

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).

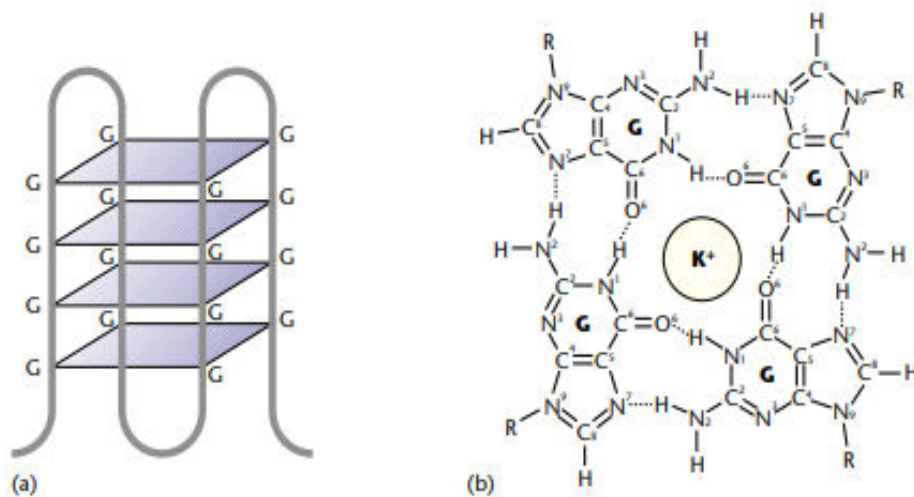


Figure 168: Représentation schématique d'un G-quartet.

- 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).

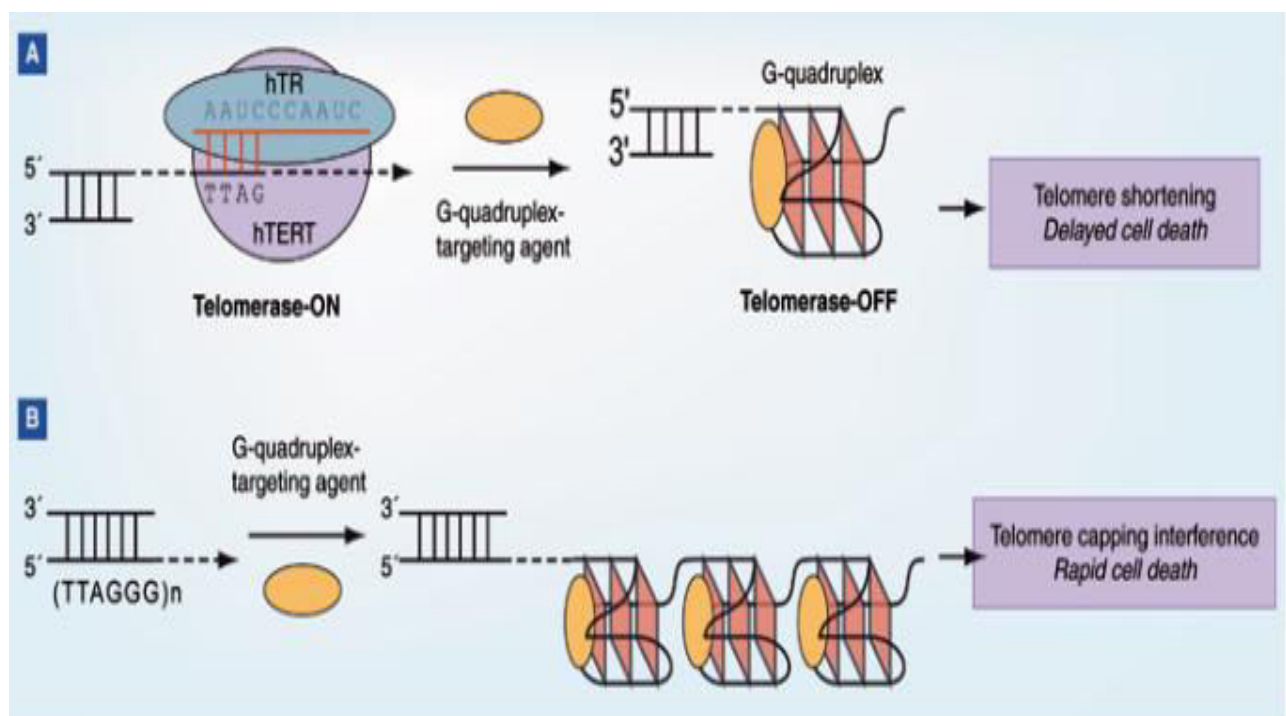


Figure 179: Les structures lors de la transcription de régions switch portant des motifs G4.

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).

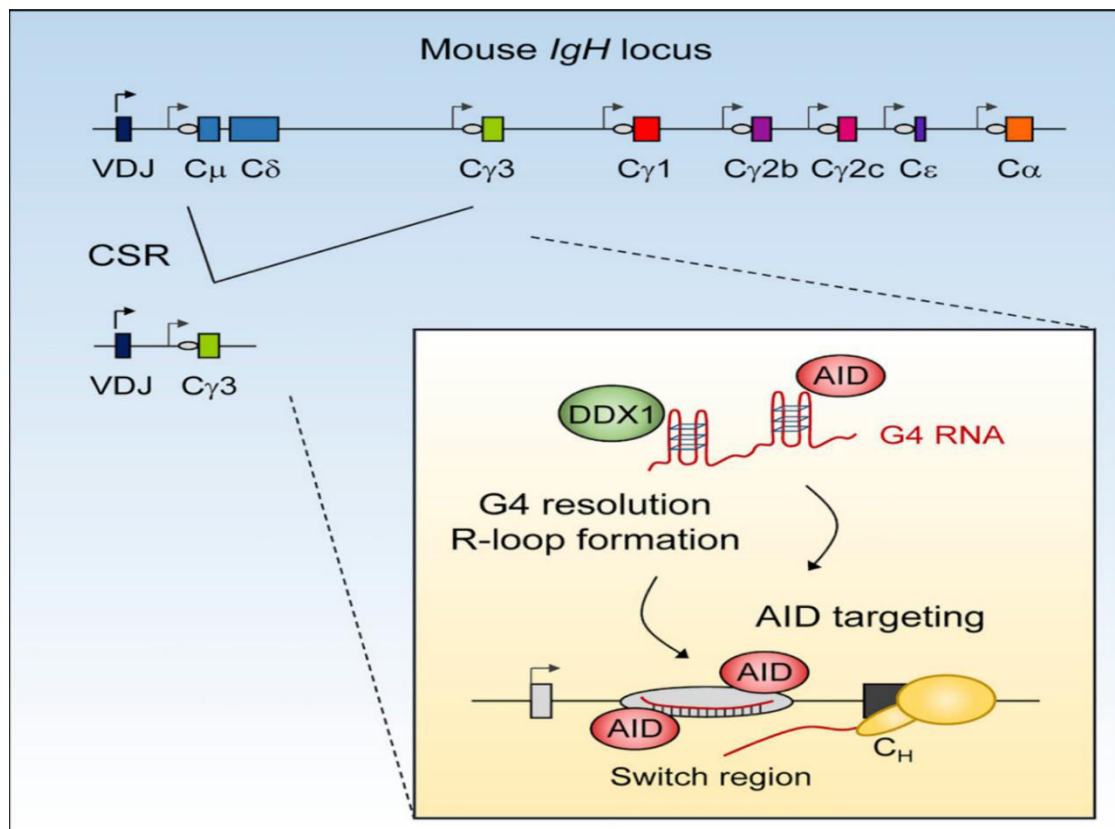


Figure 20: Les G4 au niveau du locus IgH.

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-quinolo[4,3,2-kl]acridinium méthosulfate. 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).

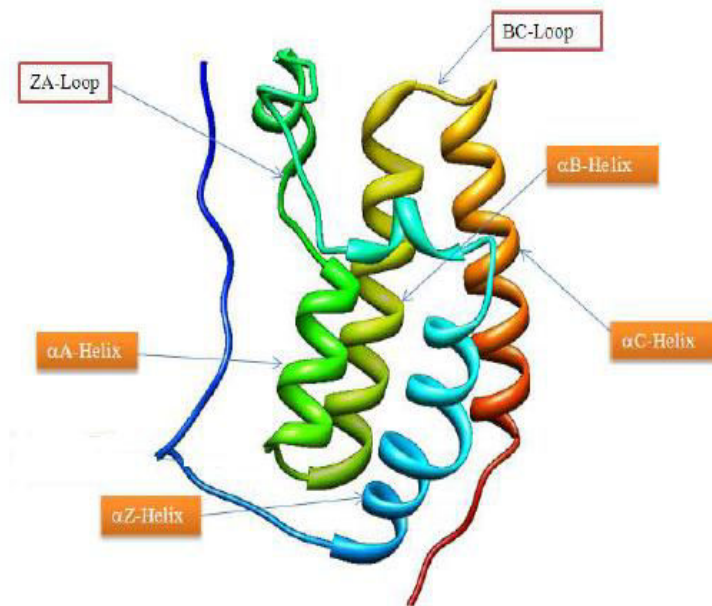


Figure 21: Représentation schématique de la structure d'un bromodomaine.

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 décompactation. 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 décompactation 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 bromodomains 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 bromodomains 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).

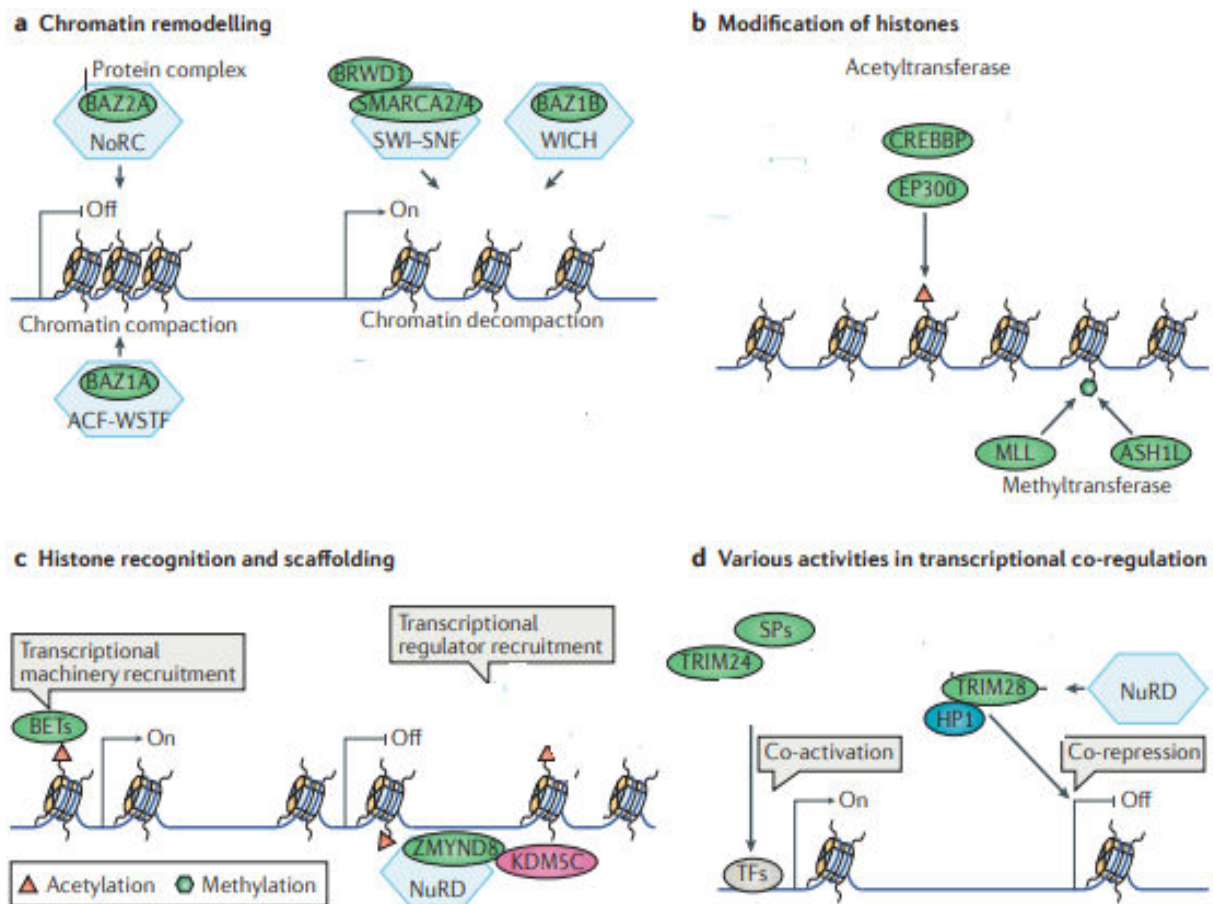


Figure 22: Rôles des bromodomaines dans la régulation des gènes.

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 bromodomains, 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 bromodomains (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 bromodomains. 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 immunomodulateur 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 preparation**).

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 lymphocytaires, 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*

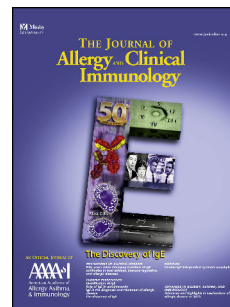
Received Date: 31 January 2018

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.

ACCEPTED MANUSCRIPT

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).

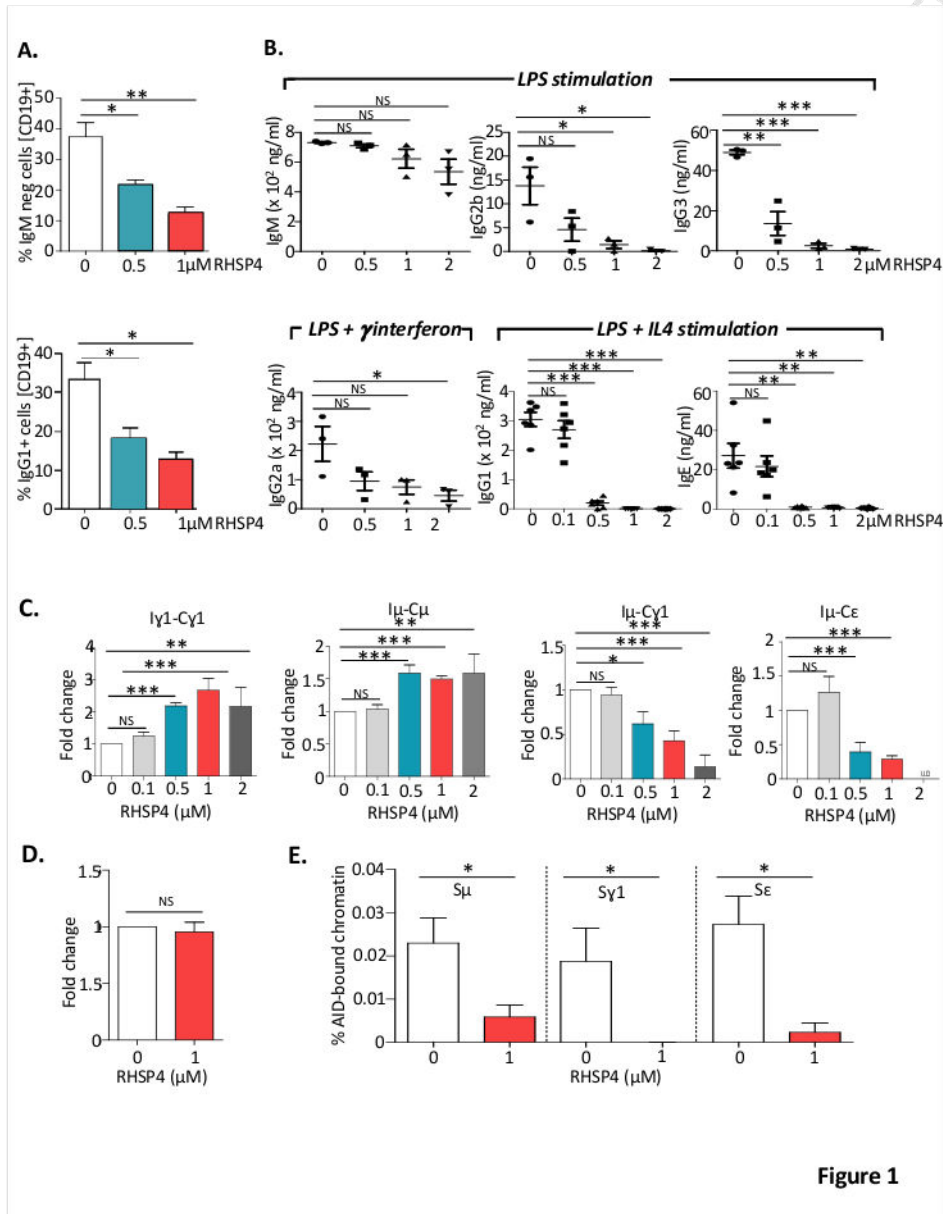


Figure 1

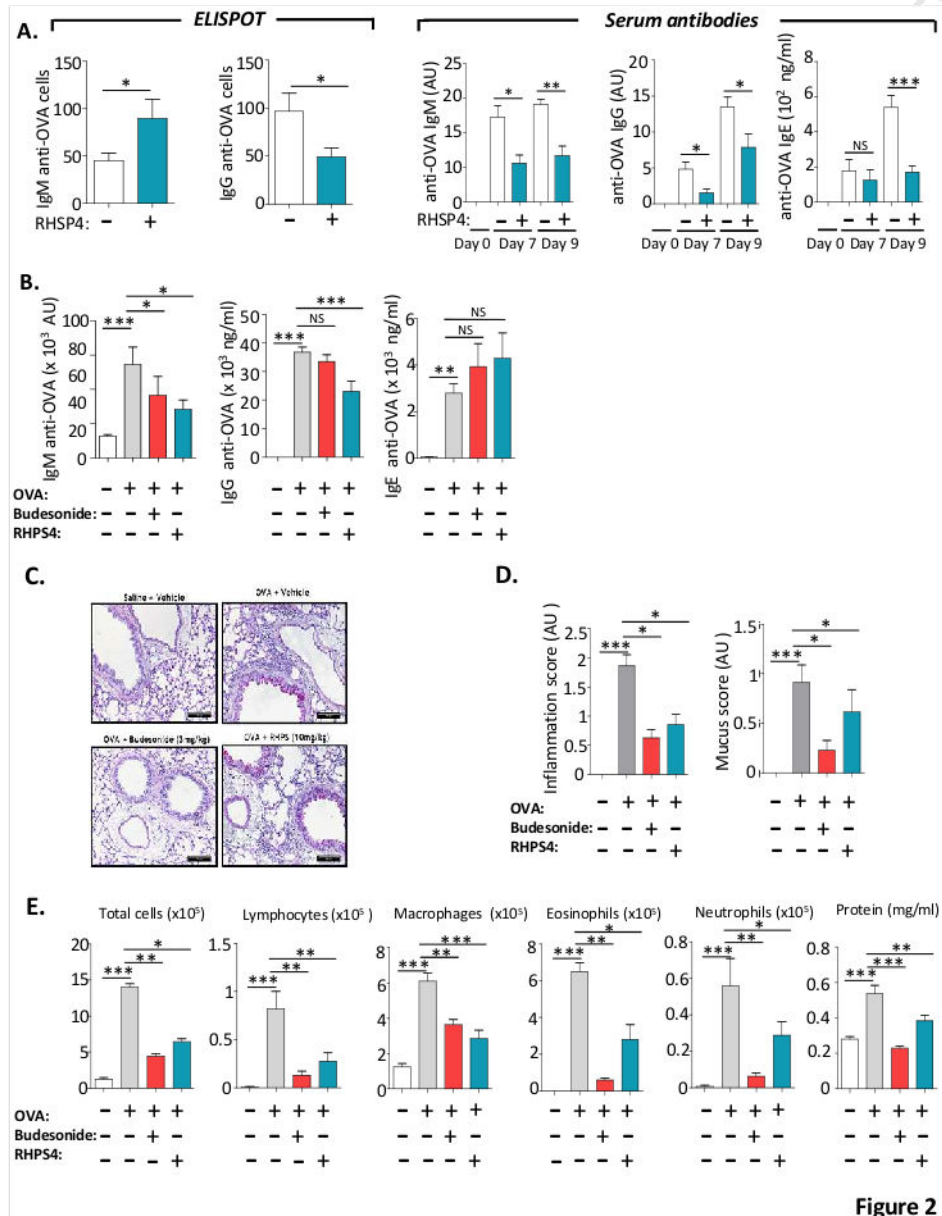


Figure 2

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 + IFN γ (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 RHPS4: 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 µM) 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 µg/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 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 of alkaline phosphatase-coupled anti-IgG or anti-IgM. After washing, 100 µL 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)

$I\mu$ - $C\mu$, and $I\gamma$ 1- $C\gamma$ 1 germline transcripts and $I\mu$ - $C\gamma$ 1, $I\mu$ - $C\epsilon$ 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 ($I\gamma$ 1 forward primer: 5' - GGCCCTTCCAGATCTTTGAG-3'; $C\gamma$ 1 reverse primer: 5' - ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCA-3'. $I\mu$ forward primer: 5' -ACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTT-3'. $C\mu$ reverse primer 5' -TCTGAACCTTCAAGGATGC TCTTG-3'. $C\epsilon$ 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 S μ , S γ 1 and S ϵ used the following primers:

- S μ Fw: 5'-TCTAAAATGCGCTAAACTGAGG-3'

- S μ Rev: 5'-AGCGTAGCATAGCTGAGCTC -3'
- S γ 1Fw: 5'-GGGGGAGGAGATATCCAAGA -3'
- S γ 1Rev: 5'-CAGCTCTTTTGCAGGTCTTG-3'
- S ϵ Fw: 5'-CTTGACCACCGAATGTCCTT -3'
- S ϵ Rev: 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 μ g ovalbumin grade V (Sigma France) emulsified in 2 mg aluminium hydroxide gel in a total volume of 200 μ L. For control mice, 200 μ L saline was injected.

Mice were challenged at days 21-24 with 10 μ g 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% H_2O_2). 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.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 μM 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 μM RHPS4. Data represent mean % cells ± 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 ± 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 μM (hatched bars) and 2 μM (grey bars) concentrations, in the absence ("0") or presence of various oligonucleotides (1 μM) 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 S γ 1 to AID hotspots (**C**) were obtained from CSReport sequence analysis. Data represent mean \pm 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

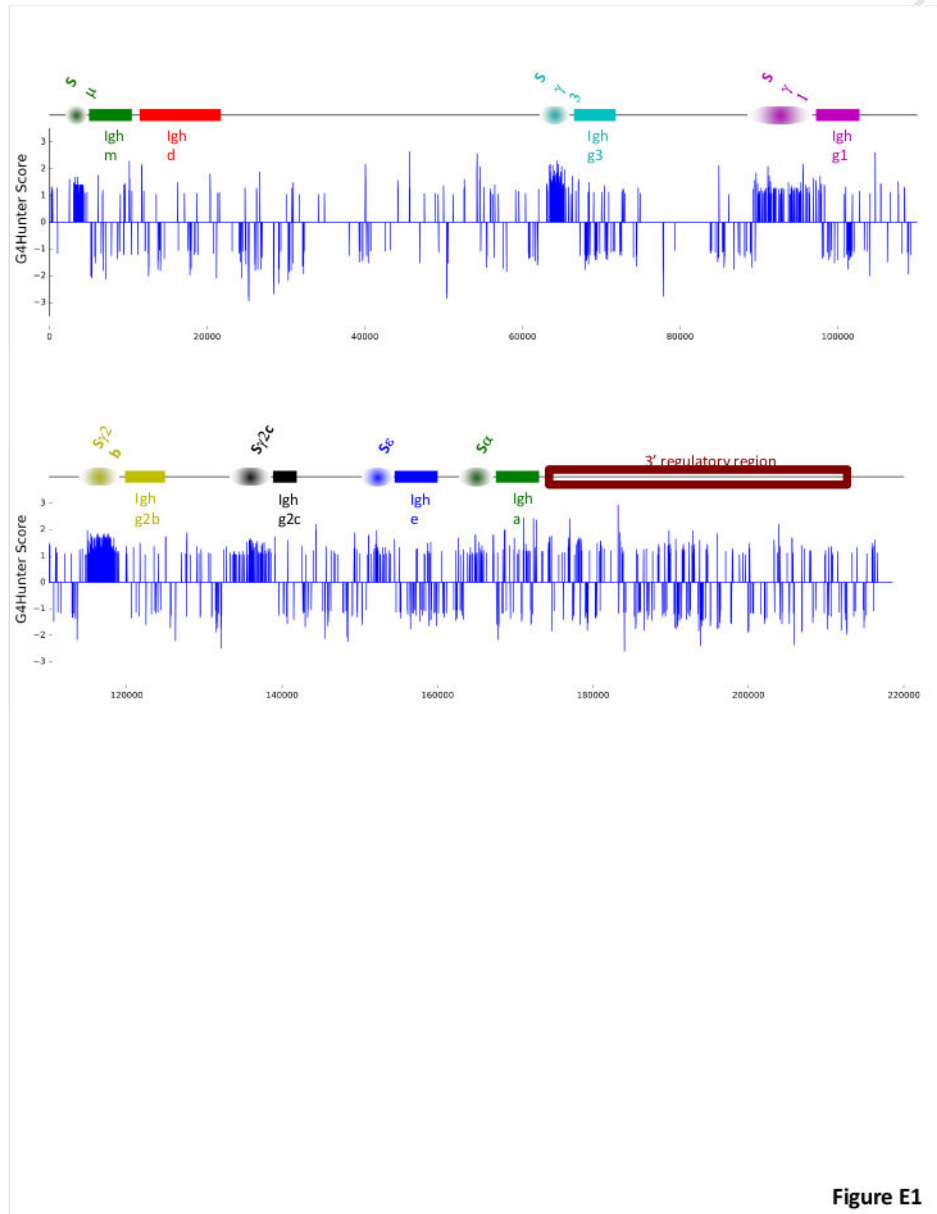


Figure E1

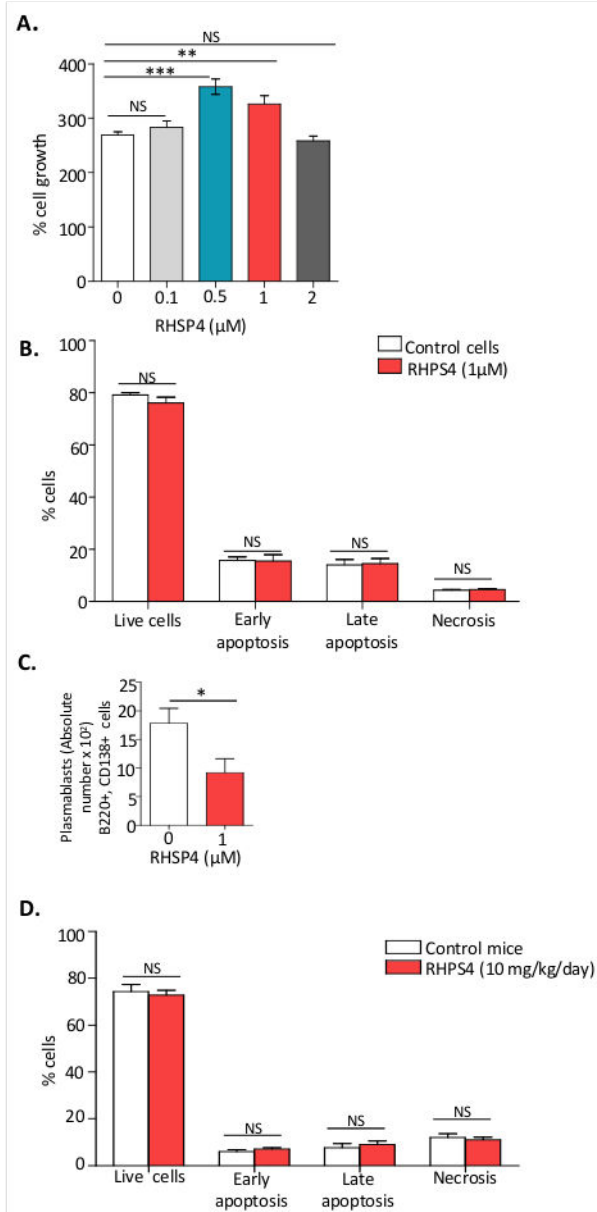
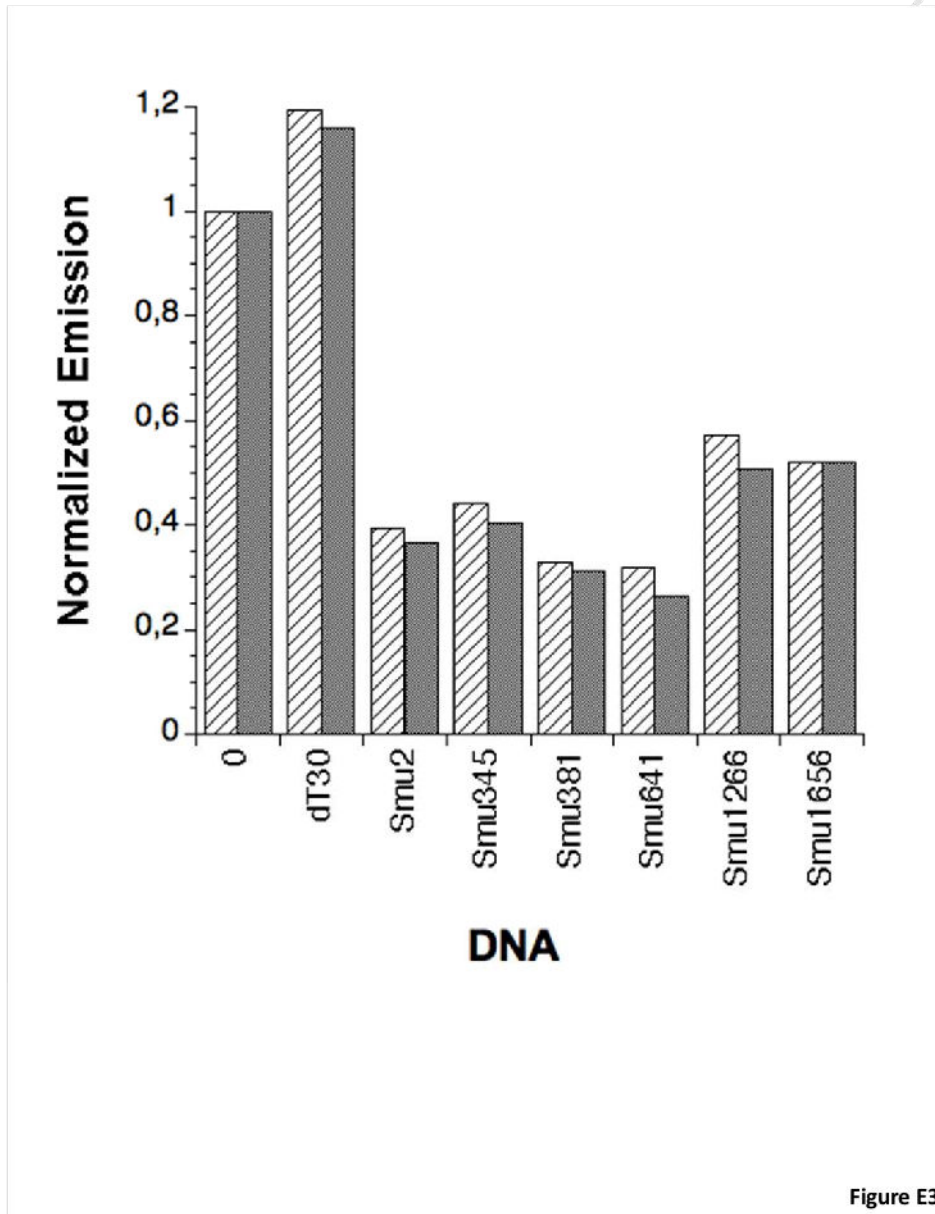
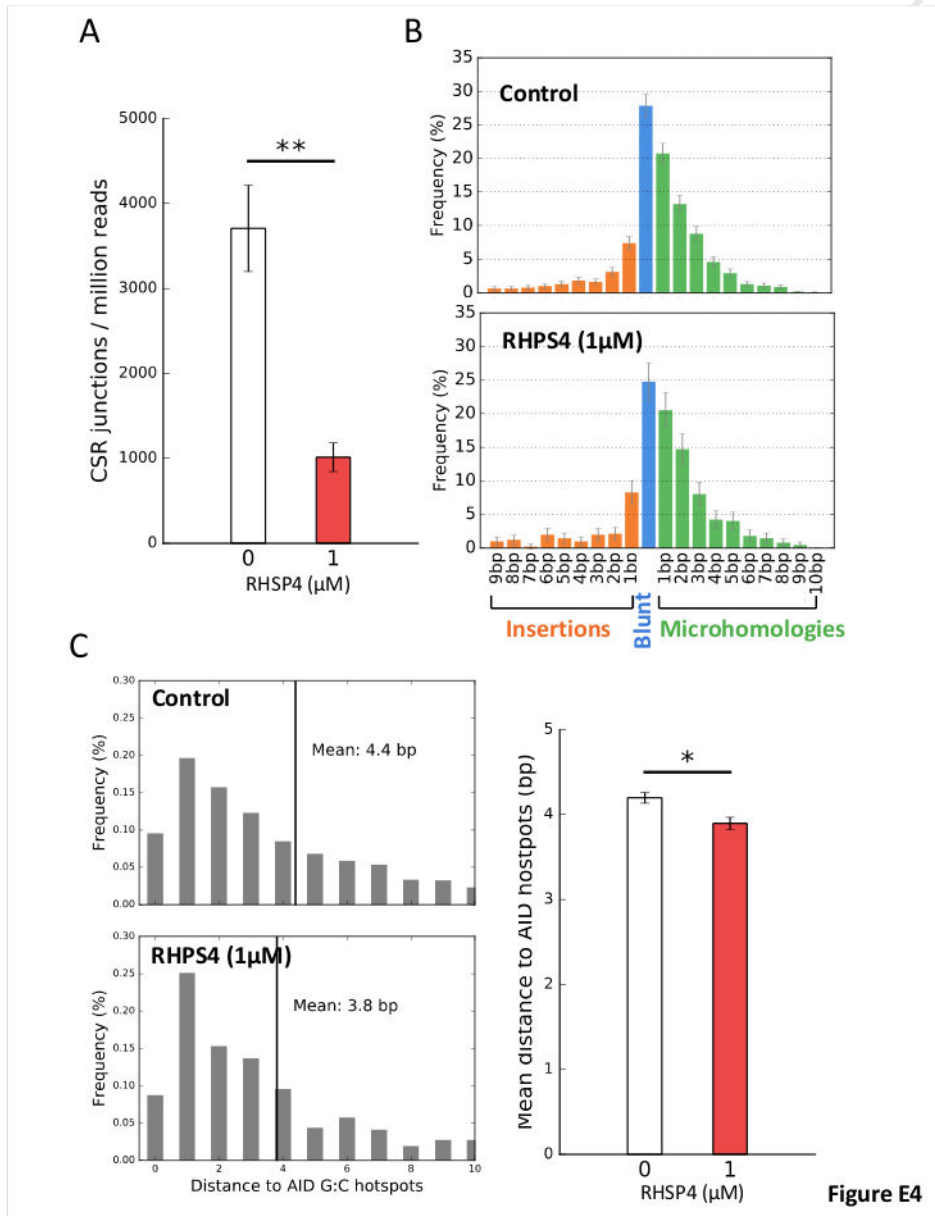
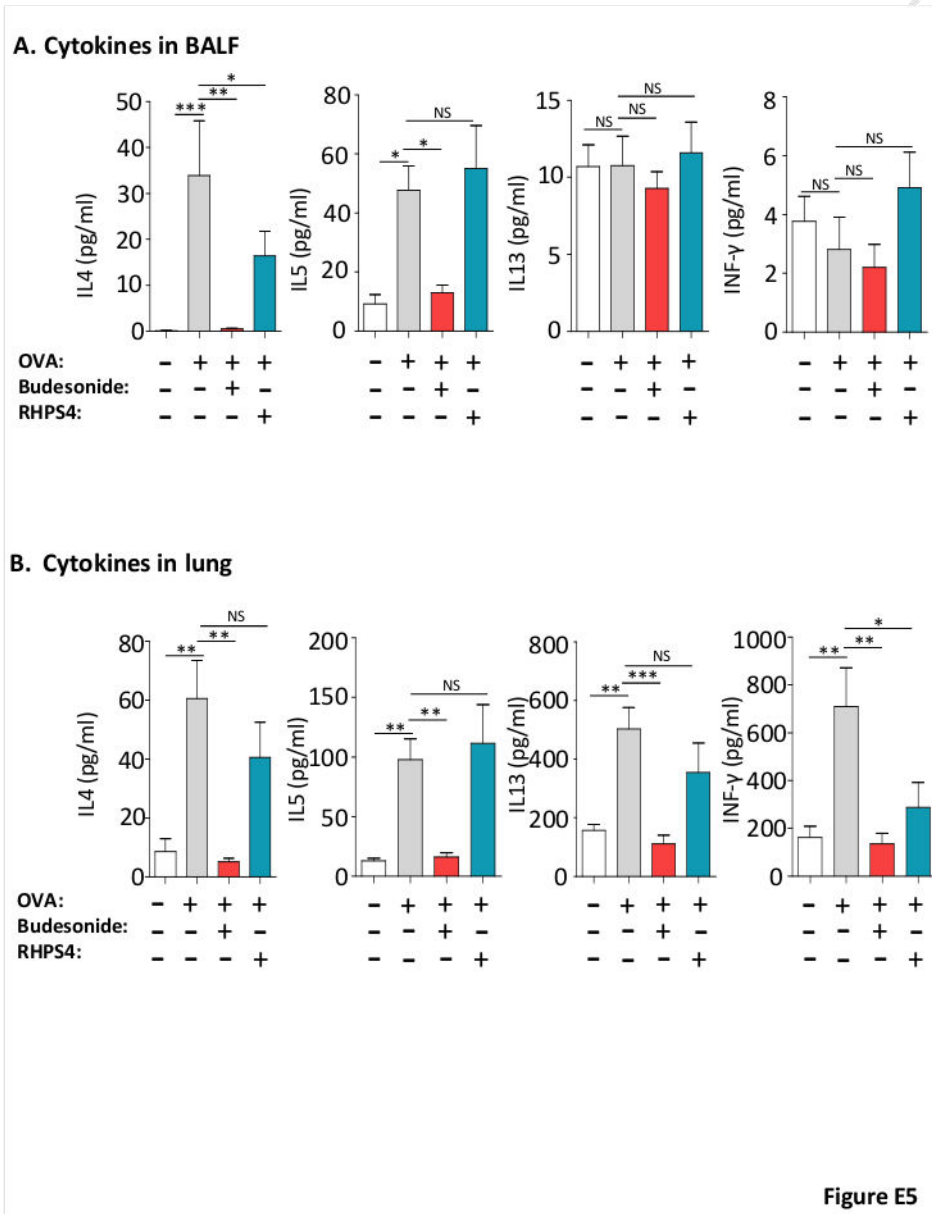


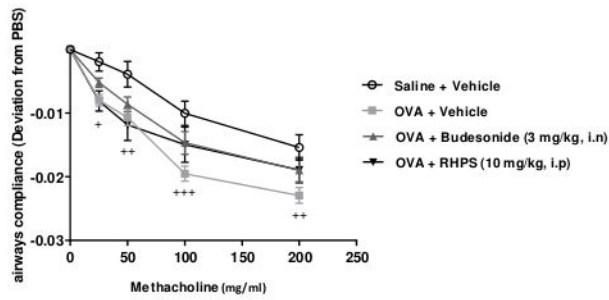
Figure E2



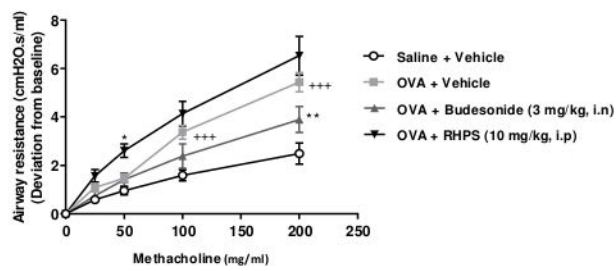




A. Airway compliance by plethysmography



B. Airway resistance by plethysmography



C. Lung eosinophil peroxidase activity

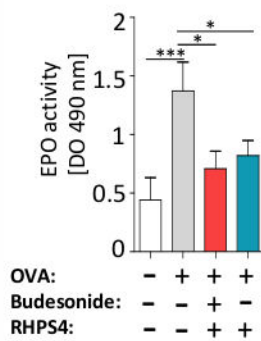
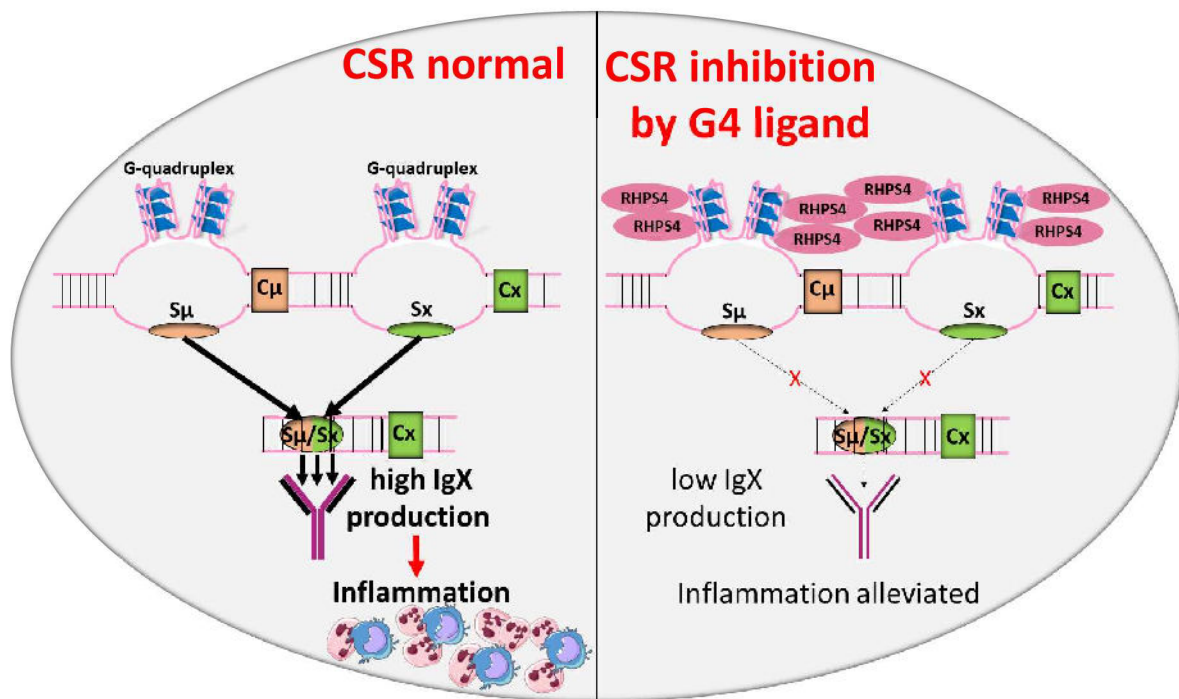


Figure E6



ACCEPTED MANUSCRIPT