIgE), positive pour le transgène CreTamox et KO pour le FcεRI, comparer avec des souris FcεRI^{+/+}.

Les matériels expectés à être utilisés :

- Lignée A20 murine transfectée par l'IgE humaine (2 clones d'IgE ε18 et ε41 ont été testés)
- Lignée A20 murine transfectée par l'IgM humaine (contrôle)
- Groupe d'intérêt: InEps^{+/+} CreTamox⁺ FcεRIγ^{-/-}
- Groupe contrôle: InEps^{+/+} CreTamox⁺ FcεRIγ^{+/+}

I. Résultats obtenus sur la lignée A20 transfectée:

En premier temps, nous avons essayé de regarder la co-expression d'IgE humaine et de FcεR1 murine dans la lignée cellulaire transfectée A20. Pour cela, les cellules ont été marquées en par les deux anticorps: anti-hIgE-FITC et anti-FcεR1-PE puis elles été analysées par la cytométrie en flux (marquage IgE et FcεR1 en extracellulaire) (**Figure 1A**) et par l'AMNIS (marquage IgE en extracellulaire et FcεR1 en extracellulaire et intracellulaire) (**Figure 1B**). Les résultats de la cytométrie en flux ont montré une co-expression hIgE/FcεR1 dans les cellules A20 hIgE+, mais aussi dans la lignée hIgM+ (60% cellules positives). Les analyses de l'AMNIS ont permis de conclure que la lignée cellulaire B A20 transfectée par le hIgE (manip faite sur le clone ε18) co-exprime le BCR à IgE et le récepteur FcεR1 sur la surface des cellules B.

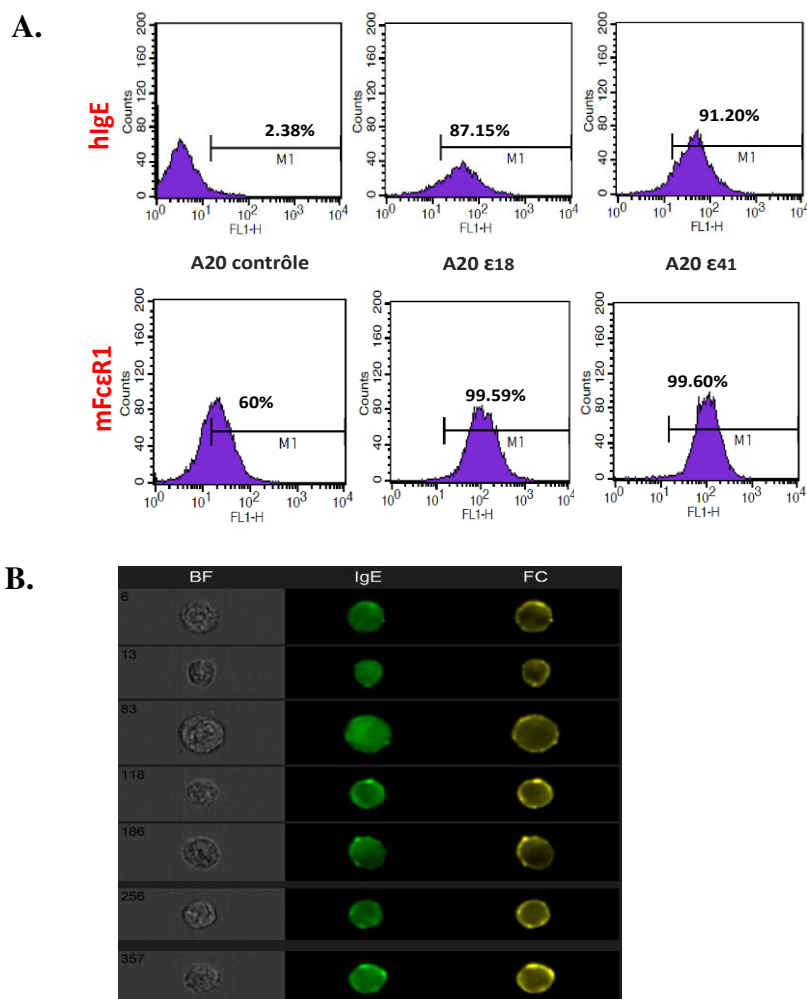


Figure 1 : Co-expression de hIgE et du FcεR1 dans les transfectants A20.

A. Les cellules A20 transfectées par le hIgE ou hIgM ont été marquées en extracellulaire par l'anti-hIgE-FITC et l'anti-FcεR1-PE puis analysées en cytométrie en flux.

B. Les cellules A20 transfectées par le hIgE ont été marquées en extracellulaire par l'anti-hIgE-FITC et l'anti-FcεR1-PE et en intracellulaire par l'anti-FcεR1-PE puis analysées par l'AMNIS.

II. Résultats obtenus sur les cellules B primaires

Ensuite, nous avons essayé de tester la co-expression du BCR à IgE et du récepteur FcεR1 cette fois dans les cellules B primaires isolées à partir de la rate murine et stimulées par LPS+IL4 pour 4 jours pour favoriser le switch vers l'IgE murine. L'évaluation de la co-expression protéique a été faite par la cytométrie en flux (**Figure 2**). Les résultats obtenus ont montré un très faible pourcentage cellulaire B IgE+ (exemple pour une souris 2% avec une absence d'expression du récepteur FcεR1. Le faible pourcentage des cellules IgE+ peut s'expliquer par le fait que la majorité des cellules qui expriment l'IgE entre en apoptose et sont alors exclues de l'analyse. Pareillement à la lignée A20 transfectée, des manips d'AMNIS ont été aussi réalisées sur les cellules B primaires stimulées in-vitro, mais dans ces conditions la mauvaise qualité des cellules obtenues (avec un fort taux d'apoptose) a largement compliqué les analyses.

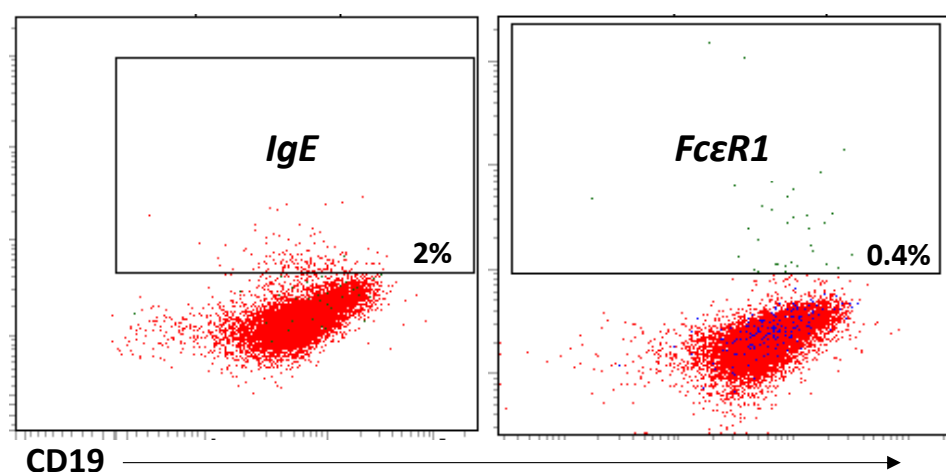


Figure 2 : Co-expression de hIgE et du FcεR1 dans B primaires.

Les cellules B primaires stimulées in-vitro par LPS et IL4 pour 4 jours ont été marquées en extracellulaire par l'anti-hIgE-FITC et l'anti-FcεR1-PE puis analysées en cytométrie en flux.

Conclusion

L'objectif principal de ce projet était de voir le devenir des cellules B hIgE⁺ en présence ou en l'absence du récepteur FcεRI. Nous avons pu le montrer sur la lignée A20 transfectée par le hIgE qui est plus résistante au mécanisme de mort programmé. Mais malheureusement nous n'avons pas pu le montrer sur les cellules B primaires car nous avons été confrontés pas mal de difficultés parmi elles : la rareté des cellules IgE⁺ in-vivo et l'apoptose rapide des cellules exprimant le BCR à IgE. Une tentative, exemple le traitement des cellules par des inhibiteurs d'apoptose (cyclosporin A ou caspase inhibitor Q-VD-OPh) sera ainsi intéressante à essayer pour gagner un tel pourcentage cellulaire vivant et analysable.

Annexe 3: (Revue 1)

When immunoglobulin genes assemble with bricks from other chromosomes

Brice Laffleur, **Zeinab Dalloul**, Iman Dalloul, Sandrine Le Noir et Michel Cogné

Revue acceptée en September 2016 à M/S (Médecine/Sciences)

Cette revue décrit un type de recombinaison en trans au sein du locus IgH qui assemble une translocation du gène LAIR1 (*Leukocyte Associated Immunoglobulin like Receptor 1*) situé normalement sur le chromosome 19 vers locus IgH situé sur chromosome 14 chez des patients atteints du paludisme.

J'ai participé à dessiner les figures de cette revue.



RÉFÉRENCES

5. Thion MS, McGuire JR, Sousa CM, et al. Unraveling the role of huntingtin in breast cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 2015 ; 107 : djv208.
6. Sorensen SA, Fenger K, Olsen JH. Significantly lower incidence of cancer among patients with Huntington disease: An apoptotic effect of an expanded polyglutamine tract? *Cancer* 1999 ; 86 : 1342-6.
7. Ji J, Sundquist K, Sundquist J. Cancer incidence in patients with polyglutamine diseases: a population-based study in Sweden. *Lancet Oncol* 2012 ; 13 : 642-8.
8. Charafe-Jauffret E, Chaffanet M, Bertucci F, et al. Les cancers du sein : vers un modèle cellulaire et moléculaire intégré. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 626-32.
9. Tokes AM, Szasz AM, Juhasz E, et al. Expression of tight junction molecules in breast carcinomas analysed by array PCR and immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res* 2012 ; 18 : 593-606.
10. Hoover KB, Liao SY, Bryant PJ. Loss of the tight junction MAGUK ZO-1 in breast cancer: relationship to glandular differentiation and loss of heterozygosity. *Am J Pathol* 1998 ; 153 : 1767-73.
11. Martin TA, Watkins G, Mansel RE, et al. Loss of tight junction plaque molecules in breast cancer tissues is associated with a poor prognosis in patients with breast cancer. *Eur J Cancer* 2004 ; 40 : 2717-25.
12. Lo Sardo V, Zuccato C, Gaudenzi G, et al. An evolutionary recent neuroepithelial cell adhesion function of huntingtin implicates ADAM10-Ncadherin. *Nat Neurosci* 2012 ; 15 : 713-21.

NOUVELLE

Quand les gènes codant les anticorps s'adjoignent des fragments venus d'autres chromosomes

Brice Laffleur¹, Zeinab Dalloul², Iman Dalloul², Sandrine Le Noir², Michel Cogné^{2,3}

¹Department of immunology, Columbia university, New York, États-Unis ;

²Université de Limoges, CNRS UMR 7276, Contrôle de la réponse immune et lymphoprolifération, faculté de médecine, 2, rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France ;

³Institut universitaire de France, Paris, France.

cogne@unilim.fr

Diversité du système immunitaire et recombinaisons chromosomiques

L'immunité met en œuvre une multiplicité de cellules et molécules aptes à reconnaître un immense répertoire de structures moléculaires portées par les antigènes. Ceci permet à la fois la « tolérance du soi » en condition basale et une réponse à diverses agressions grâce à une immunité contre le « non-soi » (comme des microorganismes) ou le « soi modifié » (induit par des mutations, un cancer, etc.). Chez les invertébrés, l'immunité innée repose sur un répertoire limité de récepteurs invariants reconnaissant un spectre restreint d'antigènes. Elle a l'avantage de préexister à l'arrivée de tout antigène étranger mais elle présente peu de spécificité et d'affinité, et aucune adaptabilité. Chez les mammifères, s'ajoute une immunité adaptative qui est, elle, capable de lier une immense diversité d'antigènes avec spécificité et affinité via deux grands répertoires très diversifiés de cellules (les lymphocytes T et B) et de récepteurs ou molécules solubles : les récepteurs TCR (*T cell receptor*) et BCR (*B cell receptor*) ou les immunoglobulines (Ig) solubles. L'économie des gènes

codant ces récepteurs permet de générer leur diversité de façon combinatoire, en réassociant des fragments de gènes à la manière d'un patchwork pour créer dans une cellule la combinaison codant une Ig ou un TCR donné. Des réarrangements chromosomiques génèrent ainsi une variété quasi-infinie de récepteurs à partir de seulement quelques dizaines de gènes ou briques élémentaires (*Figure 1*). Alors que ces mécanismes semblaient connus en détails, un type de réarrangement très inattendu vient d'être décrit comme permettant la génération d'anticorps de large réactivité contre le parasite responsable du paludisme, *Plasmodium falciparum* [1], remettant certains dogmes en questions...

Génération de la diversité des récepteurs à l'antigène

Les récepteurs à l'antigène, TCR et BCR, des lymphocytes T et B sont codés via la mécanique moléculaire commune de la « recombinaison V(D)J ». Celle-ci survient avant la rencontre avec l'antigène, dans le thymus pour les lymphocytes T, et dans la moelle osseuse pour les B. Elle assemble des segments de gènes

nommés V (variable), D (diversité) et J (jonction) (*Figure 1A*). Le brassage combinatoire de ces quelques dizaines de gènes s'opère grâce aux enzymes spécialisées RAG (*recombination activating gene*) qui coupent l'ADN aux extrémités des segments V(D)J, au niveau de signaux dits RSS (*recombination signal sequences*). Les mécanismes classiques de réparation de l'ADN permettent ensuite de ressouder deux segments entre eux. À la diversité combinatoire, ces mécanismes de réparation ajoutent une certaine « imprécision » (par l'ajout ou le retrait de quelques bases au point de cassure qui a été réparé), augmentant ainsi la diversité des séquences générées (diversité dite « jonctionnelle ») [2, 3]. L'assemblage unique par chaque clone T ou B de tels segments « V(D)J », génère ainsi des populations lymphocytaires polyclonales qui expriment globalement un répertoire de récepteurs dont la diversité est quasi-infinie. Parmi ces millions de clones (chacun arborant un récepteur de spécificité définie), certains seront activés par la rencontre d'un antigène spécifique et participeront donc à la réponse immune.

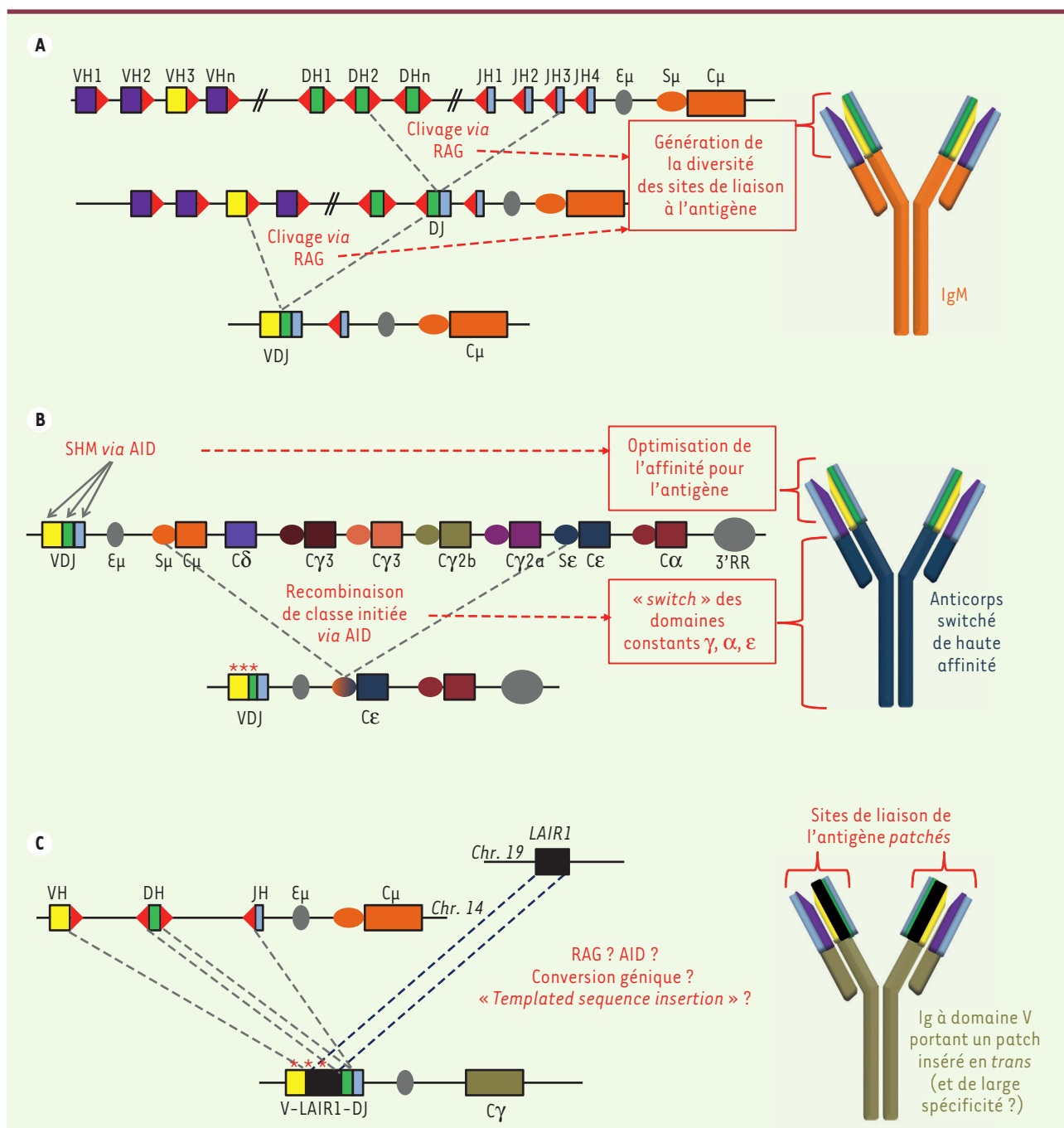


Figure 1. Mécanisme des remaniements des gènes d'immunoglobulines. **A.** Génération initiale de la diversité des immunoglobulines (Ig) par RAG (recombination activating gene) et recombinaison VDJ au sein du locus des chaînes lourdes d'Ig (IgH). Les segments V, D, J et constant du locus IgH sont respectivement représentés en violet et jaune, vert, bleu et orange ; les RSS (recombination signal sequences) sont schématisés par des triangles rouges. La partie droite représente une IgM après recombinaison VDJ. **B.** Optimisation des Ig sous l'effet d'AID (activation induced cytidine deaminase) après rencontre de l'antigène, par hypermutation somatique et recombinaison de commutation de classe (switch ou CSR [class switch recombination]) du locus IgH. Les régions switch et les gènes constants sont respectivement représentés par des ronds et des carrés. Les étoiles correspondent aux mutations induites par AID sur le segment VDJ. La partie basse du schéma représente le locus IgH après CSR ; la partie droite représente une Ig après SHM (somatic hypermutation) et CSR, dans l'exemple du switch IgE. **C.** Insertion par recombinaison en « trans » d'une séquence non-Ig LAIR1 au sein d'un gène réarrangé VDJ du locus IgH et génération d'un domaine variable porteur d'un patch. Schéma représentatif d'une insertion du gène LAIR1 (leukocyte associated immunoglobulin like receptor 1) (représenté en noir) lors d'une recombinaison (VDJ-like ?) du locus IgH. Le schéma de droite représente une Ig avec un site de fixation à l'antigène comprenant l'addition d'un patch LAIR1.



Les cellules T orchestrent ces réponses et peuvent détruire des cellules cibles ; les cellules B pourront sécréter leurs BCR sous la forme d'Ig solubles, les anticorps. Une mémoire immunitaire sera également générée permettant une réponse accélérée en cas de nouvelle rencontre avec le même antigène (vaccination).

Maturation d'affinité et commutation de classe des immunoglobulines

Afin d'adapter la réponse immune après la rencontre avec l'antigène, la lignée B est capable de prolonger le remaniement des gènes d'Ig grâce à l'enzyme AID (*activation induced cytidine deaminase*). Celle-ci initie deux processus : l'hypermutation somatique (SHM, pour *somatic hypermutation*) et la recombinaison de classe (CSR, pour *class switch recombination*) (Figure 1B) (pour revue voir [4]). Un segment VDJ préalablement assemblé pourra alors être modifié et son site de liaison à l'antigène amélioré par SHM. Un processus de sélection cellulaire favorise les cellules présentant le BCR ayant la plus haute affinité vis-à-vis de l'antigène. Plusieurs « classes » de BCR et d'Ig (IgM, puis IgG, IgA ou IgE, avec différents domaines constants) sont en outre successivement produites par un clone B (Figure 1B). Cette « commutation isotypique » ou « switch » résulte de la CSR entre des séquences d'ADN (régions « switch » des gènes d'Ig) dont le ciblage par AID crée des cassures double brin. Un dernier type AID-dépendant de recombinaison est la LSR (*locus suicide recombination*), une variante du switch qui supprime la totalité des gènes constants IgH (à l'origine de la chaîne lourde des Ig) et entraîne donc la perte du BCR et l'apoptose [5].

Interactions cis- et trans-chromosomiques

Physiologiquement, dans l'immense majorité des cas, ces cassures programmées du génome réassocient *in fine* des fragments de gènes qui sont des partenaires légitimes (Ig-Ig dans les B, TCR-TCR dans les T). Les *trans*-recom-

binaisons avec d'autres chromosomes sont considérées comme rarissimes, relevant du champ de la pathologie. Les remaniements lymphoïde-spécifiques physiologiques du génome nécessitent donc un contrôle strict et leurs erreurs peuvent s'avérer dramatiques (comme la translocation d'un oncogène, à l'origine de leucémies ou de lymphomes) [10] (→).

L'expression et la localisation nucléaire des enzymes RAG et AID ainsi que leur accès à la chromatine sont ainsi régulées dans le temps et l'espace, strictement dans les lignées lymphoïdes, et à des stades spécifiques de leur développement. Les chromosomes impliqués sont alors relocalisés dans des compartiments nucléaires particuliers qu'on peut dénommer « *recombination factories* »¹. Différents activateurs transcriptionnels des gènes d'Ig ou de TCR orchestrent leurs remaniements en rapprochant les séquences cibles de recombinaison, créant d'éventuelles boucles chromosomiques lors de recombinaison « en *cis* » (sur un même chromosome). Les recombinaisons V(D)J sont réputées survenir quasi-exclusivement en *cis* lorsqu'elles surviennent entre des partenaires « légitimes » (c'est-à-dire entre segments V, D et J authentiques). Au contraire, les réarrangements de switch (qui surviennent de façon simultanée sur les deux allèles) impliquent fréquemment des recombinaisons inter-alléliques « en *trans* » (sortes de translocations légitimes entre chromosomes de la même paire) [6].

Un nouveau mécanisme de génération d'anticorps en *trans*

Le nouveau type de remaniement décrit par Tan *et al.* s'inscrit dans un contexte d'interactions *trans*-chromosomiques, mais avec la particularité d'impliquer, au moins partiellement, les recombinaisons V(D)J et d'apparier les locus d'Ig avec un gène autre situé sur un chro-

mosome non homologue [1]. De façon étonnante, elles semblent cependant physiologiques puisqu'elles aboutissent à la production d'une molécule qui porte la plupart des caractéristiques d'un anticorps fonctionnel présentant une réactivité large et qui aurait vraisemblablement un rôle actif dans la réponse immune anti-plasmodiale.

Ce nouveau type d'anticorps a été découvert chez deux individus différents, à l'occasion d'une étude portant sur les anticorps de réactivité large qui sont présents chez des sujets impaludés (le paludisme se traduit notamment par la présence de *P. falciparum* infectant les érythrocytes et induisant alors l'expression d'antigènes du parasite à la surface des hématies infectées). Alors que les malades peuvent présenter des accès sévères de paludisme en début d'infection ou de réinfection, les personnes vivant en zone impaludée développent une immunité et des anticorps dirigés contre l'isolat de parasite à l'origine de leur infection. Quelques sujets développent des anticorps dits « de large réactivité » qui sont capables d'agglutiner des hématies infectées par de multiples isolats indépendants de *P. falciparum*. L'étude de leur immunité présente donc un intérêt particulier, potentiellement révélateur de stratégies naturelles d'immunité anti-plasmodiale large. Ainsi, après avoir criblé des centaines d'échantillons, Tan *et al.* ont identifié quelques donneurs sains dont les anticorps sont capables de neutraliser des érythrocytes infectés par 6 isolats différents du parasite et d'entraîner leur élimination par phagocytose Ig-dépendante [1]. Les lymphocytes B de ces donneurs ont été immortalisés afin de déterminer la séquence de ces anticorps protecteurs de large réactivité. De façon totalement inattendue, le séquençage a révélé que le domaine de liaison à l'antigène de certains de ces anticorps était codé (chez deux patients indépendants) par un gène composite qui incluait une large portion étrangère aux

(→) Voir la Synthèse de S. Gisselbrecht, m/s n° 2, février 2003, page 201

¹ Usines à recombinaison.

gènes normaux d'Ig (qui sont situés sur le chromosome 14 humain) identifiable comme provenant du chromosome 19 mais recombinée et insérée entre les segments V et DJ. Ce segment de chromosome 19 correspond à une partie du gène *LAIR1* (*leukocyte associated immunoglobulin like receptor 1*), un récepteur inhibiteur (à domaines ITIM [*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*]) appartenant à la superfamille des Ig exprimé par les cellules B et liant, normalement, le collagène. Une séquence codant 98 acides aminés de *LAIR1* est ainsi exprimée comme une sorte de « patch » inséré au sein d'un domaine variable d'Ig et permet, après hypermutation somatique, d'y lier non pas le collagène, mais des épitopes de la famille multigénique *RIFIN* (la plus large famille d'antigènes variants de *Plasmodium*, qui sont exprimés à la surface des érythrocytes infectés et impliqués en tant qu'adhésines dans certaines formes sévères du paludisme). De plus, une fois cette séquence insérée au sein du gène VDJ, elle subit comme un VDJ classique l'hypermutation permettant d'augmenter son affinité pour l'antigène plasmodial *RIFIN* (et de supprimer l'affinité de *LAIR1* pour le collagène) (*Figure 1C*).

Conclusion

Ce nouveau mécanisme démontre la capacité physiologique de nos cellules B à introduire au sein d'un gène d'Ig une séquence étrangère (non-Ig) afin de créer un néo-site de liaison à l'antigène. Le séquençage haut-débit devrait permettre d'évaluer la fréquence de telles insertions d'un patch *LAIR1* dans des populations saines et éventuellement exposées à des infections chroniques. D'autres patches de séquences non-Ig ainsi insérés pourraient également être découverts et il reste donc à savoir si le cas de *LAIR1*, pour les anticorps anti-*Plasmodium*, restera ou non un exemple unique d'anticorps fonctionnel naturel incluant un patch « non-Ig ».

Le mécanisme de ce remaniement génique reste à préciser, mais il porte au moins la signature de RAG puisque l'insertion se fait au niveau du point de jonction entre les segments V et DJ. De plus, la séquence de *LAIR1* se révèle flanquée d'introns incluant des séquences qui évoquent des RSS cryptiques. Une *trans*-recombinaison simple médiée par RAG semble exclue car les cellules B des clones concernés ont conservé 2 chromosomes 19 portant des copies intactes du gène *LAIR1*. Ceci évoquerait donc plutôt un phénomène de type conversion génique, ou encore l'insertion au point de cassure d'un gène d'Ig d'un pré-ARN messager *LAIR1* rétrotranscrit (ce type de réparation mutagène des cassures double brin avec insertion d'une séquence rétrotransposée a récemment été décrit et dénommé « *templated sequence insertion* ») [7]. Pour les anticorps anti-*Plasmodium*, la complexité du phénomène décrit est encore accrue par l'implication claire d'AID dans les mutations secondaires du gène *V-LAIR1-DJ* réarrangé et du patch *LAIR1*. L'infection palustre entraîne une stimulation B chronique et une expression accrue d'AID, pouvant favoriser des translocations [8]. Il est possible qu'elle suscite également la *trans*-recombinaison de *LAIR1* au sein d'un segment VDJ, puis son hypermutation. Dans ce contexte, on se rappellera aussi que même s'ils échappent au dogme et au schéma classique de la maturation B, des épisodes de co-expression de RAG et AID ont été démontrés [9].

Alors que ce processus est sans doute plus l'exception que la règle, il dévoile cependant des aptitudes insoupçonnées des lymphocytes B à poursuivre encore plus loin l'extrême diversification de leur répertoire afin d'optimiser et d'adapter les réponses immunes aux antigènes rencontrés, par l'usage d'un arsenal dont la description vient de s'enrichir d'une nouvelle arme ! Il est frappant de noter que cette description survient au cours de la caractérisa-

tion d'anticorps d'un grand intérêt potentiel en immunothérapie, actuellement traqués dans le cadre de la protection contre divers agents infectieux (VIH [virus de l'immunodéficience humaine], *Norovirus*, *Influenza*, *P. falciparum*, etc.), les anticorps neutralisants à vaste spectre de réactivité [11] (→). ♦

(→) Voir la Nouvelle de T. Bruel et al. sur les anticorps bNAb, page 671 de ce numéro

When immunoglobulin genes assemble with bricks from other chromosomes

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Tan J, Pieper K, Piccoli L, et al. A *LAIR1* insertion generates broadly reactive antibodies against malaria variant antigens. *Nature* 2016 ; 529 : 105-9.
2. Nishana M, Raghavan SC. Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunology* 2012 ; 137 : 271-81.
3. Lieber MR, Yu K, Raghavan SC. Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair* 2006 ; 5 : 1234-45.
4. Laffleur B, Denis-Lagache N, Péron S, et al. AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* 2014 ; 5 : 1118-31.
5. Péron S, Laffleur B, Denis-Lagache N, et al. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 2012 ; 336 : 931-4.
6. Laffleur B, Bardet SM, Garot A, et al. Immunoglobulin genes undergo legitimate repair in human B cells not only after cis- but also frequent trans-class switch recombination. *Genes Immun* 2014 ; 15 : 341-6.
7. Onozawa M, Zhang Z, Kim YJ, et al. Repair of DNA double-strand breaks by templated nucleotide sequence insertions derived from distant regions of the genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : 7729-34.
8. Robbiani DF, Deroubaix S, Feldhahn N, et al. *Plasmodium* infection promotes genomic instability and AID-dependent B cell lymphoma. *Cell* 2015 ; 162 : 727-37.
9. Wang JH, Gostissa M, Yan CT, et al. Mechanisms promoting translocations in editing and switching peripheral B cells. *Nature* 2009 ; 460 : 231-6.
10. Gisselbrecht S. Oncogènes et leucémies : historique et perspectives. *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 201-10.
11. Bruel T, Mouquet H, Schwartz O. Des anticorps qui détruisent les cellules infectées par le VIH-1. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 671-4.

Annexe 4 : (Revue 2)

B Cell intrinsic Mechanisms Constraining IgE Memory

Brice Laffleur, Orianne Debeaupuis, **Zeinab Dalloul** and Michel Cogné.

Revue acceptée en novembre 2017 à Frontiers of immunology

Cette revue parle de la classe d'IgE d'immunoglobuline et les mécanismes intrinsèques des cellules B qui contribuent ou aggravent la formation d'une mémoire de type IgE dangereuse en cas des maladies allergiques.

J'ai participé à la rédaction et l'organisation des références de cette revue



B Cell Intrinsic Mechanisms Constraining IgE Memory

Brice Laffleur¹, Orianne Debeaupuis², Zeinab Dalloul³ and Michel Cogné^{3,4*}

¹ Department of Microbiology and Immunology, College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY, United States, ² Faculté de Pharmacie, Université Paris-Descartes, Paris, France, ³ UMR 7276 Centre National de la Recherche Scientifique: Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations, Université de Limoges, Limoges, France, ⁴ Institut Universitaire de France, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Deborah K. Dunn-Walters,
University of Surrey,
United Kingdom

Reviewed by:

David Holowka,
Cornell University, United States
Gregory C. Ippolito,
University of Texas at Austin,
United States

*Correspondence:

Michel Cogné
cogne@unilim.fr

Specialty section:

This article was submitted to
B Cell Biology,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 13 August 2017

Accepted: 25 September 2017

Published: 13 November 2017

Citation:

Laffleur B, Debeaupuis O, Dalloul Z
and Cogné M (2017)
B Cell Intrinsic Mechanisms
Constraining IgE Memory.
Front. Immunol. 8:1277.
doi: 10.3389/fimmu.2017.01277

Memory B cells and long-lived plasma cells are key elements of adaptive humoral immunity. Regardless of the immunoglobulin class produced, these cells can ensure long-lasting protection but also long-lasting immunopathology, thus requiring tight regulation of their generation and survival. Among all antibody classes, this is especially true for IgE, which stands as the most potent, and can trigger dramatic inflammatory reactions even when present in minute amounts. IgE responses and memory crucially protect against parasites and toxic components of venoms, conferring selective advantages and explaining their conservation in all mammalian species despite a parallel broad spectrum of IgE-mediated immunopathology. Long-term memory of sensitization and anaphylactic responses to allergens constitute the dark side of IgE responses, which can trigger multiple acute or chronic pathologic manifestations, some punctuated with life-threatening events. This Janus face of the IgE response and memory, both necessary and potentially dangerous, thus obviously deserves the most elaborated self-control schemes.

Keywords: IgE, B cell receptor, B-lymphocytes, IgE regulation, IgE memory

INTRODUCTION

B cells are specialized in immunoglobulin (Ig) selection and production, the development of which implies several phases. The first is antigen (Ag) independent, with V(D)J assembly creating functional B cell receptor (BCR) genes. In a second phase after cells have reached the periphery, Ag activation can induce expression of activation-induced deaminase (AID) (1, 2), then allowing a second round of Ig gene diversification by somatic hypermutation (SHM) and/or class switch recombination (CSR), which strongly influences their fate (3). In parallel, activated lymphocytes can further differentiate into memory B cells or into plasma cells (PCs) secreting antibodies. PCs can themselves be split into either short- or long-lived cells, the latter surviving and secreting Ig for years in human. CSR switches Ig production from IgM (⁺/IgD) to IgG, IgA, and IgE. IgE was the last discovered Ig class (4, 5), notably due to its low amount in body fluids and the scarcity of IgE⁺ cells *in vivo*.

Both IgE and IgG emerged in proto-mammals from the ancestral reptilian IgY molecule and further diverged (6). IgG and IgE now stand as the predominant vs. less abundant Ig class in mammals. IgE structure (i.e., constant domains, positions of disulfide bonds, and a CH3 domain N-glycosylation site) is well conserved, with homology culminating at the Fc receptor high-affinity (FcεRI) binding site (7), in agreement with its major functional role. Tiny production is another IgE conserved feature, indicative of a stringently controlled process, consistent with IgE potentially hazardous properties during anaphylactic reactions (8).

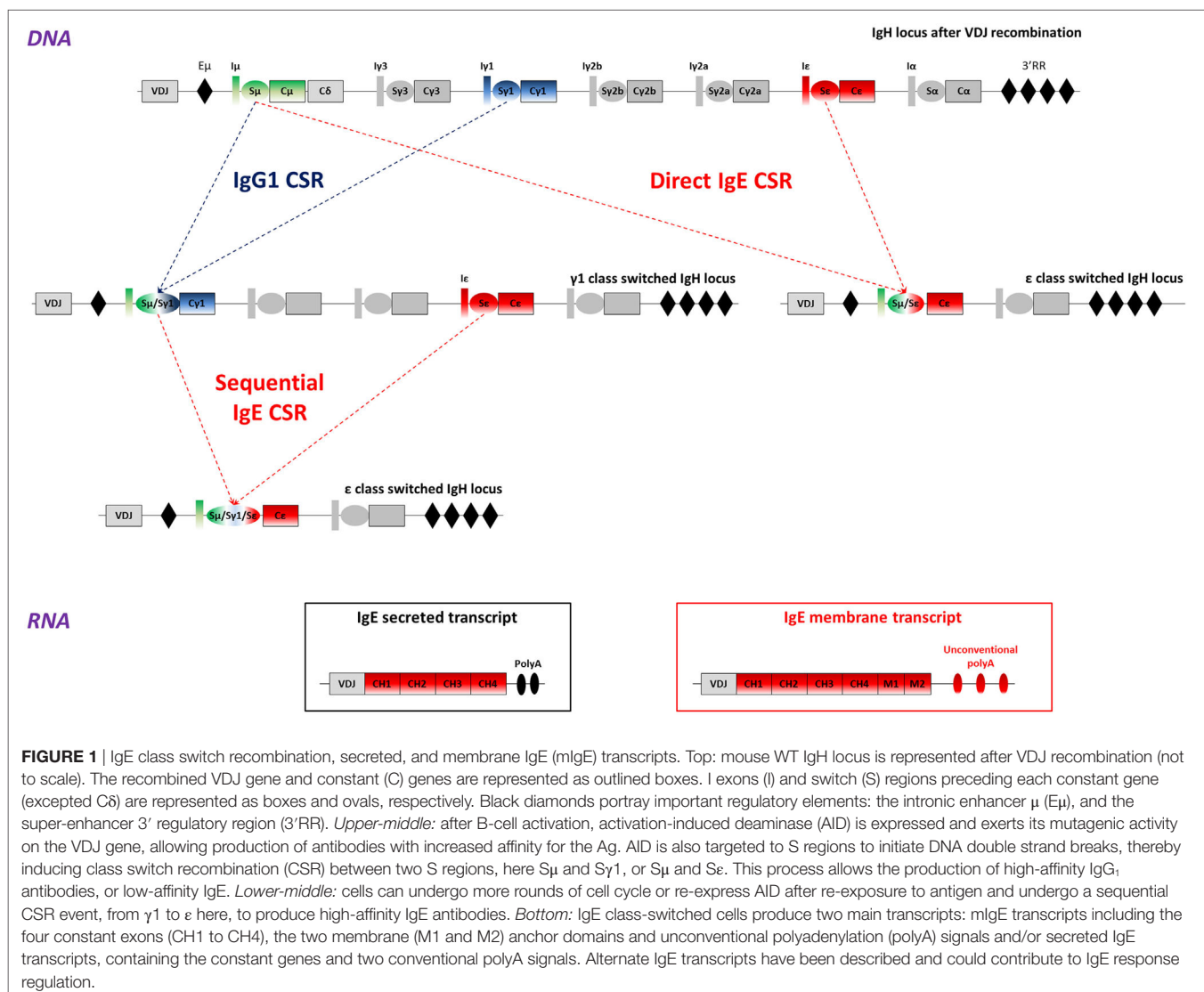
IgE antibodies are notably active against helminths, in responses featuring high total and specific IgE levels, hyper-eosinophilia and Th2 polarization (9). IgE have crucial FcεRI-dependent anti-venom properties (10, 11). They also show an adjuvant effect for IgG responses, dependent on the low-affinity FcεRII receptor (CD23) (12–14), which could participate in Ag endocytosis and presentation to T cells. IgE can finally act against tumors by recruiting eosinophils, mastocytes, macrophages, and CD8 T-cells, in a FcεRI-dependent manner (15–17).

Unfortunately, these benefits come with multiple deleterious effects in allergies, and even also autoimmunity (18, 19). Accordingly, the immune system evolved with multiple regulations tempering IgE responses. IgE CSR is stimulated by Th2 cytokines IL4 and IL13, and by IL9 producing T-cells and mast cells [for review (20, 21)], whereas other cytokines (IFNγ, TGFβ, IL10, etc.), T_{REG} cells, and dendritic cells dampen IgE responses (22, 23). These extrinsic controls are consolidated by B cell intrinsic brakes ensuring tight regulation of IgE CSR, mostly

short-lived IgE PC differentiation and an extremely short-lived fate of lymphocytes expressing membrane IgE (mIgE). We review recent findings documenting how IgE production is intrinsically self-controlled in B cells.

IgE CSR REGULATION

Class switch recombination occurs between switch (S) donor and acceptor regions (**Figure 1**). S regions are preceded with non-translatable I exons and I promoters, regulated both by the cytokine and cellular environment and in a B cell intrinsic manner. The IgH super-enhancer 3' regulatory region (3'RR), a hub for multiple factors important for B-cell identity and/or activation is a major regulator of CSR (24, 25). Following B cell activation, germinal transcription of I-S regions is induced, recruiting AID, which initiates DNA double strand breaks under the control of the 3'RR [for review (26)]. Synapsis between broken S regions is also 3'RR dependent (27).



I promoters are crucial CSR regulators for each isotype by carrying sites for specific transcription factors. The I ϵ promoter binds E2A, AP1, C/EBP, STAT6, PU.1, Pax5, and NF- κ B (28, 29). Classically, I ϵ -Se transcription before IgE CSR is induced by phosphorylation and dimerization of STAT6, which is stabilized by SWAP-70 (30). While IL4 induces STAT6 and NFIL3/E4BP4, CD40 ligation synergistically activates NF- κ B (31). In contrast, several negative regulators inhibit Se transcription and CSR. Bcl6, strongly expressed in GC, competes with STAT6 for the same binding sites, then restricting IgE CSR. Id2 sequesters E2A and Pax5 and inhibits I ϵ transcription (32) [for review (33)]. TGF- β , IFN γ , and IL10 likely contribute to these negative regulations, and in human by concomitant binding of HoxC4 and Oct-1 to the I ϵ promoter (34).

Se structure itself contributes to IgE CSR regulation, as the shortest and least repetitive S region in both mouse and human (2 kb only, whereas Sy1 is around 10 kb) (35). Consistently, either Se replacement by S μ or insertion of Ce downstream of Sy1 enhances IgE production (36, 37). Epigenetic changes also affect Se: H3 acetylation and K4 tri-methylation (38) and IL4-dependent demethylation (39). Immature B cells, with potentially different epigenetic marks, thus preferentially switch to IgE rather than IgG₁ (40).

IgE CSR can be direct (S μ to Se) or sequential (S μ to Sy1 first and then to Se) with an IgG₁ intermediate (41) (**Figure 1**). Direct CSR produces low-affinity IgE that competes with high-affinity IgE generated by sequential CSR (42). A probabilistic model suggests that low activation induces IgE CSR while high level favors IgG₁ CSR with eventual secondary CSR to IgE (43). This could impact *in vivo* IgE responses which can be either inside or outside the GC, respectively, providing stronger or weaker co-receptor signaling. Human IgE⁺ cells are also produced by either direct or sequential CSR (44). Taken together, these features limit Se accessibility during GC reactions, ensuring a first control for IgE production in cells rather biased toward preferential IgG₁ CSR (45).

MULTIPLE IgE MEMBRANE AND SECRETED IgE TRANSCRIPTS

After IgE CSR, B-lymphocytes express mIgE heavy chain transcripts, containing four constant (CH) and two membrane exons (M1 and M2), while PCs produce secreted transcripts lacking membrane exons (**Figure 1**). Alternatively spliced human IgE transcripts are found both for secreted and membrane forms, and can notably include a supplemental sequence of 156 nucleotides using an acceptor splicing site upstream of the M1 exon (46–50). Human mIgE BCR variants thus feature short *ms*IgE and long *ml*IgE, expressed after B cell activation (51). Alternately spliced IgE transcripts were also found in the mouse (52).

Noticeably and contrary to other Ig genes, membrane-type IgE transcripts lack a canonical AATAAA polyadenylation (polyA) site downstream of membrane exons. Maturation of these mRNAs then relies on suboptimal variant polyA sites likely lowers mIgE expression. The resulting ratio of secreted-type/membrane-type ϵ mRNA is indeed higher than for IgG in stimulated B cells, but partially normalized upon insertion of a classical polyA site downstream the IgE membrane exons *in vitro* (53). However, the

insertion of a classical polyA sequence downstream the IgE gene does not really increase IgE level *in vivo* (54). Unconventional polyA sites are found in many sequenced organisms, notably 26 primate and 12 non-primate species (55).

Altogether, this alternative and non-canonical maturation of IgE transcripts could dampen IgE production, notably with low mIgE expression conferring specific properties to mIgE⁺ cells. In other models, low BCR expression was shown to boost tonic BCR signaling and plasma cell differentiation (56, 57).

IgE⁺ LYMPHOCYTES ARE PRONE TO DIFFERENTIATION INTO SHORT-LIVED PCs

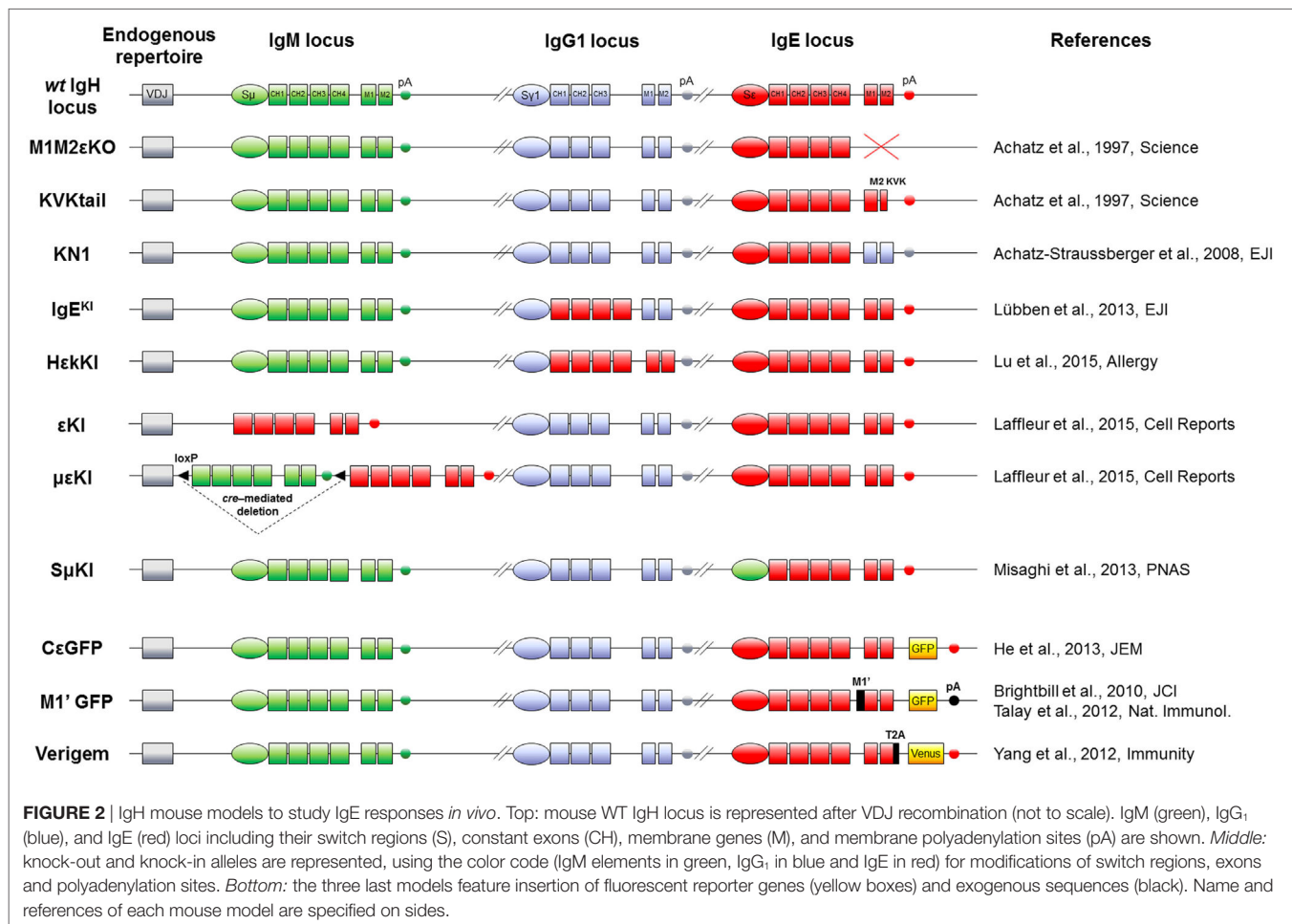
Following Ag activation, some cells differentiate into memory B cells (58), while others evolve into short- or long-lived PCs, then ensuring short- or long-term infusion of specific Ig in body fluids.

Studying IgE⁺ cell fate *in vivo* in WT mice suggested that these cells transiently appeared outside GCs and then rapidly yielded PCs (59). This differentiation was also observed in a transgenic model, where IgE⁺ cells become GFP⁺, with IgE⁺ cells overexpressing Blimp-1 and prompt to become short-lived PCs (60). This effect is also observed *in vitro*, using feeder cells and cytokines for B cell stimulation, exclusively generating IgM⁺ and IgG₁⁺ B cells, while IgE⁺ cells again rapidly become PCs (61). Other *in vitro* B cell stimulation protocols also suggest PC predisposition for IgE⁺ cells expressing a WT or an exogenous mIgE (62, 63).

We also found exacerbated PC differentiation *in vivo* within the LATY136F mouse model, with a ratio of IgE⁺ plasmablasts vs. B-lymphocytes 10- to 100-fold higher than for IgM and IgG₁ (64). Transfer experiments into immunodeficient mice showed a rapid collapse of these IgE⁺ cells, both lymphocytes, and PCs, arguing for a short-lived fate.

Normal B cell differentiation and activation are known to involve mobility, notably into GC. *In vitro* migration assays, by contrast, revealed that cells expressing mIgE poorly migrate toward chemokines (64). This likely compromises their entry into optimal zones of long-term survival as memory B cells or even as long-lived PCs in physiological conditions.

That IgE plasmablasts have an intrinsic lower chance to migrate to long-lived PC niches was indeed demonstrated *in vivo*, using chimeric BCR IgE/IgG₁ [C γ 1 membrane exons knock-in (KI) into Ce, **Figure 2**] (65). However, long-term allergy obviously involves the continuous infusion of specific IgE into the blood by long-lived PCs, which may then constitute the only cell compartment surviving after IgE CSR. Such PCs can indeed be demonstrated *in vivo* in spleen and bone marrow (66). Also in a model of forced IgE CSR, mIgE-expressing cells disappeared within a few days following induction, while IgE secretion persisted for months (64). In human, bone marrow transplantation can induce the transfer of allergen-specific IgE production, likely by transferring long-lived PCs (67). Of note, IgE serum half-life is less than 2 days, ensuring their rapid disappearance if secretion ceases. Although this half-life is higher for cell-bound IgE carried by Fc ϵ RI-expressing cells (68), only the permanent production of IgE by persisting long-lived IgE PCs can account for lifelong allergic conditions. Beside immediate allergy related to persistent



IgE secretion but with some delay after an antigenic boost, IgG memory B cells, can also generate new IgE-secreting cells after sequential CSR.

It thus appears that the actors of long-term IgE responses are mostly PCs. Despite their scarcity, their persistent production of a highly pro-inflammatory Ig class endows them with a major role in both physiology and pathology. Since IgE CSR is very efficient *in vitro* and since many reports showed that IgE-switched cells more efficiently differentiate into PCs than into persisting IgE⁺ lymphocytes, it remains to be understood why IgE PCs are so rare *in vivo* and IgE production so low (about 1,000-fold below that of specific IgG). Convergent data now show that the rate-limiting step of IgE PC generation is a specifically fragile and short-lived status of mIgE⁺ lymphocytes. Poorly moving and briefly surviving, these mandatory precursors (69) constitute a bottleneck in IgE PC generation.

mIgE EXPRESSION STRONGLY IMPACTS LYMPHOCYTE CELL FATE

In physiological conditions, mIgE⁺ lymphocytes are barely detectable *in vivo* either in mouse or human. They are, however, mandatory for building IgE responses, knock-out (KO)

of membrane exons (**Figures 2 and 3**) decreasing total serum IgE by 95%, and preventing the production of specific IgE after immunization (69). Replacement of the IgE intracellular tail with a KVK tail (similar to IgM BCR) (**Figures 2 and 3**) also decreased IgE production, showing that this intracellular tail positively contributed to IgE secretion (69). That antibody targeting the mIgE extracellular portion decrease IgE production *in vitro* as well as *in vivo*, further underlines the importance of mIgE⁺ cells as IgE PC precursors. A first study showed *in vitro* induction of apoptosis of mIgE⁺ cells and inhibition of specific IgE responses in allergic mice, using an anti-EMPD (extracellular membrane-proximal domain) monoclonal antibody (MAb) (70). Anti-human extra-membrane proximal domain (EMPD) antibodies proved efficient *in vivo*, targeting humanized mouse (**Figure 2**), or human PBMC, by promoting apoptosis, decreasing IgE PC number, and lowering IgE production in models of asthma induction and helminth infection (71). Soluble IgE neutralization and decrease of IgE⁺ cells was also obtained using a single-chain antibody against total IgE (72). Another antibody targeting total IgE and including a Fc γ RIIb binding Fc region is 40-fold more efficient than the classical omalizumab MAb anti-IgE in HuSCID mice, diminishing PCs and IgE production, likely due to co-engagement of mIgE and

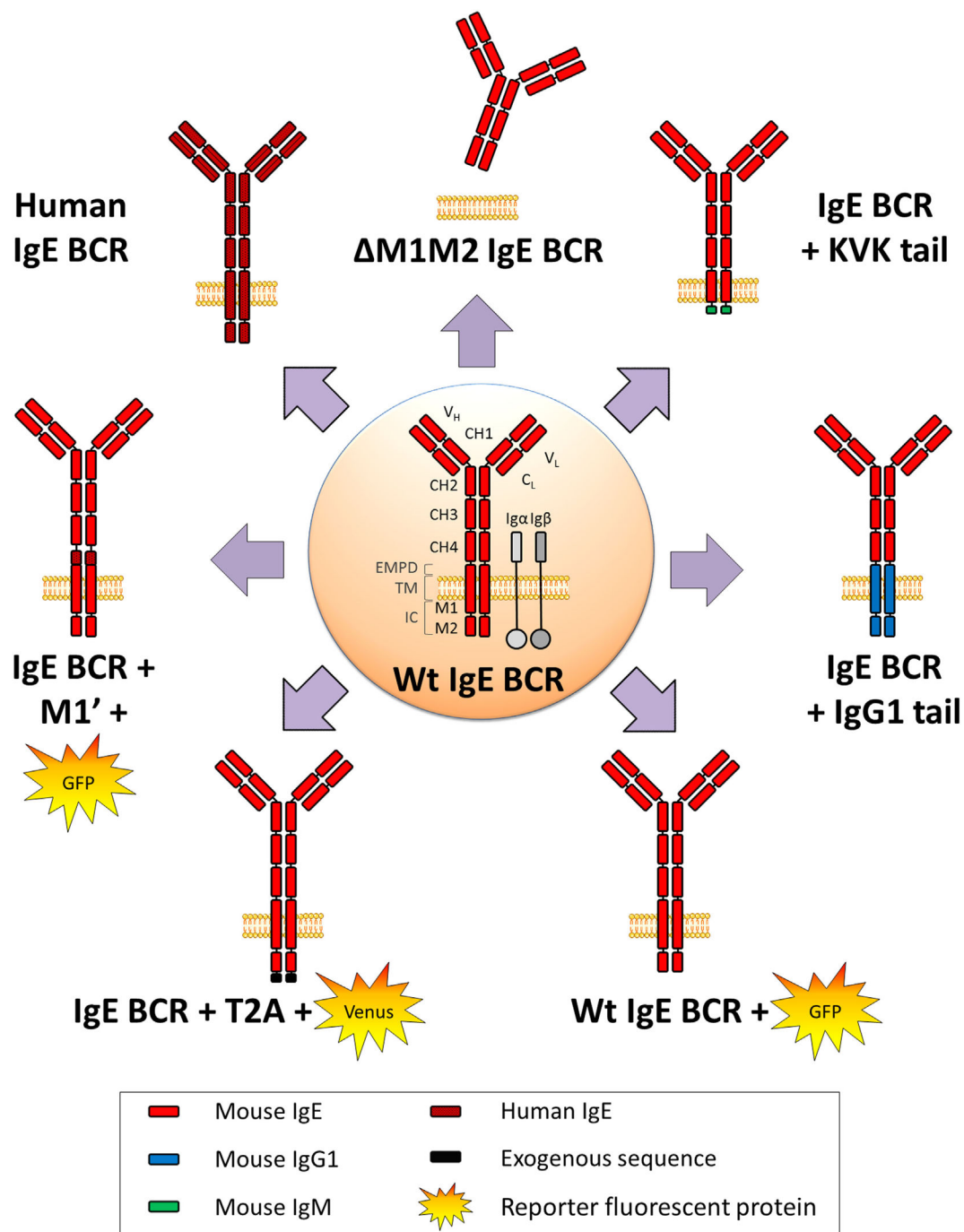


FIGURE 3 | WT and variant IgE B cell receptor (BCR) expressed in mouse models. Mouse WT IgE BCR structure is schematized in the center. Heavy and light chain variable (V_H and V_L) domains form the antigen-binding site, constant domains (CH), transmembrane (TM), and intracellular domains (IC) are shown, and anchored in the lipid membrane. IgE BCR includes an extra-membrane proximal domain (EMPD). Co-signaling molecules $Ig\alpha$ and $Ig\beta$ are represented in gray. Variant and chimeric IgE BCR resulting from the different knock-in and knock-out alleles (described in **Figure 2**) are represented, and reporter fluorescent proteins are illustrated.

the inhibitory receptor $Fc\gamma RIIB$ at the lymphocyte surface (73). It remains to be explored whether the IgE BCR is only expressed on B-lymphocytes, as for IgG, or also on some bone marrow long-lived PCs, as for some IgA and IgM-PCs (74, 75).

Altogether, $mIgE^+$ cells are a mandatory step of IgE responses, but since they poorly show up *in vivo*, their study is challenging and has needed specific biochemical and cellular *in vitro* and *in vivo* strategies.

Phage display helped identify two mIgE intra-cytosolic binding proteins: HPK1 binds mIgE and other isotype tails (76) while HAX1 only binds IgE (77). IgE production, however, remained unaffected in corresponding KO models (78–80).

As for transfected IgE BCRs expressed *in vitro* in cell lines, both human mIgE forms expressed into the immature WEHI cell line, associated with mouse signaling co-receptors Ig α /Ig β , and inhibited cell growth after mIgE BCR cross-linking (51). Chimeric receptors (missing CH1 to CH3 exons) expressed in A20 mature B cell line induce caspase-dependent apoptosis upon cross-linking when lacking the EMPD domain (81). Short chimeric constructions expressed into Ramos human mature cells showed Grb2 adaptor recruitment to intra-cytoplasmic mIgG or mIgE tails, enhancing BCR signals and proliferation (82). Membrane IgE expression alone induced some apoptosis of the mature Daudi cell line, which was increased by mIgE cross-linking and reversed by caspase inhibitors (71).

Primary cell studies need tricky sensitive protocols to specifically identify true mIgE⁺ cells and not passive IgE binding to Fcε receptors. Several protocols limit false positivity: cells can be intracellularly stained after trypsin treatment, to remove CD23-bound IgE (40), or after saturation of surface IgE with non-fluorescent antibodies (60). An acidic wash can also efficiently remove CD23-bound IgE and then allow for direct mIgE staining (59).

In vitro, IL21 induces apoptosis of IgE⁺-stimulated B cells, but not IgG₁⁺ (83). High concentration of IgE⁺ cells also promotes caspase-dependent apoptosis (84). Using a more sophisticated *in vitro* system, “GC like” structures can be created with IgM/IgD and IgG, but not IgE, “memory” B cells, suggesting that mIgE⁺ cells die (61).

We observed spontaneous apoptosis induced by the human mIgE expression, both in heterologous (mouse mature B cell line) and homologous (human mature B cell line) transfectants. Consistently, we observed increased apoptosis of mIgE⁺ lymphocytes among primary B cells stimulated *in vitro* toward CSR and deprived of cytokines. This apoptosis implicated the mitochondrial and caspase pathways and was partially reversed using cyclosporine A, caspase inhibitors, or bcl2 overexpression. In these cells, survival was affected by multiple means: mobility was drastically reduced while the actin cytoskeleton was reorganized and cells took circular shapes, HAX1 was delocalized from mitochondria, IgE BCR was spontaneously incorporated into lipid rafts and endocytosed, transcriptional program controlling cell death, metabolism, signaling, and mobility was affected (64). Another study confirmed spontaneous apoptosis *in vitro*, upon expression of an exogenous BCR into stimulated primary B cells, and confirmed that the IgE BCR induces cell death actively, and not due to a signaling defect (63).

All these data are informative about the B-cell intrinsic impact of mIgE expression but do not integrate the *in vivo* complexity of IgE responses. Beyond these intrinsic aspects, extracellular factors such as cell–cell interactions, Ag presentation by B-cells to T-cells and various soluble factors could strongly influence IgE⁺ B cell fate. Methods and mouse models have been developed by different labs and help further understand IgE responses.

WT AND TRANSGENIC MOUSE MODELS TO INVESTIGATE IgE RESPONSES *IN VIVO*

One first model involved a transgene encoding secreted IgE, thus increasing serum IgE level, but without providing any clue about mIgE⁺ cells (85). KI insertion of Cε into the Cγ₁ locus (**Figures 2 and 3**) also increased IgE production without generating mIgE⁺ B cells *in vivo*, whereas these cells appeared *in vitro* (37). IgG₁ membrane exons (M1–M2) KI downstream of Cε (**Figures 2 and 3**) also increased IgE basal levels and secondary IgE responses, suggesting that the transmembrane (TM) and intracellular IgE tail contribute to IgE homeostasis *in vivo* (65). De Laffaille and colleagues developed a hyper-IgE model revealing several aspects of IgE responses: these mice carry a transgenic anti-OVA TCR and a KI anti-HA BCR, inducing strong IgE response after immunization with OVA-HA peptide and revealing the role of T_{REGS} in controlling IgE production (22). In this model and in helminth (*Nippostrongylus brasiliensis*)-infected WT mice, IgE⁺ PCs were localized outside GC, whereas IgE CSR occurred in GC IgG₁⁺ cells, i.e., through sequential CSR (**Figure 1**). Intracellularly stained IgE⁺ cells have specific characteristics: they are large, express PC genes but not CXCR5, which is implicated into GC localization (59). Ig affinity was studied after OVA-PEP1 immunization (a variant of OVA-HA), and showed rapid specific IgG₁ but delayed specific IgE production, suggesting sequential CSR from IgM to IgG₁ and then to IgE, where SHM occurs in parallel to IgG₁ CSR (59). Consistently, IgG₁-deficient mice show a defect in specific IgE production, whereas total IgE level is unaffected. This suggests that sequential IgE CSR generates high-affinity (potentially pathogenic) IgE, whereas direct IgE CSR generates low-affinity IgE (rather dampening allergy by saturating FcεRI receptors) (42). We can note that a “natural” IgE production by B2 cells, independently of MHCII, could eventually provide some of the protective low-affinity IgE antibodies (86), as well as IgE produced by immature B cells (40). The specific role of IgG₁ memory cells into IgE memory has been confirmed using a high-throughput sequencing approach and adoptive transfer, suggesting the absence of mIgE⁺ memory B-lymphocytes (87).

Three fluorescent reporter mouse models have been generated to study the rare IgE⁺ cells *in vivo*. The first one (M1’ GFP) includes a human EMPD IgE domain knocked into the mouse Cε (**Figure 2**) and an IRES-GFP cassette downstream of membrane exons. Upon *N. brasiliensis* infection, IgE⁺ cells were then detected into GCs, but without strong PC differentiation (54). These conclusions could be biased by this chimeric BCR, the use of a classical polyA for membrane exons, and the fact that this IRES does not tag the IgE protein but IgE transcripts (with some GFP⁺ cells expressing functional IgG₁⁺ on one hand and germline Cε transcripts on the other). A second model used the peptide 2A system to really tag IgE⁺ cells, coupling translation of mIgE and the fluorescent protein “Venus” (**Figure 2**), so that IgE⁺ cells are also Venus⁺. This model showed IgE⁺ cells into GC and confirmed their PC bias. These PCs were mostly short-lived but their number can be enhanced by Bcl2 overexpression, they express mIgE, opposite to IgG PCs (60). Another IRES-GFP cassette has been inserted into Cε, conserving the natural architecture of mIgE

and the unconventional polyA sites (**Figure 2**). This showed that along *N. brasiliensis* infection, IgE⁺ cells generated into GC were less mobile than IgG₁ and restricted to the dark zone, limiting their contribution to memory. This also showed more *in vivo* apoptosis of IgE⁺ than IgG₁⁺ lymphocytes (88).

All these models converge toward the conclusion that the IgE response highly differs from other isotypes, by generating few class-switched lymphocytes, which are short-lived and might then face the cell fate decision of differentiating into PCs or dying through apoptosis. Since there are good indications that mIgE by itself elicits signals that cut B-cell mobility, shorten survival, and/or induce apoptosis (64), the issue of BCR expression in long-lived PCs downstream of the B-lymphocyte stage is of interest. For IgM⁺ and IgA⁺ PCs expressing a functional BCR, cross-linking this receptor with high doses of anti-BCR antibodies decreases PC survival (74). Regarding the mIgE which by itself shortens the half-life of B-lymphocytes (somehow mimicking high-dose cross-linking of other BCR classes), whether it can also be detrimental to PC survival remains an open issue.

Two mouse models uncoupled mIgE expression to normal CSR and microenvironment signals. C ϵ was inserted into S μ (eKI, **Figure 2**) to force mIgE BCR expression in place of mIgM, as previously done successfully with mIgA (89). A strong blockade of early B cell development hereby occurred, suggesting a defect in ϵ – pre-BCR signaling or a pro-apoptotic signal. Another model followed the same strategy, but now including a floxed human C μ upstream of C ϵ (μ eKI, **Figure 2**), human IgM expression then initially supporting B cell development (90). Upon tamoxifen-inducible cre-deletion, these mice secreted IgE and transiently showed IgE⁺ B-lymphocytes. IgE levels peaked around 1 week after induction and while IgE⁺ B-lymphocytes rapidly vanished from lymphoid tissues after a few days independently of any BCR cross-linking, secreted IgE levels persisted for months, indicating that long-lived IgE⁺ PCs survived (64). Another model replaces C γ 1 with human C ϵ but conserving S γ 1 and its polyA site (**Figure 2**). Human IgE level was then higher than mouse IgE, but much lower than IgG₁. Very infrequent IgE⁺ hybridomas could be obtained after immunization, suggesting again an underrepresentation of mIgE⁺ cells (91).

While expression of human IgE in a mouse context could participate to this phenotype, this was consistent with the observation of increased apoptosis in IgE class-switched primary B-cells. A recent study also confirmed spontaneous apoptosis of IgE⁺ lymphocytes, induced by mIgE expression in a BLNK-dependent manner, while the same cells were also simultaneously induced to leave the B-cell stage and readily become PCs, with a PC bias attributed to the CD19 and BLNK signaling pathways. This was dependent from mIgE extracellular domains (63). FAS-dependent apoptosis (92) might also dampen IgE responses since FAS inactivation yields expanded IgE PCs, and IgG and IgE autoantibodies (18).

Finally, a recent study showed that expression of mIgE promotes PC differentiation rather than survival of mIgE⁺ lymphocytes even in the absence of Ag, due to constitutive activation of Syk, CD19, BLNK, Btk, and IRF4 signaling pathways. This model did not demonstrate apoptosis but a proliferative defect and showed an exaggerated GC response for IgE⁺ B cells after

disruption of BCR signaling. IgE⁺ B cells also poorly presented Ag *in vivo*, which could explain poor participation to immune responses (62).

Altogether, IgE⁺ B cells are very scarce *in vivo*, they can be generated for a short-term window but quickly vanish, apparently only surviving as PCs.

DISCUSSION

IgE and Their Receptors

IgE responses are also controlled by IgE receptors, several of which exist under soluble as well as membrane-anchored isoforms. Surface Fc ϵ RI expression in mast cells is stabilized by soluble IgE (93) and participates to the clearance of soluble IgE by dendritic cells and monocytes (94). Membrane Fc ϵ RI, expressed by a basophilic leukemia cell line, also bound mIgE expressed by lymphocytes (95). The soluble form of Fc ϵ R2/CD23 also binds mIgE (96), and interestingly, Fc ϵ R2 KO increases IgE responses (97). Fc γ R4 can bind IgE-Ag immune complexes and activate macrophages in mouse (98). Other receptors like soluble galectin 3 and 9 also bind IgE, respectively, with low [for review (99)] or high affinity (100), and might also bind mIgE. We can speculate that this hub of IgE receptors, expressed and secreted by different cell populations or by mIgE⁺ lymphocytes themselves, and IgE/Ag immune complexes could cross-link mIgE, re-enforcing the intrinsic control mIgE⁺ lymphocyte homeostasis.

IgE Memory

After primary immunization in the mouse, multiple layers of memory B cells are generated, including IgM⁺ and IgG⁺. This ensures secondary responses with rapid PC differentiation of IgG⁺ memory cells and re-entry into GC center of IgM⁺ memory cells (101). Long-lived PCs establish soluble Ig memory for long term. Class-switched BCRs strongly influence B cell fate, globally inducing PC differentiation (56, 89, 102) and modulating the memory B cell pool. As discussed above, there are contradictory data about IgE memory. Some studies suggested that mIgE⁺ memory B cells persisted after IgE responses (54), but convergent reports rather documented that these cells end into short-lived PC and undergo multiple counter-selection processes including apoptosis (36, 37, 60, 64, 87, 88, 91). These contradictory conclusions might result from technical pitfalls, like false mIgE staining, use of leaky IRES, disruption of IgE BCR natural architecture, an introduction of exogenous sequences, heterologous systems, genetic background, etc. Kinetic and spatial issues are also crucial as IgE responses are transient and restricted to specific compartments, which is difficult to investigate *in vivo*. Differences between mouse and human are also possible.

Numerous indirect pieces of evidence strongly suggest the absence of mIgE⁺ cells in the memory lymphocyte compartment; thanks to sequential CSR to IgE after an antigenic boost, some IgE memory could in fact indirectly be created through *de novo* CSR of classical IgG₁⁺ memory lymphocytes then ending with the production of high-affinity IgE. This mechanism could ensure that high-affinity IgE antibodies are not generated as a first defense layer but only in a second stage when Ag reappears

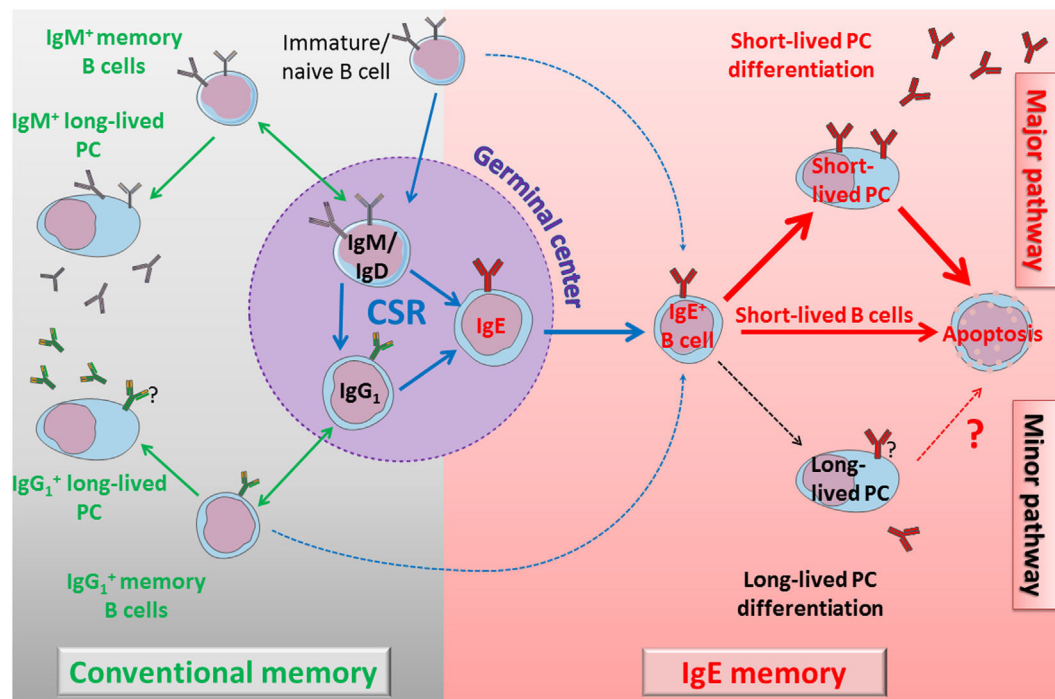


FIGURE 4 | Self-controlled IgE production model. *Left part:* immature cells differentiate into naïve B cells and could undergo direct class switch recombination (CSR) to IgE or enter into the GC. During the GC reaction, cells can switch directly to IgG1 or IgE, or eventually undergo a sequential switching with an IgG1 intermediate and an extra-follicular CSR to IgE. IgM⁺ and IgG1⁺ lymphocytes generate classical humoral memories, with memory B cells and long-lived plasma cells (PCs). These memory B cells can undergo more rounds of GC reaction to increase their antigen (Ag) affinity and to switch to IgG1 or IgE. Direct or sequential CSR produces membrane IgE⁺ lymphocytes with different Ag affinity, and IgE B cell receptor (BCR) seems to induce a common, short-lived fate. *Right part:* IgE⁺ lymphocytes have a bias in short-lived PC differentiation. These short-lived PCs strongly express IgE BCR and undergo massive apoptosis. Membrane IgE⁺ lymphocytes are also counter-selected by various mechanisms including poor mobility, low membrane IgE expression, and spontaneous apoptosis. Long-lived PCs are very elusive but produce IgE antibodies for a long term, potentially including pathological IgE. A better characterization of these cells and their targeting to eliminate them could lead to new treatments to re-initialize IgE memory and deplete pathological IgE production.

in an appropriate cytokine context and that these responses are essentially transient.

Membrane IgE expression strongly affects lymphocyte phenotype and we suggest that evolution selected multiple mechanisms to restrict IgE responses. IgE tail itself perturbs BCR signaling, eventually by sequestering anti-apoptotic protein (HAX1), recruiting adaptor or signaling proteins (Grb2, Syk), or through still unknown interactions. TM and extra-membrane domains notably contribute to specific interactions with Ig- α , CD19 and probably other molecules. IgE is highly flexible (103, 104) and could spontaneously adopt a closed conformation, even when expressed as a BCR, and be spontaneously cross-linked; this effect could be enhanced by interactions with IgE receptors. C ϵ domains seem to be implicated in multiple signaling pathways and functions, ensuring both efficient PC differentiation and a selective disadvantage for mIgE⁺ cells, with reduced proliferation, Ag presentation, and mobility, also affected with constitutive BCR clustering into lipid rafts and endocytosis lowering surface expression, globally promoting poor survival. These effects are now well documented in lymphocytes and might also impact mIgE⁺ PCs (Figure 4).

Note Added in Proof

A new mouse model has been generated to force membrane IgE expression from early B cell development (105), similarly to ϵ KI mice (Figure 2), but using a different strategy and a mouse C ϵ gene. These animals have also a strong blockade at the pro-B cell stage, again showing that C ϵ gene cannot support B cell development. Interestingly, the authors demonstrate that the strong (secreted vs. membrane) ratio of IgE accounts for this phenotype, which could be partially rescued by inserting an mIgE. Finally, they show that increasing BCR signaling by PTEN deletion increases mIgE cell number and IgE responses.

CONCLUSION

IgE production is tightly regulated, from CSR to PC differentiation, including IgE half-life and survival of mIgE⁺ memory B cells. It is interesting to note that upon all different KI strategies deployed to investigate IgE⁺ cells *in vivo* (Figure 2), these cells are generated at a very low frequency, only during short intervals, and do not yield mIgE⁺ memory B cells. IgE CSR is initially controlled by the cytokine microenvironment, the anomalies of which can boost IgE

production in allergic individuals (106). The mechanistic of Se accessibility likely contributes to restricting IgE CSR in mature B cells, as indicated by Se replacements (36). Unconventional polyA sites could also contribute to IgE regulation (53). Several chimeric IgE BCR models were generated to dissect domain functions (Figures 2 and 3), but it seems that distinct protein parts contribute to disadvantage mIgE⁺ cells, resulting in overrepresentation of short-lived PCs and almost no accumulation of mIgE⁺ lymphocytes. The protracted expression of the IgE BCR might also provide counter-selective signals in plasmablasts and contribute to their short-lived fate. These multiple mechanisms induced by mIgE expression even in the absence of Ag could be enhanced *in vivo* by mIgE cross-linking.

Membrane IgE expression *per se* is, thus, a powerful gatekeeper of IgE production, both ensuring and restraining a punctual IgE response while minimizing IgE memory. These elements clearly need to be taken into account when dealing with therapy of IgE-mediated disorders. Acting on cytokines and microenvironment

of the immune response is important at the initiation of IgE responses and for preventing sequential IgE CSR of memory B-lymphocytes (notably IgG1). Acting on the true memory cells responsible for the long-term infusion of IgE should by contrast rather focus onto IgE PCs.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BL and MC wrote the manuscript, OD created the figures and participated to the redaction, and ZD helped for references and redaction.

FUNDING

This work was supported by grants from ARC (PGA12015 0202338), Agence Nationale de la Recherche (ANR 16-CE15-0019-01), and Région Nouvelle Aquitaine.

REFERENCES

- Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* (2000) 102(5):553–63. doi:10.1016/S0092-8674(00)00078-7
- Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* (2000) 102(5):565–75. doi:10.1016/S0092-8674(00)00079-9
- Laffleur B, Denis-Lagache N, Péron S, Sirac C, Moreau J, Cogné M. AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* (2013) 5(5):1118–31. doi:10.18632/oncotarget.1546
- Ishizaka K, Ishizaka T. Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reagenic activity. *J Immunol* (1967) 99(6):1187–98.
- Stanworth DR, Humphrey JH, Bennich H, Johansson SG. Specific inhibition of the Prausnitz-Küstner reaction by an atypical human myeloma protein. *Lancet* (1967) 2(7511):330–2. doi:10.1016/S0140-6736(67)90171-7
- Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* (1995) 16(8):392–8. doi:10.1016/0167-5699(95)80008-5
- Vernersson M, Aveskogh M, Hellman L. Cloning of IgE from the echidna (*Tachyglossus aculeatus*) and a comparative analysis of epsilon chains from all three extant mammalian lineages. *Dev Comp Immunol* (2004) 28(1):61–75. doi:10.1016/S0145-305X(03)00084-3
- Wu LC, Zarrin AA. The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat Rev Immunol* (2014) 14(4):247–59. doi:10.1038/nri3632
- Capron M, Capron A. Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science* (1994) 264(5167):1876–7. doi:10.1126/science.8009216
- Marichal T, Starkl P, Reber LL, Kalesnikoff J, Oettgen HC, Tsai M, et al. A beneficial role for immunoglobulin E in host defense against honeybee venom. *Immunity* (2013) 39(5):963–75. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.005
- Palm NW, Rosenstein RK, Yu S, Schenten DD, Florsheim E, Medzhitov R. Bee venom phospholipase A2 induces a primary type 2 response that is dependent on the receptor ST2 and confers protective. *Immunity* (2013) 39(5):976–85. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.006
- Heyman B. Antibodies as natural adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol* (2014) 382:201–19. doi:10.1007/978-3-319-07911-0_9
- Xu H, van Mechelen L, Henningsson F, Heyman B. Antigen conjugated to anti-CD23 antibodies is rapidly transported to splenic follicles by recirculating B cells. *Scand J Immunol* (2015) 81(1):39–45. doi:10.1111/sji.12248
- Martin RK, Brooks KB, Henningsson F, Heyman B, Conrad DH. Antigen transfer from exosomes to dendritic cells as an explanation for the immune enhancement seen by IgE immune complexes. *PLoS One* (2014) 9(10):e110609. doi:10.1371/journal.pone.0110609
- Nigro EA, Brini AT, Soprana E, Ambrosi A, Dombrowicz D, Siccardi AG, et al. Antitumor IgE adjuvanticity: key role of Fc epsilon RI. *J Immunol* (2009) 183(7):4530–6. doi:10.4049/jimmunol.0900842
- Jensen-Jarolim E, Turner MC, Karagiannis SN. AllergoOncology: IgE- and IgG4-mediated immune mechanisms linking allergy with cancer and their translational implications. *J Allergy Clin Immunol* (2017) 140(4):982–84. doi:10.1016/j.jaci.2017.04.034
- Nigro EA, Brini AT, Yenagi VA, Ferreira LM, Achatz-Straussberger G, Ambrosi A, et al. Cutting edge: IgE plays an active role in tumor immunosurveillance in mice. *J Immunol* (2016) 197(7):2583–8. doi:10.4049/jimmunol.1601026
- Butt D, Chan TD, Bourne K, Hermes JR, Nguyen A, Satham A, et al. FAS inactivation releases unconventional germinal center B cells that escape antigen control and drive IgE and autoantibody production. *Immunity* (2015) 42(5):890–902. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.010
- Sanjuan MA, Sagar D, Kolbeck R. Role of IgE in autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol* (2016) 137(6):1651–61. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.007
- Geha RS, Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* (2003) 3(9):721–32. doi:10.1038/nri1181
- Kudo M, Ishigatsubo Y, Aoki I. Pathology of asthma. *Front Microbiol* (2013) 4:263. doi:10.3389/fmicb.2013.00263
- Curotto de Lafaille MA, Muriglan S, Sunshine MJ, Lei Y, Kutchukhidze N, Furtado GC, et al. Hyper immunoglobulin E response in mice with monoclonal populations of B and T lymphocytes. *J Exp Med* (2001) 194(9):1349–59. doi:10.1084/jem.194.9.1349
- Obayashi K, Doi T, Koyasu S. Dendritic cells suppress IgE production in B cells. *Int Immunol* (2007) 19(2):217–26. doi:10.1093/intimm/dxl138
- Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, et al. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol* (2011) 110:27–70. doi:10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8
- Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, et al. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* (2010) 116(11):1895–8. doi:10.1182/blood-2010-01-264689
- Casellas R, Basu U, Yewdell WT, Chaudhuri J, Robbani DF, Di Noia JM. Mutations, kataegis, and translocations in B lymphocytes: towards a mechanistic understanding of AID promiscuous activity. *Nat Rev Immunol* (2016) 16(3):164–76. doi:10.1038/nri.2016.2
- Wuerffel R, Wang L, Grigera F, Manis J, Selsing E, Perlot T, et al. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* (2007) 27(5):711–22. doi:10.1016/j.immuni.2007.09.007

28. Monticelli S, Vercelli D. Molecular regulation of class switch recombination to IgE through epsilon germline transcription. *Allergy* (2001) 56(4):270–8. doi:10.1034/j.1398-9995.2001.00129.x
29. Geha RS. Allergy and hypersensitivity. Nature versus nurture in allergy and hypersensitivity. *Curr Opin Immunol* (2003) 15(6):603–8. doi:10.1016/j.coi.2003.09.017
30. Audzevich T, Pearce G, Breucha M, Gunal G, Jessberger R. Control of the STAT6-BCL6 antagonism by SWAP-70 determines IgE production. *J Immunol* (2013) 190(10):4946–55. doi:10.4049/jimmunol.1203014
31. Kashiwada M, Levy DM, McKeag L, Murray K, Schroder AJ, Canfield SM, et al. IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107(2):821–6. doi:10.1073/pnas.0909235107
32. Sugai M, Gonda H, Kusunoki T, Katakai T, Yokota Y, Shimizu A. Essential role of Id2 in negative regulation of IgE class switching. *Nat Immunol* (2003) 4(1):25–30. doi:10.1038/ni874
33. Tong P, Wesemann DR. Molecular mechanisms of IgE class switch recombination. *Curr Top Microbiol Immunol* (2015) 388:21–37. doi:10.1007/978-3-319-13725-4_2
34. Schaffer A, Kim EC, Wu X, Zan H, Testoni L, Salamon S, et al. Selective inhibition of class switching to IgG and IgE by recruitment of the HoxC4 and Oct-1 homeodomain proteins and Ku70/Ku86 to newly identified ATTT cis-elements. *J Biol Chem* (2003) 278(25):23141–50. doi:10.1074/jbc.M212952200
35. Hackney JA, Misaghi S, Senger K, Garriss C, Sun Y, Lorenzo MN, et al. DNA targets of AID evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv Immunol* (2009) 101:163–89. doi:10.1016/S0065-2776(08)01005-5
36. Misaghi S, Senger K, Sai T, Qu Y, Sun Y, Hamidzadeh K, et al. Polyclonal hyper-IgE mouse model reveals mechanistic insights into antibody class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110(39):15770–5. doi:10.1073/pnas.1221661110
37. Lübken W, Turqueti-Neves A, Okhrimenko A, Stöberl C, Schmidt V, Pfeffer K, et al. IgE knock-in mice suggest a role for high levels of IgE in basophil-mediated active systemic anaphylaxis. *Eur J Immunol* (2013) 43(5):1231–42. doi:10.1002/eji.201242675
38. Dayal S, Nedbal J, Hobson P, Cooper AM, Gould HJ, Gellert M, et al. High resolution analysis of the chromatin landscape of the IgE switch region in human B cells. *PLoS One* (2011) 6(9):e24571. doi:10.1371/journal.pone.0024571
39. Kuwabara N, Kondo N, Fukutomi O, Agata H, Orii T. Relationship between interferon-gamma, interleukin-4 and IgE production of lymphocytes from hen's egg-sensitive patients. *J Invest Allergol Clin Immunol* (1995) 5(4):198–204.
40. Wesemann DR, Magee JM, Boboila C, Calado DP, Gallagher MP, Portuguese AJ, et al. Immature B cells preferentially switch to IgE with increased direct $\text{S}\mu$ to $\text{S}\epsilon$ recombination. *J Exp Med* (2011) 208(13):2733–46. doi:10.1084/jem.20111155
41. Yoshida K, Matsuoka M, Usuda S, Mori A, Ishizaka K, Sakano H. Immunoglobulin switch circular DNA in the mouse infected with *Nippostrongylus brasiliensis*: evidence for successive class switching from μ to epsilon via gamma 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990) 87(20):7829–33. doi:10.1073/pnas.87.20.7829
42. Xiong H, Dolpady J, Wabl M, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Sequential class switching is required for the generation of high affinity IgE antibodies. *J Exp Med* (2012) 209(2):353–64. doi:10.1084/jem.20111941
43. Wu YL, Stubbington MJT, Daly M, Teichmann SA, Rada C. Intrinsic transcriptional heterogeneity in B cells controls early class switching to IgE. *J Exp Med* (2017) 214(1):183–96. doi:10.1084/jem.20161056
44. Ramadani F, Bowen H, Upton N, Hobson PS, Chan YC, Chen JB, et al. Ontogeny of human IgE-expressing B cells and plasma cells. *Allergy* (2017) 72(1):66–76. doi:10.1111/all.12911
45. Siebenkotten G, Esser C, Radbruch A, Wabl M. The murine IgG1/IgE class switch program. *Eur J Immunol* (1992) 22(7):1827–34. doi:10.1002/eji.1830220723
46. Peng C, Davis FM, Sun LK, Liou RS, Kim YW, Chang TW. A new isoform of human membrane-bound IgE. *J Immunol* (1992) 148(1):129–36.
47. Zhang K, Saxon A, Max EE. Two unusual forms of human immunoglobulin E encoded by alternative RNA splicing of epsilon heavy chain membrane exons. *J Exp Med* (1992) 176(1):233–43. doi:10.1084/jem.176.1.233
48. Zhang K, Max EE, Cheah HK, Saxon A. Complex alternative RNA splicing of epsilon-immunoglobulin transcripts produces mRNAs encoding four potential secreted protein isoforms. *J Biol Chem* (1994) 269(1):456–62.
49. Batista FD, Efremov DG, Tkach T, Burrone OR. Characterization of the human immunoglobulin epsilon mRNAs and their polyadenylation sites. *Nucleic Acids Res* (1995) 23(23):4805–11. doi:10.1093/nar/23.23.4805
50. Batista FD, Efremov DG, Burrone OR. Characterization of a second secreted IgE isoform and identification of an asymmetric pathway of IgE assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1996) 93(8):3399–404. doi:10.1073/pnas.93.8.3399
51. Batista FD, Anand S, Presani G, Efremov DG, Burrone OR. The two membrane isoforms of human IgE assemble into functionally distinct B cell antigen receptors. *J Exp Med* (1996) 184(6):2197–205. doi:10.1084/jem.184.6.2197
52. Anand S, Batista FD, Tkach T, Efremov DG, Burrone OR. Multiple transcripts of the murine immunoglobulin epsilon membrane locus are generated by alternative splicing and differential usage of two polyadenylation sites. *Mol Immunol* (1997) 34(2):175–83. doi:10.1016/S0161-5890(96)00110-1
53. Karnowski A, Achatz-Straussberger G, Klockenbusch C, Achatz G, Lamers MC. Inefficient processing of mRNA for the membrane form of IgE is a genetic mechanism to limit recruitment of IgE-secreting cells. *Eur J Immunol* (2006) 36(7):1917–25. doi:10.1002/eji.200535495
54. Talay O, Yan D, Brightbill HD, Straney EEM, Zhou M, Ladi E, et al. IgE⁺ memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nat Immunol* (2012) 13(4):396–404. doi:10.1038/ni.2256
55. Wu PC, Chen JB, Kawamura S, Roos C, Merker S, Shih CC, et al. The IgE gene in primates exhibits extraordinary evolutionary diversity. *Immunogenetics* (2012) 64(4):279–87. doi:10.1007/s00251-011-0586-9
56. Martin SW, Goodnow CC. Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nat Immunol* (2002) 3(2):182–8. doi:10.1038/ni752
57. Lehouane F, Bonaud A, Delpy L, Casola S, Oruc Z, Chemin G, et al. B-cell receptor signal strength influences terminal differentiation: cellular immune response. *Eur J Immunol* (2013) 43(3):619–28. doi:10.1002/eji.201242912
58. Phan TG, Tangye SG. Memory B cells: total recall. *Curr Opin Immunol* (2017) 45:132–40. doi:10.1016/j.coi.2017.03.005
59. Erazo A, Kutchukhidze N, Leung M, Christ AP, Urban JF Jr, Curotto de Lafaille MA, et al. Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity* (2007) 26(2):191–203. doi:10.1016/j.immuni.2006.12.006
60. Yang Z, Sullivan BM, Allen CDC. Fluorescent in vivo detection reveals that IgE(+) B cells are restrained by an intrinsic cell fate predisposition. *Immunity* (2012) 36(5):857–72. doi:10.1016/j.immuni.2012.02.009
61. Nojima T, Haniuda K, Moutai T, Matsudaira M, Mizokawa S, Shiratori I, et al. In-vitro derived germinal centre B cells differentially generate memory B or plasma cells in vivo. *Nat Commun* (2011) 2:465. doi:10.1038/ncomms1475
62. Yang Z, Robinson MJ, Chen X, Smith GA, Taunton J, Liu W, et al. Regulation of B cell fate by chronic activity of the IgE B cell receptor. *Elife* (2016) 5:e21238. doi:10.7554/eLife.21238
63. Haniuda K, Fukao S, Kodama T, Hasegawa H, Kitamura D. Autonomous membrane IgE signaling prevents IgE-memory formation. *Nat Immunol* (2016) 17(9):1109–17. doi:10.1038/ni.3508
64. Laffleur B, Duchez S, Tarte K, Denis-Lagache N, Péron S, Carrion C, et al. Self-restrained B cells arise following membrane IgE expression. *Cell Rep* (2015) 10(6):900–9. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.023
65. Achatz-Straussberger G, Zaborsky N, Königsberger S, Luger EO, Lamers M, Cramer R, et al. Migration of antibody secreting cells towards CXCL12 depends on the isotype that forms the BCR. *Eur J Immunol* (2008) 38(11):3167–77. doi:10.1002/eji.200838456
66. Luger EO, Fokuhl V, Wegmann M, Abram M, Tillack K, Achatz G, et al. Induction of long-lived allergen-specific plasma cells by mucosal allergen challenge. *J Allergy Clin Immunol* (2009) 124(4):819–26.e4. doi:10.1016/j.jaci.2009.06.047
67. Hallstrand TS, Sprenger JD, Agosti JM, Longton GM, Witherspoon RP, Henderson WR. Long-term acquisition of allergen-specific IgE and asthma

- following allogeneic bone marrow transplantation from allergic donors. *Blood* (2004) 104(10):3086–90. doi:10.1182/blood-2004-05-1775
68. Achatz-Straussberger G, Zaborsky N, Königsberger S, Feichtner S, Lenz S, Peckl-Schmid D, et al. Limited humoral immunoglobulin E memory influences serum immunoglobulin E levels in blood. *Clin Exp Allergy* (2009) 39(9):1307–13. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03278.x
 69. Achatz G, Nitschke L, Lamers MC. Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response. *Science* (1997) 276(5311):409–11. doi:10.1126/science.276.5311.409
 70. Feichtner S, Inführ D, Achatz-Straussberger G, Schmid D, Karnowski A, Lamers M, et al. Targeting the extracellular membrane-proximal domain of membrane-bound IgE by passive immunization blocks IgE synthesis in vivo. *J Immunol* (2008) 180(8):5499–505. doi:10.4049/jimmunol.180.8.5499
 71. Brightbill HD, Jeet S, Lin Z, Yan D, Zhou M, Tan M, et al. Antibodies specific for a segment of human membrane IgE deplete IgE-producing B cells in humanized mice. *J Clin Invest* (2010) 120(6):2218–29. doi:10.1172/JCI40141
 72. Ota T, Aoki-Ota M, Duong BH, Nemazee D. Suppression of IgE B cells and IgE binding to Fc(epsilon)RI by gene therapy with single-chain anti-IgE. *J Immunol* (2009) 182(12):8110–7. doi:10.4049/jimmunol.0900300
 73. Chu SY, Horton HM, Pong E, Leung IW, Chen H, Nguyen DH, et al. Reduction of total IgE by targeted coengagement of IgE B-cell receptor and FcγRIIb with Fc-engineered antibody. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 129(4):1102–15. doi:10.1016/j.jaci.2011.11.029
 74. Pinto D, Montani E, Bolli M, Garavaglia G, Sallusto F, Lanzavecchia A, et al. A functional BCR in human IgA and IgM plasma cells. *Blood* (2013) 121(20):4110–4. doi:10.1182/blood-2012-09-459289
 75. Blanc P, Moro-Sibilot L, Barthly L, Jagot F, This S, de Bernard S, et al. Mature IgM-expressing plasma cells sense antigen and develop competence for cytokine production upon antigenic challenge. *Nat Commun* (2016) 7:13600. doi:10.1038/ncomms13600
 76. Geisberger R, Prlic M, Achatz-Straussberger G, Oberndorfer I, Luger E, Lamers M, et al. Phage display based cloning of proteins interacting with the cytoplasmic tail of membrane immunoglobulins. *Dev Immunol* (2002) 9(3):127–34. doi:10.1080/1044667031000137584
 77. Oberndorfer I, Schmid D, Geisberger R, Achatz-Straussberger G, Cramer R, Lamers M, et al. HSI-associated protein X-1 interacts with membrane-bound IgE: impact on receptor-mediated internalization. *J Immunol* (2006) 177(2):1139–45. doi:10.4049/jimmunol.177.2.1139
 78. Königsberger S, Peckl-Schmid D, Zaborsky N, Patzak I, Kiefer F, Achatz G. HPK1 associates with SKAP-HOM to negatively regulate Rap1-mediated B-lymphocyte adhesion. *PLoS One* (2010) 5(9). doi:10.1371/journal.pone.0012468
 79. Peckl-Schmid D, Wolkerstorfer S, Königsberger S, Achatz-Straussberger G, Feichtner S, Schwaiger E, et al. HAX1 deficiency: impact on lymphopoiesis and B-cell development. *Eur J Immunol* (2010) 40(11):3161–72. doi:10.1002/eji.200940221
 80. Shui JW, Boomer JS, Han J, Xu J, Dement GA, Zhou G, et al. Hematopoietic progenitor kinase 1 negatively regulates T cell receptor signaling and T cell-mediated immune responses. *Nat Immunol* (2007) 8(1):84–91. doi:10.1038/ni1416
 81. Poggianella M, Bestagno M, Burrone OR. The extracellular membrane-proximal domain of human membrane IgE controls apoptotic signaling of the B cell receptor in the mature B cell line A20. *J Immunol* (2006) 177(6):3597–605. doi:10.4049/jimmunol.177.6.3597
 82. Engels N, König LM, Heemann C, Lutz J, Tsubata T, Griep S, et al. Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nat Immunol* (2009) 10(9):1018–25. doi:10.1038/ni.1764
 83. Harada M, Magara-Koyanagi K, Watarai H, Nagata Y, Ishii Y, Kojo S, et al. IL-21-induced bepsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J Exp Med* (2006) 203(13):2929–37. doi:10.1084/jem.20062206
 84. Rabah D, Conrad DH. Effect of cell density on in vitro mouse immunoglobulin E production. *Immunology* (2002) 106(4):503–10. doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01435.x
 85. Matsuoka K, Taya C, Kubo S, Toyama-Sorimachi N, Kitamura F, Ra C, et al. Establishment of antigen-specific IgE transgenic mice to study pathological and immunobiological roles of IgE in vivo. *Int Immunol* (1999) 11(6):987–94. doi:10.1093/intimm/11.6.987
 86. McCoy KD, Harris NL, Diener P, Hatak S, Odermatt B, Hangartner L, et al. Natural IgE production in the absence of MHC class II cognate help. *Immunity* (2006) 24(3):329–39. doi:10.1016/j.immuni.2006.01.013
 87. Turqueti-Neves A, Otte M, Schwartz C, Schmitt ME, Lindner C, Pabst O, et al. The extracellular domains of IgG1 and T cell-derived IL-4/IL-13 are critical for the polyclonal memory IgE response in vivo. *PLoS Biol* (2015) 13(11):e1002290. doi:10.1371/journal.pbio.1002290
 88. He JS, Meyer-Hermann M, Xiangying D, Zuan LY, Jones LA, Ramakrishna L, et al. The distinctive germinal center phase of IgE+ B lymphocytes limits their contribution to the classical memory response. *J Exp Med* (2013) 210(12):2755–71. doi:10.1084/jem.20131539
 89. Duchez S, Amin R, Cogné N, Delpy L, Sirac C, Pascal V, et al. Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107(7):3064–9. doi:10.1073/pnas.0912393107
 90. Metzger D, Chambon P. Site- and time-specific gene targeting in the mouse. *Methods* (2001) 24(1):71–80. doi:10.1006/meth.2001.1159
 91. Lu CS, Hung AF, Lin CJ, Chen JB, Chen C, Shiung YY, et al. Generating allergen-specific human IgEs for immunoassays by employing human epsilon gene knockin mice. *Allergy* (2015) 70(4):384–90. doi:10.1111/all.12572
 92. Volpe E, Sambucci M, Battistini L, Borsellino G. Fas-fas ligand: checkpoint of T cell functions in multiple sclerosis. *Front Immunol* (2016) 7:382. doi:10.3389/fimmu.2016.00382
 93. Yamaguchi M, Lantz CS, Oettgen HC, Katona IM, Fleming T, Miyajima I, et al. IgE enhances mouse mast cell Fc(epsilon)RI expression in vitro and in vivo: evidence for a novel amplification mechanism in IgE-dependent reactions. *J Exp Med* (1997) 185(4):663–72. doi:10.1084/jem.185.4.663
 94. Greer AM, Wu N, Putnam AL, Woodruff PG, Wolters P, Kinet JP, et al. Serum IgE clearance is facilitated by human FcεRI internalization. *J Clin Invest* (2014) 124(3):1187–98. doi:10.1172/JCI68964
 95. Vangelista L, Soprana E, Cesco-Gaspere M, Mandiola P, Di Lullo G, Fucci RN, et al. Membrane IgE binds and activates Fc epsilon RI in an antigen-independent manner. *J Immunol* (2005) 174(9):5602–11. doi:10.4049/jimmunol.174.9.5602
 96. Hibbert RG, Teriete P, Grundy GJ, Beavil RL, Reljic R, Holers VM, et al. The structure of human CD23 and its interactions with IgE and CD21. *J Exp Med* (2005) 202(6):751–60. doi:10.1084/jem.20050811
 97. Yu P, Kosco-Vilbois M, Richards M, Köhler G, Lamers MC. Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature* (1994) 369(6483):753–6. doi:10.1038/369753a0
 98. Hirano M, Davis RS, Fine WD, Nakamura S, Shimizu K, Yagi H, et al. IgE immune complexes activate macrophages through FcγRIV binding. *Nat Immunol* (2007) 8(7):762–71. doi:10.1038/ni1477
 99. Platzer B, Ruiter F, van der Mee J, Fiebigler E. Soluble IgE receptors—elements of the IgE network. *Immunol Lett* (2011) 141(1):36–44. doi:10.1016/j.imlet.2011.08.004
 100. Niki T, Tsutsui S, Hirose S, Aradono S, Sugimoto Y, Takeshita K, et al. Galectin-9 is a high affinity IgE-binding lectin with anti-allergic effect by blocking IgE-antigen complex formation. *J Biol Chem* (2009) 284(47):32344–52. doi:10.1074/jbc.M109.035196
 101. Dogan I, Bertocci B, Vilmonet V, Delbos F, Mégret J, Storck S, et al. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat Immunol* (2009) 10(12):1292–9. doi:10.1038/ni.1814
 102. Gitlin AD, von Boehmer L, Gazumyan A, Shulman Z, Oliveira TY, Nussenzweig MC. Independent roles of switching and hypermutation in the development and persistence of B lymphocyte memory. *Immunity* (2016) 44(4):769–81. doi:10.1016/j.immuni.2016.01.011
 103. Wurzburg BA, Jardetzky TS. Conformational flexibility in immunoglobulin E-Fc 3-4 revealed in multiple crystal forms. *J Mol Biol* (2009) 393(1):176–90. doi:10.1016/j.jmb.2009.08.012
 104. Drinkwater N, Cossins B, Keeble AH, Wright M, Cain K, Hailu H, et al. Human immunoglobulin E flexes between acutely bent and extended conformations. *Nat Struct Mol Biol* (2014) 21(4):397–404. doi:10.1038/nsmb.2795
 105. Tong P, Granato A, Zuo T, Chaudhary N, Zuiani A, Han SS, et al. IgH isotype-specific B cell receptor expression influences B cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114(40):E8411–20. doi:10.1073/pnas.1704962114

106. Ober C, Yao T-C. The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev* (2011) 242(1):10–30. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01029.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Laffleur, Debeaupuis, Dalloul and Cogné. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Annexe 5 : (Article publié)

CSReport: A New Computational Tool Designed for Automatic Analysis of Class Switch Recombination Junctions Sequenced by High-Throughput Sequencing

François Boyer, Hend Boutouil, Iman Dalloul, **Zeinab Dalloul**, Jeanne Cook-Moreau, Jean-Claude Aldigier, Claire Carrion, Bastien Herve, Erwan Scaon, Michel Cogné and Sophie Péron.

Manuscrit accepté en mai 2017 à The journal of immunology

Cet article décrit un outil automatisé développé par notre laboratoire capable d'analyser de grands ensembles de données de séquences de jonctions CSR produites par séquençage à haut débit. A côté, CSReport est capable de caractériser la structure des jonctions induites et de trouver des éventuelles points de cassures causés lors de la CSR (et de la LSR).

J'ai participé aux manipulations sur les souris de cet article



Selection Antibiotics

Keep what you want, lose the rest!

Blasticidin, Zeocin™, Puromycin, G418, Hygromycin B Gold and Phleomycin

InvivoGen



This information is current as of October 14, 2018.

CSReport: A New Computational Tool Designed for Automatic Analysis of Class Switch Recombination Junctions Sequenced by High-Throughput Sequencing

François Boyer, Hend Boutouil, Iman Dalloul, Zeinab Dalloul, Jeanne Cook-Moreau, Jean-Claude Aldigier, Claire Carrion, Bastien Herve, Erwan Scaon, Michel Cogné and Sophie Péron

J Immunol 2017; 198:4148-4155; Prepublished online 17 April 2017;
doi: 10.4049/jimmunol.1601924
<http://www.jimmunol.org/content/198/10/4148>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2017/04/16/jimmunol.1601924.DCSupplemental>

References This article **cites 16 articles**, 6 of which you can access for free at:
<http://www.jimmunol.org/content/198/10/4148.full#ref-list-1>

Why *The JI*? Submit online.

- **Rapid Reviews! 30 days*** from submission to initial decision
- **No Triage!** Every submission reviewed by practicing scientists
- **Fast Publication!** 4 weeks from acceptance to publication

**average*

Subscription Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscription>

Permissions Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/alerts>



CSReport: A New Computational Tool Designed for Automatic Analysis of Class Switch Recombination Junctions Sequenced by High-Throughput Sequencing

François Boyer,^{*,†,1} Hend Boutouil,^{*,†,1} Iman Dalloul,^{*,†} Zeinab Dalloul,^{*,†}
Jeanne Cook-Moreau,^{*,†} Jean-Claude Aldigier,^{*,†} Claire Carrion,^{*,†} Bastien Herve,[‡]
Erwan Scaon,[‡] Michel Cogné,^{*,†,§} and Sophie Péron^{*,†}

B cells ensure humoral immune responses due to the production of Ag-specific memory B cells and Ab-secreting plasma cells. In secondary lymphoid organs, Ag-driven B cell activation induces terminal maturation and Ig isotype class switch (class switch recombination [CSR]). CSR creates a virtually unique *IgH* locus in every B cell clone by intrachromosomal recombination between two switch (S) regions upstream of each C region gene. Amount and structural features of CSR junctions reveal valuable information about the CSR mechanism, and analysis of CSR junctions is useful in basic and clinical research studies of B cell functions. To provide an automated tool able to analyze large data sets of CSR junction sequences produced by high-throughput sequencing (HTS), we designed CSReport, a software program dedicated to support analysis of CSR recombination junctions sequenced with a HTS-based protocol (Ion Torrent technology). CSReport was assessed using simulated data sets of CSR junctions and then used for analysis of S μ -S α and S μ -S γ 1 junctions from CH12F3 cells and primary murine B cells, respectively. CSReport identifies junction segment breakpoints on reference sequences and junction structure (blunt-ended junctions or junctions with insertions or microhomology). Besides the ability to analyze unprecedentedly large libraries of junction sequences, CSReport will provide a unified framework for CSR junction studies. Our results show that CSReport is an accurate tool for analysis of sequences from our HTS-based protocol for CSR junctions, thereby facilitating and accelerating their study. *The Journal of Immunology*, 2017, 198: 4148–4155.

B cells ensure humoral immune responses due to their capacity to recognize a wide variety of Ags via their BCR for Ag. BCR is the association of an Ig, composed of two

identical IgH chains covalently bound to two identical IgL chains, which are associated with an Ig α /Ig β heterodimer at the B cell membrane. In mature B cells, in secondary lymphoid organs, Ag binding by the BCR with T cell-dependent coactivation signaling induces Ag-driven activation of B cells, which then undergo terminal maturation, ensuring production of Ag-specific memory B cells and Ab-secreting plasma cells. Two molecular events absolutely necessary for efficient humoral responses against Ag occur, as follows: Ig isotype class switch (class switch recombination [CSR]) and somatic hypermutation (SHM) (1, 2). CSR is an intrachromosomal recombination that occurs in the *IgH* locus between two switch (S) regions located upstream of each C segment encoding the C region of the Ig. SHM consists in the introduction of mutations in the V regions of *IgH* (V_HD_HJ_H) and *IgL* (V_LJ_L) loci, which recognize the Ag. CSR enables synthesis of different Ig isotypes, each characterized by distinct effector functions, without affecting the antigenic specificity of Ig. SHM permits the selection of B cell clones with high affinity for Ag. CSR is divided into three steps, as follows: 1) germline transcription of targeted S regions; 2) DNA lesions induced by the enzyme activation-induced cytidine deaminase (1, 3) leading to double-strand breaks (DSB) in DNA; and finally 3) DNA repair mainly by the nonhomologous end joining (NHEJ) pathway.

Analysis of CSR junctions has been used in basic and clinical research (for review, see Ref. 4) because it provides insight into the amount of class-switched B cells in samples and documents the predominant CSR molecular pathway. In response to Ag, B cells expand and CSR creates a virtually unique *IgH* locus in every B cell clone, and CSR junctions can be amplified by PCR in a given sample. This is especially needed to evaluate the potential alterations of CSR in various immune defects. Structure of the repair

*Université de Limoges, Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations, UMR 7276, F-87000 Limoges, France; †CNRS, Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations, UMR 7276, F-87000 Limoges, France; ‡Université de Limoges, plateforme Biologie Intégrative Santé Chimie Environnement, F-87000 Limoges, France; and §Institut Universitaire de France, F-75000 Paris, France

¹F.B. and H.B. contributed equally to this work.

ORCIDs: 0000-0002-0351-685X (F.B.); 0000-0003-3590-1602 (J.C.-M.); 0000-0003-3221-6319 (C.C.); 0000-0002-8519-4427 (M.C.); 0000-0002-0056-3271 (S.P.).

Received for publication November 10, 2016. Accepted for publication February 19, 2017.

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer, and Ligue contre le Cancer (Comité de la Haute-Vienne, Comité de la Corrèze). F.B. is supported by Fondation Partenariale de l'Université de Limoges and Association Limousine pour l'Utilisation du Rein Artificiel à Domicile. H.B. is supported by Région Limousin and Université de Limoges. M.C. is supported by Institut Universitaire de France and Fondation pour la Recherche Médicale.

The sequences presented in this article have been submitted to the European Molecular Biology Laboratory–European Bioinformatics Institute European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena>) under the accession number ERP019632.

See related articles in this issue: Langerak et al. (*J. Immunol.* 198, 3765; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602050>) and IJspeert et al. (*J. Immunol.* 198, 4156; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601921>).

Address correspondence and reprint requests to Dr. Sophie Péron, Université de Limoges, CNRS UMR 7276, Centre de Biologie et de Recherche en Santé, Faculté de Médecine, 2 rue du Docteur Marcland, Limoges 87000, France. E-mail address: sophie.peron@inserm.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CSR, class switch recombination; DSB, double strand break; HTS, high-throughput sequencing; NHEJ, nonhomologous end joining; SHM, somatic hypermutation; S region, switch region.

Copyright © 2017 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/17/\$30.00

junction between donor and acceptor segments indeed reflects the DNA DSB repair pathway used during CSR: it has been shown that a recombination junction between two S regions may be repaired by alternative end joining DNA (5, 6) in the case of defective NHEJ. CSR recombination junction analysis protocols (6, 7) until now relied on cloning and subsequent sequencing by Sanger's method of individual products obtained by a single PCR or a nested PCR designed to amplify DNA fragments from switch junctions. Alignment of sequences with germline reference sequences assigns breakpoints on the *IgH* locus for each donor and acceptor segments involved, characterizes individual junction structure, and identifies mutations around the CSR recombination sites.

To overcome the laborious currently used manual processes and increase in-depth switch junction analysis, we applied a protocol using high-throughput sequencing (HTS). As a proof of concept, this was done with data generated in our laboratory using the Ion Torrent technology (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) based on simple library preparation utilizing DNA segments from amplification of switch junctions by nested PCR. For processing of large data sets from HTS, available Blastn and BWA algorithms for sequences analysis are inappropriate, because they are unable to automatically summarize results and structural patterns of junctions. The massive amount of HTS data thus requires a specifically designed tool to process sequencing data into insightful information. A big challenge was to develop a new computational tool that automatically analyzes HTS data, which identifies CSR junctions between two regions of the *IgH* locus and summarizes breakpoints and structure (blunt junctions, junctions with microhomology, or insertions inserted into the junction). During this study, we developed CSReport, a program processing HTS data for automatic analysis of CSR recombination junctions. CSReport is a Python code using Blast⁺ and Biopython module. It runs in ~10 min on a laptop computer for a typical 1 million read library. Our results validate CSReport as a successful and accurate computational tool for supporting analysis of extremely large numbers of sequences (as from our HTS-based protocol for CSR junctions), gaining in-depth assessment, and facilitating manipulation and extraction of valuable information.

Materials and Methods

CH12F3 cell culture and CSR induction in vitro

CH12F3 cells were maintained in RPMI 1640 supplemented with Ultra Glutamine, 10% FCS (Lonza), sodium pyruvate (Lonza), penicillin/streptomycin (Lonza), nonessential amino acids (Lonza), and 2-ME. Cells were stimulated to undergo CSR toward IgA with murine IL-4 (5 ng/ml; PeproTech), human TGF- β 1 (1 ng/ml; R&D Systems), and murine anti-CD40 Ab (200 ng/ml; eBioscience) (8). After 72-h activation, cells were labeled with anti-mouse IgA (IgA-FITC; BD Biosciences-Pharmingen) and anti-mouse IgM-PE-cyanine7 (eBioscience) Abs. IgA-bearing cells, representing the population that had undergone CSR, were sorted by a BD FACS Aria III cell sorter for DNA extraction.

Mice and CSR induction in vitro

C57BL/6J wild-type mice (6–8 wk old) were maintained in a specific opportunistic pathogen-free facility and immunized i.p. with 100 μ g nuclear protein–keyhole limpet hemocyanin (Biosearch Technologies) or 50 μ g nuclear protein–AECM–Ficoll (Biosearch Technologies) supplemented with CFA (Sigma-Aldrich). A boost was performed 3 wk later. After 7 d, animals were sacrificed and splenocytes were recovered. Splenocytes were stimulated in vitro to undergo CSR toward IgY1 with LPS B4 (1 μ g/ml; InvivoGen) and murine IL-4 (20 ng/ml; PeproTech) for 72 h. Experimental procedures were performed in accordance with the ethics committee review board of Limoges University (Limoges, France) and Hospital (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Limoges, France).

Amplification of $S\mu/S\alpha$ junctions from CH12F3 cells

Genomic DNA from sorted CH12F3 cells was extracted by the phenol/chloroform/isoamyl alcohol method. $S\mu/S\alpha$ junctions were amplified by

nested PCR using Phusion HF polymerase from BioLabs. The first PCR used the following primers: Smum1 (5'-CAG TTG AGG CCA GCA GGT-3') and mC α CH1 reverse 2 (5'-TTC TTG GAC GGC GTT AGA GT-3'), and the following protocol: 94°C for 5 min; 35 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min, and 72°C for 1:30 min; and 72°C for 7 min. The second PCR was performed with Smum2 (5'-CAG GTC GGC TGG ACT AAC TC-3') and mC α CH1 reverse 1 (5'-ATG TTG CAC GGA ACA TTT CA-3') under these conditions: 94°C for 5 min; 35 cycles of 94°C for 1 min, 62°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and 72°C for 7 min. PCRs were done in triplicate.

Amplification of $S\mu/S\gamma$ junctions from mouse splenocytes

CSR junctions were amplified from murine splenocyte genomic DNA by nested PCR. First PCR primer pairs were as follows: S μ nest1 forward (5'-AGA GAC CTG CAG TTG AGG CC-3') and sg1D reverse (5'-AGG ATG TCC ACC CTC ACC CAG GC-3'), and touchdown conditions as follows: 98°C for 30 s; 2 cycles of 98°C for 10 s, 69°C for 30 s, and 72°C for 90 s; 2 cycles of 98°C for 10 s, 67°C for 30 s, and 72°C for 90 s; 2 cycles of 98°C for 10 s, 65°C for 30 s, and 72°C for 90 s; and 25 cycles of 98°C for 10 s, 60°C for 30 s, 72°C for 90 s, and a final step at 72°C for 7 min. Primers for the second PCR were as follows: S μ Nest forward 2 (5'-CCA GCC ACA GTA ATG ACC CAG-3') and DownSg1 reverse (5'-TTG TTA TCC CCC ATC CTG TCA CCT-3'), according to the following protocol: 98°C for 30 s, and 35 cycles of 98°C for 10 s, 65°C for 30 s, 72°C for 90 s, and 72°C for 7 min. PCRs were done in triplicate for each sample.

Amplification of $S\mu/S\alpha$ junctions from human PBMCs

CSR junctions were amplified as previously (9). Amplified CSR junctions from DNA of PBMCs from four healthy individuals were equally mixed to prepare sequencing library. Study was approved by the ethics committee (N°: CPP12-012/2012-A00630-43, Comité de Protection des Personnes du Sud-Ouest et Outre-Mer IV).

Library preparation for ion proton sequencing

Libraries of 200-bp read length were prepared from 100 ng equally mixed triplicate PCR products as a starting material. A first enzymatic fragmentation was performed with Ion Xpress Plus Fragment Library kit (Life Technologies). Fragmented products were then linked to barcodes to identify each library. Ligated DNA fragments were migrated on E-Gel SizeSelect 2% agarose gels, and fragments of desired length were collected and amplified with cyclizer parameters, as follows: 95°C for 5 min, and 5 cycles of 95°C for 15 s, 58°C for 15 s, and 70°C for 1 min. Library concentrations were determined by Qubit dsDNA high sensitivity (Invitrogen), and an equimolar mixture was prepared. Libraries were run on an Ion PI v3 chip on the Ion Proton sequencer (Life Technologies).

Sequences are available on European Molecular Biology Laboratory–European Bioinformatics Institute European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena>; study accession number: ERP019632).

Pipeline HTS data analysis

Raw sequencing data consisted of fastq files containing adapter-trimmed reads and were obtained from the sequencer's processing pipeline. The algorithm of CSReport aims at interpreting each read as an assembly of a segment from the donor S region $S\mu$ and segment from an acceptor S region. First, these reads were used as query sequences in a Blast search (Blastn) (10) with ad hoc options (-dust no-, parameter adapted for repeated regions, and -culling_limit 1- restricting the junction mapping to segments with highest score). Reference sequences were slices from the murine C57BL/6 chromosome 12 sequence (gi|372099098 GRCm38.p3) and from the *IgH* locus sequence from *Homo sapiens* chromosome 14 reference (NC_000014.9). Only reads that map both regions, that is, a first hit in donor S region $S\mu$ and a second hit in the target S region (user defined), with a minimum of 30 bp for each mapping, were kept for further analysis. A first junction structure evaluation was performed based on segmentation given by Blastn algorithm. The junction structure evaluation consists in determining the number of bases in the overlap between the 3' end of the first segment and the 5' end of the second segment. If this count is strictly positive, the junction is identified as microhomology. If no overlap is found, the junction is identified as either blunt or insertion if some bases are not mapped between the segments' ends. When a long (>10-bp) segment in the middle of a read was not mapped, a second Blast search was performed for the inserted segment (Blastn-short). This rescued some reads that may have originated from multiple breaks in S regions (complex junctions), as already reported (11, 12). When a microhomology (>2 bp) was found, realignment was performed to ensure that reported microhomologies did not contain any mismatches (as the first Blastn algorithm may have introduced mismatches to extend alignment); this

alignment against each germline segment was performed using pairwise 2 from Biopython module (Python implementation of Needleman–Wunsch algorithm). Results of segmentation and junction structure for each filtered read were then reported in a tabular text file. In a subsequent step, these results were processed by statistical summarization procedures that may be selected by user at time of execution as they depend on the validated definition of an individual unique junction: by default, a junction is uniquely defined by one structure/size and two breakpoint positions, and all reads sharing these features are clustered into a single junction's identification. Clustering based on breakpoint proximity can also be used to cluster junctions with very close breakpoints. These steps resulted in a consolidated set of identified junctions described by structure and breakpoint positions. This set was then used to report the structural profile and breakpoint distributions. CSReport workflow is described on the diagram in Supplemental Fig. 1. CSReport as well as other postprocessing scripts are available upon request as a Python code. To use CSReport on other species, one just has to provide an *IgH* reference sequence and an annotation file for S region definition.

Results

Assessment of CSReport using a simulated data set of switch junctions

Use of simulated data sets is a common method to test sensitivity and resolution of computational tools (13) as they compare resulting outputs with expected outcomes. First, CSReport was used to analyze a computer-generated sequence file (Fasta) of 5000 randomly chosen concatenations of germline segments of S_{μ} and S_{α} (each 50–100 bp in length). By generation principle, all sequences are thus blunt junctions

and each of their breakpoints is known. Fig. 1A shows structural profiles of such junctions in terms of either junctions with insertions (more simply insertions), blunt junctions, or junctions with microhomologies (more simply microhomologies). As expected, blunt junctions are the most frequent reported structure (~50% of sequences). Microhomologies are also found at significant frequencies. As already emphasized by previous studies (4), junction analysis is inherently biased to microhomologies as such structures can arise by chance, and this statistical effect (which can be analytically characterized for random sequences) is further increased when recombined regions share extensive homology. If breakpoints are located in short homologous regions, each alignment will extend further than the actual breaks and a microhomology will be found independently of a microhomology-mediated repair mechanism. Finally, it has to be stressed that about only two thirds of junctions (3278 of 5000) were reported by CSReport: a manual curation of some unidentified junctions showed that the homology between S_{μ} and S_{α} was again responsible for this loss of sensitivity as the initial Blastn search failed to properly address each segment to its correct S region.

Accuracy of junction analysis can also be evaluated using a simulated data set of S_{μ} - S_{α} sequences. As shown in Fig. 1B and 1C, segment assignment using CSReport was highly accurate as 90 and 97% of break positions were correctly identified within 10 bp in S_{μ} and S_{α} , respectively. Insets showed a slight dispersion of break positions toward longer alignments for the same reasons

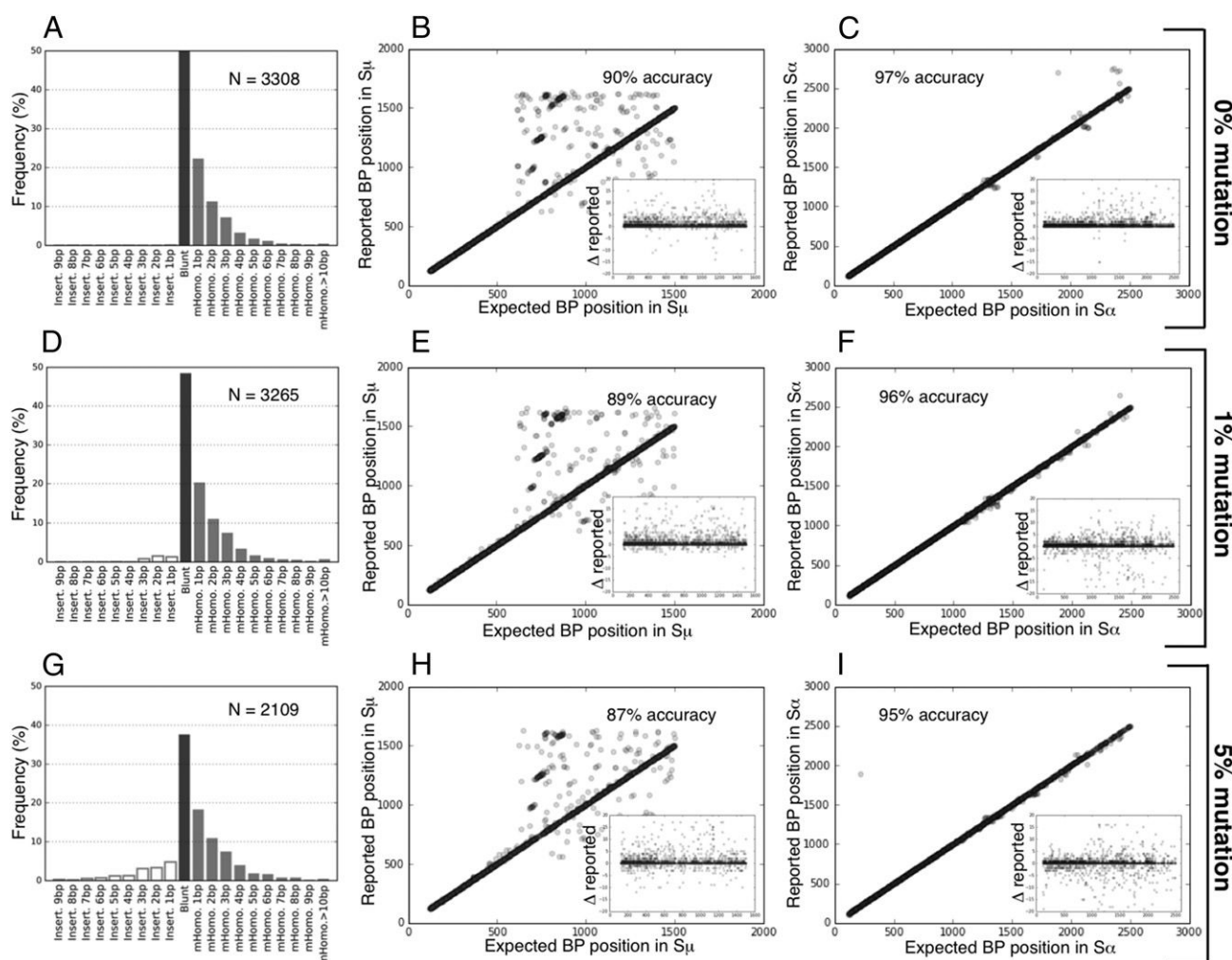


FIGURE 1. CSReport accurately identifies switch junctions in simulated S_{μ} - S_{α} sequences. Structural profiles and reported breakpoint positions are obtained from simulated S_{μ} - S_{α} blunt junctions, randomly generated from concatenation of S_{μ} and S_{α} segments: (A–C) without mutations, (D–F) with 1% random mutations, and (G–I) with 5% random mutations.

as the observed levels of statistical microhomologies. Therefore, the accuracy of junction assignment by CSReport has to be evaluated with some tolerance in break positions (in this study, 10 bp) as this bias is only related to the extent of homology between both S regions and will be inherent to any alignment-based method.

As mutations frequently occur close to breakpoints of switch junctions, CSReport had to be tested in mutated sequences. Simulated mutated data sets were generated with a uniform substitution rate of 1 and 5% and analyzed with CSReport. Fig. 1 shows sensitivity and accuracy results for mutated junctions. As expected, the strongest effect is obtained with 5% mutations. Compared with unmutated sequences, fewer junctions were identified (2109 versus 3278). The

structural profile (Fig. 1G) not only displays the previously discussed bias to microhomologies but also shows insertions at low frequencies. Breakpoint assignment accuracy was also slightly reduced but remained at high levels so that segments were correctly identified for most junctions (Fig. 1H, 1I). Nevertheless, 1% mutation does not seem to modify results compared with no mutations (Fig. 1D–F).

Statistics of *Sμ-Sα* CSR junctions in CH12F3 cells

CSReport was used to analyze switch junctions from in vitro CSR-induced CH12F3 cells. Results from three independent samples are reported in Fig. 2. To document bottlenecks in the pipeline and influence of filter parameters, counts of reads/junctions are shown in Fig. 2A. For each sample, filtration of reads that map to a valid

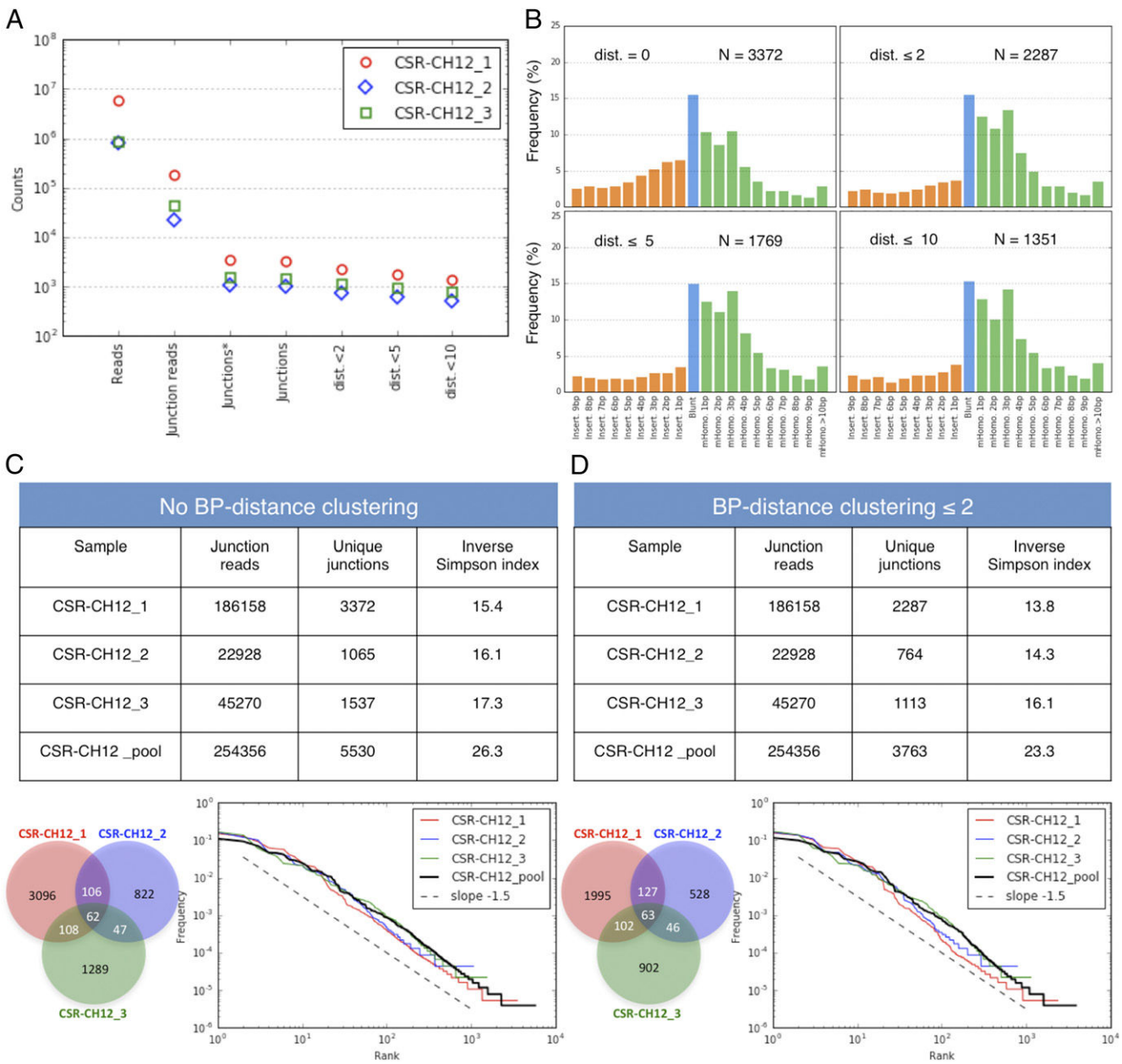


FIGURE 2. Quantitative assessment of switch junctions in CSR-induced CH12F3 cells. **(A)** Overview of junction counts for three independent samples of CH12F3 cells. Reads: sequences in raw fastq file (Ion Proton output). Junction reads: sequences that can be segmented in a strand-aware consistent switch junction. Junctions*: uniquely defined by two breakpoint positions and one structure. Junctions: same as before, and >10-bp insertions are excluded. dist < x: junctions with close breakpoint positions are counted only once. **(B)** Structural profile of sample CSR-CH12_1 for four different values of the breakpoint-distance clusterization parameter (similar trends were observed for the other samples). **(C and D)** Statistics of junction diversity across samples for junctions obtained without breakpoint-distance clusterization (C) or with clusterization of breakpoint distance ≤2. Venn diagram comparing the three independent samples. Rank–frequency curves of unique junctions are compared with a generalized Zipf law $f \approx k^{-1.5}$.

CSR junction was highly selective as only 3–5% of input sequences were kept at this step. CSR quantification in a sample relied on determining the number of independent switch recombination events and therefore depended on the definition of a unique junction. A logical choice was to define a junction by its structure (insertion, blunt, or microhomology/size) and the positions of both breakpoints. When counting junctions, 2–5% of junction reads were found to be independent, indicating that most junctions were sequenced multiple times. A reasonable choice was to exclude junctions with large inserts (>10 bp) as they are only partially assembled and represent a small fraction of identified junctions. A further step of summarization was done by clustering identified junctions with very close breakpoints on both S regions. This was parameterized by the maximal distance in base pairs between break positions for two junctions to be clustered. From Fig. 2B, counts of independent junctions after clustering were seen to significantly depend on the distance parameter, whereas the structural profile did not depend on this parameter for non-null values. It thus indicates that distance clustering is efficient in identifying junctions that differ by only a few base pairs in breakpoint positions. A manual curation of these examples suggests this arises when an insertion is present right at the junction site. It is likely that this insertion is an unfortunate sequencing

error (indels are by far the most frequent errors in the Ion Proton system), and these reads should not be considered as single junctions. Increasing the distance clustering parameter further than 2 bp would only reduce the number of independent junctions and seems an overcorrection of this effect as the structure profiles remain unchanged. Detailed investigation of clustering effects is shown in Fig. 2C and 2D in terms of junction counts and diversity. For all three samples, counts were indeed reduced after clustering, but it has to be noted from the Venn diagrams that only nonredundant junctions were significantly removed. Also, sample diversity was slightly reduced after clustering. All these results on three independent samples clearly demonstrated homogeneity (as shown on rank–frequency graphs) so that the pooled data set provided a deeper insight into CSR junctions under these conditions, with greater statistical power.

Summarization of 3763 independent junctions provided descriptions of S μ –S α CSR sequences at an unprecedented level. The distribution of breakpoints along S regions thus gave indications of motif targeting during the generation of DSB. Fig. 3 indicates colocalization of breakpoints, both in S μ –S α , with motifs AGCT or GGG. The density of breakpoints shares local maxima with the density of one of these two typically abundant switch motifs. The clear correlation observed in this study indicates that breaks will

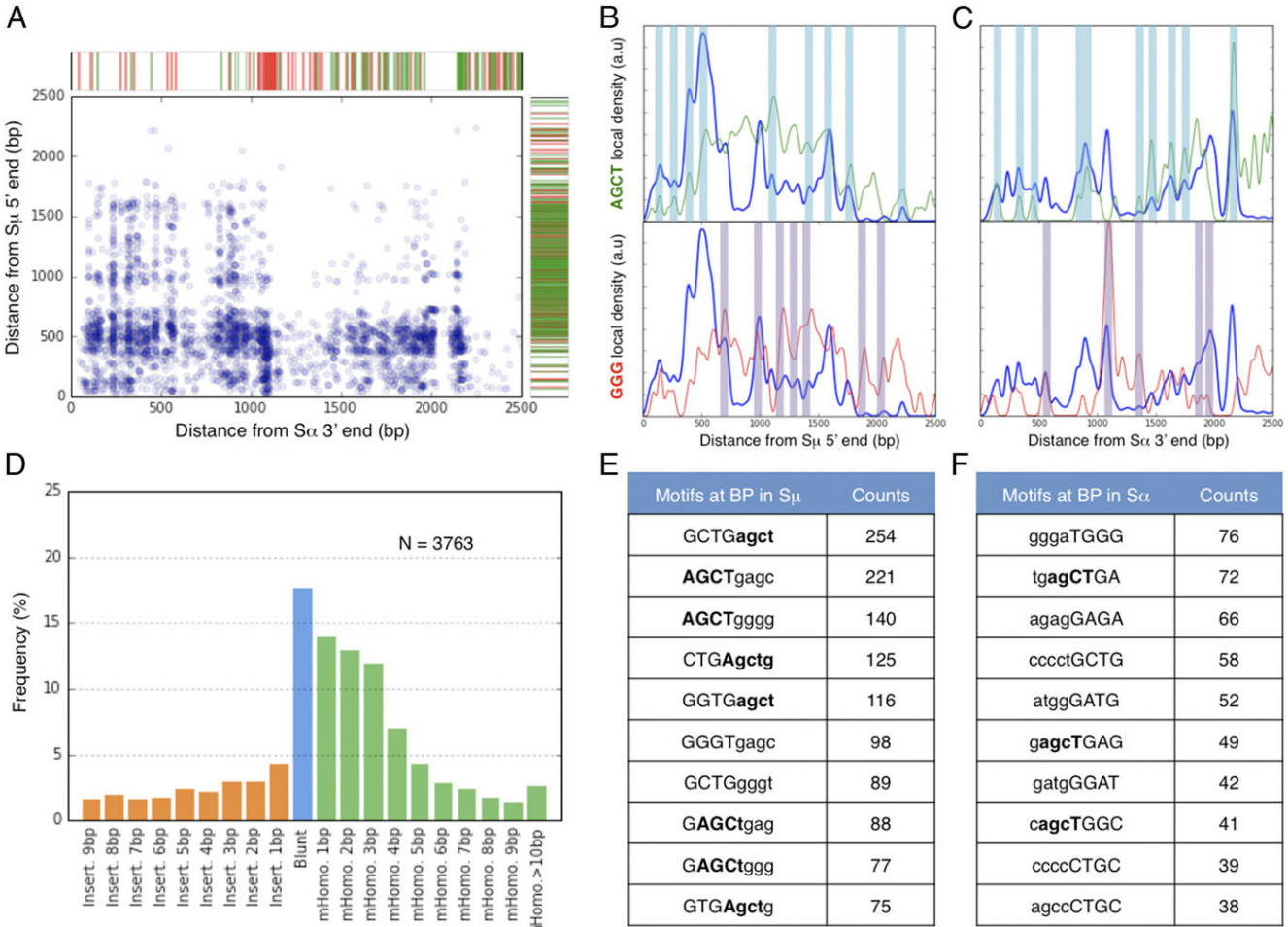


FIGURE 3. CSReport provides valuable DNA break/repair information on large data sets. Structural and positional results obtained from analysis of S μ –S α junctions in CSR-induced CH12F3 cells (pool of three independent samples). (A) Positions of junction breakpoint expressed in terms of distance from S region ends. Each point in the graph is a unique junction defined by 2 bp positions (in S μ and in S α). Positions of palindromic AGCT motifs (green) and GGG motifs (red) are reported on right (S μ) and top sides (S α). (B and C) Estimation of local density of AGCT motifs (green), GGG motifs (red), and breakpoint along S μ (B) and S α (C) regions. (D) Structural profile of S μ –S α junctions. (E and F) Most frequent 8-nt motifs at breakpoint in S μ (E) and S α (F). Excised DNA at junctions is shown in lowercase; AGCT motifs are emphasized in bold.

be preferentially generated at local maxima in motif density, regardless of the average motif density of the subregion. As CSReport ensures 1-bp resolution, a more precise characterization of the break mechanism specificity can be obtained by looking at the most frequent nucleotide motif at breakpoints from both regions. Again, both AGCT and GGG were found to account for a large proportion of junction motifs, in accordance with the commonly accepted activation induced-cytidine deaminase-induced break mechanism. Finally, statistics about junction structures (Fig. 3D) can be obtained on a large number of independent junctions. Despite previously discussed bias toward insertions (due to mutations) and microhomologies (by chance, due to region homology), blunt junctions were found to be the most frequent structures. Microhomologies of 1–3 bp were also found at significant levels as the results of shared motifs between $S\mu$ and $S\alpha$. This profile is therefore characteristic of NHEJ-resolved DSB. As already emphasized in a thorough review of CSR junction studies (4), detailed structural information is critical to infer DNA repair pathways. $S\mu$ - $S\alpha$ switch junctions are known to be noticeably biased to statistical microhomologies, but studies have been limited to a few manually curated junction sequences. In this work, our experimental HTS-based protocol and our computational analysis with CSReport give valuable detailed and accurate information on a large set of switch junctions for better elucidation of recombination mechanisms.

Statistics of CSR $S\mu$ - $S\gamma 1$ junctions in resting versus stimulated mouse splenocytes

The comparative analysis of CSR $S\mu$ - $S\gamma 1$ junctions in resting versus stimulated mouse splenocytes was performed using CSReport, and results are shown in Fig. 4. As expected, in vitro LPS plus IL-4 stimulation of splenocytes efficiently induced CSR as a greater number of independent $S\mu$ - $S\gamma 1$ junctions was found ($n = 9428$) compared with those before stimulation ($n = 674$). Interestingly, the structural profile was also modified as blunt junctions were reported in a higher proportion of stimulated B cells (27.5%) than in resting B cells (15.9%). Whereas microhomology frequencies exhibited a smooth decrease as a function of microhomology size in stimulated cells, microhomologies of 1–4 bp were found approximately at the same amounts as blunt junctions in resting cells.

Quantitative and qualitative differences can also be documented in terms of breakpoint positions and distinctive motifs at junctions. Fig. 4B shows how possible breakpoint positions were used upon stimulation: breaks resulting in valid junctions span over 3 kb in $S\gamma 1$ in stimulated cells, whereas they appear more localized to the 3' end of this region in resting splenocytes. In contrast, distribution of break positions in $S\mu$ was similar in both conditions (spanning over the first 1.6 kb). Again, local density maxima of breakpoints in the S regions colocalized with local density maxima of palindromic AGCT and GGG motifs, as highlighted by the prevalence of such

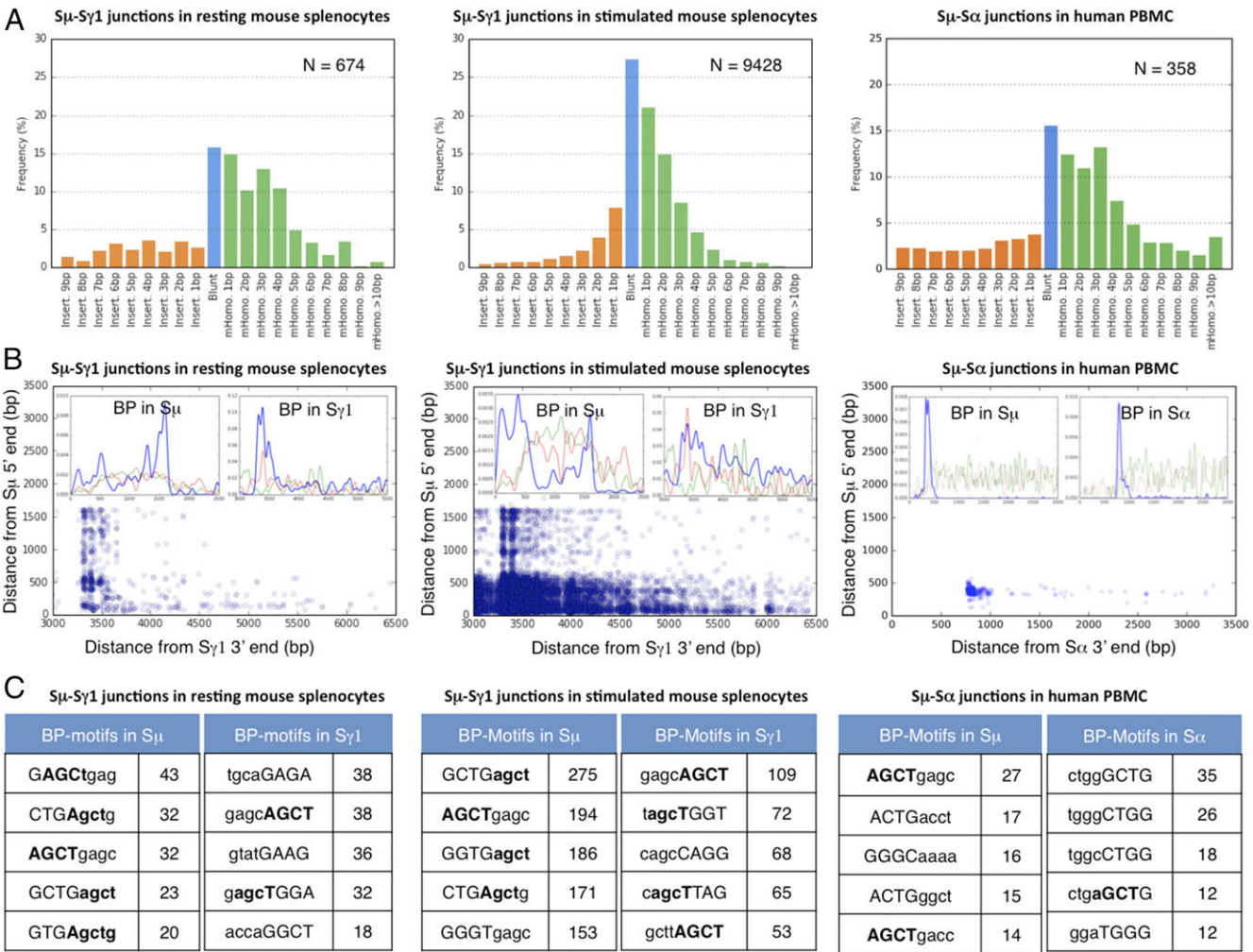


FIGURE 4. CSReport identifies switch junctions in mouse splenocytes and human PBMCs. (A) Structural profiles, (B) distribution of breakpoints, and (C) most frequent 8-nt motifs at breakpoint. Left and middle figures are obtained from $S\mu$ - $S\gamma 1$ junctions, respectively, in resting and stimulated mouse splenocytes. Right figures are obtained from $S\mu$ - $S\alpha$ junctions in human PBMCs.

patterns in the distinctive break sequences (Fig. 4C). Again, S_{μ} breaks exhibited more similarity in motif usage when stimulated cells were compared with resting cells.

Discussion

Sequence analysis of switch junctions from B cells reveals valuable information on the mechanism and effectiveness of CSR, and this is done almost routinely during studies of B cell functions in a variety of mouse models and clinical research. We aimed to study CSR junctions using a protocol based on HTS (Ion Torrent technology and Ion Proton sequencer). This technique challenges currently used methods already used due to the extremely large amount of collected data. To address the lack of automated tools for the analysis of large data sets of switch junction sequences, we designed CSReport, a software that ensures assessment of switch recombination junctions from Fastq or Fasta files. Typically, CSReport analyzes millions of reads that represent a few thousand single CSR junctions (Fig. 2A). In commonly used methods for CSR junction study, bias in junction mapping and junction structural characterization can arise from the chosen alignment algorithm as well as from the author interpretation. Blastn remains the more appropriate mapping software in regard to the BWA aligner, mostly used for HTS data analysis that we excluded because results obtained with BWA were very far from manual analysis. Blastn parameters were set up, but can be modified by the user, and we used the -no dust- option appropriate to the analysis of repeated sequences as S regions and the -culling limit-1- returning the highest quality mapping result. This implies that the correct reference sequence is used, which is particularly important for different murine genetic backgrounds. To evaluate errors in junction analysis induced by CSReport, we subjected it to analysis of artificially designed blunt-ended S_{μ} - S_{α} junctions with known breakpoints (Fig. 1). Obtained results showed that CSReport interpretation induced a shift of blunt-ended junctions toward junctions using microhomologies (Fig. 1A) in the same way as a manual analysis, whatever the used aligner. In addition, mutations in proximity to the junction site induced false detection of junctions with insertions (Fig. 1D–G). These effects are most likely to be present in previous methods of junction analysis as well. As HTS data are more prone to sequencing errors, it appeared that clustering of unique junctions can lower the rate of abnormal detection of junctions with insertions (Fig. 2A, 2B). Clustering is controlled by the breakpoint-distance parameter (maximal distance of breakpoint of two individual junctions for them to be clustered). Based on our results, we recommend using CSReport with a breakpoint distance ≤ 2 bp. Increasing further this parameter will only result in fewer reported junctions. It is of note that this 2-bp clustering does not significantly affect diversity of the samples (Fig. 2C, 2D), as evaluated by Inverse Simpson Index, which can be only determined with large amounts of data. More detailed evaluation of sample clonality is provided by rank-frequency curves that also require substantial depth. After accuracy assessment of CSR junction identification by CSReport, we submitted results from HTS of five libraries made using amplified CSR junctions from DNA of CSR-stimulated CH12F3 cells (Fig. 3) and normal mouse splenocytes before and after 3 d of IL-4 plus LPS in vitro stimulation (Fig. 4). CSReport permits the automatic determination of breakpoint positions along the reference sequences, structural features of CSR junctions, and the most frequent DNA motifs at the junction breakpoints. As expected, S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ junction count was greatly increased after splenocyte stimulation, and CSReport revealed structural features for all tested samples with 25–50% of blunt-end junctions, whereas

junctions with microhomologies longer than 4 bp were quite rare, according to results in the literature (4).

Finally, we propose CSReport as an automated computational tool able to support analysis of large data sets from CSR junction HTS. Widespread use of CSReport will normalize studies analyzing switch junctions as it provides a single pipeline providing breakpoint positions and junction structure (blunt-end junctions or junctions with insertion or microhomology). CSReport conforms to the definition of microhomology as perfectly matched nucleotides shared by donor and acceptor junction segments without any imperfect homology or mismatch, as previously described (14). CSReport also includes specific identification of complex sequential CSR (S_{μ} - S_{α} - S_{γ} junctions) by realigning long insertions (>10 bp) that may not have been mapped during the first alignment step. In addition, the use of CSReport will reduce the bias in the delineation of CSR junction characteristics due to operator interpretation. CSReport is able to support Fastq and Fasta files and is meant to process data sets regardless of the sequencing technology used to produce them. It is of note that read size is not a limitation criterion, as in Ig or TCR repertoire analyses (15, 16), which need ~ 500 -bp length sequencing, because CSReport only keeps for analysis those reads that map on donor and acceptor regions for >30 bp. Nevertheless, large fragments could certainly improve capture of junctions containing reads.

Another interesting point is that CSReport permits CSR junction study regardless of the species, as demonstrated by S_{μ} - $S_{\alpha 1}$ junction analysis done on human PBMCs (Fig. 4). Finally, in addition to the count and characterization of CSR junctions, CSReport presents results in the form of clear and easily manipulated tabular files of valuable information. CSReport facilitates and accelerates the study of CSR junctions. It also harmonizes analysis and interpretation.

Acknowledgments

We thank the G  noLim platform and the Cytométrie, Imagerie et Microscopie platform (G  nomique Environnement Immunité Santé et Th  rapeutique Institut, Université de Limoges, Centre de Biologie et de Recherche en Santé, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges) for sequencing and cell sorting, and S. Desfor  ges, B. Remeraud, and D. Champagnol for help with animal care.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

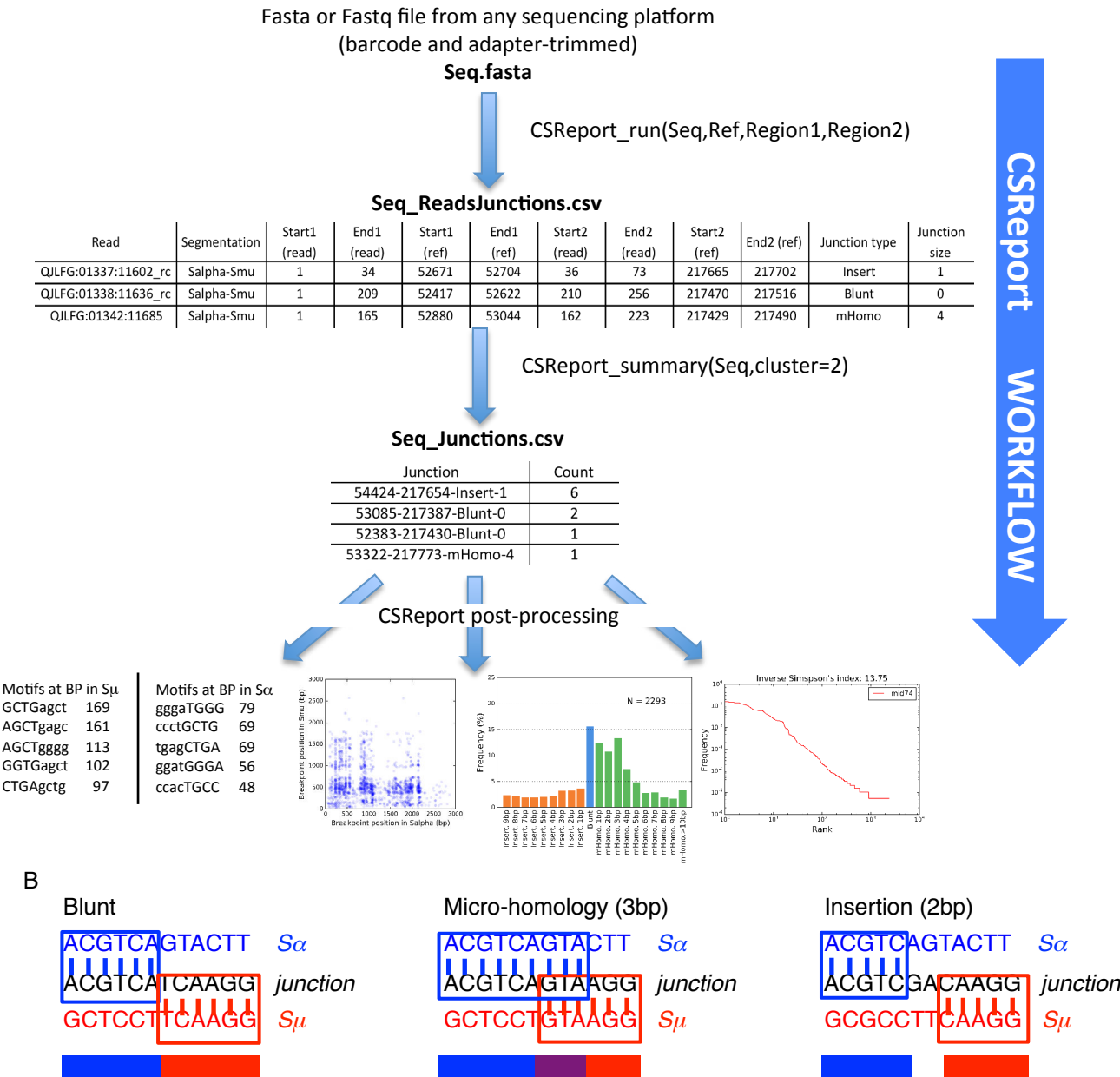
References

1. Muramatsu, M., K. Kinoshita, S. Fagarasan, S. Yamada, Y. Shinkai, and T. Honjo. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102: 553–563.
2. Teng, G., and F. N. Papavasiliou. 2007. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu. Rev. Genet.* 41: 107–120.
3. Revy, P., T. Muto, Y. Levy, F. Geissmann, A. Plebani, O. Sanal, N. Catalan, M. Forveille, R. Dufourcq-Lapelouse, A. Gennery, et al. 2000. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102: 565–575.
4. Stavnezer, J., A. Björkman, L. Du, A. Cagigi, and Q. Pan-Hammarström. 2010. Mapping of switch recombination junctions, a tool for studying DNA repair pathways during immunoglobulin class switching. *Adv. Immunol.* 108: 45–109.
5. Soulas-Sprauel, P., G. Le Guyader, P. Rivera-Munoz, V. Abramowski, C. Olivier-Martin, C. Goujet-Zalc, P. Charneau, and J.-P. de Villartay. 2007. Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 204: 1717–1727.
6. Ehrenstein, M. R., and M. S. Neuberger. 1999. Deficiency in Msh2 affects the efficiency and local sequence specificity of immunoglobulin class-switch recombination: parallels with somatic hypermutation. *EMBO J.* 18: 3484–3490.
7. Pan, Q., H. Rabbani, F. C. Mills, E. Severinson, and L. Hammarström. 1997. Allotype-associated variation in the human $\gamma 3$ switch region as a basis for differences in IgG3 production. *J. Immunol.* 158: 5849–5859.
8. Nakamura, M., S. Kondo, M. Sugai, M. Nazarea, S. Imamura, and T. Honjo. 1996. High frequency class switching of an IgM+ B lymphoma clone CH12F3 to IgA+ cells. *Int. Immunol.* 8: 193–201.

9. Pan, Q., C. Petit-Frère, S. Dai, P. Huang, H. C. Morton, P. Brandtzaeg, and L. Hammarström. 2001. Regulation of switching and production of IgA in human B cells in donors with duplicated alpha1 genes. *Eur. J. Immunol.* 31: 3622–3630.
10. Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403–410.
11. Pan-Hammarström, Q., A. Lähdesmäki, Y. Zhao, L. Du, Z. Zhao, S. Wen, V. L. Ruiz-Perez, D. K. Dunn-Walters, J. A. Goodship, and L. Hammarström. 2006. Disparate roles of ATR and ATM in immunoglobulin class switch recombination and somatic hypermutation. [Published erratum appears in 2006 *J. Exp. Med.* 203: 251.] *J. Exp. Med.* 203: 99–110.
12. Reina-San-Martin, B., J. Chen, A. Nussenzweig, and M. C. Nussenzweig. 2007. Enhanced intra-switch region recombination during immunoglobulin class switch recombination in 53BP1^{-/-} B cells. *Eur. J. Immunol.* 37: 235–239.
13. Safonova, Y., A. Lapidus, and J. Lill. 2015. IgSimulator: a versatile immunosequencing simulator. *Bioinformatics* 31: 3213–3215.
14. Pan, Q., C. Petit-Frère, A. Lähdesmäki, H. Gregorek, K. H. Chrzanowska, and L. Hammarström. 2002. Alternative end joining during switch recombination in patients with ataxia-telangiectasia. *Eur. J. Immunol.* 32: 1300–1308.
15. IJspeert, H., P. A. van Schouwenburg, D. van Zessen, I. Pico-Knijnenburg, A. P. Stubbs, and M. van der Burg. 2017. Antigen Receptor Galaxy: a user-friendly, web-based tool for analysis and visualization of T and B cell receptor repertoire data. *J. Immunol.* 198: 4156–4165.
16. Langerak, A. W., M. Brüggemann, F. Davi, N. Darzentas, D. Gonzalez, G. Cazzaniga, V. Giudicelli, M.-P. Lefranc, M. Giraud, E. A. Macintyre, et al. 2017. High-throughput immunogenetics for clinical and research applications in immunohematology: potential and challenges. *J. Immunol.* 198: 3765–3774.

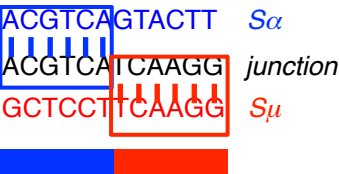
Figure S1

A

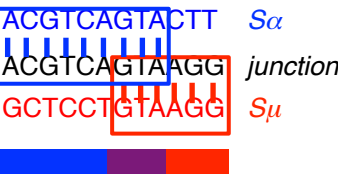


B

Blunt



Micro-homology (3bp)



Insertion (2bp)

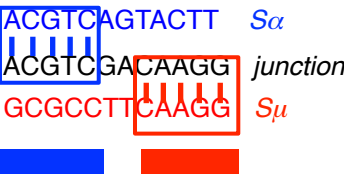


Figure S1. CSReport identifies swith junctions from raw sequencing reads and provides graphical results for direct interpretation. (A) Workflow diagram of CSReport. Input files are sequencing reads in fasta or fastq format. The first command (CSReport_run) calls Blastn and assembles junctions from realignment of segments'ends (individual structure and BP). The second command (CSReport_summary) identifies single junctions from the junction reads, accordingly to the user-defined parameter of distance clustering. Other CSReport functions produces graphical output to represent structural profile, BP distribution, junctional diversity or involved nucleotidic motifs. (B) Definition of blunt junction (left), junction with micro-homology (middle), or junction with insertion (right). CSReport conforms to those definitions

Annexe 6 : (Article soumis)

Processes supported by the IgH 3'RR in mature B-cells, including hypermutation and recombination events, also rely on Mediator

Iman Dalloul, Sandrine Le Noir, **Zeinab Dalloul**, François Boyer, Bernardo Reina-San-Martin, Jeanne Moreau, Michel Cogné

Manuscrit soumis à *The Journal of Experimental Medicine*

Ce papier étudie l'implication de la sous-unité Med1 du complexe médiateur, connue être impliquée dans la régulation de la transcription et dans le rapprochement des enhancers et les promoteurs des gènes, dans les recombinaisons tardives qui touchent le locus IgH.

J'ai participé à l'expérimentation ayant conduit à la rédaction de cet article (collection du sang des souris et préparation du sérum, préparation des splénocytes, stimulation in-vitro, tri des cellules, ELISA, ELISPOT, cytométrie en flux, extraction d'ARN, qPCR, ChIP, préparation des bibliothèques pour la NGS).

Processes supported by the IgH 3'RR in mature B-cells, including hypermutation and recombination events, also rely on Mediator

Running title: Role of Mediator in *IgH* locus physiology

Iman Dalloul¹, Sandrine Le Noir¹, Zeinab Dalloul¹, François Boyer¹, Bernardo Reina-San-Martin^{2,3,4,5}, Jeanne Moreau¹, Michel Cogné,¹

¹Université de Limoges, CRIBL, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Limoges, France

² Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire; Illkirch, 67400; France.

³ Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258; Illkirch, 67400; France.

⁴ Centre National de Recherche Scientifique, UMR7104; Illkirch, 67400; France.

⁵ Université de Strasbourg; Illkirch, 67400; France.

Keywords: Mature B-cells, Mediator, transcription, class switching, locus suicide recombination

Corresponding author: Michel Cogné, UMR CNRS 7276, University of Limoges, France.

Tel: 33 519564204; Fax: 33 555435896; email: cogne@unilim.fr;

ABSTRACT

In mature B-cells, the *IgH* locus is controlled by dynamic long-range 3D-interactions that regulate transcription and recombination events, under stringent regulation by the 3'RR super-enhancer. The 3'RR exerts its effects over long distances to maintain optimal expression of membrane Ig and secreted antibodies in B-lymphocytes and plasma cells, respectively. In activated cells, it controls recruitment of Activation-induced cytidine deaminase (AID) at three specific locations: the variable region during somatic hypermutation (SHM), switch regions during class switch recombination (CSR) and the 3'RR itself, during locus suicide recombination (LSR).

Med1, a subunit of Mediator, facilitates the transcriptional activation of the *IgH* locus and enforces the long-range interactions taking place during CSR. Here we show that, in addition, conditional inactivation of Med1 in B-cells impacts all of the features controlled by the 3'RR. Med1 promotes BCR expression, enhances SHM and is mandatory for hyper-transcription in plasma cells. We also show that Med1 promotes both inter- and trans-chromosomal CSR. Finally, the absence of Med1 appears to strongly impair 3'RR eRNA transcription and LSR. Overall, our results indicate that Mediator contributes to all of the long-range effects of the 3'RR that influence the status and fate of the *IgH* locus in mature B cells.

INTRODUCTION

The immunoglobulin heavy (*IgH*) chain locus encompasses more than two thousand kilobases and undergoes multiple remodelling, recombination and hypermutation events throughout differentiation and activation (Reynaud et al., 2008; Stavnezer et al., 2008; Dudley et al., 2005; Pinaud et al., 2011). During humoral immune responses, *IgH* expression varies profoundly in mature B-cells through various events occurring successively in germinal centers (GCs). Somatic hypermutation (SHM) of the rearranged variable regions begins and predominates in dark zone centroblasts, class switch recombination (CSR) of constant genes mostly marks light zone centrocytes, while cells engaged towards the plasma cell (PC) stage undergo focal hyper-transcription of *Ig* genes, thereby ensuring elevated antibody (Ab) production. In addition, activated B cells can also undergo a CSR-like form of recombination known as locus suicide recombination (LSR), which joins S μ to the 3' *IgH* super-enhancer (3'RR) and which results in the loss of B cell receptor (BCR) expression and cell death (Péron et al., 2012),

These events are under the control of an *IgH* super-enhancer promoting not only transcriptional changes, but also chromatin remodelling, accessibility to recombinases, and recruitment of the SHM machinery (Cogné et al., 1994; Pinaud et al., 2011; Rouaud et al., 2013; Saintamand et al., 2015b). How these gene modifications remain focused on very specific targets within the locus still remains incompletely understood. By analogy to classical promoter-enhancer transcriptional interactions associated with looping of intervening sequences, the concept has emerged that intra-chromosomal loops are also needed prior to recombination. This is supported not only by the observation of strictly legitimate junctions between distant S-regions, their need for preexisting transcription, and by the direct demonstration of dynamic physical contacts between *IgH* enhancers, promoters and S-regions (Wuerffel et al., 2007; Thomas-Claudepierre et al., 2016).

While the concept of loops provides the simplest model representing the contacts between S regions, it overlooks the fact that junctions also occur between S regions from different *IgH* alleles, accounting for up to 10% of CSR events in mammals (Kingzette et al., 1998; Reynaud et al., 2005; Laffleur et al., 2014). Accommodating all observed events thus needs to consider that the general prerequisite to CSR is the occurrence of legitimate interactions between paired S regions, whether in *trans* or in *cis* and only the latter result in DNA looping and fit with the prevalent model. Coexistence of these classical *cis*-CSR and alternate *trans*-CSR pathways supports the concept of “CSR factories”, as areas attracting any DNA sequence targeted, bound, or functionally related to the CSR machinery, whether or not bounding an intra-chromosomal loop, and regardless of being an S-region or the *IgH* 3' super-enhancer. Since *trans*-interactions should not yield chromosomal instability, a major issue is to ensure their legitimacy: interallelic *IgH* interactions preceding CSR, and resulting allelic transvection, might contribute to CSR legitimacy (Le Noir et al., 2017). It is currently unknown whether *trans*-interactions are looser than loops occurring in *cis* and differentially regulated by specific factors. While LSR can be considered as a variation of the CSR process, the parameters governing the choice between CSR and LSR are unknown and detailed study of the conditions regulating the synapsis of AID targets over long distances is necessary.

Mediator is a large (four-modules) multi-subunit complex with an important role in connecting DNA-bound transcription factors directly to RNA polymerase II (Pol II). It controls Pol II C-terminal domain (CTD) phosphorylation and communicates various regulatory signals to the polymerase, in forming the preinitiation complex, pausing, or elongation (Allen and Taatjes, 2015). It also interacts with the Cohesin complex, itself known to stabilize chromosome pairing at meiosis, and was thus suggested to promote interactions between chromosomes of the same pair (Carlsten et al., 2013). Notably, the Med1 subunit interacts with various transcriptional activators, the recruitment of which to chromatin culminates at locations of super-enhancers

and marks them with a one-order-of-magnitude higher load of Mediator than for simple enhancers (Whyte et al., 2013). As for any Mediator subunit specific for a given set of transcription factors, Med1 is only included in a fraction of all Mediator complexes and it is not mandatory for transcription (Allen and Taatjes, 2015). Its activity additionally relies on its phosphorylation by the MapK/ERK pathway, followed by increased recruitment to Mediator complexes and boosted transcription of specific genes in activated cells (Belakavadi et al., 2008). Interestingly, Med1 was recently shown to qualitatively affect SHM and to promote germline transcription of switch (S) regions and long-range enhancer/S region interactions during CSR (Thomas-Claudepierre et al., 2016; Gaudot et al., 2018). Mediator thus stands as a good candidate for connecting the MAPK/ERK-dependent B-cell activation and all the subsequent *IgH* locus remodelling and 3D changes controlled by the 3'RR super-enhancer during late B-cell differentiation. Given the functional importance of gene architecture and long-range interactions for the physiology of the *IgH* locus, we decided to explore the role of the Med1 subunit of Mediator on all the features relying on the 3'RR in mature activated B cells and plasma cells: BCR expression, SHM, CSR (*cis* and *trans*), LSR and antibody secretion.

Results

Decreased membrane BCR expression and antibody secretion in Med1-deficient mature B-lineage cells.

Conditional ablation of Med1 in the B-cell lineage is known to globally preserve B-cell development (Thomas-Claudepierre et al., 2016). While all splenic B-cell populations were present, we observed a significantly lower density of membrane BCR in almost all B-cell compartments, and most significantly in IgM^{high} marginal zone B-cells and B1 cells (**Fig. 1A**). Consistent with this, we found that the serum levels of circulating antibodies was lower in Med1-deficient mice (**Fig. 1B**). This was particularly noticeable for IgA and IgE, short-lived Ig not recycled by the FcRn pathway, which were cut by up to five-fold (**Fig 1B**). Although less important, a significant (about 2-fold) reduction in serum IgG and IgM also manifested. Furthermore, single-cell analysis of antibody secretion by Elispot showed that bone marrow-derived plasma cells isolated from Med1-deficient mice showed a significant decrease in the number of IgM-expressing spots (approximately cut by half) and area (cut by one-third) when compared to wild type controls (**Fig1C, Top**). As expected from the CSR defect described for Med1-deficiency (Thomas-Claudepierre et al., 2016), IgG1 plasma cell numbers were decreased to a much higher extent in Med1-deficient mice, and again showed reduced spot areas, indicating decreased levels of secretion on a per cell basis (**Fig1C, bottom**). We conclude that Med1-deficiency impacts the level of BCR expression and antibody secretion in mature B cells and plasma cells.

Med1-deficiency results in decreased levels of both intra- and inter-chromosomal CSR and severely impaired LSR.

In agreement with the previously described CSR defect after *in vitro* stimulation of Med1-deficient B cells (Thomas-Claudepierre et al., 2016), we found that LPS/IL4 stimulated B-cells

secreted less IgG1 in supernatants, yielded a lower number of IgG secreting cells by Elispot (while IgM producing cells appeared correlatively higher) and globally showed lower transcription of C γ 1 (**Fig. S1**). To gain insight into the CSR defect at the molecular level and further appreciate how much Med1-deficiency impacts on CSR and to also determine whether it affects LSR, we sequenced CSR and LSR junctions detectable in LPS/IL4 activated B cells using a semi-quantitative nested PCR assay coupled to high-throughput sequencing (Boyer et al., 2017). We used primers flanking the S μ and S γ 1 switch regions to amplify CSR junctions and primers flanking S μ and the 3'RR to amplify LSR junctions (adapted from our initial description of LSR (Péron et al, 2012)). As expected, Med1-deficient B cells yielded a significantly lower level of CSR junctions when compared to controls (**Fig. 2A, left**). This was true when considering either the number of unique reads identified as CSR junctions, or the numbers of “unique junctions” (repeatedly found in multiple reads).

Surprisingly, we found that the effect of Med1-deletion on LSR is much more pronounced than on CSR, as LSR junctions were barely detectable in Med1-deficient B-cells (**Fig. 2A, right**).

The repair of CSR breaks is known to influence the fine structure of CSR junctional sequences. Those sequences obtained from Med1-deficient B-cells significantly varied from *wt* controls by showing an increased frequency of short junctional insertions together with increased usage of microhomology-mediated repair (with consequently a relative decrease of blunt junctions compared to *wt* controls) (**Fig. 2B**).

We conclude that Med1 deficiency quantitatively impairs the efficiency of CSR and LSR, and also qualitatively impacts the repair of CSR junctions.

In order to evaluate physical interactions between *IgH* alleles, inter-allelic distances were measured by 3D-FISH and compared in resting *versus* activated B-cells in either wild-type or Med1-deficient B-cells. Short-range inter-allelic interactions were, as expected, increased upon

B-cell activation, but they did not significantly differ in Med1-deficient compared to -proficient cells, neither in LPS-stimulated nor in unstimulated B-cells (**Fig. 2C**).

IgH alleles are known to frequently undergo reciprocal exchanges during CSR. To determine whether Med1-deficiency might more severely impact *trans* CSR and junctions between different chromosomes, we used mice heterozygous for the *IgH* a/b allotypes and measured the frequency of switched VDJ-C α *IgH* transcripts showing the association of a J_H^a allotype with C α ^b allotype (or reciprocally of J_H^b with C α ^a) in B cells purified from the Peyer's patches. This allowed us to evaluate the proportions of *trans*-CSR vs. *cis*-CSR for the C α gene. We found that the proportion of *trans*-CSR and *cis*-CSR was not altered by Med1-deficiency (**Fig 2D**). Therefore, Med1-deficiency equally affects recombination in *cis* and in *trans*.

Med1-deficiency affects the frequency of somatic hypermutation in coding regions.

To assess whether Med1-deficiency also functionally affects SHM in coding gene segments, we sequenced expressed VDJ regions from Peyer's patch B-cells. Sequences were specifically analyzed for SHM in class-switched *IgH* transcripts. We found a two-fold decrease in the frequency of SHM, affecting both the framework and complementary determining regions of VDJ rearranged exons (**Fig. 3A**). Globally 52437 mutations (37455 replacements (R) and 14982 silent (S) mutations) were found among 2231 kb of sequenced V regions from *WT* controls (23.5 per Kb), while only 46823 mutations (33445 R and 13378 S mutations) were found among 3337 kb of sequenced V regions from Med1-deficient B-cells (14.0 per Kb). By contrast, the AT/GC mutation pattern in coding regions was not different between sequences obtained from Med1-deficient B cells and controls when considering all mutations or when analyzing R or S mutations separately (**Fig. 3B**). We conclude that Med1-deficiency affects the frequency of SHM in coding regions without altering the mutation pattern.

Transcription of the IgH 3'RR is impaired in the absence of Med1.

As for other enhancers, accessibility and activity of the *IgH* 3'RR can be assessed by evaluating transcription of core enhancer elements into eRNA. Comparison of Med1-proficient and -deficient B-cells for *IgH* transcripts after a 4-days stimulation by LPS revealed a major reduction in eRNA transcripts from the 3'RR hs1,2 and hs4 core enhancer elements, which were reduced by three and five-fold, respectively. This was more pronounced than for the primary *IgH* transcripts, which were reduced by two-fold in parallel evaluation of transcription in the J_H-E_μ intron (**Fig. 4A**).

Chromatin accessibility throughout the *IgH* locus, including the E_μ and 3'RR enhancers, was assessed by chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments on LPS-activated B cells and using antibodies specific for histone marks classically associated with active enhancers (H3K9 and H3K27 acetylation). By contrast to 3'RR transcriptional changes mentioned above, we found no difference in H3K9 and H3K27 acetylation between Med1-deficient and -proficient B cells (**Fig 4B**). The only apparent change was a higher signal of H3K27 acetylation at the S_μ region, most likely related to the more frequent preservation of S_μ in LPS-activated Med1-deficient cells due to the CSR defect.

Discussion

The Med1 subunit of Mediator is involved in functional and physical loops between promoter and enhancer elements. Besides its role in promoting transcription within chromosomal loops, it is also postulated to play a role in inter-chromosomal interactions, notably after its abundant binding to super-enhancers which broadly influences 3-D nuclear architecture (Whyte et al., 2013). Med1 was recently shown to partially impact long-distance interactions within the *IgH* locus during CSR (Thomas-Claudepierre et al., 2016). A mild effect on SHM was also found in the intron following a rearranged JH element, without global SHM decrease but with a biased A-T / G-C ratio in Med1-deficient B-cells (Gaudot et al., 2018). Not only CSR and SHM but also multiple quantitative and qualitative traits of *IgH* expression are under control by chromosomal loops coordinated by the *IgH* 3'RR super-enhancer (Wuerffel et al., 2007). We thus explored in detail the impact of Med1 on both the amount and the quality of expressed Ig in mature B-cells and on the various *IgH* locus features controlled by long-distance interactions with the 3'RR super-enhancer.

This revealed that the phenotype of Med1-deficiency is reminiscent of the phenotype of 3'RR-deficient mice (Saintamand et al., 2015a; Ghazzoui et al., 2018; Rouaud et al., 2013; Vincent-Fabert et al., 2010), although milder. In addition to the previously reported partial class-switch defect (Thomas-Claudepierre et al., 2016), Med1-deficient B-cells also featured a decreased density of BCR expression affecting all B-cell compartments and most notable in B1 and MZ cells. This is very similar to the decreased BCR density observed in 3'RR-deficient animals, which does not affect signaling and B-cell activation but associates with slightly reduced basal transcription of the pVH promoter (Saintamand et al., 2015a). Regarding Ig secretion, which normally correlates with strongly boosted Ig gene transcription at the plasma cell stage, we also observed that the absence of Med1 led to defective secretion of all Ig classes *in vivo*, affecting

not only class-switched Ig (IgG, IgA, IgE) but also, to a lesser extent, IgM. The decrease in serum IgG is especially significant since IgG has a long half-life *in vivo* and usually accumulates even in conditions of lower production due to homeostatic regulation of recycling and catabolism (Fahey and Sell, 1965). Again, the globally decreased Ig secretion including IgM phenocopies the alterations seen in 3'RR-deficient mice, since the 3'RR super-enhancer is mandatory for full-blown *IgH* expression in plasma cells (Vincent-Fabert et al., 2010).

Besides quantitative aspects, optimal immune responses also rely on qualitative changes triggered by antigen encounter, such as Ig affinity maturation and associated hypermutation of V region sequences. In activated mature B-cells, SHM of *IgH* V regions stands as another process supported by the *IgH* super-enhancer (Rouaud et al., 2013). In this regard, a noticeable difference in SHM appeared between expressed *IgH* variable regions from either Med1-deficient or proficient mice. Med1-deficient conditions revealed a quantitative SHM defect affecting all segments of the VDJ region, both framework and complementarity determining regions. This defect most likely resulted from mechanistic alterations of SHM and was not at the cell selection level, since it similarly affected silent and replacements mutation. The evaluated functional sequences from exons, were by contrast not affected by the bias of AT vs GC mutation that we previously noticed in the J_H4 flanking intron, which might be restricted to non-coding regions (Gaudot et al., 2018).

Another more functional aspect of inter-allelic *IgH trans*-interactions is the occurrence of *trans*-recombination during CSR. Indeed, while intrachromosomal repair predominates in B-cells in the case of IsceI-induced breaks (Gostissa et al., 2014), physiological CSR involves a significant ratio of *trans*-junctions between allelic chromosomes. *Trans*-CSR, a legitimate and functional process, is then much more frequent than rare junctions with illegitimate partners (such aberrations being connected to lymphomagenesis). We checked whether *trans*-CSR was more dependent upon Med1 than *cis*-CSR by sequencing α heavy chain transcripts and

quantifying the re-pairing of J_H and C α allotypes in *IgH* a/b heterozygous mice. *Cis* and *trans*-CSR were equally affected in Med1-deficient mice compared to *wt*. Although Mediator binds both the Cohesin complex and super-enhancers suspected to organize nuclear 3D-architecture, Med1 thus does not appear to be mandatory neither for interallelic pairing nor for legitimate inter-chromosomal *trans*-CSR junctions.

Besides such internal variations in the mechanistics of functional CSR, a last and dramatic AID-dependent recombination of *IgH* constant genes has also been described. LSR, which deletes constant genes in some activated B-cells thus stands as an alternative to CSR with the potential to delete the relevant activated B-cells (Péron et al., 2012). Evaluation of this process by LSR-seq, a high-throughput analysis of recombined DNA fragments, showed a drastically reduced amount of LSR junctions, still more pronounced than for CSR junctions.

Interestingly the sequences of CSR junctions revealed an additional anomaly, with increased frequency of microhomology and of junctional insertions, both hallmarks of alternative end-joining (A-EJ). This suggests that beside the predominant non-homologous end-joining (NHEJ) pathway Med1-deficient B-cells make increased usage of A-EJ during the repair step of CS,.

Except for this bias in the repair process, a common feature of all other the above-mentioned processes altered in Med1-deficient cells is their dependence upon 3'RR super-enhancer function, either in basal conditions where the 3'RR optimizes *IgH* transcription and BCR expression in mature B-cells, or in the conditions of B-cell activation by antigen or TLR ligands. When checking the activity of the 3'RR directly, we observed that a known marker of enhancer activity, eRNA transcription (Wang et al., 2011), was significantly decreased. This is consistent with decreased functional effects of the super-enhancer and with its decreased availability as a recombination target during LSR. By contrast, the major chromatin marks associated with enhancer function, H3K9 and H3K27 acetylation, were unchanged, indicating that the super-

enhancer was normally bound by the transcription factors recruiting histone acetylation transferases. In these experiments, eRNA transcription of core enhancer elements was the most notable change and Med1-deficiency thus uncoupled the various parameters related to a super-enhancer active status. Since Med1 function strongly depends upon its phosphorylation by ERK in activated cells, and since 3'RR eRNA are at the highest levels in activated B-cells, these observations suggest successive steps of 3'RR activation, with an initial and partial activation status associated with chromatin remodeling, followed by induction of Med1-dependent *hIgH* eRNA transcription in activated B-cells. Only a super-enhancer optimally loaded with Pol II following interaction with a distant promoter and Mediator, might fully support 3'RR functions. The 3'RR super-enhancer is a large and complex DNA region indeed carrying multiple functions, either simultaneously (germline transcription and CSR), successively (hyper-transcription in PCs) or alternatively (SHM *vs* CSR *vs* LSR...), thus requiring the identification of conditions differentially affecting or uncoupling its functions.

It is noticeable that SHM and CSR are reduced but not abrogated in the absence of Med1, indicating that functional interactions of 3'RR with *IgH* V and S regions are maintained, in agreement with previous 4C-Seq data showing persistent Eμ-3'RR contacts in the absence of Med1 (Thomas-Claudepierre et al., 2016). Med1 thus extends or enforces chromosomal looping and long-range interactions of target regions with the relevant super-enhancer, without being completely mandatory.

LSR, featuring junctions of double strand breaks in the 3'RR to those within Sμ, appears as the process most affected by a Med1 defect, *i.e.* the most dependent upon Mediator. This suggests an implication of Med1 in the alternate choice between CSR and LSR. The parallel strong reduction in 3'RR eRNA might indicate that either Med1 itself and/or the *hIgH* level eRNA transcription resulting from Med1-Pol II interactions are prerequisites for LSR.

While *IgH* locus physiology largely relies on 3D long-range interactions, our results further demonstrate that beyond a general role on transcription, Mediator participates in the regulation of all processes governed by the *IgH* 3'RR super-enhancer, including SHM, super-transcription in plasma cells, CSR (*cis* & *trans*) and LSR.

Material and methods

Mice

Med1 fl/fl mb1-cre mice have been previously reported (Thomas-Claudepierre et al., 2016) and were obtained from Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France). Control WT C57Bl6/SV129 mice were purchased from Charles River. Procedures reviewed and approved by the local ethical review board.

Blood sampling

Blood samples were recovered from ten-week old mice with heparinised needles. Plasma samples were recovered by centrifugation and stored at -20°C until used.

Cell preparation

Splenocytes were collected, red blood cells were lysed and B-cells were isolated using EasySep™ Mouse B-cell Isolation Kit (Stem cell). B-cells were cultured for 2 days (for Chip experiments), 3 days (for 3D-FISH) and 4 days (for ELISA, Elispot and qPCR), in RPMI containing 10% fetal bovine serum with LPS (1 µg/mL) (Invivogen) or LPS + IL-4 (20 ng/mL) (Peprotech). Supernatants were recovered and stored at -20°C until used. Cultured splenic B-cells were used in parallel for RNA preparation.

Plasma cells were enriched from bone marrow using CD138 microbeads (Miltenyi biotech).

Class-specific ELISA

ELISA was performed on sera and supernatants from *in vitro* stimulated primary B-cells for the detection of the various Ig classes and subclasses. Plates were coated overnight with monoclonal antibodies specific for IgM, IgA, IgE, IgG1, and total IgG (Southern Biotech). Sera or supernatants were added and incubated for 2h at 37°C. After washing, alkaline phosphatase

(AP)-conjugates of goat anti mouse IgM, IgG1, IgE, IgA and total IgG (Southern Biotech) were incubated for 1h at 37°C. Following washing and addition of AP substrate (Sigma), absorbance was measured at 405 nm.

Elispot

For evaluation of IgG1 or IgM secretion, cells (*in vitro* activated B-cells or enriched plasma cells from bone marrow) were seeded in triplicate in culture medium in a 96-well MultiScreen HTS plate (Millipore) coated with 100ng/well of anti-IgG1 or anti-IgM. Cells were incubated overnight at 37 °C and then removed by washing with PBS/0.01 % Tween. Plates were then incubated 1 h at 37 °C with AP-coupled anti-IgG1 or phosphatase-coupled -anti-IgM (1/1000). After washing, addition of 100 µL BCIP/NBT AP substrate (Millipore), new washes and drying, images were taken with an NI-E microscope (Nikon) for evaluation of spot numbers and areas with the Nis-Ar software (Nikon).

Flow cytometry

Single-cell suspensions from fresh spleens were washed with PBS containing 2% FCS. Mature B-lymphocytes were stained with CD19-APCH7, CD5-FITC, CD21-PE, CD23-PECy7 (BD Pharmingen), IgD-BV421 (Biolegend) and IgM-APC (e Bioscience) antibodies. *IgH* allotype expression on peripheral blood B-cells was verified using antibodies directed against IgM^a (IgM^a-FITC: BD Pharmingen) and IgM^b (IgM^b-PE: BD Pharmingen) allotypes. Flow cytometry was performed on a BD LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences). FACS data were analyzed using FACSDIVA software (BD Biosciences).

Real time quantitative PCR (RT-qPCR)

Quantitative PCR was performed using SYBR[®] qPCR green and premix Ex Taq (TAKARA). Hs1.2, hs4, IgH, post-switch IgG1, membrane and secreted IgM transcripts were quantified after four days of B-cell stimulation with LPS or LPS+IL4. RNA from B-lymphocytes was extracted using GenElute Mammalian RNA miniprep Kit (Sigma Aldrich). cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR primers used to study heavy chain expression for the secretory IgM (mIgM qPCR For, mIgM qPCR SEC Rev), membrane IgM (mIgM qPCR for, mIgM qPCR MB Rev), IgG1 (I μ for primer, C γ 1 Rev primer) and eRNA transcription from hs1,2 (hs1,2 For, Hs12 Rev) and hs4 (hs4 For, hs4 Rev) are listed in Supplemental Table1. *IgH* primary transcripts were quantified using Taqman probes as previously described (Rouaud et al, JEM 2013). All transcripts were normalized to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) transcripts (reference Mm99999915-g1).

ChIP experiments

ChIP experiments were done on LPS stimulated sorted CD43^{neg} spleen B-cells. Briefly, 15 $\times$ 10⁶ cells were cross-linked at room temperature for 15 min in 15 mL PBS, 1% formaldehyde. The reaction was quenched with 2.125M glycine. After lysis, chromatin was sonicated to 0.5–1 kb using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher 428 Scientific). Following dilution in ChIP buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mM EDTA, 16.7 mM Tris-HCl, pH 8.1, and 167 mM NaCl), chromatin was precleared by rotating for 2h at 4 °C with 50 mL of 50% protein A/G slurry (0.2 mg / mL sheared salmon sperm DNA, 0.5 mg/ mL BSA, and 50% protein A/G; Sigma). Cell equivalents (1 $\times$ 10⁶) were saved as input, and the remaining cell equivalents were incubated overnight with anti-acetyl-histone H3(Lys9) (Merck) or with anti-acetyl-histone H3(Lys27) (Abcam) polyclonal antibodies. Immune complexes were precipitated by the addition of protein A/G. Cross-linking was reversed by overnight incubation (70 °C) in TE

buffer with 0.02% SDS and chromatin was phenol/chloroform extracted. QPCR assays used for evaluating precipitated DNA from E μ , S μ , S γ 3, hs3a, hs3b, hs12 and hs4 are listed in Supplemental Table 1.

Amplification of S μ /S γ and S μ /LS4 junctions by NGS

DNA from LPS+IL-4 stimulated cells (from WT and Med1mb1Cre mice) was extracted using GenElute Mammalian Genomic DNA miniprep Kit (Sigma Aldrich). S μ /S γ and S μ /LS4 junctions were amplified in triplicate by nested PCR with 100 ng DNA (Phusion HF polymerase; BioLabs) using the following primers: S μ Nest1 For and S γ consensus1 Rev for PCR1 S μ /S γ junctions and S μ Nest2 For and S γ consensus2 Rev for PCR2. S μ /LS4 junctions were amplified using Smum1 For and LS4-1 Rev primers for PCR1 and Smum2 For and LS4-2 Rev for PCR2. Primers used for amplification of these junctions are listed in Supplemental Table 1. Each library was prepared using 200 ng PCR2 product. Barcoded libraries with 200-pb read lengths were prepared using Ion Xpress plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Each barcoded library was mixed in equal amounts and diluted to 100 pM. Libraries were run on an Ion PI v3 chip on the Ion Proton sequencer (Life Technologies). Data were analyzed using the CSReport software (Boyer et al., 2017).

Illumina sequencing for somatic hypermutation SHM and trans-switch

SHM and *trans*-switch analyses were performed on Peyer's patches (IgH^a/IgH^b allotype). RNA was extracted using GenElute Mammalian RNA miniprep Kit (Sigma Aldrich). These experiments combined RACE PCR and library preparations. RACE PCR was performed on 500ng RNA incubated at 72°C for 3 min and at 42°C for 2 min with a specific IgA reverse primer and 1 μ l dNTP (10Mm) (MP Biomedicals). Caprace forward primer, DTT, 5X ProtoScript buffer and Protoscript enzyme (BioLabs) were added to the mixture and incubated at 42°C for 90 min and then at 70°C for 10 min. Libraries were prepared on RACE products

using two forward primers: Universal short For and Universal long Forward primers and one IgA reverse specific primer (Mm-C α +link). Primer sequences used in this experiment are reported in Supplemental Table 1. Amplification was performed with Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) according to the following program: DNA was denatured 30 s at 98°C and then submitted to 30 cycles consisting of 98°C for 10 s, 65°C for 30 s and 72°C for 30 s, and 1 cycle at 72°C for 10 min. Adaptors were added and the resulting amplicons were sequenced using an Illumina Miseq sequencer. For analysis, the international ImMunoGeneTics information system (IMGT), IMGT/HighV-QUEST Web portal, and IMGT-ONTOLOGY concepts were used.

In order to identify alleles in the *JH1* and C α CH1 regions, raw reads R2 from Illumina paired-end sequencing were first filtered by their size (min. 150 bp) and aligned against Ighj-Igha rearranged sequences (last 34 bp of Ighj + first 76 bp of Igha) using *pairwise2* local alignment function of Biopython package (implementation of Smith-Waterman algorithm). Reference sequences were composed of either Igh1*a, Igh1*b, Igh2, Igh3, or Igh4 and Ighj gene/allele was assigned to each read according to best alignment score. Identification of *IgH* α chain alleles was based on the aligned base at position 43 in Igha (C/G polymorphism between Igha*a/Igha*b alleles). Then *cis* junctions were counted as the number of occurrences of either Ighj1*a-Igha*a (a-a) or Ighj1*b-Igha*b (b-b), and *trans* junctions as the number of occurrences of either Ighj1*a-Igha*b (a-b) or Ighj1*b-Igha*a (b-a).

3D-FISH

In vitro activated B-cells were dropped onto poly-L-lysine slides and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature (RT). After washing with PBS, cells were permeabilized with 0.02% pepsin / 0.1M HCl for 15 min at RT, then washed and post-fixed with 1% paraformaldehyde for 5 min at RT, denatured for 5 min in 70% formamide, 2X SSC

at 72°C and hybridized overnight at 37°C. The *IgH* (RP23-109B20) probe (encompassing an AID-targeted region from D_H cluster to C γ 2a) was labelled with dCTP-biotin (Invitrogen). Slides were washed in 1X SSC at 72°C for 5 min, incubated with streptavidin-Alexa Fluor 594 (1/200, BD biosciences) 1h at RT, and mounted with Vectashield (Vector labs). Images were acquired with an epifluorescence microscope (NIKON). Optical sections separated by 0.2 μ m were collected and stacks were de-convoluted and analyzed using Huygens and Volocity software, respectively. Volumetric pixel size was 0.064 μ m in xy and 0.2 μ m in z.

Statistical analysis:

Statistical tests were performed using GraphPad Prism (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001)

Conflict of interest – None

Acknowledgments - This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (PGA120150202338), ANR Ig-MemImpact (16-CE15-0019-01), ANR IgH-AID-access and ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d’Avenir ANR-10-IDEX-0002-02. F. Boyer was supported by a grant from ALURAD. We thank S. Desforges and B. Remerand for help with animal care.

Contribution section - M. Cogné, J Cook-Moreau actively participated in the experimental design of the study. I. Dalloul, S. Le Noir and Z. Dalloul performed experiments. F. Boyer analysed Ig repertoire data. B. Reina-San-Martin provided Med1-deficient mice and participated in the scientific discussion and manuscript writing.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Membrane IgM expression and Ig secretion *in vivo* in Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. (A) Peripheral B-cell populations were monitored for IgM BCR expression on *wt* and Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice by flow cytometry measuring mean fluorescent intensity. Data represent mean ± SEM from 6 *wt* and 6 Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. (B) Serum IgM, G, A and E concentrations were evaluated by ELISA in ten-week-old mice. Data represent mean ± SEM from at least 5 mice. (C) Elispot specific for IgM and IgG1 secretion, mean number of spots (left) and mean area (right) of spots were measured for bone marrow plasma cells from *wt* and Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. Data are from 2 independent experiments with at least 3 control and 3 Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice in each experiment. Mann-Whitney test was used for significance.

Figure 2: CSR and LSR in Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. (A) S μ -S γ 1 CSR junctions and LSR junctions were PCR-amplified and sequenced from LPS+IL4 stimulated spleen B-cells, comparing mutant and control mice. Data are mean counts ± SEM of identified junctions. (B) Junction structures were analyzed using CSReport. Data are means obtained from groups of 5 mice. (C) Distribution of *IgH* inter-allelic distance (bottom) was obtained by 3D-FISH in spleen B-cells (Day 0) and LPS stimulated B-cells (Day3) (with normalization according to cell diameter) in control and Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. Data represent mean distances ± SEM calculated from 2 independent experiments, each with 3 control and 3 Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. KS test was used for significance. (D) *Cis* and *trans*-switch analysis was performed on Peyer's patch RNA (from heterozygous IgH^a/IgH^b mice) using a specific C α CH1 reverse primer. The various *cis* and *trans* associations carrying IgH^a/IgH^a, IgH^b/^b (*cis*) and IgH^a/^b (*trans*) were counted after NGS sequencing. Data represent means ± SEM from 7 control and 11 Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. Mann-Whitney test was used for significance. Chi2 test was used for significance of IgG1 CSR structure analysis.

Figure 3: SHM in Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. (A) SHM of VDJ regions was studied in Peyer's patch B-cells after NGS sequencing using a C α specific reverse primer. 7746 clonotypes in control mice (n=7) and 11724 clonotypes for Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice (n=11) were characterized. Mutation rates per 1kb in the full V region and in the various subdomains (FR1, CDR1, FR2, CDR2 and FR3) are shown (A), together with mutation spectra (B) either shown globally (left) or separately for R (middle) and S mutations (right), comparing *wt* controls and Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. Mann-Whitney test was used when comparing mutation rates; Chi2 test was used for mutation spectra comparison.

Figure 4: *IgH* locus transcription and epigenetic marks in Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. (A) Primary IgH, *hs1,2* and *hs4* transcripts were evaluated by RT-qPCR of RNA from splenocytes stimulated with LPS for 3 days. (B) ChIP assays with anti-H3K9ac and anti-H3K27ac Ab were performed in 2-days LPS-stimulated B-cells from control and Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. (C) Recruitment of H3K9ac (top) and H3K27ac (bottom) to the *IgH* locus at E μ , S μ , S γ 3, *h3a*, *h1-2*, *hs3b* and *hs4* regions was analyzed by QPCR. Data represent mean signal ± SEM from 6 mice. Mann-Whitney test was used for significance.

Supplementary figure 1: Ig secretion by Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} *in vitro* stimulated splenocytes. (A) B-cells were stimulated for 4 days with LPS and IL-4. Supernatants were quantified by ELISA for IgM, IgG1 and IgE. Data represent mean concentrations ± SEM from 3 independent experiments, each with at least 3 control and 3 Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. (B) Elispot specific for

IgM (left) and IgG1 (right) secretion was performed on LPS+IL4 stimulated B-cells from control and Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. Data represent mean numbers $\pm$ SEM from 2 independent experiments, each with at least 3 control and 3 Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. **(C)** Transcripts encoding membrane (mb) and secreted (sec)-form of μ and γ 1 chains were quantified by RT-qPCR in B-cells stimulated for 4 days with LPS+IL-4. Data represent relative expression $\pm$ SEM from 3 control and 4 Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. Mann-Whitney test was used for significance.

References

- Allen, B.L., and D.J. Taatjes. 2015. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16:155–166. doi:10.1038/nrm3951.
- Belakavadi, M., P.K. Pandey, R. Vijayvargia, and J.D. Fondell. 2008. MED1 phosphorylation promotes its association with mediator: implications for nuclear receptor signaling. *Mol. Cell. Biol.* 28:3932–3942. doi:10.1128/MCB.02191-07.
- Boyer, F., H. Boutouil, I. Dalloul, Z. Dalloul, J. Cook-Moreau, J.-C. Aldigier, C. Carrion, B. Herve, E. Scaon, M. Cogné, and S. Péron. 2017. CSReport: A New Computational Tool Designed for Automatic Analysis of Class Switch Recombination Junctions Sequenced by High-Throughput Sequencing. *J. Immunol.* 198:4148–4155. doi:10.4049/jimmunol.1601924.
- Carlsten, J.O.P., X. Zhu, and C.M. Gustafsson. 2013. The multitasking Mediator complex. *Trends Biochem. Sci.* 38:531–537. doi:10.1016/j.tibs.2013.08.007.
- Cogné, M., R. Lansford, A. Bottaro, J. Zhang, J. Gorman, F. Young, H.L. Cheng, and F.W. Alt. 1994. A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell.* 77:737–747.
- Dudley, D.D., J. Chaudhuri, C.H. Bassing, and F.W. Alt. 2005. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv. Immunol.* 86:43–112. doi:10.1016/S0065-2776(04)86002-4.
- Fahey, J.L., and S. Sell. 1965. THE IMMUNOGLOBULINS OF MICE. V. THE METABOLIC (CATABOLIC) PROPERTIES OF FIVE IMMUNOGLOBULIN CLASSES. *J. Exp. Med.* 122:41–58.
- Gaudot, L., A.-S. Thomas-Claudepierre, I. Robert, E. Schiavo, V. Heyer, and B. Reina-San-Martin. 2018. Med1 deficiency alters the somatic hypermutation spectrum in murine B cells. *Eur. J. Immunol.* 48:720–723. doi:10.1002/eji.201747258.
- Ghazzaoui, N., H. Issaoui, A. Saintamand, C. Oblet, C. Carrion, and Y. Denizot. 2018. The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region superenhancer controls mouse B1 B-cell fate and late VDJ repertoire diversity. *Blood Adv.* 2:252–262. doi:10.1182/bloodadvances.2017014423.
- Gostissa, M., B. Schwer, A. Chang, J. Dong, R.M. Meyers, G.T. Marecki, V.W. Choi, R. Chiarle, A.A. Zarrin, and F.W. Alt. 2014. *IgH* class switching exploits a general property of two DNA breaks to be joined in cis over long chromosomal distances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111:2644–2649. doi:10.1073/pnas.1324176111.
- Kingzette, M., H. Spieker-Polet, P.C. Yam, S.K. Zhai, and K.L. Knight. 1998. Trans-chromosomal recombination within the *Ig* heavy chain switch region in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:11840–11845.
- Laffleur, B., S.M. Bardet, A. Garot, M. Brousse, A. Baylet, and M. Cogné. 2014. Immunoglobulin genes undergo legitimate repair in human B cells not only after cis- but also frequent trans-class switch recombination. *Genes Immun.* 15:341–346. doi:10.1038/gene.2014.25.
- Le Noir, S., B. Laffleur, C. Carrion, A. Garot, S. Lecardeur, E. Pinaud, Y. Denizot, J. Skok, and M. Cogné. 2017. The *IgH* locus 3' cis-regulatory super-enhancer co-opts AID for allelic transvection. *Oncotarget.* doi:10.18632/oncotarget.14585.
- Péron, S., B. Laffleur, N. Denis-Lagache, J. Cook-Moreau, A. Tinguely, L. Delpy, Y. Denizot, E. Pinaud, and M. Cogné. 2012. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science.* 336:931–934. doi:10.1126/science.1218692.
- Pinaud, E., M. Marquet, R. Fiancette, S. Péron, C. Vincent-Fabert, Y. Denizot, and M. Cogné. 2011. The *IgH* locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110:27–70. doi:10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8.

Reynaud, D., I.A. Demarco, K.L. Reddy, H. Schjerven, E. Bertolino, Z. Chen, S.T. Smale, S. Winandy, and H. Singh. 2008. Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros. *Nat. Immunol.* 9:927–936. doi:10.1038/ni.1626.

Reynaud, S., L. Delpy, L. Fleury, H.-L. Dougier, C. Sirac, and M. Cogné. 2005. Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol.* 174:6176–6183.

Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, A. Saintamand, R. Fiancette, M. Marquet, I. Robert, B. Reina-San-Martin, E. Pinaud, M. Cogné, and Y. Denizot. 2013. The *IgH* 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 210:1501–1507. doi:10.1084/jem.20130072.

Saintamand, A., P. Rouaud, A. Garot, F. Saad, C. Carrion, C. Oblet, M. Cogné, E. Pinaud, and Y. Denizot. 2015a. The *IgH* 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget*.

Saintamand, A., P. Rouaud, F. Saad, G. Rios, M. Cogné, and Y. Denizot. 2015b. Elucidation of *IgH* 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat Commun.* 6:7084. doi:10.1038/ncomms8084.

Stavnezer, J., J.E.J. Guikema, and C.E. Schrader. 2008. Mechanism and Regulation of Class Switch Recombination. *Annual Review of Immunology.* 26:261–292. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248.

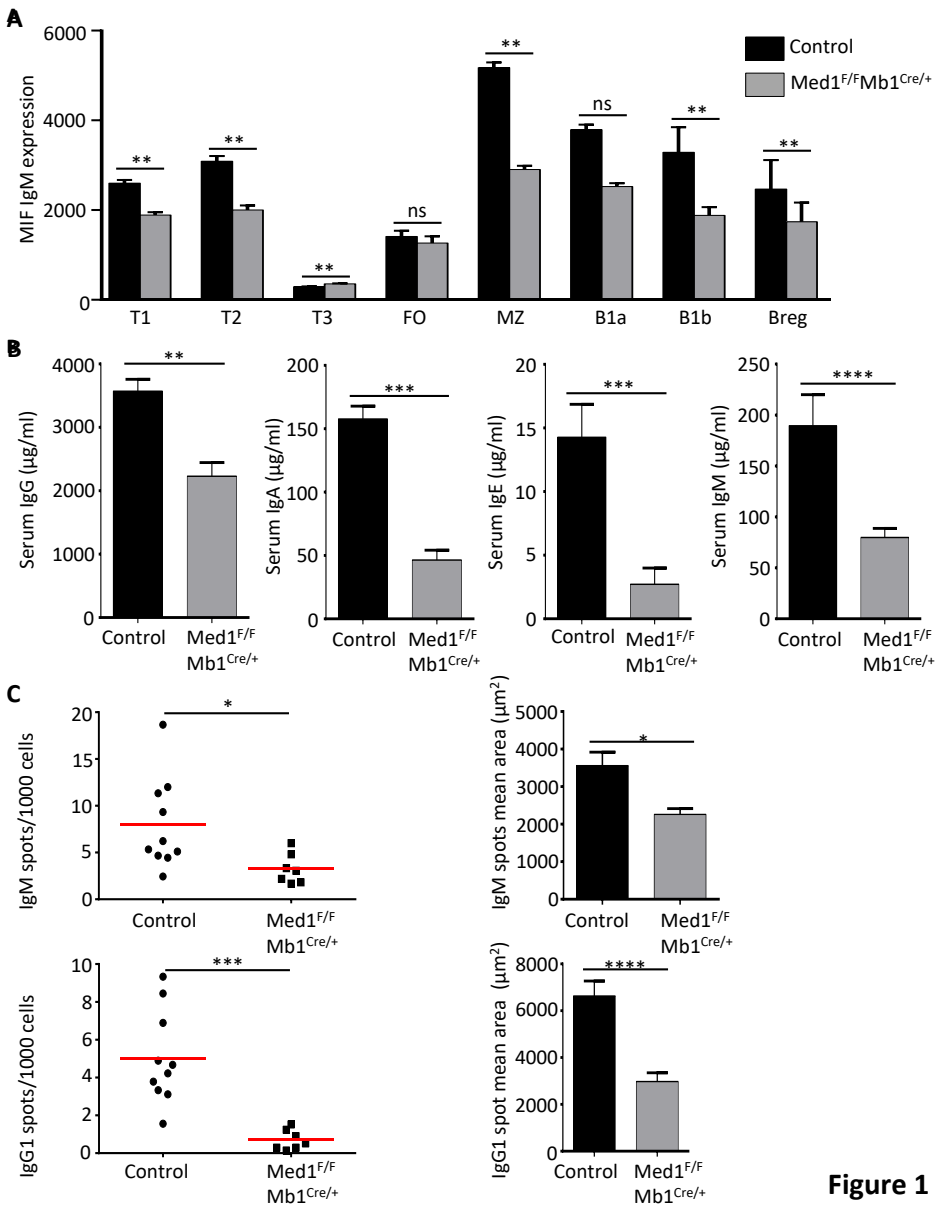
Thomas-Claudepierre, A.-S., I. Robert, P.P. Rocha, R. Raviram, E. Schiavo, V. Heyer, R. Bonneau, V.M. Luo, J.K. Reddy, T. Borggreffe, J.A. Skok, and B. Reina-San-Martin. 2016. Mediator facilitates transcriptional activation and dynamic long-range contacts at the *IgH* locus during class switch recombination. *J. Exp. Med.* 213:303–312. doi:10.1084/jem.20141967.

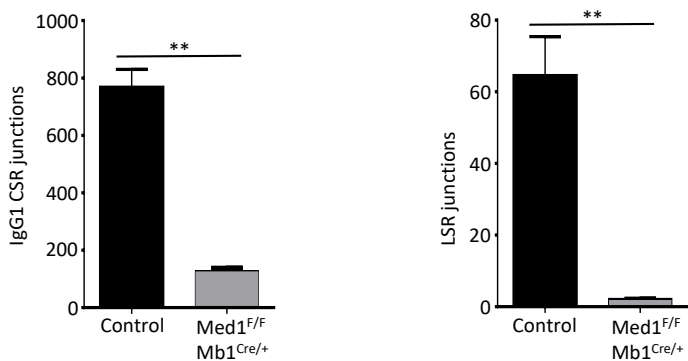
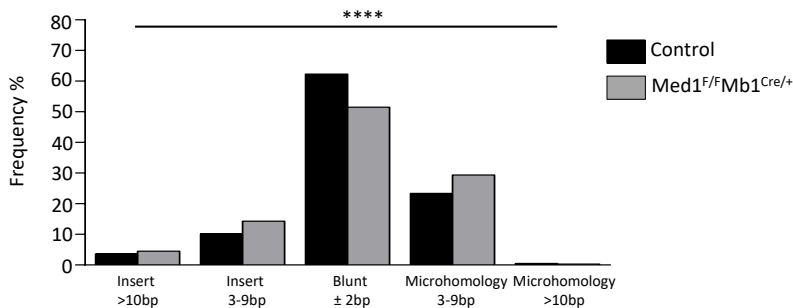
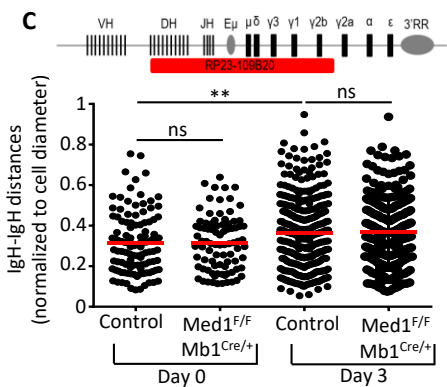
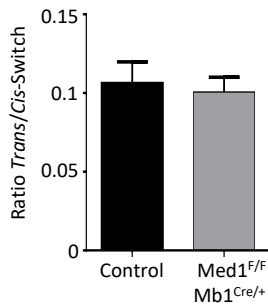
Vincent-Fabert, C., R. Fiancette, E. Pinaud, V. Truffinet, N. Cogné, M. Cogné, and Y. Denizot. 2010. Genomic deletion of the whole *IgH* 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood.* 116:1895–1898. doi:10.1182/blood-2010-01-264689.

Wang, D., I. Garcia-Bassets, C. Benner, W. Li, X. Su, Y. Zhou, J. Qiu, W. Liu, M.U. Kaikkonen, K.A. Ohgi, C.K. Glass, M.G. Rosenfeld, and X.-D. Fu. 2011. Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA. *Nature.* 474:390–394. doi:10.1038/nature10006.

Whyte, W.A., D.A. Orlando, D. Hnisz, B.J. Abraham, C.Y. Lin, M.H. Kagey, P.B. Rahl, T.I. Lee, and R.A. Young. 2013. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell.* 153:307–319. doi:10.1016/j.cell.2013.03.035.

Wuerffel, R., L. Wang, F. Grigera, J. Manis, E. Selsing, T. Perlot, F.W. Alt, M. Cogne, E. Pinaud, and A.L. Kenter. 2007. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity.* 27:711–722. doi:10.1016/j.immuni.2007.09.007.



A**B****C****D****Figure 2**

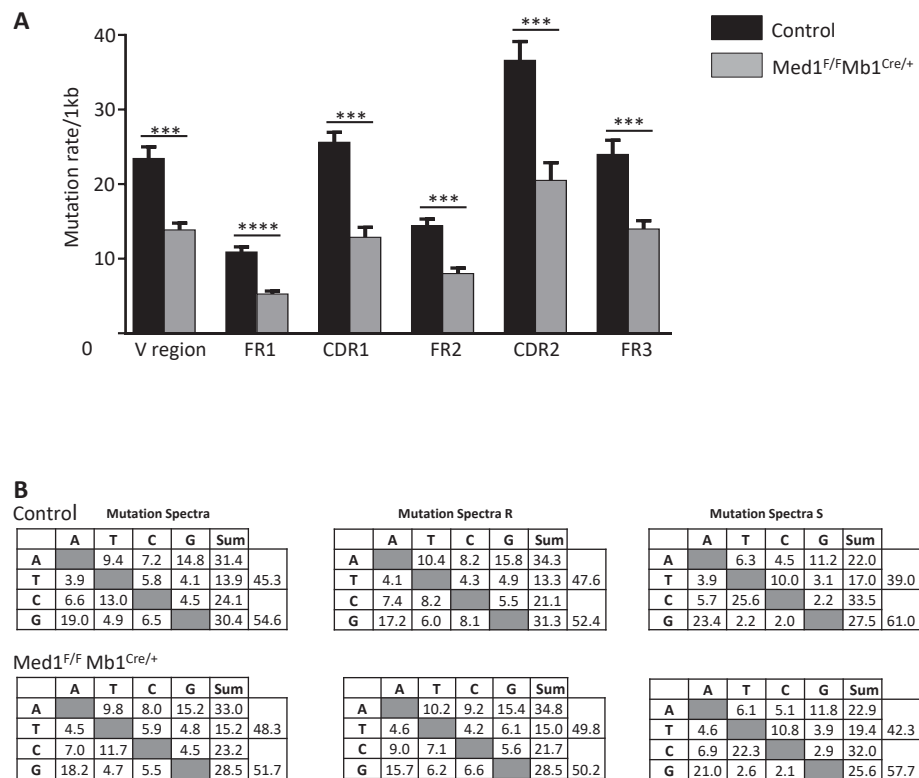
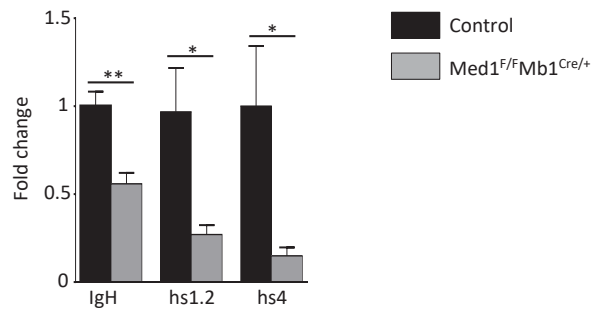


Figure 3

A



B

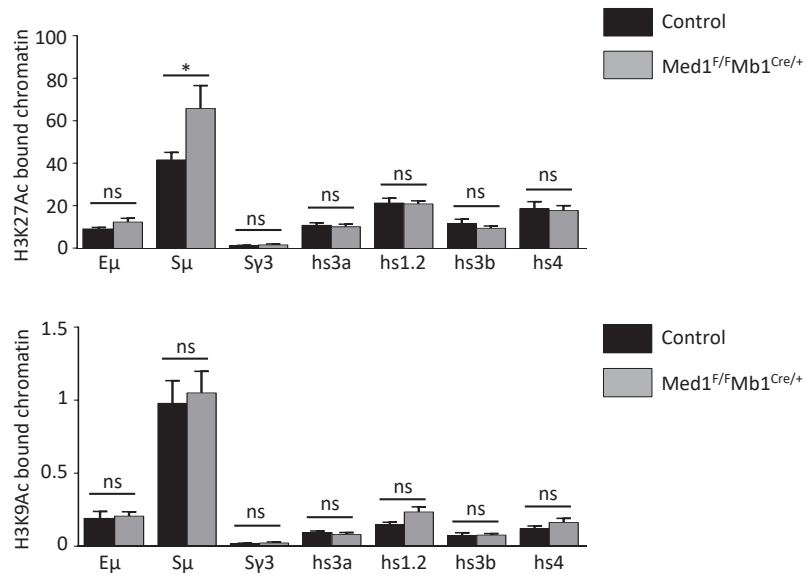
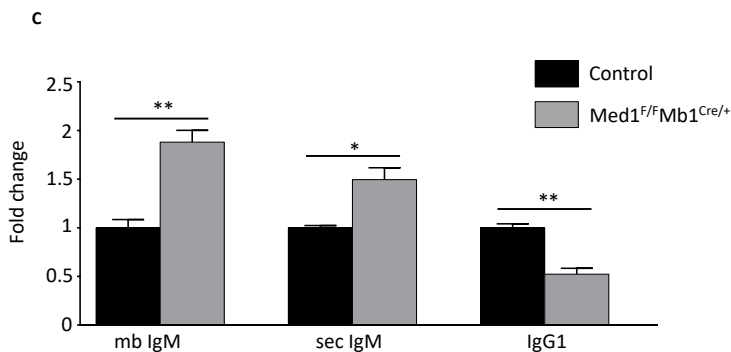
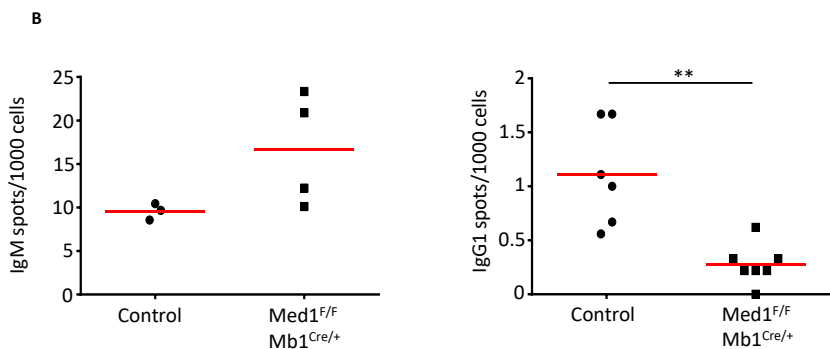
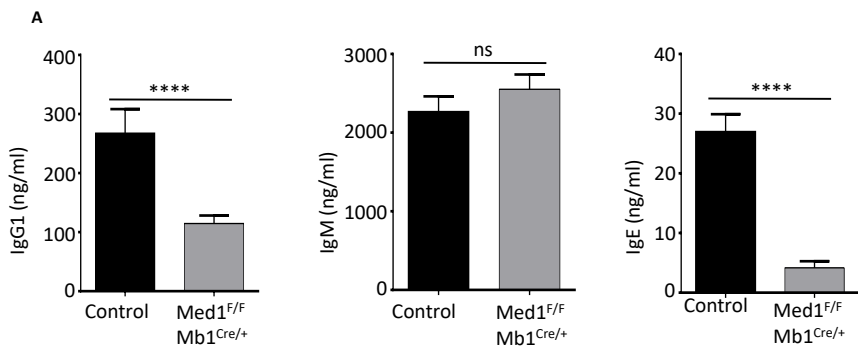


Figure 4



Annexe 7: (Article accepté)

Mediator contributes to IgH locus VDJ rearrangements by promoting usage of most distal V segments

Iman Dalloul, **Zeinab Dalloul**, Sandrine Le Noir, François Boyer, Gersende Lacombe, Bernardo Reina-San-Martin, Jeanne Cook-Moreau, Michel Cogné

Manuscrit accepté en octobre 2018 à *Journal of Cellular and Molecular Immunology*

Ce papier montre qu'il ya un défaut de développement des lymphocytes B de la rate chez des souris Med1 KO avec une diminution de la population des cellules B folliculaires et une augmentation de la population des cellules marginales. En plus la délétion de la sous unité Med1 est accompagnée par une augmentation de l'utilisation des segments V distaux et une diminution de l'utilisation des V proximaux.

J'ai participé à l'expérimentation ayant conduit à la rédaction de cet article (isolation des plaques de peyer, panel cytométrie en flux, stimulation in-vitro des cellules B).



CORRESPONDENCE

Mediator contributes to IgH locus VDJ rearrangements by promoting usage of most distal V segments

Iman Dalloul¹, Zeinab Dalloul¹, Sandrine Le Noir¹, François Boyer¹, Bernardo Reina-San-Martin², Jeanne Cook-Moreau¹ and Michel Cogné¹

Keywords: B cells; mediator; VDJ repertoire

Cellular & Molecular Immunology _#####_; <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0175-z>

INTRODUCTION

The immunoglobulin heavy (*IgH*) chain locus includes a large cluster of V, D and J segments spanning thousands of kilobases in mammals and its expression implies long-range 3D-regulation of various gene modifications.¹ V(D)J recombination occurs during early B-cell ontogeny.² It is regulated by multiple transcription factors and *cis*-regulatory elements, and most notably by the intronic 5' $\text{E}\mu$ element located in the JH to $\text{C}\mu$ intron.³ The intergenic control region 1 (IGCR1) located between the V_H and D gene clusters inhibits rearrangement of the most D_H -proximal V_H gene segments, while promoting usage of distal V_H gene segments.⁴ Other downstream elements of the locus, flanking its 3' end might have more subtle roles: while the large 3' regulatory region (3'RR) shows strong internal synergies² and behaves as a superenhancer in mature B cells. Its deletion showed no influence on the VDJ repertoire and rather increased transcription of unrearranged V segments.^{3–5} Insulators binding CTCF farther downstream of the 3'RR were shown, however, to promote usage of distal V_H segments.⁶ Altogether, there are strong indications that elements involved in long-distance regulation of transcription might also influence VDJ recombination. In-frame splicing of VDJ exons is also needed for full Ig expression.⁷ Given the functional importance of gene architecture and long-range interactions for the *IgH* locus physiology, we explored the dependence of the VDJ repertoire on Med1, a known actor of long-range enhancer interactions. By checking the repertoire using high-throughput sequencing, we now show that Med1 also has a role in early rearrangements and promotes expression of distal V_H genes. Med1 deficiency resulted in a significant repertoire bias, with decreased usage of distal V segments, together with decreased usage of the upstream JH1 and JH2 segments.

Procedures were approved by the local ethics committee review board and conducted according to the European guidelines for animal experimentation. To specifically deplete Med1 in the B-cell lineage, Med1-floxed mice ($\text{Med1}^{\text{F/F}}$) were bred with Mb1Cre/+ knock-in mice, a conditional ablation known to globally preserve B-cell development.⁸ Single cell suspensions of splenocytes from $\text{Med1}^{\text{F/F}}$ mb1-cre and control WT C57BL6/SV129 mice were stained with CD19-APCH7, CD5-FITC, CD21-PE, CD23-PECy7, IgD-BV421 and IgM-APC antibodies for flow cytometry. As previously described, normally abundant peripheral B cells were present

upon deletion of Med1, with an increased ratio of marginal zone vs follicular splenic B cells (Fig. 1a). Detailed analysis of V regions from sequenced *IgH* transcripts revealed a significant alteration of V and J_H usage (Fig. 1b). The VDJ repertoire was specifically studied in RNA extracted from mature B cells after dissociation of Peyer's patches from Med1-deficient mice. RACE-PCR amplicons were sequenced on an Illumina Miseq sequencer. Data were analyzed with the international ImMunoGeneTics IMGT/HighV-QUEST Web portal, and IMGT-ONTOLOGY concepts. V_H segments showed increased usage of proximal genes (i.e. those located less than 500 bp upstream of J_H). J_H distribution was also altered, with increased use of those J_H closest to the $\text{E}\mu$ enhancer ($\text{J}_\text{H}4$ and $\text{J}_\text{H}3$) and decreased usage of the more distant $\text{J}_\text{H}2$ and $\text{J}_\text{H}1$.

Mediator is a four-module complex with several important functions in binding transcription factors to RNA polymerase II (Pol II). It regulates Pol II C-terminal domain phosphorylation and Pol II status regarding transcription initiation, pausing or elongation.⁹ While not mandatory for transcription and lacking in some Mediator complexes, the Med1 subunit is characterized by specific and direct interaction with several transcriptional activators binding enhancer elements. It is involved in functional and physical loops between promoter and enhancer elements that stimulate transcription in activated cells.¹⁰ A single report described Med1 influence on gene recombination in activated mature B cells, where it promoted the long-distance interactions of *IgH* enhancers with target switch-regions and globally enhanced CSR to all Ig classes by 2 to 3-fold.⁸ VDJ recombination also involves long-distance interactions promoted by enhancer elements which control locus contraction.^{11,12}

While VDJ rearrangement is contemporary to early B-cell development and occurs in the absence of B-cell activation, we explored whether this process was under the influence of Med1 as well. Although Med1 deficiency did not affect peripheral B-cell populations as previously described, checking the Ig VDJ repertoire from Med1-deficient B cells revealed a decreased usage of the J_H segments that are more distal from the $\text{E}\mu$ enhancer ($\text{J}_\text{H}1$ and $\text{J}_\text{H}2$), together with decreased usage of the distal cluster of V_H segments. The variable exon bias was reminiscent of anomalies previously reported in several models deficient for factors that contribute to early accessibility and chromosomal looping during the so-called 'IgH locus contraction'.^{12–15} Med1 thus most likely

¹UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Université de Limoges, Limoges 87025, France and ²INSERM U1258, UMR CNRS 7104, Institut de Genetique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch 67400, France
Correspondence: Michel Cogné (cogne@unilim.fr)

Received: 4 October 2018 Accepted: 8 October 2018

Published online: 07 November 2018

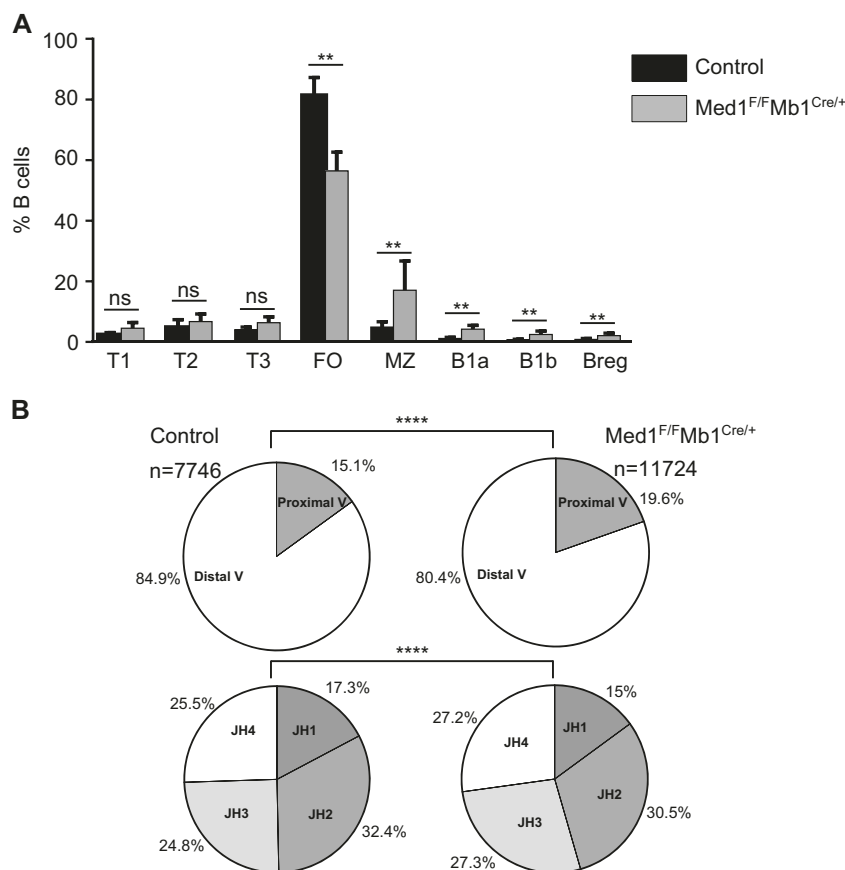


Fig. 1 B-cell populations and VDJ recombination in Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. **a** Spleen B-cell populations were studied by flow cytometry on wt and Med1^{F/F}mb1^{Cre/+} mice. Data represent mean ± SEM from 6 wt and 6 Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice. Mann–Whitney test was used for significance. **b** VDJ repertoire was studied in Peyer's patches from Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice after NGS sequencing using a Cα specific reverse primer. Proximal and distal V_H (top) and J_H H (bottom) were studied on 7746 clonotypes in control mice (n = 7) and 11724 clonotypes for Med1^{F/F}Mb1^{Cre/+} mice (n = 11)

contributes to long-distance gene rearrangements in the IgH locus, whether initiated by AID in mature B cells or by RAG in B-cell progenitors assembling their primary VDJ repertoire.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer (PGA1201502338), ANR grant Ig-MemImpact 16-CE15-0019-01) and ANR-10-LABX-0030-INRT, a French State fund managed by the Agence Nationale de la Recherche under the frame program Investissements d'Avenir ANR-10-IDEX-0002-02. We thank Mehdi Alizadeh for his help with MiSeq sequencing.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.C., J.C.-M. designed the study. I.D., S.L.N. and Z.D. performed experiments. F.B. analysed Ig repertoire data. B.R.-S.-M. provided mice and participated in manuscript writing.

ADDITIONAL INFORMATION

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

- Pinaud, E. et al. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Ad. Immunol.* **110**, 27–70 (2011).

- Chauveau, C., Pinaud, E. & Cogne, M. Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur. J. Immunol.* **28**, 3048–3056 (1998).
- Morvan, C. L., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A. & Cogné, M. The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* **102**, 1421–1427 (2003).
- Rouaud, P. et al. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* **287**, 8356–8360 (2012).
- Braikia, F. Z. et al. Developmental switch in the transcriptional activity of a long-range regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* **3**, 3370–3380 (2015).
- Guo, C. et al. CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* **477**, 424–430 (2011).
- Ashi M. O., et al. Physiological and druggable skipping of immunoglobulin variable exons in plasma cells. *Cell Mol Immunol* 2018. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0160-6>
- Thomas-Claudepierre, A.-S. et al. Mediator facilitates transcriptional activation and dynamic long-range contacts at the IgH locus during class switch recombination. *J. Exp. Med.* **213**, 303–312 (2016).
- Allen, B. L. & Taatjes, D. J. The Mediator complex: a central integrator of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 155–166 (2015).
- Whyte, W. A. et al. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* **153**, 307–319 (2013).
- Fuxa, M. et al. Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev.* **18**, 411–422 (2004).
- Verma-Gaur, J. et al. Noncoding transcription within the IgH distal VH region at PAIR elements affects the 3D structure of the IgH locus in pro-B cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 17004–17009 (2012).
- Xu, C.-R., Schaffer, L., Head, S. R. & Feeney, A. J. Reciprocal patterns of methylation of H3K36 and H3K27 on proximal vs. distal IgVH genes are modulated by IL-7 and Pax5. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 8685–8690 (2008).

14. Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G. & Busslinger, M. Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* **401**, 556–562 (1999).

15. Su, I.-H. et al. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat. Immunol.* **4**, 124–131 (2003).

Annexe 8: (Article soumis)

Locus Suicide Recombination of the functionally rearranged IgH allele actively occurs in B-cells from inflamed human lymphoid tissues

Iman Dalloul, François Boyer, **Zeinab Dalloul**, Amandine Pignarre, Gersende Lacombe, Thierry Fest, Henda Boutouil, Jean-Claude Aldigier, Sophie Peron, Jeanne Cook-Moreau, Michel Cogné

Manuscrit soumis à PLOS Genetics

Ce papier montre la détection d'un nouveau type de remaniment qui touche le locus IgH humain et qui aboutit à la perte totale de l'expression d'un BCR à la surface des cellules B conduisant à la mort des lymphocytes B par perte d'un signal de survie. Ce type de recombinaison est nommé recombinaison suicide de locus IgH ou LSR.

J'ai participé à l'expérimentation ayant conduit à la rédaction de cet article (préparation des PBMC à partir du sang total, tri cellulaire, stimulation in-vitro des cellules B humaines, préparation des bibliothèques pour la NGS).

Locus Suicide Recombination actively occurs on the functionally rearranged IgH allele in B-cells from inflamed human lymphoid tissues

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Locus Suicide Recombination actively occurs on the functionally rearranged IgH allele in B-cells from inflamed human lymphoid tissues
Short Title:	LSR actively targets the human IgH locus
Article Type:	Research Article
Section/Category:	General
Keywords:	
Corresponding Author:	Michel Cogné Universite de Limoges Limoges Cedex, FRANCE
Corresponding Author's Institution:	Universite de Limoges
First Author:	Michel Cogné
Order of Authors:	Michel Cogné Iman Dalloul françois Boyer Zeinab Dalloul Amandine Pignarre gersende Iacombe THierry Fest fabrice chatonnet Céline Delaloy Anne Durandy robin jeannet emilie Iereclus hend boutouil jean-claude Aldigier sophie péron jeanne cook-moreau
Abstract:	B-cell activation yields abundant cell death in parallel to clonal amplification and remodeling of immunoglobulin (Ig) genes by activation-induced deaminase (AID). AID promotes affinity maturation of Ig variable regions and class switch recombination (CSR) in mature B lymphocytes. In the IgH locus, these processes are under control by the 3' regulatory region (3'RR) super-enhancer, a region demonstrated in the mouse to be both transcribed and itself targeted by AID-mediated recombination. Alternatively to CSR, IgH deletions joining Sμ to "like-switch" DNA repeats that flank the 3' super-enhancer can thus accomplish so-called "locus suicide recombination" (LSR) in mouse B-cells. We now show that AID-mediated LSR also actively occurs in humans, and provides an activation-induced cell death pathway in multiple conditions of B-cell activation. LSR deletions either focus on the functional IgH allele or are bi-allelic, since they can only be detected when they are ongoing and their signature vanishes from fully differentiated plasma cells or from "resting" blood memory B-cells, but readily reappears when such memory B-cells are re-stimulated in vitro. Highly diversified

	breakpoints are distributed either within the upstream (3'RR1) or downstream (3'RR2) copies of the IgH 3' super-enhancer and all conditions activating CSR in vitro also seem to trigger LSR.
Suggested Reviewers:	Ali Zarrin, PhD investigator, Genentech Research zarrin.ali@gene.com Expertise about AID enzyme activity in gene recombination Jayanta CHAUDHURI, PhD Memorial Sloan Kettering Cancer Center chaudhuj@mskcc.org Expertise about gene recombination IN B-cells Javier Di Noia, PhD Universite de Montreal javier.di.noia@ircm.qc.ca Expertise about AID-mediated recombination Frederick Alt, PhD Professor, Harvard Medical School alt@enders.tch.harvard.edu
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure Enter a financial disclosure statement that describes the sources of funding for the work included in this submission. Review the submission guidelines for detailed requirements. View published research articles from PLOS Genetics for specific examples. This statement is required for submission and will appear in the published article if the submission is accepted. Please make sure it is accurate.	This work was supported by grants to MC from Association pour la Recherche sur le Cancer (PGA120150202338), Agence Nationale de la Recherche (ANR grant 16-CE15-0019-01), Institut National du Cancer (INCa grant #9363), Ligue Nationale contre le Cancer and Région Aquitaine-Limousin-Poitou-Charente. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Locus Suicide Recombination actively occurs on the functionally rearranged IgH allele in B-cells from inflamed human lymphoid tissues

Iman Dalloul¹, François Boyer¹, Zeinab Dalloul¹, Amandine Pignarre², Gersende Lacombe², Thierry Fest², Fabrice Chatonnet², Céline Delaloy², Anne Durandy³, Robin Jeannet¹, Emilie Lereclus¹, Hend Boutouil¹, Jean-Claude Aldigier¹, Sophie Peron¹, Jeanne Cook-Moreau^{1,4}, Michel Cogné^{1, 2, 4}

¹ CNRS, UMR 7276 / INSERM, U1262, Univ Limoges, 87000 Limoges, France

² INSERM U1236, Univ Rennes ; EFS Bretagne, 35000 Rennes, France

³ Institut Imagine INSERM U1163, Paris, France

⁴ MC and JCM co-directed this work

*Corresponding authors: cogne@unilim.fr, jeanne.cook-moreau@unilim.fr.

Abstract: B-cell activation yields abundant cell death in parallel to clonal amplification and remodeling of immunoglobulin (Ig) genes by activation-induced deaminase (AID). AID promotes affinity maturation of Ig variable regions and class switch recombination (CSR) in mature B lymphocytes. In the IgH locus, these processes are under control by the 3' regulatory region (3'RR) super-enhancer, a region demonstrated in the mouse to be both transcribed and itself targeted by AID-mediated recombination. Alternatively to CSR, IgH deletions joining S μ to "like-switch" DNA repeats that flank the 3' super-enhancer can thus accomplish so-called "locus suicide recombination" (LSR) in mouse B-cells. We now show that AID-mediated LSR also actively occurs in humans, and provides an activation-induced cell death pathway in multiple conditions of B-cell activation. LSR deletions either focus on the functional IgH allele or are bi-allelic, since they can only be detected when they are ongoing and their signature vanishes from fully differentiated plasma cells or from "resting" blood memory B-cells, but readily reappears when such memory B-cells are re-stimulated *in vitro*. Highly diversified breakpoints are distributed either within the upstream (3'RR1) or downstream (3'RR2) copies of the IgH 3' super-enhancer and all conditions activating CSR *in vitro* also seem to trigger LSR.

INTRODUCTION

Humoral immune responses and immunoglobulin (Ig) production rely on the selection of B-cells harboring antigen (Ag)-specific B-cell receptors (BCRs). This selection implies not only proliferation and differentiation of those cells optimally binding Ag but also elimination of the less efficient or inappropriately activated cells. The latter can be accomplished through various pathways leading to anergy, death-by-neglect or activation-induced cell death (AICD). While AICD pathways have been characterized in detail for T-cells, and notably involve FAS-induced apoptosis, they are less documented in B-cells. A major and unique feature of mature B-cells during Ag-driven responses, is their ability to reshape their genome, and more specifically Ig genes, after activation-induced deaminase (AID)-dependent modifications. Somatic hypermutation (SHM) within germinal centers (GC) can yield cells with higher affinity V domains, which preferentially capture Ag from follicular dendritic cells, undergo stimulatory cognate interactions with T follicular helper cells and are further selected for survival. In parallel, AID-dependent class switch recombination (CSR) diversifies IgH classes by joining repetitive switch (S) regions that precede the various constant (C) genes. Besides the selected winners of AID-mediated reshaping, many cells are losers or undesired responders deserving elimination, in agreement with the considerable amount of GC B-cells which have been demonstrated as actively undergoing apoptosis [1,2]. Out-of-frame or other unfavorable V region mutations might result in BCR loss and promote apoptosis while more subtle cell fate decisions will arbitrate between death, short-term or long-term survival as memory lymphocytes or plasma cells [1,3]. Such intra-GC cell fate choices are crucial since inappropriate survival or terminal differentiation of bystander cells producing useless Ig or Ig with increased affinity for self or environmental Ags might trigger auto-immunity, inflammation and disease. Since class-switched antibodies are potent actors of auto-immunity and/or hypersensitivity, means for restricting CSR and reentry of class-switched cells into SHM thus appear as necessary safeguards to keep humoral immune responses both specific and innocuous. The AID-dependent process of locus suicide recombination (LSR) reported in mouse B-cells ideally fits this necessity [4]. We now show that the human IgH 3'RR super-enhancers include sequences ideally suited as recombination targets, and that LSR actively occurs in human lymphoid B-cells.

LSR features recombination between S μ and the 3' regulatory region (3'RR) located downstream of the IgH locus, thus deleting the whole IgH constant gene cluster. The 3'RR includes several B-lineage specific enhancers (hs3, hs1-2 and hs4) which are mostly active after B-cell activation and then promote transcription and recombination [5]. Targeted mutations of the 3'RR in the mouse demonstrated its major role in SHM, its control of germline transcription

and CSR to most C genes, its booster effect on IgH gene expression in plasma cells and even its ability to promote inter-allelic transvection between IgH alleles [5–11]. The mouse 3'RR has a unique palindromic architecture with functional implications [12–15], and this structure is shared by all mammalian species studied to date, including humans [16]. In addition, the mouse 3' RR includes multiple stretches of repetitive DNA resembling S-regions albeit shorter [4,12], potentially promoting LSR through a mechanistic process similar to CSR. In B-cells, Ag stimulation with appropriate co-stimuli induces AID expression and then initiates staggered DNA nicking in repetitive S-regions, double strand breaks (DSBs) and CSR. Highly repetitive “Like switch” (LS) regions from the 3'RR might serve a similar role, ending with S μ -3'RR junctions and deletion of the entire IgH constant region gene cluster. By abrogating BCR expression, which is critical for B-cell survival, this eliminates the corresponding cells.

In humans and old-world apes, an internal duplication of the IgH locus constant gene cluster has additionally duplicated 3' regulatory regions downstream of each C α gene (3'RR1 and 3'RR2 respectively downstream of C α 1 and C α 2)[16,17]. We show that both human 3'RRs include LS-regions which are highly structured in terms of DNA repeats and which can locally be G-rich, with predicted ability to form the G-quadruplex (G4) DNA now known as the ideal substrate for AID [18,19]. Importantly, these regions also actively undergo AID-dependent recombination in activated B-cells, whatever the activation conditions assayed, both *in vivo* and *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Human samples

Blood from healthy volunteers was collected, after obtaining written informed consent, from the CHU Dupuytren Hospital, Limoges, France (ANSM: 2012-A00630-430) or from the Etablissement Français du Sang (Rennes, France; French Ministry of Higher Education and Research approval: AC-2014-2315) according to the Declaration of Helsinki. Blood from septic patients was collected from the Hematology department, CHU Dupuytren. The study was accepted by the Ethics Committee of CHU Dupuytren (n° 119-2013-19). The trial was registered under ClinicalTrials.gov: NCT01995448. Tonsils were obtained from patients undergoing tonsillectomy performed in CHU de Rennes, while adenoids were obtained from CHU Dupuytren. All were operative pieces. Bone marrow aspirates obtained from patients undergoing cardiac surgery. Subjects were recruited under institutional review board approval and informed consent according to the Declaration of Helsinki. Samples from AID-/- patients (3 PBMC samples and 1 sample of sorted tonsil B-cells) were provided by Pr Anne Durandy, Hôpital Necker, Paris, France.

Activation of human B-lymphocytes *in vitro*

Human PBMC were obtained by density gradient centrifugation and human B-cells were negatively sorted from PBMC using EasySep Human B-cell Isolation Kit (StemCell) according to the manufacturer's instructions. Purified B-lymphocytes were seeded at 1×10^6 cells/ml in IMDM medium (Lonza) supplemented with 20% fetal bovine serum (Deutscher), 1% penicillin/streptomycin (Gibco) and stimulated for 4 days with 100 ng/ml human recombinant CD40L (Enzo Life Sciences) alone or with 50 ng/ml recombinant human IL-4 (Peprotech) or 2 µg/ml Gardiquimod (InvivoGen) or 2.5 µg/ml CpG oligodeoxynucleotide 2006 (InvivoGen) or 100 ng/ml IL-21 (R&D Systems) or 100 ng/ml INFγ (R&D Systems) or 50 ng/ml Pam3CSK4 (InvivoGen) or 0.5 µg/ml goat anti-human kappa (Southern Biotech).

Sorting of memory, transitional, and naive B-cells, and generation of *in vitro* activated plasmablasts from cultured naive B-cells

PBMCs from healthy volunteers were obtained after density centrifugation. Naive B-cells (NBCs) were purified by negative selection using magnetic cell separation (Naive B-cell Isolation Kit II; Miltenyi Biotec), following the manufacturer's instructions, with the AutoMACS deplete-sensitive program. Purity of isolated CD19+CD27- NBCs was routinely >99%. Purified NBCs were labeled with 1 µM CFSE (Thermofisher) at 37°C for 10 min and washed in complete medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and antibiotics (all from Gibco, Thermofisher). Purified human NBCs were cultured at 7.5×10^5 cells/ml in 24-well plates and stimulated during 4 days with 2.6 µg/ml F(ab')₂ goat anti-human IgA+IgG+IgM (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), 100 ng/ml recombinant human soluble CD40L (NCI), 2 µg/ml CpG oligodeoxynucleotide 2006 (Miltenyi Biotec), and 50 U/ml recombinant IL-2 (SARL Pharmaxie). Day-4 activated B-cells were washed and cultured at 4×10^5 cells/ml with 50 U/ml IL2, 12.5 ng/ml IL-10 and 5 ng/ml IL-4 (R&D Systems). At day-6, cells were separated by

cell sorting (FACS Aria cell sorter, BD Biosciences) into undifferentiated CFSE^{hi} CD38^{lo} (bystander lymphocytes, without proliferation), CFSE^{lo} CD38^{lo} (proliferating activated B-cells), and differentiated CFSE^{lo} CD38^{hi} (plasmablasts) subsets[20].

After B-cell isolation (B-cell isolation kit II, Miltenyi Biotec), we also purified transitional, naive and memory B-cells which were sorted as CD27+CD38^{lo}CD24^{lo}, CD27-CD38^{lo}CD24^{lo} and CD27-CD38^{hi}CD24^{hi} subsets, respectively. Isolated cells were stimulated 4 days with different combinations of 100 ng/ml CD40L, 50 ng/ml IL4 and 2 µg/ml Gardiquimod (InvivoGen).

Sorting of *in vivo* differentiated early plasmablasts

Actively differentiating plasmablasts from tonsils were purified as previously described [21] as CD19+IgD-CD10-CD38^{hi} cells. CD38^{hi}/CD138+ mature plasma cells were purified from bone marrow aspirates.

RNAseq on activated human B-cells

Human naive B-cells were purified and activated *in vitro* as described (Hipp et al. Nat Commun. 2017). RNA extractions were performed on day 4 IL-2 primed cells with the NucleoSpin RNA XS kit (Macherey-Nagel). Libraries were prepared with the TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) and samples were sequenced on an Illumina NextSeq 500 using 75-bp single-end reads (NextSeq 500 High Output v2, Illumina) by Helixio (Clermont Ferrand, France). Quality of sequencing data was monitored by FastQC. Residual adapters from sequencing were trimmed using Cutadapt 1.0. Potential PCR duplicates were removed using SAMtools 1.3. Reads were then aligned on the GRCh38 human genome using STAR 2.4.2a.

Amplification of Sµ/Sγ for CSR-seq experiments

DNA from B-cells was extracted using [GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit](#) (Sigma). Sµ/Sγ junctions were amplified in triplicate by nested PCR with 200 ng DNA ([Herculase II Fusion DNA Polymerase, Agilent Genomics](#)) using the following consensus primers which amplify all four classes of human IgG junctions: PCR1: Sµ1a 5'- CCAGGTAGTGGAGGGTGGTA-3' and IgGa consensus reverse 5'- GGTCACCACGCTGCTGAG-3', PCR 2: Sµ1b forward 5'- CAGGGAAGTGGGGTATCAAG-3' and IgGb consensus reverse: 5'- CTTGACCAGGCAGCCCAG-3'. Forward primers used in both PCRs are located in Sµ while the reverse primers are located in the IgG consensus sequence of the CH1 region.

Amplification of Sµ/3'RR junctions for LSR-seq experiments

Sµ/3'RR junctions were amplified under the same conditions as for Sµ/Sγ junctions using different primers located at different positions within the 3' RR. The forward primer located in the Eµ region (EµH1) was used with a reverse primer located downstream of Hs4 (3'FarHs4 reverse) or with a primer located in Hs1.2 (Hs1.2 reverse1) or in Hs3 (Hs3 reverse 1). PCR1 product was used to perform PCR2 using Sµ1b forward with all reverse primers located in 3' RR. The primers sequences and PCR programs are given in Table I.

Table I. Primers used in nested PCR for amplification of LSR junctions

PCR 1 Primers	Sequence
EμH1 Forward	5'- AGGCTGACCGAAACTGAAAA-3'
3'farHhs4 reverse	5'- CAAGCGTCAAGGTGTGGAC-3'
Hs1,2 reverse 1	5'-TTCCCAGGGGTCCTGTGGGTC-3'
Hs3 reverse 2	5'- CTGGCCAGGTCTCGGTTTT-3'
PCR2 primers	Sequence
Sμ1b Forward	5'-CAGGGAAGTGGGGTATCAAG-3'
Probe 3'Hhs4 reverse	5'-GGACGCGGTTTGCTTTTAT-3'
Hs1,2 reverse 2	5'-GCTGAGTTTTTCGGCATCTCT-3'
Hs3 reverse 1	5'-GTTTTGGGGCATGTTTCTCA-3'

Ion torrent next generation sequencing NGS

Barcoded libraries with 200-pb read lengths were prepared using Ion Xpress plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. Each library was prepared using 200 ng PCR2 product. For LSR junction sequencing equal amounts of each PCR2 product (using hs3, hs12 and h4 primers) were mixed together and diluted to 100 pM to prepare one barcoded library. Libraries were run on an Ion PI v3 chip on the Ion Proton sequencer (Life Technologies). Data analysis was performed using CSReport [22].

Data analysis:

Data was analyzed by using GraphPad Prism software. Data are shown as means $\pm$ SEM of the indicated number of values. The student T test was used to determine significance between stimulation conditions.

RESULTS

Human 3'RR1 and 3'RR2 share multiple common features with S regions

Architectures of human 3'RR1 and 3'RR2 elements were analyzed for the presence of direct and inverted repeats (Fig1). As previously described for the mouse 3'RR, “like-switch” (LS) sequences (*i.e.* stretches of highly repetitive DNA somehow resembling S regions) were readily evidenced using the YASS algorithm (<http://bioinfo.lifl.fr/yass/yass.php>) for a survey of direct repeats in window range set over 20bp, with a minimal identity threshold set at 90% (Fig. 1A). Five to six human LS regions stand in each of the human IgH 3'RR super-enhancers. These LS regions are each 0.5 to 2 kb long, and are interspersed with core enhancer elements, which they do not overlap.

Human 3'RR LS sequences additionally show 35-50% G-richness on one or the other DNA strand, and analysis using the G4-hunter algorithm <http://bioinformatics.cruk.cam.ac.uk/G4Hunter/> [23], predicted the occurrence of several clusters of G4-DNA, standing in either one or the other DNA strand of LS regions (Fig 1B).

When checking RNA-seq data from activated human B-cells, we noticed that 3'RR transcription occurred in both the sense and antisense orientation in reference to IgH constant genes, and that, quantitatively, it revealed equivalent amounts of transcripts corresponding to either orientation (Fig. 1B). This is in contrast with IgH constant genes (see for example C α and the preceding S α region on Fig 1B), which are predominantly transcribed in the sense orientation.

LSR occurs at multiple sites within the whole extent of both human 3'RR

As previously described for mouse LSR, we identified human LSR junctions by nested PCR in DNA from B-cell samples [4]. The specificity of the read-out for these PCR assays was improved by replacing the final hybridization step of PCR products, initially done with specific probes[4]), with high-throughput sequencing adapted from our recently described CSR evaluation algorithm, CSReport [22]. Sequence determination thus precisely mapped the breakpoint sites. CSReport mapped LSR junctions linking S μ to either the human 3'RR1 downstream of C α 1 or 3'RR2 downstream of C α 2.

Although such an “LSR-seq” DNA amplification method (with some amplified fragments above 30kb) is necessarily biased towards amplification of the shorter fragments, the use of 3 primers located either downstream from the h3, hs1,2 and hs4 enhancers finally amplified breakpoints located throughout 3'RR1 and 3'RR2.

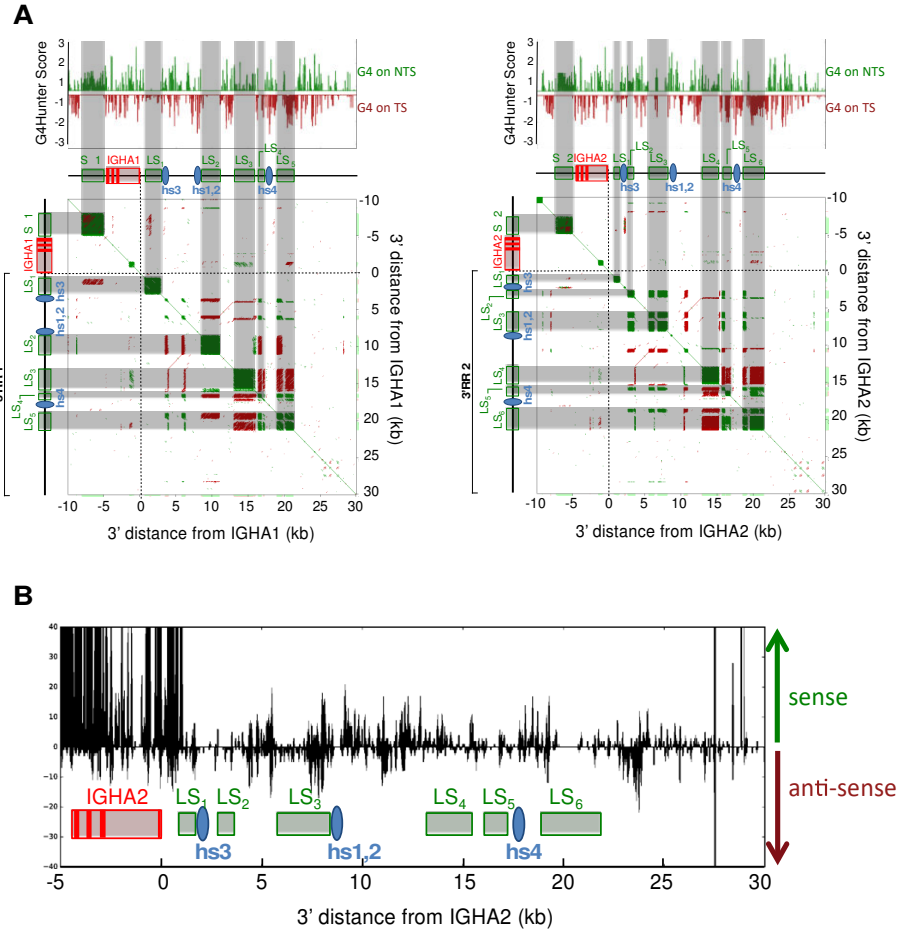


Figure 1: 3'RR structure and transcription in activated B-cells. A. Structure of genomic fragments including either human $\alpha 1$, $\alpha 1$ gene and 3'RR1 (left), or $\alpha 2$, $\alpha 2$ and 3'RR2 (right) was analyzed for presence of G4 DNA on the template (TS) or non-template (NTS) strand (**Top**). Dot plot analysis of internal repeats (**Bottom**) was ran with the YASS algorithm: colored dots indicate short stretches of homology in direct (green) or inverted (red) orientation (green squares thus mark positions of highly repetitive S or LS regions / red lines indicate positions of inverted repeats, notably the palindrome centered on the hs1,2 enhancer). **B.** Transcription of human 3'RR2 in sense and antisense orientation, as evaluated by RNA-seq experiments with RNA from *in vitro* activated B-cells.

These breaks were joined to various positions within Sp_i , with preferential use of breakpoints at the 5' side of Sp_i , especially for junctions with the downstream part of the 3'RRs. When considering the sum of all junctions mapped in this study (Fig. 2), the most striking observation was their highly diversity and scattered distribution throughout the 3'RRs (both within LS regions and in their proximity).

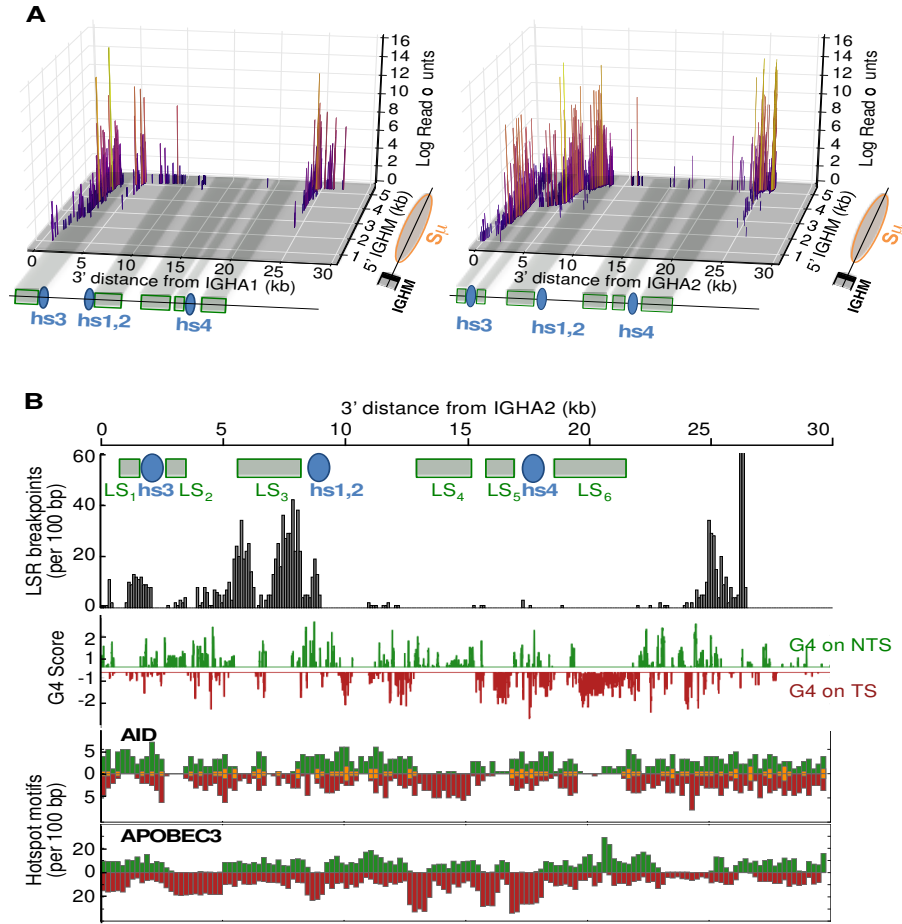


Figure 2: Positions of LSR breaks in human activated B-cells. A. A 3D-schematic showing the positions of junctions sequenced in this study with regards to abundance among sequence reads (in log scale) and position of DSBs in S_{μ} , and 3'RR1 (left) or 3'RR2 (right). **B.** Map of 3'RR2 reporting breaks observed in sequenced LSR junctions together with the position of G4 DNA on either the non-template (green) or template (red) strand (with reference to the transcriptional orientation of IgH constant genes), AID consensus target sites, and APOBEC3 family deaminases.

It is questionable whether LSR targets only unswitched B-cells, determining the occurrence of S_{μ} -3'RR junctions, or can also target class-switched cells and then eventually conserve a remnant of a downstream S region inserted in-between S_{μ} and a recombined 3'RR. We indeed obtained multiple evidence of such “post-switch” LSR, with sequence reads obtained from the LSR-seq protocol (*i.e.* sequencing an S_{μ} to 3'RR amplicon) but including junctions of S_{μ} with S_{γ} or S_{α} , (or S_{γ} or S_{α} joined with a 3'RR). Within a total of 11179 LSR junctions sequenced in this study, 1126, *i.e.* about 10% could be typed as complex junctions involving breaks with a downstream S (S_{γ} or S_{α}) region and certifying their origin from switched cells. Conversely, direct S_{μ} -3'RR junctions could originate from either unswitched or switched cells (upon complete deletion of the intervening S regions), so that the sequence of a given LSR junction cannot by itself certify that it occurred in an IgM+ cell.

LSR-seq can semi-quantitatively estimate *in vivo* LSR in freshly collected B-cells

CSR junctions were characterized in parallel to LSR junctions, by a similar PCR/sequencing strategy in order to provide an LSR/CSR comparison. “LSR-seq” and “CSR-seq” protocols thus provided two semi-quantitative assessments of recombination events: numbers of sequencing reads including the expected junctions, and numbers of unique junctions. Although we cannot claim such a nested PCR and sequencing assay to be fully quantitative, it appeared to be at least semi-quantitative, giving negative results in non-B-cell samples and abundant signals in B-cells from chronically inflamed lymphoid tissues. It also had the abovementioned advantage of formally identifying sequencing reads mapped as CSR or LSR junctions, and allowed us to count repeated reads with identical sequences as “unique junctions”.

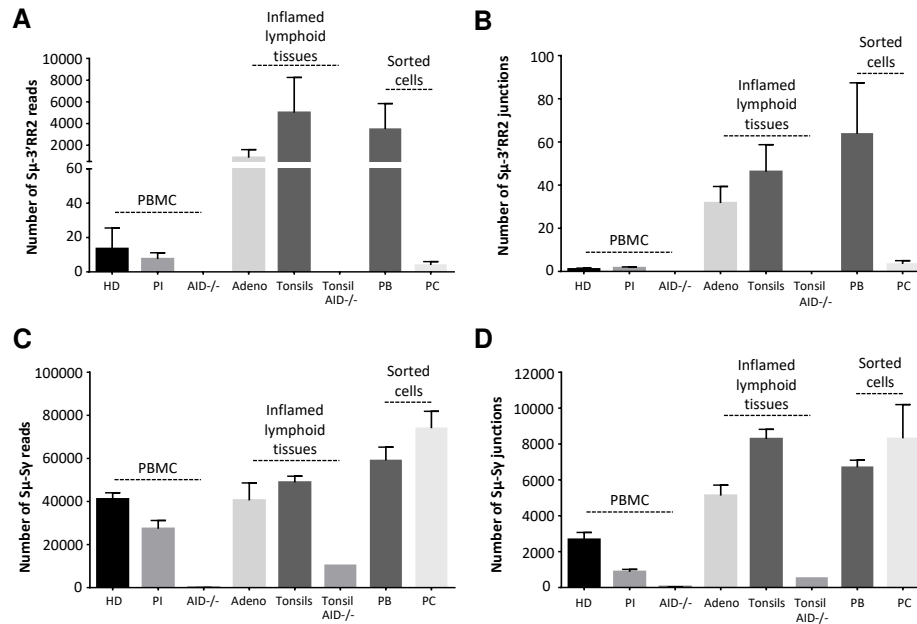


Figure 3: LSR breaks *in vivo* in humans. Sμ-3'RR2 LSR reads (A) and junctions (B) were analyzed in peripheral blood B cells isolated from healthy donors (HD) (n=6) but also in blood from post-infection (PI) patients recently hospitalized and treated for bacterial infections (n=17) and from AID-/- B-cells (n=3). LSR was also studied using DNA from inflamed lymphoid tissues (adenoids (n=3) and tonsils (n=11)), 1 AID-/- tonsil, from sorted plasmablasts (PB) isolated from tonsils (n=5) and finally in DNA from terminally differentiated plasma cells (PC) (n=2) sorted from bone marrow. Frequencies of LSR junctions amplified with an Sμ forward primer and a downstream Hs4 reverse primer were evaluated in parallel to those of classical Sμ-Sy CSR reads (C) and junctions (D) amplified from the same DNA samples, in order to provide an LSR/CSR comparison, data represent mean numbers (reads or junctions) ± SEM.

LSR junctions from S μ to either 3'RR were accordingly “semi-quantified” in DNA from fresh primary B-cells from various origins. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors regularly yielded low, close to negative, LSR signals, and the same was observed in a series of patients recently treated for bacterial infections. By contrast, LSR was abundant in DNA from tonsils or adenoids. No LSR junctions were found in DNA from either tonsil B-cells nor PBMC obtained from AID-deficient patients. In healthy donors, as expected from the weak signals from PBMC, LSR was also absent or very low in sorted [CD19+, CD27+] peripheral blood memory B-cells and in sorted bone marrow CD138+ plasma cells (Fig. 3). LSR junctions were thus rare in DNA from circulating B-cells of healthy subjects and in differentiated plasma cells or memory cells. Further splitting and sorting of tonsil cells showed that LSR junctions occurred at a high level in cells with ongoing activation (sorted as blasting CD19+IgD-CD10-CD38^{hi} B-cells) (Fig. 3).

LSR junctions actively occur *in vitro* in activated B-cells

Class-switching and induction of AID in human B-cells is mostly a T-dependent process and is most often modelled *in vitro* by activating B-cells with CD40 ligands. When total blood B-cells from healthy patients were stimulated in such conditions, this resulted in the induction of LSR simultaneously with CSR. Associating anti-CD40 stimulation with various co-stimulatory factors, increased LSR and the LSR/CSR ratio in most of the conditions assayed and notably upon addition of IL4, IL21, or BCR ligation with anti- κ antibodies, or, to the highest extent, upon TLR ligation (Fig. 4).

We also sorted three different activated B-cell stages, using a 6-day long *in vitro* activation protocol with combined anti-CD40, TLR9 ligand CpG, anti-BCR antibodies and cytokines, previously described as optimal for mimicking the *in vivo* humoral immune response [21] (ref). This allowed us to generate either plasmablasts committed towards plasma cell differentiation, or activated B-cells having proliferated but still at an earlier stage (resembling proliferating centroblasts), and to compare them to surviving but non-dividing B-cells (bystanders) from the same culture. Analysis of the three types of cells showed that LSR was virtually absent in non-dividing bystander B-cells, but was, by contrast, at the highest level in plasmablasts and at an intermediate level in actively proliferating activated B-cells (Fig. 5A).

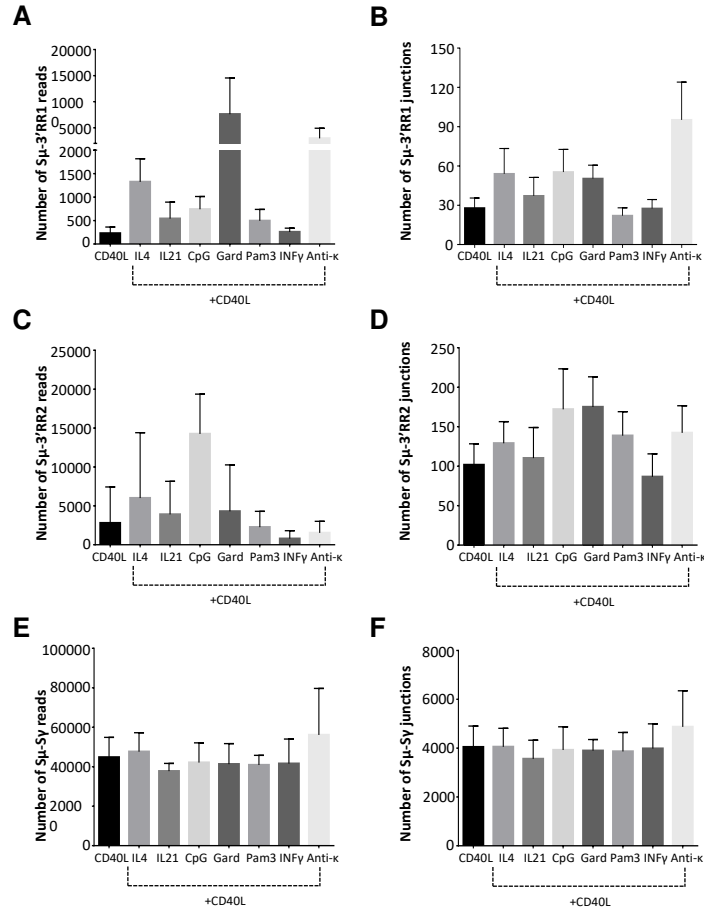


Figure 4: LSR after *in-vitro* stimulation of peripheral blood B-cells in various conditions of activation. PBMC from healthy donors activated for 4 days with human recombinant CD40L alone or with recombinant human IL4, IL21, CpG, gardiquimod (Gard), Pam3, IFN γ or with an anti-Ig κ antiserum. S μ -3RR1 (A and B) and S μ -3RR2 (C and D) LSR junctions were amplified using reverse primers located in hs3, hs1-2 and downstream hs4. Equal amounts of the three PCR products were mixed in a single library. E and F represent IgG CSR reads and junctions using the same stimulation conditions. Data represent means (for unique reads and junctions) $\pm$ SEM for 6 people.

We also studied LSR in cells first sorted and then stimulated *in vitro*, comparing memory, naive and transitional B-cells (sorted as CD27⁺CD38^{lo}CD24^{lo}, CD27⁻CD38^{lo}CD24^{lo} and CD27⁻CD38^{hi}CD24^{hi} subsets, respectively). We found that upon *in vitro* activation, memory B-cells yielded much higher levels of LSR than naive or transitional B-cells (LSR remaining undetectable in control Jurkat cells) (Fig. 5, E and F). As expected in sorted populations including from the beginning a large amount of switched cells, CSR junctions assayed in parallel were the most abundant in memory cells (Fig. 5, G and H).

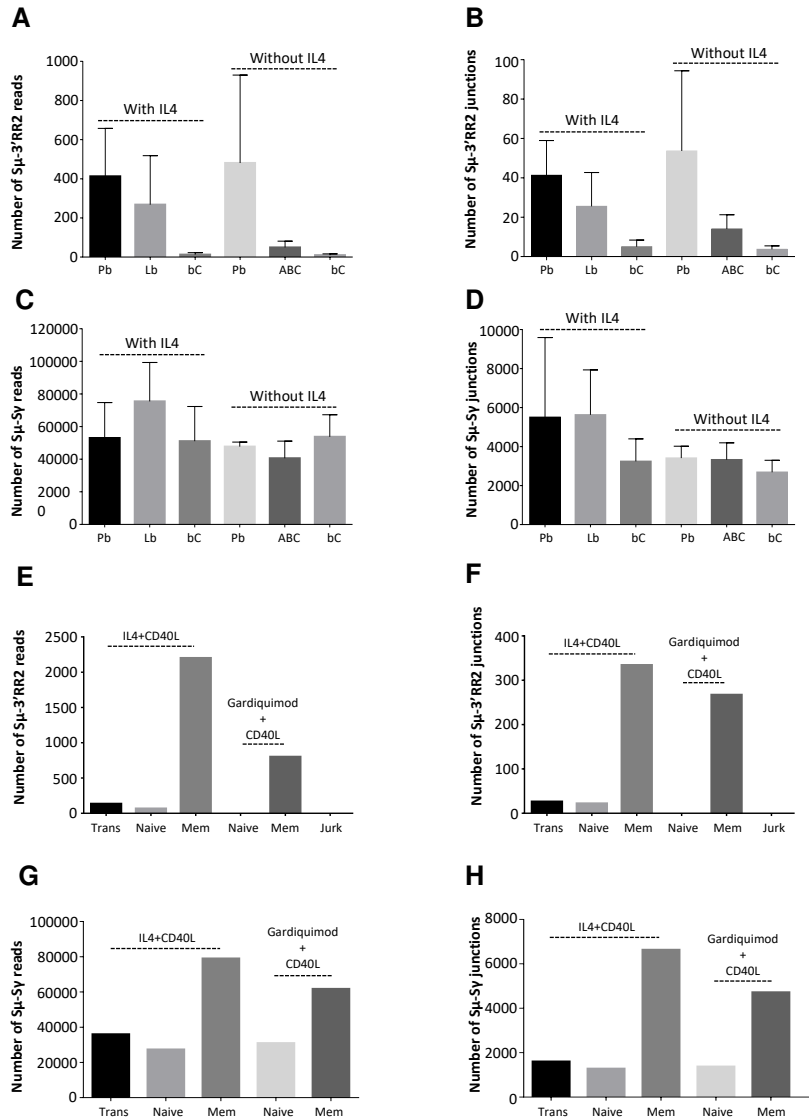


Figure 5: LSR breaks in vitro in stimulated B-cells from various origins. **A** and **B**. LSR (reads and junctions) in *in vitro* stimulated naive B-cells, sorted after stimulation. PBMC from healthy donors were activated *in-vitro* for 6 days with combined anti-CD40, TLR9 ligand CpG, anti-BCR antibodies and other cytokines generating three different stages of differentially activated- B-cells: Pb (plasmablasts), ABC (proliferating activated B-cells) and bC (bystander B-cells). Data represent mean number (reads or junctions) $\pm$ SEM for 3 donors. **C** and **D**. CSR (reads and junctions) to Sy in same samples as A and B. CSR junctions were amplified using a downstream IgG consensus primer located in CH1. **E** and **F**. Reads and junctions from *in vitro*-induced LSR in stimulated B-cells from various origins: sorted transitional (Trans), naive and memory B-cells (Mem) (n=1) B-cells obtained from peripheral blood of healthy donors. Before DNA extraction, cells were stimulated for four days *in-vitro* with human recombinant CD40L combined with human recombinant IL4 or with gardiquimod. Jurkat (Jurk) cells stood as negative controls. **G** and **H**. CSR reads and junctions from same samples as in E and F. CSR junctions were amplified using a downstream C γ consensus primer located in CH1. Data represent means (for unique reads and junctions) $\pm$ SEM.

Structure of LSR junctions

CSR junctions from S_{μ} to S_{γ} and LSR junctions from S_{μ} to 3'RR were amplified by PCR with specific primers, sequenced by NGS (Ion Proton) and analyzed regarding their positions in S regions and/ or 3'RR, and their nature using CSReport, a dedicated tool that performs junction assembly and analysis based on BLAST alignments (Fig. 6). A first difference between LSR and CSR concerned the global position with regard to repetitive regions. All S_{μ} breaks were located in the repetitive part of S_{μ} (in agreement with the fact that in the mouse, deletion of S_{μ} repeats virtually abrogates CSR)[24]. By contrast in the 3'RRs, breaks were found not only within but also outside of LS regions. A second difference concerned the detailed position of 3'RR breaks (as identified in sequenced unique junctions) and their increased distance relative to the various genomic features relevant to DNA cleavage (main AID target sites WRCY and RGYW, G4 sites suggested by the G4 Hunter algorithm) (Fig. 6, A and B). Interestingly in LSR junctions, the increased mean distance concerned only 3'RR breaks, while S_{μ} breaks were similar to CSR junctions. These increased mean distances between breakpoints in unique junctions and relevant genomic features (in color) were compared to the same distance calculated from simulated random break positions in the sequenced regions. Even if the mean [break to AID site] distance was longer in the 3'RR than in S_{μ} , it remained significantly shorter than that calculated under the random break hypothesis. The same evaluation was done for APOBEC3 family target sequences, which by contrast did not show any difference between the observed distance and that calculated under the hypothesis of random breaks (Fig. 6C).

Beyond DNA breaks, another difference between CSR and LSR was related to the junctional sequence itself. Our CSReport algorithm indeed classifies junctions as either blunt (broken ends directly joined without overlap), with microhomologies (stretches of a few nucleotides shared between joined segments) or with insertions (a few nucleotides inserted between joined segments). Figures 6, D-F compare more than 2000 LSR unique direct junctions characterized in this study ($\approx 20\%$ S_{μ} -3'RR1 and $\approx 80\%$ S_{μ} -3'RR2 junctions) to a thousand of independent unique S_{μ} - S_{γ} 1 junctions obtained from one tonsil sample. LSR and CSR somehow differed : LSR to both S_{μ} -3'RR1 and S_{μ} -3'RR2 exhibited a lower frequency of blunt junctions (12 % vs. 19%) and longer microhomologies (mean length 3.8bp vs. 2.7bp) and insertions (mean length 4.8bp vs. 3.7bp).

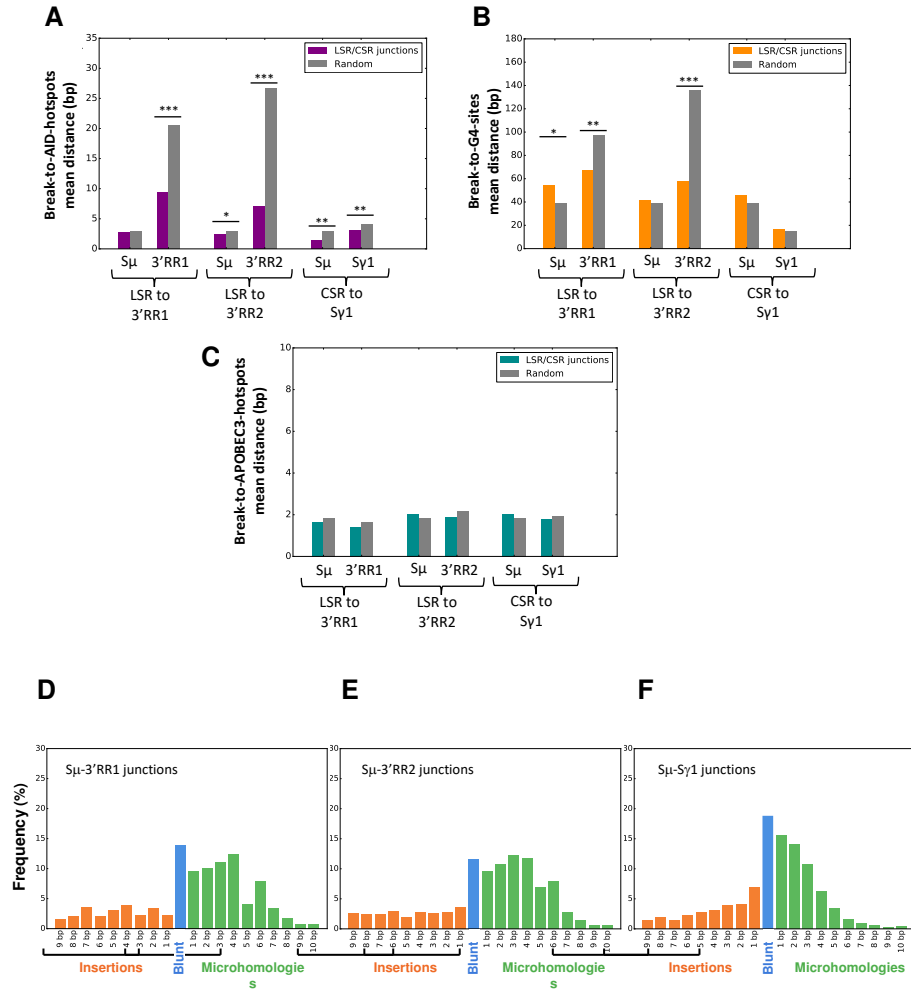


Figure 6: Detailed position of breaks and structure of human repaired LSR junctions. Mean distance to AID target sites (A), G-quadruplex (B) and APOBEC3 family (C) sites. Structure of repaired junctions with regards to mean number of inserted nucleotides and length of microhomology between broken ends for Sμ-3'RR1 (D), Sμ-3'RR2 (E) and Sμ-Sy1 (F).

DISCUSSION

Analyzing the architecture of human IgH 3'RR elements shows their high architectural similarity with the mouse 3'RR, notably for the presence of a central palindrome centered on the hs1,2 enhancer and for the presence of several stretches of repetitive LS regions. The latter LS regions are each 0.5 to 2 kb long, which is close to the length of S α 2 and appears longer than LS regions in the mouse 3'RR, with the longest LS flanking the hs4 core enhancer.

Although in lower amounts than for S-regions, human 3'RR1 and 3'RR2 also include G-rich DNA, but not restricted to a single DNA strand. A specific feature of mammalian S regions is indeed G-richness of the non-template strand, where it promotes the initiation or extension of R-loops, and also often determines tandem G-repeats with potential to form G4 DNA [18,19,25]. In S regions, G4-DNA promotes the occurrence of DNA nicks and further excision by exonuclease 1, while pharmacological agents binding G4-DNA can inhibit CSR [18,26,27]. *In vitro*, G4-DNA was also shown to provide a type of structured DNA which favors the activity of Activation-Induced Deaminase (AID) [19]. Finally, G-quadruplexes forming in S region transcripts were shown to recruit the helicase Ddx1 and contribute to the formation of R-loops before CSR [28].

The G4-hunter algorithm also identified G4-DNA forming sequences within the human 3'RRs, together with long G-rich stretches standing in either one or the other DNA strand. In this regard, it should be noticed first that human 3'RR transcription occurs in both the sense and antisense orientation (with reference to *IgH* constant genes) and secondly that 3'RR eRNA are non-coding transcripts, for which definition of a "template strand" (as for *IgH* constant genes) is ambiguous. In such settings, G4 structures from any DNA strand might recruit AID activity within the 3'RR LS regions, similarly to G4-DNA from the non-template strand within S-regions.

The present study demonstrates a high diversity of IgH recombination events joining S μ or downstream S regions to the 3'RR super-enhancers in activated human B-cells from healthy individuals, showing inter-species conservation of the LSR process previously observed in the mouse. This process appears to be AID-dependent since such junctions were virtually absent in tissues from AID-deficient patients. Study of cells from various origins indicated that human LSR junctions could only be detected transiently when cells were activated but were not preserved in the long term in quiescent memory B-cells. Indeed, when DNA from peripheral blood B-cells was collected from various individuals or from bone marrow plasma cells, it gave low or negative LSR signals by LSR-seq, while CSR signals were high. Since peripheral blood is known to include one-third of memory B-cells in adults [29], this observation suggests that IgH alleles carrying LSR deletions are absent (or exquisitely rare) in circulating

memory B-cells and thus that they rarely target the non-functional allele. Rather, LSR deletion likely predominantly targets the functional IgH allele (or is biallelic), and therefore incompatible with further survival of B-cells in the absence of a functional BCR. On the contrary, a major portion of circulating memory B-cells obviously survive class-switching and accounts for persisting CSR junctions detectable in DNA from PBMC [29].

By contrast to blood, human lymphoid tissues, known as sites of chronic immune stimulation, such as tonsils and adenoids, yielded abundant LSR junctions by LSR-seq. Contrasting with spleen or blood, tonsils and adenoids are known to include abundant GC B-cells with an ongoing activation phenotype (CD20^{high}, BCR low, often showing CD38 expression) [29,30]. B-cells from such chronically activated lymphoid tissues thus include a mix of naive cells, memory cells (about 20%) and GC activated B-cells as well as plasmablasts involved in ongoing local immune reactions to mucosal antigens.

This major difference between blood and tonsils thus confirms that LSR signals in humans are not associated with the presence of memory B-cells (by contrast to CSR) and indicates that LSR is only transiently detectable contemporaneously to *in vivo* B-cell activation.

Human LSR junctions were related to either 3'RR1 or 3'RR2 and disseminated throughout these regions. The main conclusion to be drawn concerning this distribution is the high diversity of the breakpoints. The apparent higher frequency of breaks at the beginning of S_μ likely relates to the preferential amplification of short fragments in a nested PCR assay. Breaks within the large 3'RR, also appeared to cluster in three sub-regions each spanning 3 to 5 kilobases, but these sub-regions in fact preceded the three unique non-repetitive locations where it had been possible to design highly specific reverse primers for the LSR-seq assay. While the use of additional regularly spaced reverse primers is prevented by the highly repetitive 3'RR sequence, it is thus likely that the frequency of breaks occurring at large distances from our primers is under-estimated.

Interestingly, sequence analysis of LSR-seq data from both *in vivo* and *in vitro* activated B-cells revealed the presence of both direct junctions from S_μ to one or the other 3'RR, or of complex junctions including S_γ or S_α regions in addition to S_μ.

Evaluation of LSR and comparison to CSR is inherently hindered by the need to identify junctions at the DNA level using nested PCR and sequencing (which can only be semi-quantitative), and by the fact that suiciding

cells rapidly vanish while switched cells are healthy and CSR remains detectable in the long term. In spite of that, we routinely identified LSR reads in DNA samples from activated B-cells, with frequencies up to 3% of the detection rate for CSR reads, meaning the LSR is a frequent event.

LSR junctions were found both in cells activated *in vitro* and in cells activated *in vivo* after CD40 ligation. It was not possible to identify conditions stimulating CSR in the absence of LSR. Even if variations appeared, with a tendency to increase the LSR/CSR ratio when TLR ligands were associated with CD40 ligation, or to decrease this ratio when BCR cross-linking was associated, these variations remained below statistical significance.

Another interesting point is the mechanisms of DNA breaks occurring in the 3'RR. While the process of LSR is globally AID-dependent, we cannot exclude that breaks in S μ might be initiated by AID while breaks in the 3'RR might be generated by another mechanism, yet to be identified. While the 3'RR includes repeats and is transcribed, similarly to a S region, our analysis showed that the distance between AID consensus motifs and 3'RR DSBs was much higher than for S regions. The same is true for the distance between breaks and G quadruplexes. This increase might in part relate to the structure of the target sequences: S μ is indeed extremely rich in AID hotspot motifs and G4 DNA; the mean distance of breaks to these target sites was accordingly very low (and did not differ significantly from the distance calculated under the hypothesis of random breaks). In contrast, both 3'RRs exhibit a lower density of AID hotspots and G4 DNA. 3'RR DSBs identified in unique junctions were located significantly closer to these sites than they would be if randomly distributed. This suggests active targeting of these sites by AID, even if the mean distance from AID sites is higher than for S μ breaks (or for S γ breaks in CSR junctions). While the similarity of S μ breaks in CSR and LSR junctions strongly suggests that identical mechanisms are at work, the differences seen for the 3'RR might suggest that, in addition to the structure of the targeted sequence, either AID or its partners are differentially involved in both regions. The occurrence of breaks both within and outside LS repeats together with the lower density of AID sites suggest that, compared to S μ , DSBs less easily follow staggered SSBs in the 3'RR and require more complex processing of initial SSBs. DNA cleavage outside of a repetitive target sequence has been previously reported for CSR to the C δ gene, where the target $\Sigma\delta$ sequence harbors few AID hotspots [31]. Even in classical S regions, once initiated in a repetitive region, R-loops eventually extend at distance though nearby G-rich regions, and hereby increases the length of the region targeted by CSR [25].

LSR was nearly absent in samples from AID-deficient individuals but we cannot exclude that this would only result from the absence of DSBs in S μ . There is however no evidence indicating that enzymes other than AID might

contribute to LSR breaks, and notably the evaluation of distance from breaks to APOBEC3 family targets sites more or less ruled out that these deaminases might significantly contribute to LSR. Altogether, the significant implication of AID hotspots despite their relative scarcity implies that, in the 3'RR, cytosine deamination is followed by DNA remodeling on longer distances than within S μ before occurrence of DSBs, synapsis to an S region and repair. The hypothesis of a change in the structure of the broken ends fits quite well with the observed increased length of microhomologies in repaired junctions. LSR is indeed repaired less frequently than CSR with blunt junctions typical of non-homologous end-joining, but with an increased usage of microhomologies and longer insertions, as described in the situation with increased involvement of alternate end-joining and microhomology mediated repair.

AID-initiated locus suicide recombination of the IgH locus thus actively occurs in human B-cells, with downstream breakpoints throughout the 3'RR super-enhancer. (Fig. 7). The phenomenon either predominates on the functional IgH allele or is bi-allelic, since LSR deletions are only detected transiently during B-cell activation but do not remain detectable in memory cells or plasma cells.

Because it is transient and followed by cell death, it remains difficult to evaluate LSR regulation and impact on B-cell homeostasis, relative to the other cell death pathways active in the GC. Few methods are available for studying deletions of hundreds kilobases with loosely determined breakpoints and the use of PCR followed with next generation sequencing remains semi-quantitative, given the PCR obstacles introduced by the repetitive nature of the 3'RR. In such settings, all conditions assayed for B-cell activation induce LSR at some degree and new methods will be necessary in order to determine where and when LSR occurs *in vivo* at the single-cell level.

The diagram illustrates the structure of the B-cell receptor (BCR) gene, which is organized into two main regions: 3'RR1 and 3'RR2. The 3'RR1 region contains the VDJ, Cμ, Sμ, Cx, Sx, Cα1, LS1, LS2, LS3, LS4, LS5, Cψγ, Sy2, and Cx segments. The 3'RR2 region contains the Cα2, LS1, LS2, LS3, LS4, LS5, and LS6 segments. The gene is flanked by Sμ and Sα1/Sα2 segments. A large grey triangle labeled "Total excision of constant genes" points to a blue dashed arrow pointing down to the text "Sub-optimal B-cell activation?". Below this, the text "Self-reactivity or polyreactivity." and "Special sensitivity of memory B-cells to LSR?" are displayed.

REFERENCES

1. Mayer CT, Gazumyan A, Kara EE, Gitlin AD, Golijanin J, Viant C, et al. The microanatomic segregation of selection by apoptosis in the germinal center. *Science*. 2017;358. doi:10.1126/science.aao2602
2. Lebecque S, de Bouteiller O, Arpin C, Banchereau J, Liu YJ. Germinal center founder cells display propensity for apoptosis before onset of somatic mutation. *J Exp Med*. 1997;185: 563–571.
3. Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, Mackay F, Brink R. Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol*. 2010;11: 681–688. doi:10.1038/ni.1900
4. Péron S, Laffleur B, Denis-Lagache N, Cook-Moreau J, Tinguely A, Delpy L, et al. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science*. 2012;336: 931–934. doi:10.1126/science.1218692
5. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, et al. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol*. 2011;110: 27–70. doi:10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8
6. Cogné M, Lansford R, Bottaro A, Zhang J, Gorman J, Young F, et al. A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell*. 1994;77: 737–747.
7. Pinaud E, Khamlichi AA, Le Morvan C, Drouet M, Nalesso V, Le Bert M, et al. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity*. 2001;15: 187–199.
8. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, et al. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J Exp Med*. 2013;210: 1501–1507. doi:10.1084/jem.20130072
9. Saintamand A, Rouaud P, Saad F, Rios G, Cogné M, Denizot Y. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat Commun*. 2015;6: 7084. doi:10.1038/ncomms8084
10. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, et al. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood*. 2010;116: 1895–1898. doi:10.1182/blood-2010-01-264689
11. Le Noir S, Laffleur B, Carrion C, Garot A, Lecardeur S, Pinaud E, et al. The IgH locus 3' cis-regulatory super-enhancer co-opts AID for allelic transvection. *Oncotarget*. 2017; doi:10.18632/oncotarget.14585
12. Chauveau C, Cogné M. Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat Genet*. 1996;14: 15–16. doi:10.1038/ng0996-15
13. Chauveau C, Pinaud E, Cogne M. Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur J Immunol*. 1998;28: 3048–3056. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3048::AID-IMMU3048>3.0.CO;2-V
14. Saintamand A, Vincent-Fabert C, Garot A, Rouaud P, Oruc Z, Magnone V, et al. Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy-chain 3' regulatory region. *Nat Commun*. 2016;7: 10730. doi:10.1038/ncomms10730
15. Le Noir S, Boyer F, Lecardeur S, Brousse M, Oruc Z, Cook-Moreau J, et al. Functional anatomy of the immunoglobulin heavy chain 3' super-enhancer needs not only core enhancer elements but also their unique DNA context. *Nucleic Acids Res*. 2017;45: 5829–5837. doi:10.1093/nar/gkx203

16. Pinaud E, Aupetit C, Chauveau C, Cogné M. Identification of a homolog of the C alpha 3'/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH/hs1,2 enhancer downstream of the human immunoglobulin alpha 1 gene. *Eur J Immunol.* 1997;27: 2981–2985. doi:10.1002/eji.1830271134
17. Mills FC, Harindranath N, Mitchell M, Max EE. Enhancer complexes located downstream of both human immunoglobulin Calpha genes. *J Exp Med.* 1997;186: 845–858.
18. Duquette ML, Handa P, Vincent JA, Taylor AF, Maizels N. Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev.* 2004;18: 1618–1629. doi:10.1101/gad.1200804
19. Qiao Q, Wang L, Meng F-L, Hwang JK, Alt FW, Wu H. AID Recognizes Structured DNA for Class Switch Recombination. *Mol Cell.* 2017;67: 361-373.e4. doi:10.1016/j.molcel.2017.06.034
20. Caron G, Hussein M, Kulis M, Delaloy C, Chatonnet F, Pignarre A, et al. Cell-Cycle-Dependent Reconfiguration of the DNA Methylome during Terminal Differentiation of Human B Cells into Plasma Cells. *Cell Reports.* 2015;13: 1059–1071. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.051
21. Caron G, Le Gallou S, Lamy T, Tarte K, Fest T. CXCR4 expression functionally discriminates centroblasts versus centrocytes within human germinal center B cells. *J Immunol.* 2009;182: 7595–7602. doi:10.4049/jimmunol.0804272
22. Boyer F, Boutouil H, Dalloul I, Dalloul Z, Cook-Moreau J, Aldigier J-C, et al. CSReport: A New Computational Tool Designed for Automatic Analysis of Class Switch Recombination Junctions Sequenced by High-Throughput Sequencing. *J Immunol.* 2017;198: 4148–4155. doi:10.4049/jimmunol.1601924
23. Bedrat A, Lacroix L, Mergny J-L. Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: 1746–1759. doi:10.1093/nar/gkw006
24. Khamlichi AA, Glaudet F, Oruc Z, Denis V, Le Bert M, Cogné M. Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood.* 2004;103: 3828–3836. doi:10.1182/blood-2003-10-3470
25. Zhang ZZ, Pannunzio NR, Hsieh C-L, Yu K, Lieber MR. The role of G-density in switch region repeats for immunoglobulin class switch recombination. *Nucleic Acids Res.* 2014;42: 13186–13193. doi:10.1093/nar/gku1100
26. Vallur AC, Maizels N. Activities of human exonuclease 1 that promote cleavage of transcribed immunoglobulin switch regions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105: 16508–16512. doi:10.1073/pnas.0805327105
27. Dalloul Z, Chenuet P, Dalloul I, Boyer F, Aldigier J-C, Laffleur B, et al. G-quadruplex DNA targeting alters class-switch recombination in B cells and attenuates allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; doi:10.1016/j.jaci.2018.06.011
28. Ribeiro de Almeida C, Dhir S, Dhir A, Moghaddam AE, Sattentau Q, Meinhart A, et al. RNA Helicase DDX1 Converts RNA G-Quadruplex Structures into R-Loops to Promote IgH Class Switch Recombination. *Mol Cell.* 2018;70: 650-662.e8. doi:10.1016/j.molcel.2018.04.001
29. al GC et. Tissue distribution and dependence of responsiveness of human antigen-specific memory B cells. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 4 Aug 2018]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/insb.bib.cnrs.fr/pubmed/24567530>
30. Gadol N, Peacock MA, Ault KA. Antigenic phenotype and functional characterization of human tonsil B cells. *Blood.* 1988;71: 1048–1055.

31. Rouaud P, Saintamand A, Saad F, Carrion C, Lecardeur S, Cogné M, et al. Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region. *J Exp Med*. 2014;211: 975–985. doi:10.1084/jem.20131385

Références bibliographiques

- Akahori, Y., and Kurosawa, Y. (1997). Nucleotide Sequences of All the γ Gene Loci of Murine Immunoglobulin Heavy Chains. *Genomics* *41*, 100–104.
- Akamatsu, Y., and Oettinger, M.A. (1998). Distinct roles of RAG1 and RAG2 in binding the V(D)J recombination signal sequences. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 4670–4678.
- Alessandrini, A., and Desiderio, S.V. (1991). Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol. Cell. Biol.* *11*, 2096–2107.
- Almejun, M.B., and Borge, M. (2017). Somatic Hypermutation Defects in Common Variable Immune Deficiency. *Curr Allergy Asthma Rep* *17*, 76.
- Ameratunga, R., Woon, S.-T., Gillis, D., Koopmans, W., and Steele, R. (2013). New diagnostic criteria for common variable immune deficiency (CVID), which may assist with decisions to treat with intravenous or subcutaneous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol* *174*, 203–211.
- Bahjat, M., and Guikema, J.E.J. (2017). The Complex Interplay between DNA Injury and Repair in Enzymatically Induced Mutagenesis and DNA Damage in B Lymphocytes. *Int J Mol Sci* *18*.
- Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* *109 Suppl*, S45-55.
- Bébin, A.-G., Carrion, C., Marquet, M., Cogné, N., Lecardeur, S., Cogné, M., and Pinaud, E. (2010). In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol.* *184*, 3710–3717.
- Belkina, A.C., Nikolajczyk, B.S., and Denis, G.V. (2013). BET protein function is required for inflammation: Brd2 genetic disruption and BET inhibitor JQ1 impair mouse macrophage inflammatory responses. *J. Immunol.* *190*, 3670–3678.
- Bensmana, M., Huck, S., Lefranc, G., and Lefranc, M.P. (1988). The human immunoglobulin pseudo-gamma IGHGP gene shows no major structural defect. *Nucleic Acids Res* *16*, 3108.
- Bid, H.K., and Kerk, S. (2016). BET bromodomain inhibitor (JQ1) and tumor angiogenesis. *Oncoscience* *3*, 316–317.
- Blumberg, R.S., Lillicrap, D., and IgG Fc Immune Tolerance Group (2018). Tolerogenic properties of the Fc portion of IgG and its relevance to the treatment and management of hemophilia. *Blood* *131*, 2205–2214.
- Bottaro, A., Young, F., Chen, J., Serwe, M., Sablitzky, F., and Alt, F.W. (1998). Deletion of the IgH intronic enhancer and associated matrix-attachment regions decreases, but does not abolish, class switching at the mu locus. *Int. Immunol.* *10*, 799–806.
- Bruhns, P. (2012). Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* *119*, 5640–5649.
- Bruhns, P., Iannascoli, B., England, P., Mancardi, D.A., Fernandez, N., Jorieux, S., and Daéron, M. (2009). Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood* *113*, 3716–3725.

van der Burg, M., Tümkaya, T., Boerma, M., de Bruin-Versteeg, S., Langerak, A.W., and van Dongen, J.J. (2001). Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. *Blood* 97, 1001–1008.

Cantaert, T., Schickel, J.-N., Bannock, J.M., Ng, Y.-S., Massad, C., Oe, T., Wu, R., Lavoie, A., Walter, J.E., Notarangelo, L.D., et al. (2015). Activation-Induced Cytidine Deaminase Expression in Human B Cell Precursors Is Essential for Central B Cell Tolerance. *Immunity* 43, 884–895.

Capron, M., and Capron, A. (1994). Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. *Science* 264, 1876–1877.

Cerutti, A. (2008). The regulation of IgA class switching. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 421–434.

Chauveau, C., and Cogné, M. (1996). Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat. Genet.* 14, 15–16.

Chen, K., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N.W., Bengtén, E., Edholm, E.-S., Santini, P.A., Rath, P., Chiu, A., et al. (2009). Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* 10, 889–898.

Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* 8, 463–470.

Cogné, M., Dalloul, I., Boyer, F., Dalloul, Z., Pignarre, A., Lacombe, G., Fest, Th., Chatonnet, F., Delaloy, C., Durandy, A., et al. (2018). Locus Suicide Recombination actively occurs on the functionally rearranged IgH allele in B-cells from inflamed human lymphoid tissues. *BioRxiv* 430215.

Conley, M.E., and Koopman, W.J. (1983). Serum IgA1 and IgA2 in normal adults and patients with systemic lupus erythematosus and hepatic disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 26, 390–397.

Cookson, J.C., Heald, R.A., and Stevens, M.F.G. (2005). Antitumor Polycyclic Acridines. 17. Synthesis and Pharmaceutical Profiles of Pentacyclic Acridinium Salts Designed To Destabilize Telomeric Integrity. *J. Med. Chem.* 48, 7198–7207.

Cree, S.L., and Kennedy, M.A. (2014). Relevance of G-quadruplex structures to pharmacogenetics. *Front Pharmacol* 5, 160.

Czajkowsky, D.M., and Shao, Z. (2009). The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14960–14965.

D'Addabbo, P., Scascitelli, M., Giambra, V., Rocchi, M., and Frezza, D. (2011). Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1.2 within the palindrome of IgH 3'Regulatory Region. *BMC Evol. Biol.* 11, 71.

Dal Porto, J.M., Gauld, S.B., Merrell, K.T., Mills, D., Pugh-Bernard, A.E., and Cambier, J. (2004). B cell antigen receptor signaling 101. *Mol. Immunol.* 41, 599–613.

De Cian, A., Guittat, L., Kaiser, M., Saccà, B., Amrane, S., Bourdoncle, A., Alberti, P., Teulade-Fichou, M.-P., Lacroix, L., and Mergny, J.-L. (2007). Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. *Methods* 42, 183–195.

Delmore, J.E., Issa, G.C., Lemieux, M.E., Rahl, P.B., Shi, J., Jacobs, H.M., Kastiris, E., Gilpatrick, T., Paranal, R.M., Qi, J., et al. (2011). BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell* 146, 904–917.

Deniz, Y.M., and Gupta, N. (2005). Safety and tolerability of omalizumab (Xolair), a recombinant humanized monoclonal anti-IgE antibody. *Clin Rev Allergy Immunol* 29, 31–48.

Descatoire, M., Weller, S., Irtan, S., Sarnacki, S., Feuillard, J., Storck, S., Guiochon-Mantel, A., Bouligand, J., Morali, A., Cohen, J., et al. (2014). Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties. *J. Exp. Med.* 211, 987–1000.

Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 1–22.

DiMenna, L.J., and Chaudhuri, J. Regulating infidelity: RNA-mediated recruitment of AID to DNA during class switch recombination. *European Journal of Immunology* 46, 523–530.

Drygin, D., Siddiqui-Jain, A., O'Brien, S., Schwaebe, M., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C.B., Proffitt, C., Trent, K., Whitten, J.P., et al. (2009). Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res.* 69, 7653–7661.

Duchez, S., Amin, R., Cogne, N., Delpy, L., Sirac, C., Pascal, V., Corthesy, B., and Cogne, M. (2010). Premature replacement of with immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 3064–3069.

Dunn-Walters, D.K., Isaacson, P.G., and Spencer, J. (1995). Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J. Exp. Med.* 182, 559–566.

Duquette, M.L., Handa, P., Vincent, J.A., Taylor, A.F., and Maizels, N. (2004). Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev.* 18, 1618–1629.

Ehrenstein, M.R., and Notley, C.A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 778–786.

Ernst, P., and Smale, S.T. (1995). Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* 2, 427–438.

Esplin, B.L., Welner, R.S., Zhang, Q., Borghesi, L.A., and Kincade, P.W. (2009). A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 5773–5778.

Featherstone, K., Wood, A.L., Bowen, A.J., and Corcoran, A.E. (2010). The mouse immunoglobulin heavy chain V-D intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V(D)J recombination. *J. Biol. Chem.* 285, 9327–9338.

Fellah, J.S., Wiles, M.V., Charlemagne, J., and Schwager, J. (1992). Evolution of vertebrate IgM: complete amino acid sequence of the constant region of *Ambystoma mexicanum* mu chain deduced from cDNA sequence. *Eur. J. Immunol.* 22, 2595–2601.

Ferrante, A., Beard, L.J., and Feldman, R.G. (1990). IgG subclass distribution of antibodies to bacterial and viral antigens. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9, S16-24.

Fugmann, S.D. (2001). RAG1 and RAG2 in V(D)J recombination and transposition. *Immunol. Res.* 23, 23–39.

Fujisawa, T., and Filippakopoulos, P. (2017). Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 246–262.

Gao, F., Yang, Y., Wang, Z., Gao, X., and Zheng, B. (2015). BRAD4 plays a critical role in germinal center response by regulating Bcl-6 and NF- κ B activation. *Cell. Immunol.* 294, 1–8.

Garrett, F.E., Emelyanov, A.V., Sepulveda, M.A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L.A., Lobanenko, V.V., and Birshtein, B.K. (2005). Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1511–1525.

Gilgunn, S., Millán Martín, S., Wormald, M.R., Zapatero-Rodríguez, J., Conroy, P.J., O'Kennedy, R.J., Rudd, P.M., and Saldo, R. (2016). Comprehensive N-Glycan Profiling of Avian Immunoglobulin Y. *PLoS ONE* 11, e0159859.

Gillis, C., Gouel-Chéron, A., Jönsson, F., and Bruhns, P. (2014). Contribution of Human Fc γ Rs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Front Immunol* 5.

Girelli Zubani, G., Zivojnovic, M., De Smet, A., Albagli-Curiel, O., Huetz, F., Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., and Storck, S. (2017). Pms2 and uracil-DNA glycosylases act jointly in the mismatch repair pathway to generate Ig gene mutations at A-T base pairs. *J. Exp. Med.* 214, 1169–1180.

Giudicelli, V., Chaume, D., and Lefranc, M.-P. (2005). IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res.* 33, D256–261.

Gowan, S.M., Heald, R., Stevens, M.F., and Kelland, L.R. (2001). Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Mol. Pharmacol.* 60, 981–988.

Guo, Q., Lu, M., Marky, L.A., and Kallenbach, N.R. (1992). Interaction of the dye ethidium bromide with DNA containing guanine repeats. *Biochemistry* 31, 2451–2455.

Gutzeit, C., Magri, G., and Cerutti, A. (2014). Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev* 260, 76–85.

Hanson, Q.M., and Barb, A.W. (2015). A perspective on the structure and receptor binding properties of immunoglobulin G Fc. *Biochemistry* 54, 2931–2942.

Hardy, R.R., Kincade, P.W., and Dorshkind, K. (2007). The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* 26, 703–714.

Herzog, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 195–205.

Hoogsteen, K. (1963). The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Cryst, Acta Crystallogr* 16, 907–916.

Ichii, M., Oritani, K., and Kanakura, Y. (2014). Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse. *World J Stem Cells* 6, 421–431.

Ishioka, N., Takahashi, N., and Putnam, F.W. (1987). Analysis of the mechanism, rate, and sites of proteolytic cleavage of human immunoglobulin D by high-pressure liquid chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *84*, 61–65.

Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* *313*, 670–673.

Karasuyama, H., Rolink, A., and Melchers, F. (1993). A complex of glycoproteins is associated with VpreB/lambda 5 surrogate light chain on the surface of mu heavy chain-negative early precursor B cell lines. *J. Exp. Med.* *178*, 469–478.

Karnowski, A., Achatz-Straussberger, G., Klockenbusch, C., Achatz, G., and Lamers, M.C. (2006). Inefficient processing of mRNA for the membraneform of IgE is a genetic mechanism to limit recruitment of IgE-secreting cells. *European Journal of Immunology* *36*, 1917–1925.

Khamlichi, A.A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Bert, M.L., and Cogné, M. (2004). Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any Sμ tandem repeat. *Blood* *103*, 3828–3836.

Klein, U., and Dalla-Favera, R. (2008). Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 22–33.

Klimovich, V.B. (2011). IgM and its receptors: structural and functional aspects. *Biochemistry Mosc.* *76*, 534–549.

Klonowski, K.D., and Monestier, M. (2000). Heavy chain revision in MRL mice: a potential mechanism for the development of autoreactive B cell precursors. *J. Immunol.* *165*, 4487–4493.

Klonowski, K.D., Primiano, L.L., and Monestier, M. (1999). Atypical VH-D-JH rearrangements in newborn autoimmune MRL mice. *J. Immunol.* *162*, 1566–1572.

Kovalchuk, A.L., Qi, C.F., Torrey, T.A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S.S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoernagel, K., Polack, A., et al. (2000). Burkitt lymphoma in the mouse. *J. Exp. Med.* *192*, 1183–1190.

Krangel, M.S. (2003). Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nat. Immunol.* *4*, 624–630.

Kucuksezer, U.C., Ozdemir, C., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2013). Mechanisms of immune tolerance to allergens in children. *Korean J Pediatr* *56*, 505–513.

Kumar, R., DiMenna, L., Schrode, N., Liu, T.-C., Franck, P., Muñoz-Descalzo, S., Hadjantonakis, A.-K., Zarrin, A.A., Chaudhuri, J., Elemento, O., et al. (2013). AID stabilizes stem-cell phenotype by removing epigenetic memory of pluripotency genes. *Nature* *500*, 89–92.

Kunimoto, H., McKenney, A.S., Meydan, C., Shank, K., Nazir, A., Rapaport, F., Durham, B., Garrett-Bakelman, F.E., Pronier, E., Shih, A.H., et al. (2017). AID is a key regulator of myeloid/erythroid differentiation and DNA methylation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* *129*, 1779–1790.

Laffleur, B., Duchez, S., Tarte, K., Denis-Lagache, N., Péron, S., Carrion, C., Denizot, Y., and Cogné, M. (2015). Self-Restrained B Cells Arise following Membrane IgE Expression. *Cell Reports* *10*, 900–909.

Laffleur, B., Debeaupuis, O., Dalloul, Z., and Cogné, M. (2017). B Cell Intrinsic Mechanisms Constraining IgE Memory. *Front Immunol* *8*.

Lagah, S., Tan, I.-L., Radhakrishnan, P., Hirst, R.A., Ward, J.H., O'Callaghan, C., Smith, S.J., Stevens, M.F.G., Grundy, R.G., and Rahman, R. (2014). RHPS4 G-Quadruplex Ligand Induces Anti-Proliferative Effects in Brain Tumor Cells. *PLoS One* 9.

Leduc, I., Drouet, M., Bodinier, M.C., Helal, A., and Cogné, M. (1997). Membrane isoforms of human immunoglobulins of the A1 and A2 isotypes: structural and functional study. *Immunology* 90, 330–336.

Leonetti, C., Amodei, S., D'Angelo, C., Rizzo, A., Benassi, B., Antonelli, A., Elli, R., Stevens, M.F.G., D'Incalci, M., Zupi, G., et al. (2004). Biological activity of the G-quadruplex ligand RHPS4 (3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8H-quino[4,3,2-kl]acridinium methosulfate) is associated with telomere capping alteration. *Mol. Pharmacol.* 66, 1138–1146.

Leonetti, C., Scarsella, M., Riggio, G., Rizzo, A., Salvati, E., D'Incalci, M., Staszewsky, L., Frapolli, R., Stevens, M.F., Stoppacciaro, A., et al. (2008). G-quadruplex ligand RHPS4 potentiates the antitumor activity of camptothecins in preclinical models of solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 14, 7284–7291.

Lewis, S.M. (1994). P nucleotides, hairpin DNA and V(D)J joining: making the connection. *Semin. Immunol.* 6, 131–141.

Liu, D., Lin, P., Hu, Y., Zhou, Y., Tang, G., Powers, L., Medeiros, L.J., Jorgensen, J.L., and Wang, S.A. (2012). Immunophenotypic heterogeneity of normal plasma cells: comparison with minimal residual plasma cell myeloma. *J. Clin. Pathol.* 65, 823–829.

Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., and Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* 190, 75–89.

Lopes-Carvalho, T., and Kearney, J.F. (2004). Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* 197, 192–205.

Lübben, W., Turqueti-Neves, A., Okhrimenko, A., Stöberl, C., Schmidt, V., Pfeffer, K., Dehnert, S., Wünsche, S., Storsberg, S., Paul, S., et al. (2013). IgE knock-in mice suggest a role for high levels of IgE in basophil-mediated active systemic anaphylaxis. *Eur. J. Immunol.* 43, 1231–1242.

Luger, E.O., Wegmann, M., Achatz, G., Worm, M., Renz, H., and Radbruch, A. (2010). Allergy for a lifetime? *Allergol Int* 59, 1–8.

Luning Prak, E.T., Monestier, M., and Eisenberg, R.A. (2011). B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1217, 96–121.

Lycke, N., Erlandsson, L., Ekman, L., Schön, K., and Leanderson, T. (1999). Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. *J. Immunol.* 163, 913–919.

Maizels, N., and Gray, L.T. (2013a). The G4 Genome. *PLOS Genetics* 9, e1003468.

Maizels, N., and Gray, L.T. (2013b). The G4 genome. *PLoS Genet.* 9, e1003468.

Maki, R., Roeder, W., Traunecker, A., Sidman, C., Wabl, M., Raschke, W., and Tonegawa, S. (1981). The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* 24, 353–365.

Malu, S., Malshetty, V., Francis, D., and Cortes, P. (2012). Role of non-homologous end joining in V(D)J recombination. *Immunol. Res.* 54, 233–246.

- Marichal, T., Starkl, P., Reber, L.L., Kalesnikoff, J., Oettgen, H.C., Tsai, M., Metz, M., and Galli, S.J. (2013). A Beneficial Role for Immunoglobulin E in Host Defense against Honeybee Venom. *Immunity* 39, 963–975.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 195–201.
- Merrell, K.T., Benschop, R.J., Gauld, S.B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wysocki, L.J., and Cambier, J.C. (2006). Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* 25, 953–962.
- Mirkin, S.M. (2001). DNA Topology: Fundamentals. In *ELS*, (American Cancer Society), p.
- Misaghi, S., Senger, K., Sai, T., Qu, Y., Sun, Y., Hamidzadeh, K., Nguyen, A., Jin, Z., Zhou, M., Yan, D., et al. (2013). Polyclonal hyper-IgE mouse model reveals mechanistic insights into antibody class switch recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 15770–15775.
- Monticelli, S., and Vercelli, D. (2001). Molecular regulation of class switch recombination to IgE through epsilon germline transcription. *Allergy* 56, 270–278.
- Mujtaba, S., Zeng, L., and Zhou, M.-M. (2007). Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* 26, 5521–5527.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563.
- Muvva, C., Singam, E.R.A., Raman, S.S., and Subramanian, V. (2014). Structure-based virtual screening of novel, high-affinity BRD4 inhibitors. *Mol Biosyst* 10, 2384–2397.
- Niir, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 945–956.
- Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 34–47.
- Ntranos, A., and Casaccia, P. (2016). Bromodomains: Translating the words of lysine acetylation into myelin injury and repair. *Neurosci. Lett.* 625, 4–10.
- Nutt, S.L., Thévenin, C., and Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology* 198, 227–235.
- Oancea, A.E., Berru, M., and Shulman, M.J. (1997). Expression of the (recombinant) endogenous immunoglobulin heavy-chain locus requires the intronic matrix attachment regions. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2658–2668.
- Odegard, V.H., and Schatz, D.G. (2006). Targeting of somatic hypermutation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 573–583.
- Otero, D.C., and Rickert, R.C. (2003). CD19 function in early and late B cell development. II. CD19 facilitates the pro-B/pre-B transition. *J. Immunol.* 171, 5921–5930.
- Owen, D.J., Ornaghi, P., Yang, J.C., Lowe, N., Evans, P.R., Ballario, P., Neuhaus, D., Filetici, P., and Travers, A.A. (2000). The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p. *EMBO J.* 19, 6141–6149.

Ozdemir, C., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2009). T regulatory cells and their counterparts: masters of immune regulation. *Clin. Exp. Allergy* 39, 626–639.

Pabst, O. (2012). New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 821–832.

Paeschke, K., Simonsson, T., Postberg, J., Rhodes, D., and Lipps, H.J. (2005). Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 847–854.

Palm, N.W., Rosenstein, R.K., Yu, S., Schenten, D.D., Florsheim, E., and Medzhitov, R. (2013). Bee Venom Phospholipase A2 Induces a Primary Type 2 Response that Is Dependent on the Receptor ST2 and Confers Protective. *Immunity* 39, 976–985.

Pavlicek, J.W., Lyubchenko, Y.L., and Chang, Y. (2008). Quantitative analyses of RAG-RSS interactions and conformations revealed by atomic force microscopy. *Biochemistry* 47, 11204–11211.

Pawlitzy, I., Angeles, C.V., Siegel, A.M., Stanton, M.L., Riblet, R., and Brodeur, P.H. (2006). Identification of a Candidate Regulatory Element within the 5' Flanking Region of the Mouse Igh Locus Defined by Pro-B Cell-Specific Hypersensitivity Associated with Binding of PU.1, Pax5, and E2A. *The Journal of Immunology* 176, 6839–6851.

Pelayo, R., Dorantes-Acosta, E., Vadillo, E., and Fuentes-Pananá, E. (2012). From HSC to B-Lymphoid Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis. (*Advances in Hematopoietic Stem Cell Research*), p.

Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., and Cogné, M. (2012). AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 336, 931–934.

Phatak, P., Cookson, J.C., Dai, F., Smith, V., Gartenhaus, R.B., Stevens, M.F.G., and Burger, A.M. (2007). Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHPS4 inhibits clonogenic tumour cell growth in vitro and in vivo consistent with a cancer stem cell targeting mechanism. *Br. J. Cancer* 96, 1223–1233.

Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 959–971.

Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 767–777.

Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M., and Cogné, M. (2001). Localization of the 3' IgH Locus Elements that Effect Long-Distance Regulation of Class Switch Recombination. *Immunity* 15, 187–199.

Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., and Cogné, M. (2011). The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110, 27–70.

Qiao, Q., Wang, L., Meng, F.-L., Hwang, J.K., Alt, F.W., and Wu, H. (2017). AID Recognizes Structured DNA for Class Switch Recombination. *Mol. Cell* 67, 361-373.e4.

Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeledou, R., Gennery, A., et al. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID)

deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565–575.

Reynaud, C.-A., Descatoire, M., Dogan, I., Huetz, F., Weller, S., and Weill, J.-C. (2012). IgM memory B cells: a mouse/human paradox. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1625–1634.

Rhodes, D., and Lipps, H.J. (2015). G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res.* 43, 8627–8637.

Ribeiro de Almeida, C., Dhir, S., Dhir, A., Moghaddam, A.E., Sattentau, Q., Meinhardt, A., and Proudfoot, N.J. (2018). RNA Helicase DDX1 Converts RNA G-Quadruplex Structures into R-Loops to Promote IgH Class Switch Recombination. *Mol. Cell* 70, 650-662.e8.

Rifai, A., Fadden, K., Morrison, S.L., and Chintalacharuvu, K.R. (2000). The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes. *J. Exp. Med.* 191, 2171–2182.

Rochereau, N., Drocourt, D., Perouzel, E., Pavot, V., Redelinghuys, P., Brown, G.D., Tiraby, G., Roblin, X., Verrier, B., Genin, C., et al. (2013). Dectin-1 is essential for reverse transcytosis of glycosylated SIgA-antigen complexes by intestinal M cells. *PLoS Biol.* 11, e1001658.

Rodgers, K.K. (2017). Riches in RAGs: Revealing the V(D)J Recombinase through High-Resolution Structures. *Trends Biochem. Sci.* 42, 72–84.

Roth, D.B., and Roth, S.Y. (2000). Unequal access: regulating V(D)J recombination through chromatin remodeling. *Cell* 103, 699–702.

Rouaud, P., Saintamand, A., Saad, F., Carrion, C., Lecardeur, S., Cogné, M., and Denizot, Y. (2014). Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region. *J. Exp. Med.* 211, 975–985.

Roux, K.H., Strelets, L., and Michaelsen, T.E. (1997). Flexibility of human IgG subclasses. *J. Immunol.* 159, 3372–3382.

Russell, D.M., Dembić, Z., Morahan, G., Miller, J.F., Bürki, K., and Nemazee, D. (1991). Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature* 354, 308–311.

Sadofsky, M.J. (2001). The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease. *Nucleic Acids Res* 29, 1399–1409.

Salvati, E., Leonetti, C., Rizzo, A., Scarsella, M., Mottolese, M., Galati, R., Sperduti, I., Stevens, M.F.G., D'Incalci, M., Blasco, M., et al. (2007). Telomere damage induced by the G-quadruplex ligand RHPS4 has an antitumor effect. *J. Clin. Invest.* 117, 3236–3247.

Schlissel, M., Constantinescu, A., Morrow, T., Baxter, M., and Peng, A. (1993). Double-strand signal sequence breaks in V(D)J recombination are blunt, 5'-phosphorylated, RAG-dependent, and cell cycle regulated. *Genes Dev.* 7, 2520–2532.

Schrader, C.E., Linehan, E.K., Mohegova, S.N., Woodland, R.T., and Stavnezer, J. (2005). Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J Exp Med* 202, 561–568.

Sen, D., and Gilbert, W. (1988). Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334, 364–366.

Shapiro-Shelef, M., and Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 230–242.

Sheppard, E.C., Morrish, R.B., Dillon, M.J., Leyland, R., and Chahwan, R. (2018). Epigenomic Modifications Mediating Antibody Maturation. *Front Immunol* 9, 355.

Shim, J.M., Lee, J.S., Russell, K.E., Wiegman, C.H., Barnes, P.J., Fear, D., Adcock, I.M., and Durham, A.L. (2017). BET proteins are a key component of immunoglobulin gene expression. *Epigenomics* 9, 393–406.

Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y., and Alt, F.W. (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat. Immunol.* 4, 435–441.

Smith, J.S., Chen, Q., Yatsunyk, L.A., Nicoludis, J.M., Garcia, M.S., Kranaster, R., Balasubramanian, S., Monchaud, D., Teulade-Fichou, M.-P., Abramowitz, L., et al. (2011). Rudimentary G-quadruplex-based telomere capping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 478–485.

Smith, K.G., Hewitson, T.D., Nossal, G.J., and Tarlinton, D.M. (1996). The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur. J. Immunol.* 26, 444–448.

Stall, A.M., Adams, S., Herzenberg, L.A., and Kantor, A.B. (1992). Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 651, 33–43.

Stanlie, A., Yousif, A.S., Akiyama, H., Honjo, T., and Begum, N.A. (2014). Chromatin reader Brd4 functions in Ig class switching as a repair complex adaptor of nonhomologous end-joining. *Mol. Cell* 55, 97–110.

Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2014). IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J. Immunol.* 193, 5370–5378.

Stavnezer, J., Guikema, J.E.J., and Schrader, C.E. (2008). Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 261–292.

Sugai, M., Gonda, H., Kusunoki, T., Katakai, T., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). Essential role of Id2 in negative regulation of IgE class switching. *Nat. Immunol.* 4, 25–30.

Sundquist, W.I., and Klug, A. (1989). Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* 342, 825–829.

Takahashi, N., Ueda, S., Obata, M., Nikaido, T., Nakai, S., and Honjo, T. (1982). Structure of human immunoglobulin gamma genes: implications for evolution of a gene family. *Cell* 29, 671–679.

Tarlinton, D. (2006). B-cell memory: are subsets necessary? *Nat. Rev. Immunol.* 6, 785–790.

Tomana, M., Kulhavy, R., and Mestecky, J. (1988). Receptor-mediated binding and uptake of immunoglobulin A by human liver. *Gastroenterology* 94, 762–770.

Toniolo, P.A., Liu, S., Yeh, J.E., Moraes-Vieira, P.M., Walker, S.R., Vafaizadeh, V., Barbuto, J.A.M., and Frank, D.A. (2015). Inhibiting STAT5 by the BET bromodomain inhibitor JQ1 disrupts human dendritic cell maturation. *J Immunol* 194, 3180–3190.

Tümkaya, T., van der Burg, M., Garcia Sanz, R., Gonzalez Diaz, M., Langerak, A.W., San Miguel, J.F., and van Dongen, J.J. (2001). Immunoglobulin lambda isotype gene rearrangements in B cell malignancies. *Leukemia* 15, 121–127.

Vafa, O., Gilliland, G.L., Brezski, R.J., Strake, B., Wilkinson, T., Lacy, E.R., Scallon, B., Teplyakov, A., Malia, T.J., and Strohl, W.R. (2014). An engineered Fc variant of an IgG eliminates all immune effector functions via structural perturbations. *Methods* 65, 114–126.

Vaidyanathan, B., and Chaudhuri, J. (2015). Epigenetic Codes Programing Class Switch Recombination. *Front Immunol* 6.

Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* 5, 520.

Waisman, A., Kraus, M., Seagal, J., Ghosh, S., Melamed, D., Song, J., Sasaki, Y., Classen, S., Lutz, C., Brombacher, F., et al. (2007). IgG1 B cell receptor signaling is inhibited by CD22 and promotes the development of B cells whose survival is less dependent on Igα/β. *J Exp Med* 204, 747–758.

Wang, X., Mathieu, M., and Brezski, R.J. (2018). IgG Fc engineering to modulate antibody effector functions. *Protein Cell* 9, 63–73.

Warr, G.W., Magor, K.E., and Higgins, D.A. (1995). IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* 16, 392–398.

Watson, J.D., and Crick, F.H.C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171, 737–738.

Watson, L.C., Moffatt-Blue, C.S., McDonald, R.Z., Kompfner, E., Ait-Azzouzene, D., Nemazee, D., Theofilopoulos, A.N., Kono, D.H., and Feeney, A.J. (2006). Paucity of V-D-D-J rearrangements and VH replacement events in lupus prone and nonautoimmune TdT^{-/-} and TdT^{+/+} mice. *J. Immunol.* 177, 1120–1128.

Woodford, K.J., Howell, R.M., and Usdin, K. (1994). A novel K(+)-dependent DNA synthesis arrest site in a commonly occurring sequence motif in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* 269, 27029–27035.

Woof, J.M. (2013). Immunoglobulin A: Molecular Mechanisms of Function and Role in Immune Defence. (Molecular and Cellular Mechanisms of Antibody Activity), p.

Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2004). IgA function--variations on a theme. *Immunology* 113, 175–177.

Woof, J.M., and Kerr, M.A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* 208, 270–282.

Wroblewski, M., Scheller-Wendorff, M., Udonta, F., Bauer, R., Schlichting, J., Zhao, L., Ben Batalla, I., Gensch, V., Päsler, S., Wu, L., et al. (2018). BET-inhibition by JQ1 promotes proliferation and self-renewal capacity of hematopoietic stem cells. *Haematologica*.

Wu, Y.L., Stubbington, M.J.T., Daly, M., Teichmann, S.A., and Rada, C. (2017). Intrinsic transcriptional heterogeneity in B cells controls early class switching to IgE. *J. Exp. Med.* 214, 183–196.

Xiao, X., Fan, Y., Li, J., Zhang, X., Lou, X., Dou, Y., Shi, X., Lan, P., Xiao, Y., Minze, L., et al. (2018). Guidance of super-enhancers in regulation of IL-9 induction and airway inflammation. *J. Exp. Med.* 215, 559–574.

Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 517–531.

Yaku, H., Fujimoto, T., Murashima, T., Miyoshi, D., and Sugimoto, N. (2012). Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications. *Chem. Commun. (Camb.)* **48**, 6203–6216.

Yang, D., and Okamoto, K. (2010). Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future Med Chem* **2**, 619–646.

YOSHIDA, K., MATSUOKA, M., USUDA, S., MORIT, A., ISHIZAKA, K., and SAKANO, H. (1990). Immunoglobulin switch circular DNA in the mouse infected with *Nippostrongylus brasiliensis*: Evidence for successive class switching from μ to E via ν . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **5**.

Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.-L., Wilson, T.E., and Lieber, M.R. (2003). R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.* **4**, 442–451.

Zan, H., Cerutti, A., Dramitinos, P., Schaffer, A., and Casali, P. (1998). CD40 Engagement Triggers Switching to IgA1 and IgA2 in Human B Cells Through Induction of Endogenous TGF- β : Evidence for TGF- β But Not IL-10-Dependent Direct $\mu \rightarrow \alpha$ and Sequential $\mu \rightarrow \gamma$, $\gamma \rightarrow \alpha$ DNA Recombination. *J Immunol* **161**, 5217–5225.

Zarrin, A.A., Alt, F.W., Chaudhuri, J., Stokes, N., Kaushal, D., Du Pasquier, L., and Tian, M. (2004). An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat. Immunol.* **5**, 1275–1281.

Zhang, K., Saxon, A., and Max, E.E. (1992). Two unusual forms of human immunoglobulin E encoded by alternative RNA splicing of epsilon heavy chain membrane exons. *J. Exp. Med.* **176**, 233–243.

Zhang, M., Srivastava, G., and Lu, L. (2004). The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell. Mol. Immunol.* **1**, 89–94.

Zhang, Z., Zhang, D., Liu, Y., Yang, D., Ran, F., Wang, M.L., and Zhao, G. (2018). Targeting Bruton's tyrosine kinase for the treatment of B cell associated malignancies and autoimmune diseases: Preclinical and clinical developments of small molecule inhibitors. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **351**, e1700369.

Zheng, S., Vuong, B.Q., Vaidyanathan, B., Lin, J.-Y., Huang, F.-T., and Chaudhuri, J. (2015). Non-coding RNA Generated following Lariat Debranching Mediates Targeting of AID to DNA. *Cell* **161**, 762–773.

Zou, X., Piper, T.A., Smith, J.A., Allen, N.D., Xian, J., and Brüggemann, M. (2003). Block in development at the pre-B-II to immature B cell stage in mice without Ig kappa and Ig lambda light chain. *J. Immunol.* **170**, 1354–1361.

Résumé

Résumé

Le processus de la commutation de classe ou commutation isotypique (CSR) des gènes d'immunoglobulines caractérise les cellules de la lignée B et implique principalement les régions switch précédant les gènes constants au sein du locus IgH. Des jonctions entre la région switch donneuse S μ et celle acceptrice S x sont créées pendant ce processus. Plusieurs études ont démontré que le destin des cellules de la lignée B était largement modulé en fonction de la classe de l'immunoglobuline qu'elles produisent et en particulier selon les signaux transmis par leur BCR (qui peuvent par exemple pour la classe IgE, comporter des signaux pro-apoptotiques). Nous avons utilisé plusieurs modèles visant à l'étude de la physiologie et de la mécanistique du switch vers différentes classes de BCR et d'immunoglobulines peu exprimées. Nous avons cherché à forcer l'expression de l'isotype IgA2 grâce à un modèle transgénique dédié, dans le but d'approfondir les spécificités du signal BCR transduit par cet isotype en comparaison avec le BCR IgA1. En outre, et d'une façon très intéressante, nous avons découvert l'existence (jusqu'ici ignorée et masquée par les 4 autres sous-classes plus abondantes) d'une cinquième sous-classe d'IgG humaine, l'IgG5 qui est codé par un gène jusqu'ici faussement classifié pseudo-gène. Ainsi nous avons étudié les modalités d'expression du gène correspondant après un switch non-canonique, le répertoire normal des IgG5, leur représentation parmi les IgG humaines monoclonales ainsi que leurs fonctions immunitaires grâce à un IgG5 fabriquée artificiellement portant une activité anti-CD20 humaine. Enfin, nous avons testé des produits pharmaceutiques (RHPS4 : stabilisant des structures G-quadruplex au niveau d'ADN et JQ1 : inhibiteur des facteurs de transcription à bromodomains), montrant leur capacité à retarder ou inhiber la commutation de classe in vitro mais aussi in vivo dans des souris allergiques.

Mots clés :

Cellules B, Immunoglobulines (Igs), commutation de classe (CSR), locus IgH, G-quadruplexe (G4), protéines de bromodomains.

Summary

The process of class switch recombination (CSR) or isotypic switching of immunoglobulin genes characterizes the B cell lineage and primarily involves switch regions preceding the constant genes within the IgH locus. Junctions between donor switch region S μ and acceptor S x are generated during this process. Several studies have shown that the fate of B cells is largely modulated according to the class of immunoglobulin they produce and in particular the signals transmitted by their BCR « for example for IgE, BCRs can combine proapoptotic signals. We used several relevant mouse models to study the physiological aspect and the B cell compartment after switching to IgA2 (a dedicated transgenic model expressing IgA2) since IgA2 conveys a membrane signal different from that of IgA1. In addition, we tested two pharmaceuticals drugs (RHPS4: stabilizer of G-quadruplex structures at the DNA level and JQ1: inhibitor of bromodomain proteins) showed their ability to delay or inhibit class switching towards IgE in vitro but also in vivo in allergic mice. Interestingly, we also demonstrated the existence (till now ignored and maybe masked by the other 4 more abundant IgG subclasses) of a fifth subclass of human IgG, IgG5 which is encoded by a gene classified as a pseudo-gene. We studied the expression modalities of the corresponding gene after a non-canonical switch, the normal IgG5 repertoire, their representation among the monoclonal human IgGs as well as their immune functions through an artificially synthesized IgG5 with human anti-CD20 activity.

Keywords:

B cells, immunoglobulins (Igs), class switching (CSR), IgH locus, G-quadruplex (G4), bromodomain proteins.