

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

**Zeinab Dalloul**<sup>1</sup>, Batoul Wehbi<sup>1,2</sup>, Stéphanie Durand-Panteix<sup>1</sup>, Mylène Brousse<sup>3</sup>, Christelle Oblet<sup>1</sup>, Florence Glaudet<sup>4</sup>, Jean-Claude Aldigier<sup>1</sup>, Yolla El Makhour<sup>2</sup>, Jeanne Cook-Moreau<sup>1</sup> & 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 humorales. 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  $\alpha$  à la place de la région switch endogène  $\mu$  ( $S\mu$ ) 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 $\kappa$  qui doivent s'apparier). Les souris  $\alpha 2KI / +$  KIKS / KIKS ont montré une population de B accrue par rapport aux souris  $\alpha 2KI$  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  $\alpha 2KI / +$  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  $\alpha 2KI$ .

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  $\alpha 2KI$  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 Dalloul<sup>1</sup>, Batoul Wehbi<sup>1,2</sup>, Stéphanie Durand-Panteix<sup>1</sup>, Mylène Brousse<sup>3</sup>, Christelle Oblet<sup>1</sup>,  
Florence Glaudet<sup>4</sup>, Jean-Claude Aldigier<sup>1</sup>, Yolla El Makhour<sup>2</sup>, Jeanne Cook-Moreau<sup>1</sup> & Michel Cogné<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Lebanese University, Immunology Unit MICSU, Faculty of Sciences, Beirut, Lebanon.

<sup>3</sup>B-cell design, Limoges, France.

<sup>4</sup>CHU Dupuytren, Limoges, France.

**Correspondence author:** [cogne@unilim.fr](mailto: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  $\alpha$  genes in place of the endogenous switch  $\mu$  ( $S\mu$ ) 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,  $\alpha$ 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 $\alpha$ /Ig $\beta$  (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- $\beta$  and IL-10) and by interaction with T cells (Cerutti, 2008; Defrance et al., 1992).

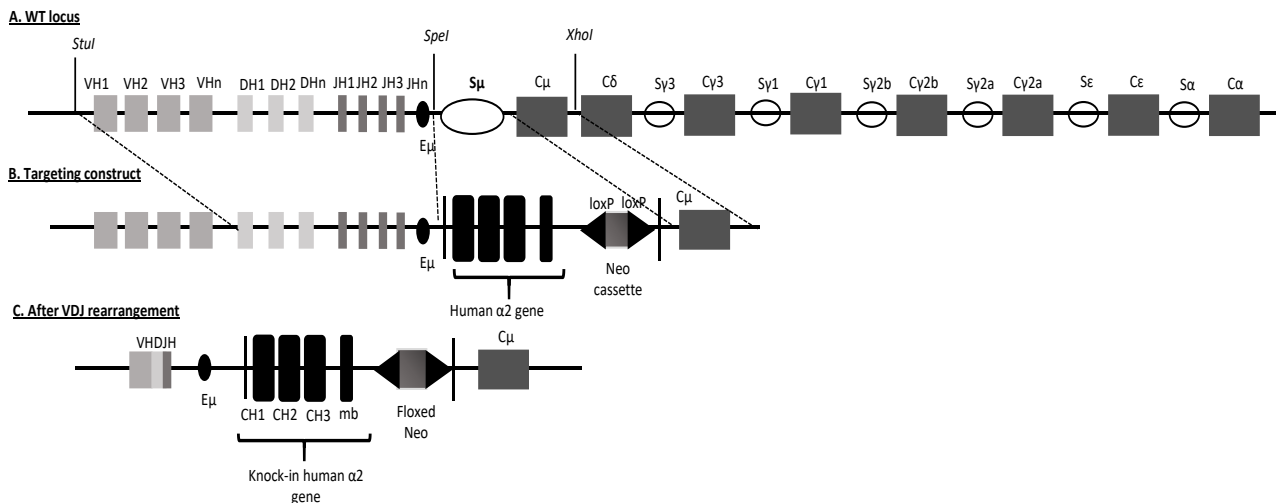
As previously reported, S $\mu$  replacement by the human  $\alpha$ 1 gene ( $\alpha$ 1KI mice) showed a supportive role for humoral immune responses albeit a reduced number of B lymphocytes. Data also showed that IgA1 promotes activation and differentiation of plasma cells (Duchez et al., 2010a). To date, little is known about the role of IgA2 in conferring specific features to mIgA2<sup>+</sup> cells compared to mIgM<sup>+</sup> and mIgA1<sup>+</sup> 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  $\alpha$ 2KI 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<sup>R</sup>* cassette inserted downstream of the  $\alpha 2$  gene and flanked by loxP sites was removed by mating  $\alpha 2$ KI mice with E11a 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

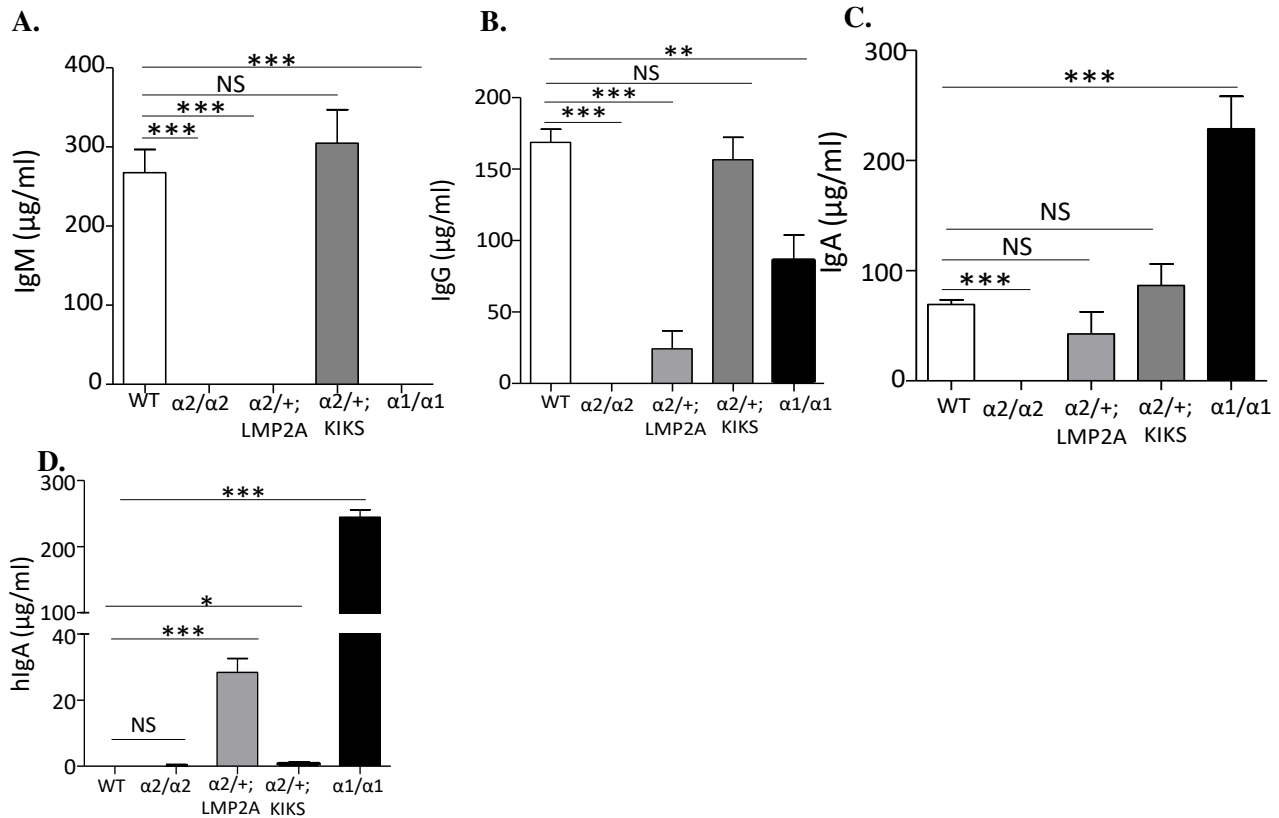
immunoglobulin light chain (hLC) to obtain a fully human IgA. Interestingly,  $\alpha 2\text{KI}/+$  KIKS/KIKS mice had increased spleen B populations compared to homozygous  $\alpha 2\text{KI}$  mice. In addition, these mice showed a significant increase in plasma IgA2 synthesis. Later, we wished to ameliorate IgA2 production, so we tried to improve B cell development in  $\alpha 2\text{KI}/+$  mice by crossing heterozygous mice with  $D_H\text{LMP2AKI}$  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	$\alpha 2\text{KI}/+$ ; $D_H\text{LMP2A}/+$	$\alpha 1\text{KI}/\alpha 1\text{KI}$
<b>Bone marrow</b>						
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 (B220 <sup>low</sup> IgM <sup>low</sup> )	45,09	58,89	0,00	38,00	0,00	0,00
<b>Spleen</b>						
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 <sup>-</sup> /low CD21+B220+)	11,67	9,74	7,95	40,39	98,32	19,81
B1b cells (CD5 <sup>low</sup> B220+)	1,57	1,61	1,31	2,34	0,00	0,00
Breg (CD23 <sup>-</sup> /CD21 <sup>high</sup> )	0,27	0,27	0,22	0,22	0,50	46,47
B1a (CD23 <sup>-</sup> / CD21 <sup>low</sup> )	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  $S_\mu$  replacement with  $h\alpha$  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  $\alpha\text{KI}$  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  $D_H\text{LMP2AKI}$  mice in comparison with the  $\alpha 2\text{KI}$  mice with a mean titer of 28  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Figure 2D**).

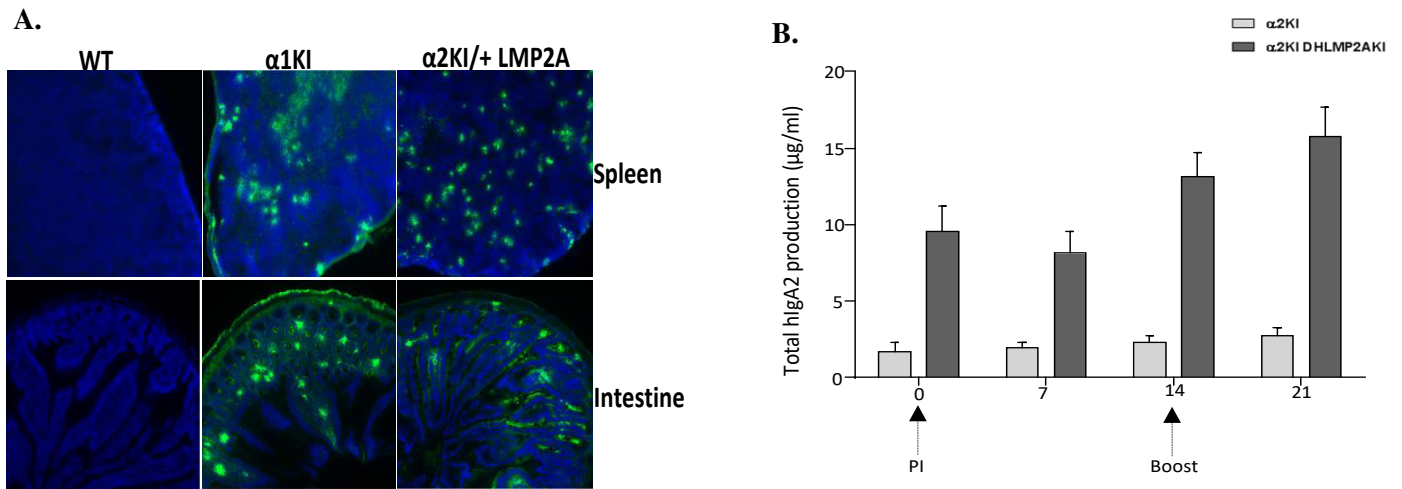


**Figure 2:** Plasma mIgM (A), mIgG (B), mIgA (C) and hIgA (D) production in different mouse models

### 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<sub>H</sub>LMP2AKI 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**).

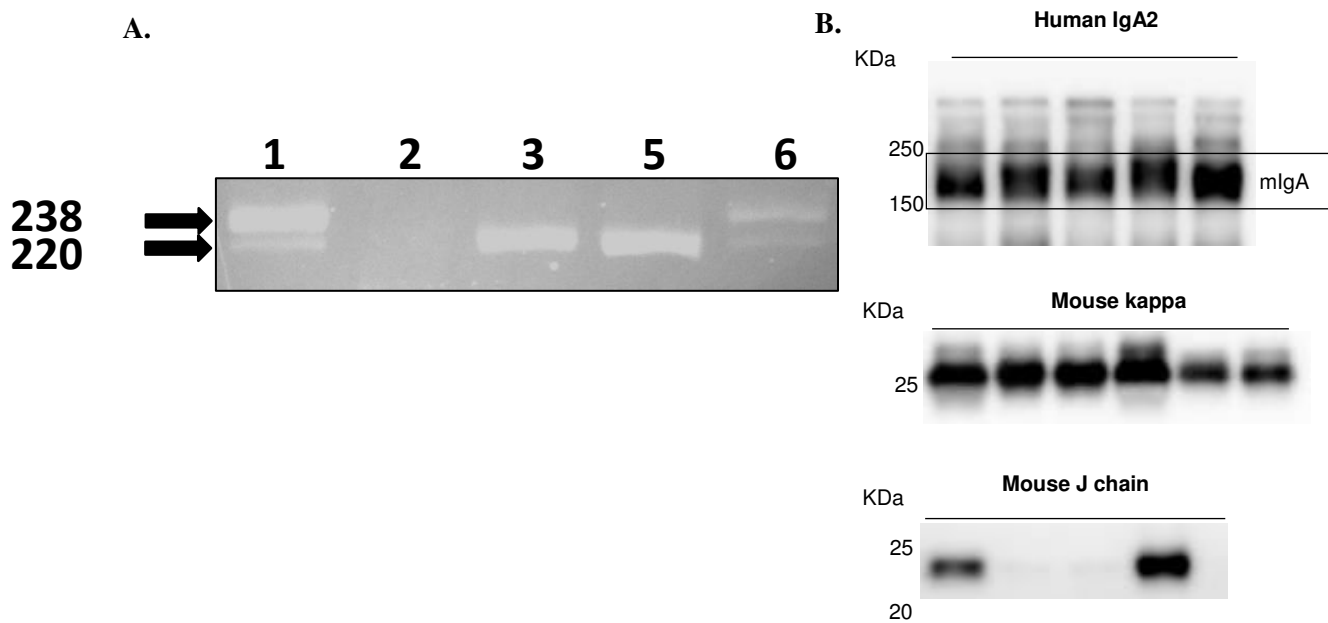




**Figure 3: A.** Immunofluorescence showing hlgA secreting cells in primary and peripheral lymphoid organs in WT,  $\alpha 1KI$  and  $\alpha 2KI/+$   $D_{HLMP2AKI}$  mice. **B.** Total hlgA2 plasma production after *i.p.* ovalbumin immunization of  $\alpha 2KI$  and  $\alpha 2KI/+$   $D_{HLMP2AKI}$  mice.

### hlgA2 membrane and secreted forms

The membrane anchored  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -mRNA by RT-PCR on splenocyte mRNA from  $\alpha 1KI$  and  $\alpha 2KI$  mice.

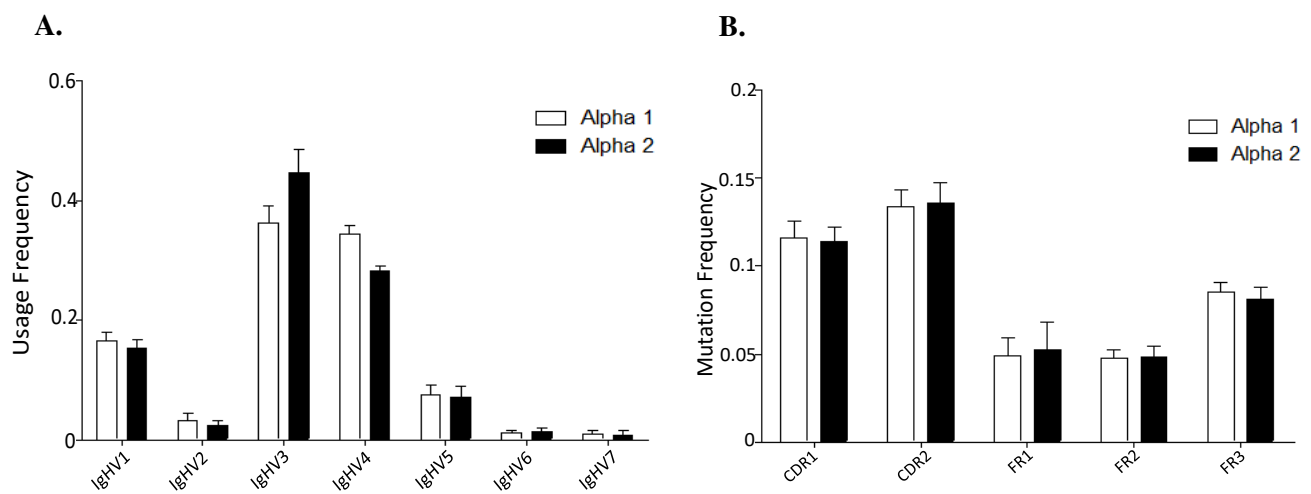


**Figure 4: A.** RT PCR showing 220bp band for hlgA isoform I and 238 bp for hlgA isoform II in different mouse models (2: WT; 3:  $\alpha 2DHLMP2A$ ; 4:  $\alpha 2KIKS$  et 5:  $\alpha 1KI$ ). Human tonsil extracts were used as positive control (1). **B.** Human IgA2, mouse kappa-light chain and J chain 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.  $\alpha$ 1KI mice carried both transcript isoforms with slight predominance of the type II whereas the  $\alpha$ 2KI 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  $\alpha$ 2KI 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  $\alpha$  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 $\alpha$  Ig gene in place of the S $\mu$  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  $\alpha$ 1KI mice, we recently generated an  $\alpha$ 2 knock-in mouse model in which the S $\mu$  region was replaced by an C $\alpha$ 2 Ig gene in order to distinguish transgenic IgA2 expression from endogenous murine class switching. In this study, we compared both  $\alpha$ 1KI and  $\alpha$ 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  $\alpha$ 2KI mice rapidly revealed a major defect in B cell development in comparison to WT or  $\alpha$ 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  $\alpha$ 2KI mice with Knock-In Kappa Switch (KIKS) mice which express a functional human C $\kappa$  light chain domain (Bonaud et al., 2015a). IgA2 secretion was improved in heterozygous  $\alpha$ 2KI/ KIKS compared to homozygous and heterozygous  $\alpha$ 2KI animals. Later, we checked whether, similarly to IgG4, IgA2 would be able to undergo Fab arm exchange (Rispen et al., 2014; vanderNeutKolfshoten 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  $\alpha$ 2KI mice with D $\mu$ 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  $\alpha$ 2KI mice, in contrast to  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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).  $\alpha$ 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.

### $\alpha$ 2KI generation

The  $\alpha$ 2KI construct included a 4.2-kb  $\alpha$ 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 $\mu$ ) and a ~5-kb long 3' arm (the C $\mu$  gene cloned as an XhoI fragment). A 1.3-kb ClaI-SalI Neo<sup>R</sup> gene flanked by loxP sites was also inserted between the  $\alpha$ 2 gene and the 3' arm, as previously described (Duchez et al., 2010a). CK35 embryonic stem (ES) cells were transfected with 8  $\mu$ g linearized targeting vector by electroporation and selected using G418 (400  $\mu$ g/mL). Recombinant clones were identified by PCR (primers listed in **Table 1**). After germline transmission, mice were bred with Ella cre mice to delete the Neo<sup>R</sup> cassette.

**Table 1:** 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	GCGAGGTGGCTAGGTAAGTCTTG	
Screening For wild type allele	CAGGTCGGCTGGACTAACTC	Mice screening
Screening Rev wild type allele	CATCTCACCCCATCTCAGCTA	
5' ClaI $\alpha$ 2	TAATCGATCACCTGTCCTCCTGGGGACATGGCAT	$\alpha$ 2 ClaI amplification and construction
3' ClaI $\alpha$ 2	TGATCGATTAGCCTCAGCCTCATTCAAGATCA	

## Mouse immunization

8-week-old mice  $\alpha 2\text{KI}$  and  $\alpha 2\text{KI}/+$  LMP2AKI were intraperitoneally primo-immunized with 50  $\mu\text{g}$  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  $\text{CO}_2$  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 $\mu\text{m}$  tissue sections were cut by using cryostat (Leica). After fixation in acetone, sections were incubated 1 hour at room temperature with goat F(ab)'<sub>2</sub> 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<sup>®</sup> 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., Corthesy, 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., Corthesy, 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.

vanderNeutKofschoten, 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).

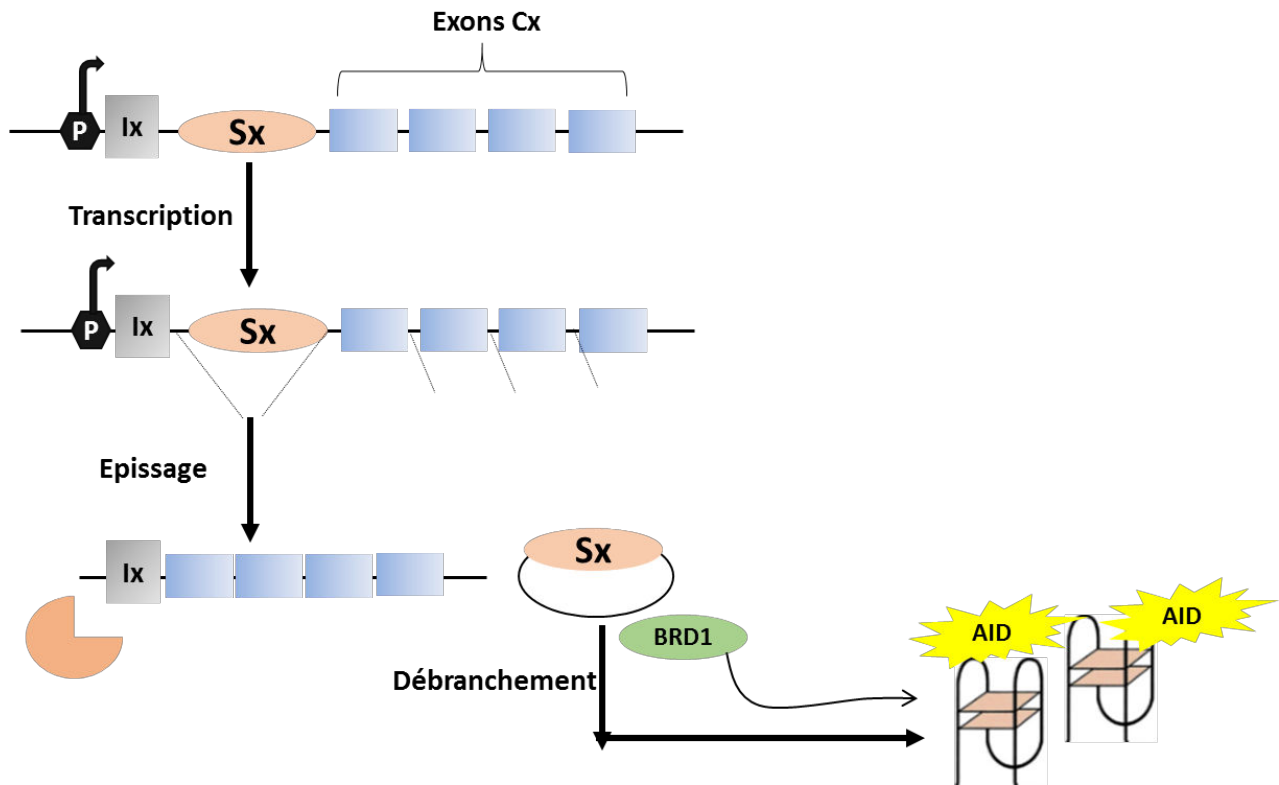
En se basant sur ces éléments et du fait que la région switch riche en guanine forme des G-quadruplexes, nous nous sommes demandés si la stabilisation de ces structures a un impact sur la CSR. Certains composés stabilisant l'ADN G4, et notamment le prototype RHPS4, ont été étudiés en détail pour leur 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  $\mu$ 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 $\mu$  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 E $\mu$ -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 C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3 et C $\gamma$ 4 respectivement. Les gènes C $\gamma$ 3 et C $\gamma$ 1 sont localisés en amont de la région 3'RR1 tandis que les gènes C $\gamma$ 2 et C $\gamma$ 4 se situent en aval de cette même région. Un cinquième pseudo- $\gamma$  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  $\gamma$ 1 et  $\gamma$ 2b et entre les gènes  $\gamma$ 2b et  $\gamma$ 2a ; un gène, appelé  $\psi\gamma$ 1, contient l'exon CH1 et l'exon M2, et l'autre gène, appelé  $\psi\gamma$ 2, 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 S $\mu$  avec la région intervenante qui sépare la 3'RR1 du premier exon CH1 C $\Psi\gamma$ . 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  $\Psi\gamma$ ) (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  $\Psi\gamma$  ne seraient pas également possibles au sein des 16kb séparant la 3'RR1 du CH1 de  $\Psi\gamma$ , 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 «  $\delta$ CSR » parfaitement fonctionnelle (via des recombinaisons S $\mu$ -like S $\delta$ ) (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 ( $Fc\gamma R$ ). La signalisation intracellulaire à travers les récepteurs d'activation ( $Fc\gamma RI$ ,  $Fc\gamma RIIa$  et  $IIC$ ,  $Fc\gamma RIIIa$  et  $IIIb$ ) 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  $Fc\gamma RIIb$  (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  $Fc\gamma R$  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  $Fc\gamma R$ . En outre, il a été montré que les IgG1 et IgG3 se lient à tous les h $Fc\gamma R$ , les IgG2 se lient sur  $Fc\gamma RIIA$ , mais aussi avec faible affinité sur  $Fc\gamma RIIA$  et  $Fc\gamma RIIIa$  et les IgG4 se lient  $Fc\gamma RI$ ,  $Fc\gamma RIIA$ ,  $IIB$  et  $IIC$  et  $Fc\gamma RIIIa$ . En plus, le récepteur inhibiteur  $Fc\gamma RIIb$  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'hypersecretion, 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'hypersecretion (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  $\alpha 2$  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  $\mu$  ( $S\mu$ ) 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 $\alpha$  provenant d'une espèce différente, a l'avantage de permettre un suivi simple de l'expression du transgène  $\alpha$ , 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  $\gamma$  membranaire insérée à la place du gène  $\mu / \delta$  (Waisman et al., 2007). La production des anticorps murins (IgG et IgA) par les plasmocytes n'est pas altéré 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 $\kappa$  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 bromodomains 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 bromodomains (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 bromodomains 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  $\alpha 2KI$  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).

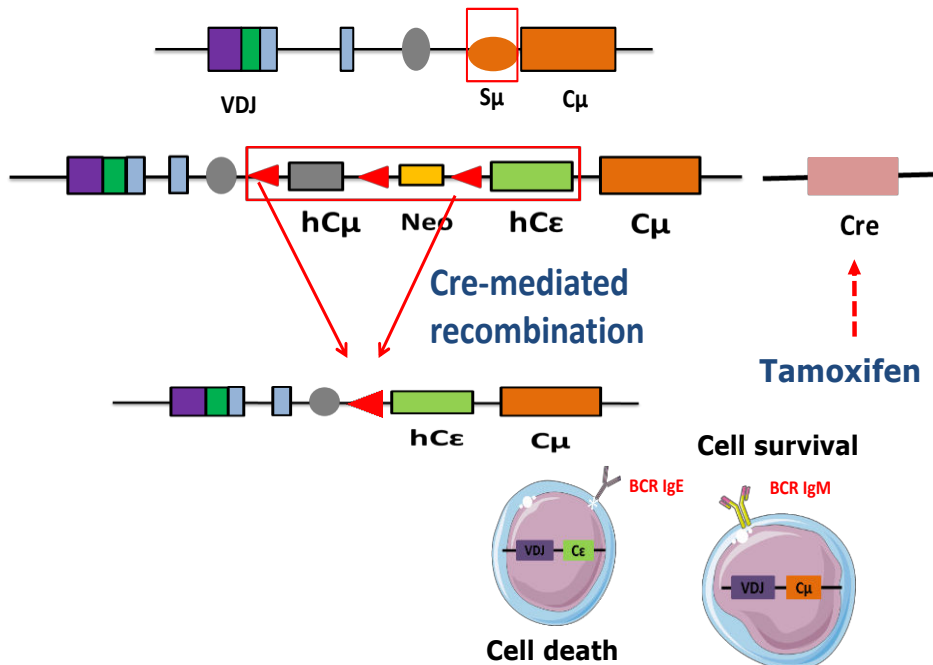
### **Stratégie du travail**

#### **Les souris utilisées**

Dans cette étude nous avons utilisé un modèle de souris Knock-in fabriqué par notre laboratoire appelé  $\mu\epsilon$ KI (ou InEPS) et qui produit les deux formes sécrétées et membranaires d'IgE humaine (Laffleur et al., 2015). La cassette C $\mu$ -Neo-C $\epsilon$  humaine est insérée dans la région S $\mu$ . Les gènes hC $\mu$  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 $\mu$  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 tumorale, j'ai croisé ce modèle avec un autre modèle de souris transgénique appelé  $\lambda$ -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 $\mu$ g) débutant lorsque la taille d'une tumeur arrive à 1cm.

Les souris ont été divisées en deux groupes :

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



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

Remplacement de la région  $S\mu$  du locus IgH par une cassette composée des gènes  $C\mu$ -Neo- $C\epsilon$  humaine (Laffleur et al, 2015). Le croisement de ces souris avec des souris exprimant le gène Cre permettant la délétion des gènes h $C\mu$  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<sup>+</sup> 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 "Plateforme de Génomique Fonctionnelle" de Nice-France.

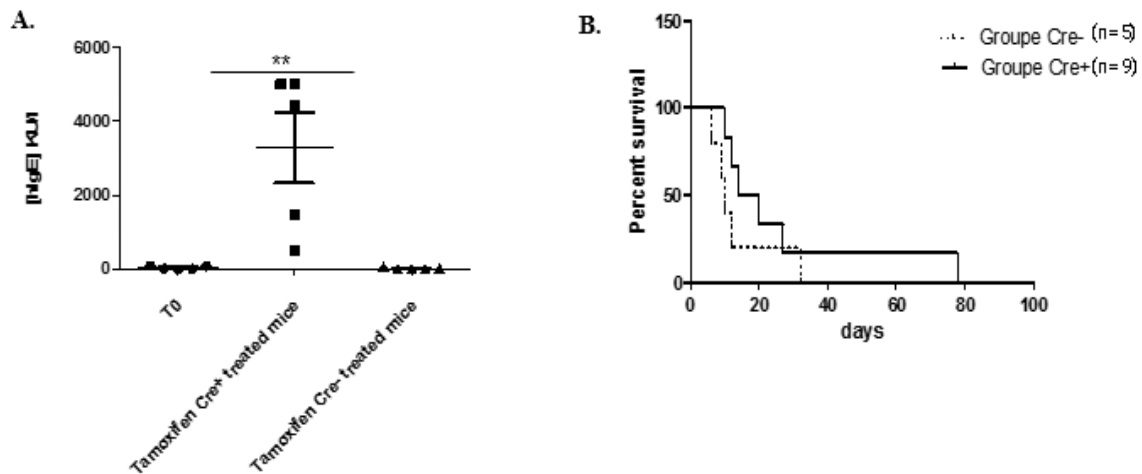
## **Résultats préliminaires et discussion**

### **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  $\geq 1$  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. Effet 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 regression 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