



HAL
open science

Etude in vivo du rôle de la région régulatrice en 3' du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines dans les réactions inflammatoires et la lymphomagenèse B

Faten Saad

► **To cite this version:**

Faten Saad. Etude in vivo du rôle de la région régulatrice en 3' du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines dans les réactions inflammatoires et la lymphomagenèse B. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2015. Français. NNT : 2015LIMO0030 . tel-01183184

HAL Id: tel-01183184

<https://theses.hal.science/tel-01183184>

Submitted on 6 Aug 2015

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

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

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Biologie-Santé [ED 524]

Faculté de Médecine

UMR CNRS 7276 [CRIBL]

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline: Biologie Science Santé

Présentée et soutenue par

Faten SAAD

Le 9 juillet 2015

Etude *in vivo* du rôle de la région régulatrice en 3' du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines dans les réactions inflammatoires et la lymphomagenèse B murine

Directeur de thèse: **Dr.Yves DENIZOT**

Jury

Présidente :

Marie Odile Jauberteau-Marchan- Professeur des Universités, Université de Limoges

Rapporteurs :

Pierre Dubus- Professeur des Universités, Université Bordeaux2

Olivier Garraud - Professeur des Universités, Université de Saint Etienne

Examineur :

Yves Denizot - Directeur de recherche INSERM, Université de Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Biologie-Santé [ED 524]

Faculté de Médecine

UMR CNRS 7276 [CRIBL]

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline: Biologie Science Santé

Présentée et soutenue par

Faten SAAD

Le 9 juillet 2015

Etude *in vivo* du rôle de la région régulatrice en 3' du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines dans les réactions inflammatoires et la lymphomagenèse B murine

Directeur de thèse: **Dr.Yves DENIZOT**

Jury

Présidente :

Marie Odile Jauberteau-Marchan- Professeur des Universités, Université de Limoges

Rapporteurs :

Pierre Dubus- Professeur des Universités, Université Bordeaux2

Olivier Garraud- Professeur des Universités, Université de Saint-Etienne

Examineur :

Yves Denizot - Directeur de recherche INSERM, Université de Limoges

Résumé

La maturation lymphocytaire B est sous le contrôle des éléments *cis*-régulateurs des gènes d'Ig. Les quatre activateurs transcriptionnels (hs3a, hs1,2, hs3b et hs4) de la région régulatrice en 3' du locus IgH (3'RR) murin sont les éléments clés pour les hypermutations somatiques (SHM) et les recombinaisons isotypiques (CSR). La 3'RR stimule aussi la transcription d'Ig au stade mature du développement B. La 3'RR, en association avec un oncogène, est un dérégulateur puissant conduisant au développement de lymphomes B. Actuellement rien n'est connu sur le rôle de la 3'RR lors de réactions immunes et/ou inflammatoires. Durant ma thèse, nous avons étudié l'impact de la délétion de la 3'RR sur le développement d'une réaction inflammatoire en réponse au pristane chez les souris BALB/c. Ces études nous ont permis de montrer que l'absence de la 3'RR ne perturbe pas l'apparition d'une réaction inflammatoire (cinétique de l'ascite, volume, cellularité, recrutement en cellules inflammatoires et leur capacité à produire des cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires). Ceci suggère la présence de lymphocytes B physiologiquement aptes à induire/propager/maintenir une réaction inflammatoire et immune robuste et efficace en absence d'une 3'RR fonctionnelle. Après avoir étudié le rôle de la délétion de la 3'RR dans un contexte inflammatoire, nous avons analysé son rôle dans un contexte de lymphomagenèse. Pour cela nous avons mis l'absence de la 3'RR dans un fond génétique murin apte à développer des lymphomes B matures (souris Igλ-Myc). On observe un changement important dans le phénotype des lymphomes B en absence de la 3'RR avec un plus grand nombre de lymphomes B immatures, une baisse du nombre de lymphomes B matures CD43⁺ et une augmentation de lymphomes B CD5⁺. Le rôle de la 3'RR dans la survenue de mutations aux stades B matures durant la SHM et la CSR est suggéré pour expliquer ces résultats. En conclusion, le ciblage pharmacologique de la 3'RR pour bloquer son effet pro-oncogénique transcriptionnel sur un oncogène transloqué au locus IgH pourrait se révéler une approche prometteuse pour le traitement de certains lymphomes B matures humains.

Mots clés: Région régulatrice IgH 3'RR, souris *knock-out*, pristane, inflammation, cytokines, souris Igλ-Myc, lymphome B

Abstract

B-cell maturation is under the control of the *cis*-regulatory elements of Ig genes. The four transcriptional enhancers (hs3a, hs1,2, hs3bandhs4) of the mouse IgH 3' regulatory region (3'RR) are the key elements for somatic hypermutation (SHM) and class-switch recombination (CSR). The 3'RR also stimulates Ig transcription during the mature B-cell stage. When associated with an oncogene, the 3'RR is a potent deregulator leading to B-cell lymphomas. Currently nothing is known about its role in the development of immune and inflammatory reactions. During my thesis, we have studied the impact of the 3'RR deletion on the development of inflammatory reactions in response to pristane in BALB/c mice. These studies have allowed us to show that the lack of the 3'RR does not disturb the development of an efficient inflammatory reaction in response to pristane (kinetics of appearance of ascites, volume, cellularity, recruitment of inflammatory cells and their capacity to produce inflammatory and anti-inflammatory cytokines). This suggests the presence of B-cells physiologically capable to induce/spread/maintain a robust and efficient inflammatory immune response. After studying the role of the deletion of the 3'RR in an inflammatory context we have investigated the role of the 3'RR in lymphomagenesis. For this we brought the 3'RR deficiency in a genetic background able to develop mature B-cell lymphomas (Ig λ -Myc mice). While *wt* mice develop mature and immature B-cell lymphomas, 3'RR-deficient mice exhibit a strong preference for immature lymphomas. Furthermore 3'RR-deficiency leads to a lowered frequency of CD43⁺ activated B-cell lymphomas and to an increased frequency of CD5⁺ B-cell lymphomas. CSR and SHM are abrogated in 3'RR-deficient mice lowering the probability of oncogenic mutations during these stages. Pharmacological targeting of 3'RR to block its transcriptional pro-oncogenic effect on translocated oncogene into IgH locus might be a promising approach for the treatment of some mature human B-cell lymphomas.

Keywords: IgH 3' regulatory region, *Knock-out* mice, pristane, inflammation, cytokines B-cell lymphomas, oncogene, Ig λ -Myc mice.

Remerciements

J'adresse mes remerciements à tous les membres de l'équipe de l'UMR CNRS 7276 dont la générosité, la gentillesse, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche ont permis de faire progresser mon projet tout au long de ces trois années de thèse et dont le soutien m'a permis de réaliser ce travail doctoral.

Tout d'abord, j'adresse un remerciement tout particulier au Dr. Yves DENIZOT, mon directeur de thèse pour m'avoir fait confiance pour réaliser ce travail et dont les qualités humaines et professionnelles m'ont marqué. Je vous remercie pour votre gentillesse, générosité et disponibilité sans faille durant ma thèse. Je suis extrêmement reconnaissante pour toutes les valeurs scientifiques dont vous m'avez fait profiter et pour tout l'encouragement que vous m'avez accordé à chaque instant durant ma thèse.

Je voudrais également remercier le professeur Michel COGNE pour sa gentillesse et pour m'avoir donné l'occasion de réaliser mon projet de thèse en Immunologie dans son unité de recherche. Soyez assuré de mon profond respect.

Je tiens à remercier le Pr. Marie Odile Jauberteau-Marchan pour avoir acceptée de présider mon jury de thèse. Je suis très reconnaissante envers les Pr. Pierre Dubus et Olivier Garraud pour avoir acceptés de relire cette thèse et d'en être rapporteurs. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance.

Je remercie également Pauline et Alexis pour leur gentillesse, leur multiples conseils et de m'avoir accordé du temps durant ma thèse. Je vous souhaite le meilleur.

Merci à Claire pour sa gentillesse et ses conseils notamment en cytométrie en flux. Je remercie également Christian pour toutes les commandes qu'il a passé durant ma thèse. Merci également à Aurore.

Merci à Eric, Laurent, Christophe, Anne, Stéphanie, Sébastien, Zélia, Sophie, Myèlen, Brice, Marie, Armand, Amélie, Nicolas et Nivine pour leur aide. Merci à Omar, Imane et Zeinab pour leur soutien.

Un grand merci à Sylvie, Bernadette et David pour le travail énorme qu'ils ont accompli pour l'entretien et le soin de nos souris.

Merci à l'équipe de Jean Feuillard. Je remercie particulièrement Nathalie pour nous avoir donné les souris transgéniques Igλ-myc.

Je remercie aussi les médecins et les techniciens du service d'Immunologie du CHU: Ahmed, Delphine et François.

Je voudrais également remercier tous les responsables à l'Université de Tichreen en Syrie pour avoir assuré la partie administrative de ma thèse. Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes : Dr. Hani shaban, Dr. Mahmoud Othman, Dr. Hassan Salman, Dr. Adibe Zeini, Dr. Hiam Fadel, Dr. Nahla Ibrahim et Dr. Nazih Daood.

Mes remerciements sincères vont également au Dr. Omar JAAFAR. Je lui suis extrêmement reconnaissante pour sa disponibilité ainsi que sa gentillesse.

J'aimerais adresser un remerciement particulier au futur medecin Ali Chebib pour sa grandeur d'âme, ses conseils, sa gentillesse et son soutien tout au long de ces années. Le mot « fattooooon » que tu me disais va me manquer beaucoup.

Je suis infiniment reconnaissante à ma chère Maha, tu étais une mère ainsi qu'une amie pour moi avec laquelle je parlais de mes problèmes.

Je remercie le Dr. Tayssir Ibrahim et sa femme, Sara, pour leur soutien tout au long de ces trois années de thèse.

Un merci spécial à mes amis Myrtille, Caroline, Agnès, Rima, Hafida, (Soha, Mustafa et mohamad Jawhari) pour leur soutien durant cette thèse.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements et mes pensées particulières à ma mère, mon père, ma sœur et mes frères, qui m'ont toujours soutenue et encouragé au cours de la réalisation de cette thèse.

Je dédie cette thèse à

la mémoire de mon frère Mouhamad

que le sang pur versé sur la terre de Syrie, fasse éclore des champs de

fleurs de paix et d'espoir

ma mère, la source bienfaitante de ma vie

mon père qui a éclairé ma route dans les ténèbres

mes frères : Aiham, Houmam, Shadi et Tarek

ma sœur : Ezdihar, Mon ange gardien et ma fidèle compagne dans les

moments les plus délicats de cette vie mystérieuse

ma joie Haydara, le rayon du soleil qui égaye ma vie

mon beau-frère Aiham Akel

mes amis, ces gouttes de rosée parfumées du matin

Liste des abréviations

3'RR : 3'Regulatory Region (région régulatrice située en 3' du locus d'IgH)

α : alpha

ϵ : epsilon

δ : delta

σ : sigma

γ : gamma

κ : kappa

μ : mu

λ : lambda

A

A-EJ: Alternative End Joining (jonction d'extrémités alternative)

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ag: Antigène

AID: Activation Induced cytidin Deaminase (cytidine deaminase induite par activation)

APOBEC: APOlipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic

B

BCR : B Cell Receptor (récepteur des cellules B)

BER: Base-Excision Repair (voie de réparation par une excision d'une base)

BL: Burkitt Lymphoma (lymphome de Burkitt)

C

C : région Constante

cADN: Complementary ADN (AND complémentaire)

CD : Cluster de Différenciation

CDK : Cyclin-Dependent Kinase (kinase dépendante des cyclines)

cE μ : core E μ

CG: Centre Germinatif

CSR: Class Switch Recombination

(Recombinaison de classe)

CTCF: CCCTC binding Factor (facteurs liant les motifs CCCTC)

D

D : segment de Diversité

dA: désoxy-Adénosine monophosphate

dC: désoxy-Cytidine

dG: désoxy-Guanosine

dT: désoxy- Thymidine

dU: désoxy-Uridine

E

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EOPS : Exempte d'Organisme Pathogène Spécifique

ES: Embryonic Stem cell (cellules souches embryonnaire)

F

Fc : récepteur des immunoglobulines

FDC : Follicular Dendritic Cell (cellules dendritiques folliculaires)

FITC : Fluorescéine isothiocyanate

FL: Follicular Lymphoma (lymphome folliculaire)

FO: Follicular zone (zone folliculaire de la rate)

G

GFP: Green Fluorescent Protein

H

H: Hheavy

hs : hypersensibilité à la DNase I

I

IC: Immunocytome

Ig: Immunoglobuline

IgH: Immunoglobulin Hheavy chain locus (Locus des chaînes Lourdes d'immunoglobulines)

IgL : Immunoglobulin Light chain loci (Loci des chaînes légères d'immunoglobulines)

IL: InterLeukin

INF γ : Interferon gamma

IR : Inverted Repeat (séquences inversées répétées)

J

J : segment de Jonction

K

Kb : kilobase

KO: Knock-Out (délétion de gène par recombinaison homologue)

L

L: Light (légère)

LB: Lymphocytes B

LBCL: Large B-Cell Lymphoma (lymphome à grande cellule B)

LGL: Large Granular Lymphocytes (grands lymphocytes granuleux)

LPS : LipoPolySaccharide bactérien

M

MALT: Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (tissus lymphoïde associé au muqueuses)

MCL: Mantle Cell Lymphoma (lymphome de manteau)

MARs : Matrix Attachment Regions (région d'ancrage à la matrice)

MM : Human Multiple Myeloma (myélome multiple humain)

MMR: MisMatch Repair (voie de réparation des mésappariements de l'ADN)

MPCs : (Mouse Plasmocytomas) (plasmocytome induit par de pristine chez la souris)

MZ: Marginal Zone (zone marginale)

N

neo^R : gène de résistance à la neomycine

NHEJ: Non Homologous End Joining

NHL : Non-Hodgkin humain Lymphoma (lymphome non-Hodgkinien humain)

NK: Natural killer cells

P

PC5 : Phycoerythrin-Cyanin 5

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction d'amplification en chaîne par polymérase)

PCT: Plasmocytome

pb : paire de bases

PE : PhycoErytrine

pRb: protéine de Rétinoblastome

pV_H : promoteurs des région variables au locus IgH

R

RAG: Recombination Activating Gene (gene activant la recombinaison V(D)J)

RSS: Recombination Signal Sequence (séquence signale de recombinaison)

S

S: région Switch

SHM: Somatic Hypermutation (hypermutation somatique)

SG : Serosal Granuloma (granulome sérique)

MG : Mesenteric Granuloma (granulome mésentérique)

T

T: Lymphocytes T

TdT: Terminaldeoxynucleotidyl Transferase

TNF α : Tumor Necrosis Factors alpha

TR: Tandem Repet

TMPD: TetraMethylPentaDecane

U

UNG: Uracile-N-Glycosylase

V

V : région Variable (**V_H** : région Variable de chaînes lourdes, **V_L** : région Variable de chaînes légères)

X

XRCC4: X-ray Repair Cross Complementing protein 4

Sommaire

Introduction	1
Introduction générale;	2
1. Les immunoglobulines	2
1.1 Structure et fonction.....	2
1.2 L'organisation des loci des gènes des Ig de souris	3
1.3 Les loci des chaînes légères de souris	4
1.3.1 Le locus de la chaîne légère κ de souris	4
1.3.2 Le locus de la chaîne légère λ de souris	4
1.4 Le locus IgH de souris	5
Chapitre1. La lymphopoïèse B	6
1. Le lymphocyte.....	6
2. Origine cellulaire des lymphocytes B et constitution du répertoire antigénique	7
2.1. La phase précoce de la lymphopoïèse B (phase indépendante de l'antigène)	7
2.2. La phase tardive de la lymphopoïèse B (phase dépendante de l'antigène) chez la souris	8
2.3. Le stade intermédiaire de développement B	8
2.4. Les cellules B matures et la formation de centre germinatif	9
2.5. La formation de centre germinatif	9
3. Description phénotypique lors de la lymphopoïèse B chez la souris	11
4. Les modifications géniques des loci d'Ig lors de la lymphopoïèse B	12
5. Les mécanismes des réarrangements géniques des gènes des Ig	13
5.1. Les recombinaisons V(D) J	13
5.2. Diversification secondaire: la commutation de classe CSR (pour class-switch recombination) et l'hypermutation somatique (SHM)	14
5.2.1. Point de vue mécanistique sur le rôle d'AID	14
5.2.2. La commutation isotypique (CSR).....	15
5.2.3. Les régions switch.....	15
5.2.4. L'hypermutation somatique (SHM)	16

Chapitre2. La lymphomagenèse B	18
1. Lorsque le développement des lymphocytes B est perturbé	18
2. Les dangers lors de la différenciation normale des cellules B	19
2.1. Le centre germinatif est un environnement favorable pour les lymphomes B.....	19
2.2. Translocations chromosomiques oncogéniques et l'émergence de lymphome	19
2.3. L'origine des cassures d'ADN dans les loci d'Ig.....	19
Chapitre3. Les éléments régulateurs du locus IgH	21
1. L'activateur intronique E μ	21
2. La région régulatrice 3'RR de locus d'IgH.....	21
2.1. Structure unique de la 3'RR.....	22
2.2. Rôle de la 3'RR lors du développement B normal.....	23
2.2.1. La 3'RR est une région B spécifique dont l'activation va du stade pré-B au stade B mature	23
2.2.2. La 3'RR orchestre l'expression des gènes constants du locus IgH.....	24
2.2.3. Rôle de la 3'RR dans la dérégulation oncogénique	25
2.2.3.1. Chez l'homme.....	25
2.2.3.2. Chez la souris.....	26
Chapitre 4. L'oncogène c-myc.....	29
1. Rôle physiologique de gène c-myc	29
2. La dérégulation de c-myc est associée avec la lymphomagenèse	31
2.1. La translocation de c-myc au locus d'IgH	31
2.2. La translocation (8;22) du gène c-myc au locus de la chaîne légère λ (modèle des souris Ig λ -Myc	33
Chapitre 5. La réaction inflammatoire induite par du pristane	34
1. Modèles des lymphomes induits par du pristane	34
2. Modèle des souris BALB/c	35
2.1. La sensibilité génétique des souris BALB/c	35
2.2. Les facteurs influençant l'apparition d'une réaction inflammatoire en réponse au pristane chez la souris	35
2.2.1. L'état sanitaire des souris	35
2.2.2. L'importance des cellules T	36
2.2.3. Le rôle critique des cellules B	36

2.2.4. Rôle de l'IL-6	36
Résultats	38
Article 1	40
Article 2	43
Article 3	46
Article 4	49
Discussion & Perspectives	52
Article 5	60
Article 6	61
Article 7	62
Références Bibliographiques	63

Tables des figures

Figure 1 :Structure des immunoglobulines (Ig).	3
Figure 2 : Représentation schématique des loci des chaînes légères d'Ig chez la souris.	4
Figure 3 :Représentation schématique du locus IgH chez la souris.	5
Figure 4 :Représentation schématique d'un lymphocyte B.	6
Figure 5 :Stades de développement lors de la lymphopoïèse B.	10
Figure 6 : Présentation schématique des marqueurs de surface lors de développement B chez la souris.	12
Figure 7 : Présentation schématique des recombinaisons V(D)J, des commutations de classe et de l'hypermutation somatique des gènes de la chaîne lourde des Ig de souris.	17
Figure 8 :Exemples d'altérations chromosomiques de gènes régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose lors des lymphomes B.	18
Figure 9 : Représentation schématique des translocations oncogéniques lors des recombinaisons V(D)J, de la SHM et de la CSR.	20
Figure 10 : Représentation schématique de locus IgH murin et des transgènes GFP-3'RR, E μ -GFP-3'RR et E μ -3'RR.	23
Figure 11 : Représentation schématique de la fenêtre d'activation transcriptionnelle de la 3'RR lors de la maturation B.	24
Figure 12 : Modèles murins KO affectant la 3'RR.	25
Figure 13 : Présentation schématique du modèle « <i>Knock-in</i> » de la 3'RR au locus du gène c-myc.	26
Figure 14 : Schéma non à l'échelle du modèle « <i>Knock-in</i> » Myc ^{His} au locus IgH murin.	27
Figure 15 : Schéma non à l'échelle du transgène c-myc-3'RR.	28
Figure 16 :Présentation schématique du rôle physiologique du gène c-myc.	30
Figure 17 : Les translocations réciproques équilibrées ou déséquilibrées sont provoquées par une mauvaise réparation des cassures d'ADN.	31
Figure 18 : La translocation de c-myc est un événement de l'initiation et de la progression de la tumeur dans les néoplasies des lymphocytes B chez l'homme et chez la souris.	32
Figure 19 : Translocations chromosomiques dérégulant l'expression de c-myc dans trois espèces de mammifères (homme, souris, rat).	32
Figure 20 : Représentation schématique de la construction utilisée pour la génération des souris transgéniques Ig λ -Myc.	33

Figure 21 : Anomalies pathologiques induites par du pristane chez les souris BALB/c.	34
Figure 22 : Représentation schématique de la formation des granulomes en réponse au pristane.	37
Figure 23 : La réponse granulomateuse chez les souris BALB/c déficientes pour la 3'RR. ...	55
Figure 24 : Lignées transgéniques surexprimant c-myc.....	58

Introduction

Introduction générale; le système immunitaire et les immunoglobulines

La mission principale du système immunitaire est de reconnaître les stress et les pathogènes qui envahissent l'organisme (virus, bactéries, champignons, protozoaires etc...) et de contrôler certains dérèglements cellulaires aboutissant à la formation de tumeurs. Cette mission est réalisée par deux mécanismes appelés l'immunité naturelle et l'immunité adaptative. L'immunité naturelle (non spécifique) comprend les cellules et les mécanismes qui assurent une résistance naturelle aux pathogènes par l'activation du système du complément, des polynucléaires neutrophiles, des macrophages, des cellules cytotoxiques naturelles NK (Natural Killer cells) ou des grands lymphocytes granuleux (LGL). L'immunité adaptative, au contraire, ajoute à l'immunité naturelle des propriétés de reconnaissance moléculaire et de mémoire qui amplifient considérablement la capacité de l'organisme à s'adapter à son environnement. L'immunité adaptative repose sur la capacité des lymphocytes B et T à répondre spécifiquement et de façon sélective à une stimulation par différents antigènes. Les lymphocytes sont les acteurs principaux de la réponse immunitaire humorale qui repose sur la production de molécules effectrices appelées immunoglobulines (Ig) ou anticorps (Ac) par les cellules de la lignée lymphocytaire B.

1. Les immunoglobulines

1.1 Structure et fonction

Les Ig aussi appelées Ac sont les effecteurs solubles de l'immunité humorale spécifique. Elles comportent une partie variable, différente pour chaque Ig, capable de reconnaître un épitope d'un antigène, et une partie effectrice permettant que cette reconnaissance soit suivie d'effets dans le système immunitaire. Ces molécules de l'immunité spécifique sont produites sous forme soluble dans les liquides biologiques ou présents sous forme de récepteurs membranaires à la surface des lymphocytes B (BCR pour B cell receptor). Les Ig sont des hétérodimères protéiques, d'environ 150KD, en forme de lettre Y. Elles sont exprimées à la surface des lymphocytes B ou sécrétées par les plasmocytes. Les Ig sont composées de quatre chaînes polypeptidiques homologues 2 à 2 et reliées entre elles par des ponts disulfures : deux chaînes lourdes (H pour heavy) et deux chaînes légères (L pour light) kappa (κ) et lambda (λ) (**Figure**

1). Chez la plupart des mammifères les deux types de chaînes légères peuvent s'associer à chacune des cinq classes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , ϵ et α) qui définissent respectivement les IgM, IgD, IgG, IgA et IgE. Chaque isotype d'Ig comprend un site de reconnaissance spécifique de l'antigène qui est la combinaison des domaines variables des chaînes lourdes (V_H) et légères (V_L) alors que les domaines constants (C) des chaînes lourdes confèrent à l'Ig sa propriété effectrice et son isotype qui peut être modifié en conservant la même spécificité antigénique (Schroeder and Cavacini, 2010). La synthèse d'Ig est assurée par trois complexes génétiques : les loci $Ig\kappa$ (chromosome 6 chez la souris, 2 chez l'homme) et $Ig\lambda$ (chromosome 16 chez la souris, 22 chez l'homme) qui codent les chaînes légères et le locus IgH (chromosome 12 chez la souris, 14 chez l'homme) qui code les chaînes lourdes (pour revues: Lefranc and Lefranc, 2004 ; Zachau, 2004 ; Riblet, 2004).

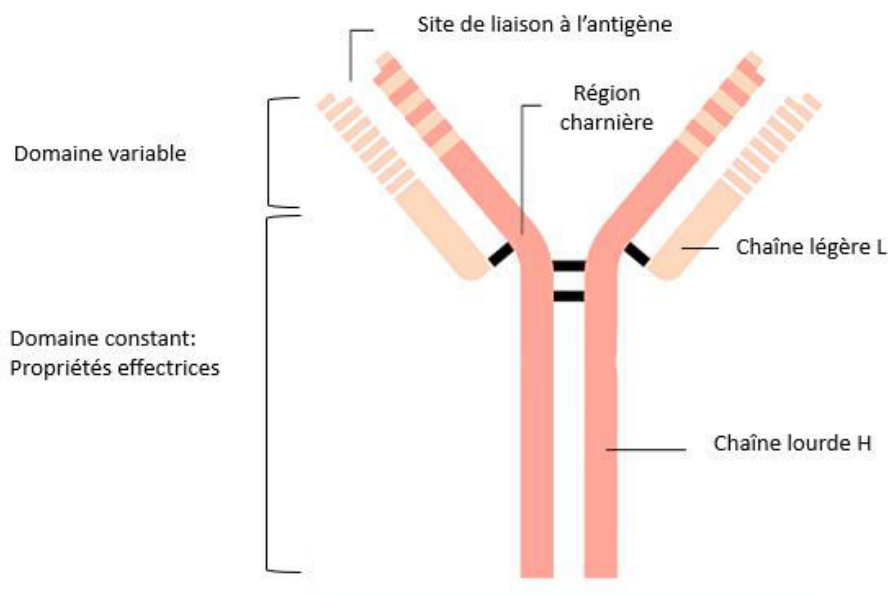


Figure 1 : Structure des immunoglobulines (Ig).

Exemple d'une IgG1 de souris. Les chaînes lourdes sont représentées en rose foncé. Les chaînes légères sont en clair. Les ponts disulfures en noir. <http://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Anticorps/1001379>.

1.2 L'organisation des loci des gènes des Ig de souris

Les gènes des Ig sont spécifiquement exprimés dans la lignée lymphoïde B. Leurs loci, chez l'homme comme chez la souris, sont situés sur 3 chromosomes différents et caractérisés par la succession de différents segments. Ces loci sont $Ig\kappa$ et $Ig\lambda$ codants les chaînes légères et IgH codant les chaînes lourdes. Nous détaillerons particulièrement l'organisation des gènes de ces loci chez la souris.

1.3 Les loci des chaînes légères de souris

1.3.1 Le locus de la chaîne légère κ de souris

Ce locus est localisé sur le chromosome 6. Il comporte 174 segments de variabilité $V\kappa$ (dont 49 à 96 sont fonctionnels) et 5 segments $J\kappa$ (dont 4 sont fonctionnels). Ces segments codent pour la région variable de la chaîne κ . La région constante de la chaîne κ est codée par un seul segment $C\kappa$ (**Figure 2A**).

1.3.2 Le locus de la chaîne légère λ de souris

Il est situé sur le chromosome 16. Il possède 3 segments $V\lambda$ et 5 segments $J\lambda$ (dont 3 sont fonctionnels) et 4 segments $C\lambda$ (dont 2 à 3 sont fonctionnels). Les segments $J\lambda$ et $C\lambda$ sont organisés en 2 clusters : $J\lambda_2-C\lambda_2-J\lambda_4-C\lambda_4$ ($J\lambda_4$ et $C\lambda_4$ étant défectifs) et $J\lambda_3-C\lambda_3-J\lambda_1-C\lambda_1$ précédés de $V\lambda_2-V\lambda_3-V\lambda_1$ (**Figure 2B**). Environ 5% des lymphocytes expriment une chaîne légère λ contre 95% exprimant κ . Ce ratio est différent de celui de l'homme (2/3 κ et 1/3 λ).

A. Locus $Ig\kappa$ (chromosome 6)



B. Locus $Ig\lambda$ (chromosome 16)

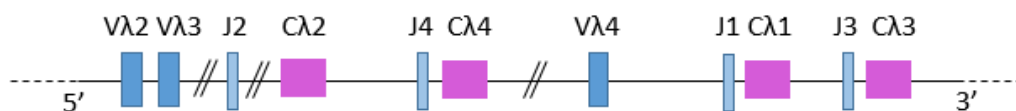


Figure 2 : Représentation schématique des loci des chaînes légères d'Ig chez la souris.

Les segments variables (V) sont présentés en bleu foncé, les segments de jonction (J) en bleu clair et les segments constants (C) en violet clair. **A.** Le locus $Ig\kappa$ est situé sur le chromosome 6. Un seul segment constant $C\kappa$ code pour la partie constante de la chaîne κ . La région variable de la chaîne κ est codée par les segments $V\kappa$ et $J\kappa$. **B.** Le locus $Ig\lambda$, situé sur le chromosome 16, est organisé en 4 paires de segments $J\lambda-C\lambda$ et ne contient que 3 segments $V\lambda$.

1.4 Le locus IgH de souris

Le locus IgH est le plus étudié. Il est localisé sur le chromosome 12 et s'étend sur environ 2,2 mégabases. En 5' du locus IgH se trouvent les gènes V (pour variabilité), D (pour diversité) et J (pour jonction). C'est l'association d'un V, d'un D et d'un J qui va former la région variable de la chaîne lourde. En 3' du locus IgH se trouve les gènes constants ($C\mu$, $C\delta$, $C\gamma3$, $C\gamma1$, $C\gamma2b$, $C\gamma2a$, $C\epsilon$ et $C\alpha$). Ces derniers, à l'exception de $C\delta$, sont précédés par une région de switch (S). Sur le locus IgH murin nous pouvons distinguer 5 régions comprenant les éléments *cis*-régulateurs, la région d'attachement à la matrice « matrix attachment regions, MARs » et les sites d'hypersensibilité à la DNase (hs) qui corrént avec des activateurs transcriptionnels ou des isolateurs (**Figure 3**). Ces 5 régions sont les suivantes :

- 1- Quatre sites hs situés en 5' des segments de variabilité (5' hs1, 2, 3a, 3b) (Pawlitzy *et al.*, 2006).
- 2- Six sites hs (V_H -D hs1 à 6) qui définissent la région V_H -D inter-génique qui s'étend sur près de 90 kilobases (Featherstone *et al.*, 2010).
- 3- Le promoteur DQ52 (Alessandrini and Desiderio, 1991)
- 4- L'élément $E\mu$ situé entre J_H et $C\mu$ avec ses MARs (Perlot and Alt, 2008).
- 5- La région régulatrice 3'RR situées en aval de $C\alpha$ composée des quatre éléments (hs3a, 3b, 1,2 et 4) et les sites d'hypersensibilité à la DNase (hs5, 6, 7) possédant une fonction isolatrice et situés en aval de la 3'RR (Khamlichi *et al.*, 2000 ; Garrett *et al.*, 2005).

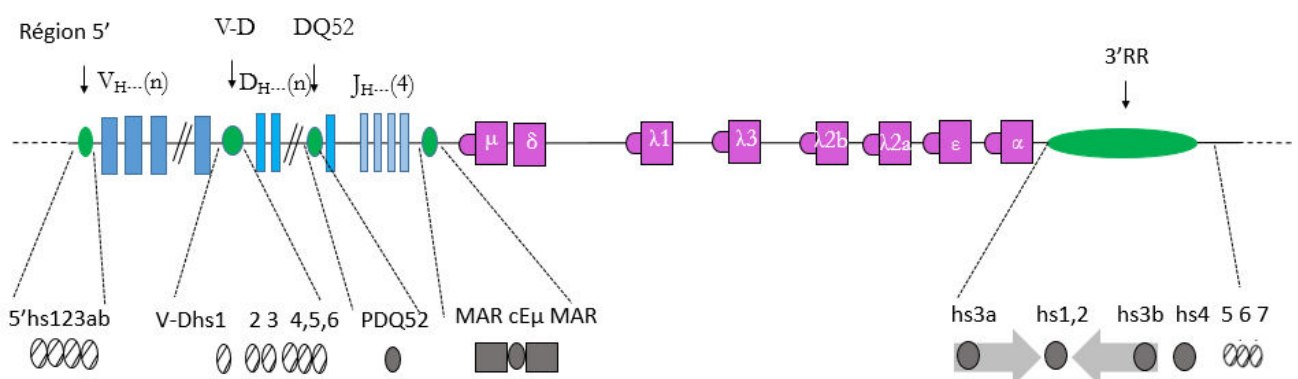


Figure 3 : Représentation schématique du locus IgH chez la souris.

Il est situé sur le chromosome 12. Il rassemble plus de 152 segments V_H , une vingtaine de segments D et 4 segments J_H codant la partie variable de l'Ig. Il comprend également 8 segments C_H codant chacun un isotype différent.

Chapitre 1. La lymphopoïèse B; le développement B et la formation du répertoire antigénique chez la souris

1. Le lymphocyte

L'homme et la souris ont tous les deux environ 70 ml de sang par Kg de poids corporel. Leur hémocrite moyen est très similaire (légèrement en dessous de 50%) ainsi que leur nombre moyen de cellules blanches circulantes (entre 5000 et 10000 par μl). Les différences apparaissent dans la répartition de ces cellules : plus de neutrophiles chez l'homme (34-71%) que chez la souris (20-25%); plus de lymphocytes chez la souris (70-75%) que chez l'homme (19-53%), plus de monocytes chez l'homme (5-13%) que chez la souris (2-6%). On note également plus de plaquettes chez la souris ($0,3-1,0 \cdot 10^6/\mu\text{l}$) que chez l'homme ($0,15-0,4 \cdot 10^6/\mu\text{l}$) (McGarry *et al.*, 2010).

Les lymphocytes sont des cellules arrondies de petite taille (6-10 μm) avec un grand noyau, une chromatine dense et un mince anneau de cytoplasme contenant des ribosomes mais très peu de lysosomes et de mitochondrie (**Figure 4**) (Ollila and Vihinen, 2005). Cet aspect morphologique des lymphocytes correspond à des cellules au repos en phase G0 du cycle cellulaire.

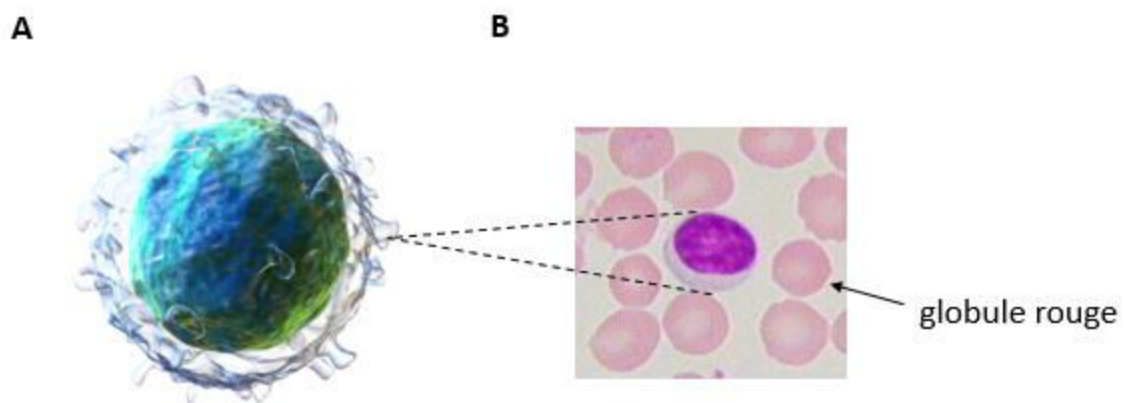


Figure 4 : Représentation schématique d'un lymphocyte B.

A. Image en 3D d'une cellule B. B. Image microscopique d'une cellule B.

http://en.wikipedia.org/wiki/B_cell http://www.funsci.com/fun3_fr/sang/sang.htm#22.

2. Origine cellulaire des lymphocytes B et constitution du répertoire antigénique

Les lymphocytes sont caractérisés, à la différence des autres cellules de l'organisme, par une différenciation à partir des cellules souches hématopoïétiques. Cette différenciation est en deux phases (**Figure 5A**). La première est indépendante de la rencontre avec l'antigène. La seconde est soumise à une activation des lymphocytes matures par des antigènes ce qui permet l'adaptation de la réponse immunitaire spécifique aux stimulations de l'organisme par l'environnement antigénique. L'identification des sous populations à chaque stade de différenciation dépend de:

- 1- L'expression de diverses molécules de surface.
- 2- L'état de réarrangement des gènes des chaînes lourdes et légères d'Ig.
- 3- L'expression de récepteur (pré-BCR, puis BCR) à la cellule B.

2.1. La phase précoce de la lymphopoïèse B (phase indépendante de l'antigène)

Cette étape se déroule dans la moelle osseuse. Elle va de la cellule souche lymphoïde à la cellule B immature qui exprime des IgM membranaires. Trois grands stades intermédiaires ont été identifiés : les cellules pro-B où les segments génétiques D et J_H sont associés; les cellules pré-B qui expriment une chaîne μ cytoplasmique et un substitut d'IgM membranaire avec une chaîne légère (V pré-B et $\lambda 5$) et les cellules B immatures qui expriment des IgM membranaires. Le précurseur B le plus précoce est la cellule pré-pro-B ([Osmond et al., 1998](#)). Elle commence à exprimer le marqueur B220 spécifique de lignée B mais n'exprime pas encore le CD19. La cellule pré-pro-B se différencie en cellule pro-B B220⁺CD117⁺CD43⁺. La cellule pro-B effectue un réarrangement V_H-DJ_H et se différencie en cellule pré-B qui exprime une chaîne μ fonctionnelle qui s'associe avec une pseudo-chaîne légère et l'hétéromère Ig α /Ig β pour constituer le pré-BCR (pre-B cell receptor). Sa signalisation assure la survie et la différenciation des cellules pré-B et leur expansion clonale. Les cellules pré-B expriment ensuite une chaîne μ cytoplasmique et réarrangent les loci des chaînes légères. Une chaîne légère définitive peut s'associer à la chaîne lourde avec pour conséquence l'expression d'un BCR de type IgM à sa surface : c'est le stade B immature. L'expression d'une IgM membranaire confère à la cellule B immature sa spécificité de reconnaissance à l'antigène.

Ces étapes de différenciation sont sous le contrôle des cellules stromales par des interactions membranaires. Les cellules stromales fournissent un microenvironnement particulier nécessaire pour le développement lymphocytaire B. Les cellules stromales modulent la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs B par la synthèse de facteurs solubles (cytokines et chémokines) et l'expression de molécules d'adhérence indispensables à l'initiation des voies des signalisations (Corfe and Paige, 2012).

2.2. La phase tardive de la lymphopoïèse B (phase dépendante de l'antigène) chez la souris

La phase tardive de la lymphopoïèse B a lieu dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires périphériques. Elle est essentielle pour la diversité du répertoire B. La phase tardive conduit à la formation des cellules sécrétrices d'anticorps et des cellules B mémoires (**Figure 5B**). Elle nécessite un signal activateur délivré par l'antigène grâce à l'interaction d'un lymphocyte TCD4⁺ et de cellules B matures IgM⁺IgD⁺. Avant de quitter la moelle osseuse, les cellules B immatures subissent une sélection positive. Les cellules B immatures non auto-réactives ou exprimant un très faible BCR auto-réactif (Gaudin *et al.*, 2004) survivent et gagnent la périphérie. Ces cellules B immatures subissent un processus de sélection négative où les cellules possédant des Ig membranaires spécifiques pour un antigène de soi sont éliminées par apoptose. Les cellules B qui survivent quittent la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes périphériques (rate, ganglions lymphatiques et plaques de Peyer) où elles subissent les dernières étapes de maturation.

2.3. Le stade intermédiaire de développement B

Ce stade, appelé le stade B transitionnel, constitue la dernière étape avant la rencontre avec des antigènes exogènes. Les cellules de ce stade font le lien entre les cellules B immatures de la moelle osseuse et les cellules B matures périphériques. Elles sont divisées en deux populations : les cellules transitionnelles de type 1 (T1) et de type 2 (T2). Les cellules T1 ont un phénotype proche de celui des cellules B immatures. Elles ont une forte expression d'IgM membranaire et peu ou pas d'expression d'IgD. Lorsqu'elles survivent à la sélection négative, elles deviennent des cellules T2 (IgM^{low}IgD^{high}CD23⁺) et elles occupent les follicules primaires de la rate (Loder *et al.*, 1999).

2.4. Les cellules B matures et la formation de centre germinatif

Les cellules B T2 poursuivent leur maturation et deviennent des cellules B matures naïves. Ces dernières, selon leur phénotype et leur fonction, peuvent être :

- Des cellules B de la zone folliculaire (cellules B folliculaire) dont le phénotype est $IgM^{low}IgD^{high}CD21^{-}CD23^{+}$. Elles sont présentes dans les follicules primaires autour des cellules dendritiques folliculaires, dans la pulpe blanche de la rate ou les ganglions lymphatiques où elles peuvent rencontrer leur antigène spécifique.
- Des cellules B de la zone marginale dont le phénotype est $IgM^{high}IgD^{low}CD21^{high}CD23^{-}$. Elles sont localisées entre la pulpe blanche et la pulpe rouge de la rate en périphérie des follicules.

La rencontre avec l'antigène déclenche une réponse T-dépendante et active les cellules B matures naïves. Elles migrent dans la zone extra-folliculaire et interagissent avec les cellules T activées par le même antigène (**Figure 5B**). Des cytokines secrétées par les lymphocytes activés favorisent la croissance et la différenciation lymphocytaire B. Ces cellules B activées vont alors connaître deux destinées :

- Une partie se différencie en plasmocytes à courte durée de vie produisant des anticorps de type Ig (cellules effectrices de la réponse humorale contre l'antigène).
- Une autre partie se différencie en cellules B mémoires (cellules à longue durée de vie)

2.5. La formation de centre germinatif

La réponse T-dépendante, après la rencontre avec l'antigène et la migration des cellules B activées dans le follicule primaire où elles entament une expansion clonale, entraîne la formation d'un centre germinatif (CG). Au sein de ces follicules, les lymphocytes B sont en interactions avec une sous population de lymphocytes T et avec les cellules dendritiques folliculaires (FDC pour Follicular Dendritic Cell). Ces interactions sont nécessaires pour le développement des LB (**Figure 5B**).

Les CG apparaissent quelques jours après la stimulation antigénique. Ils sont le siège de l'hypermutation somatique et de la commutation isotypique, de la sélection positive ou négative, et de l'induction de la différenciation des cellules B en plasmocytes ou en cellules B mémoires. Ils sont constitués de deux parties :

- Une zone sombre qui est le siège d'une prolifération massive des centroblastes qui sont la cible de l'hypermutation somatique.

- Une zone claire où se localisent les centrocytes qui sont la cible de la commutation isotypique.

La différenciation lymphocytaire B s'accompagne de modifications morphologiques, de changement dans l'expression de molécules membranaires, d'une diminution progressive des Ig de membrane avec augmentation des Ig cytoplasmiques, et de modifications génétiques.

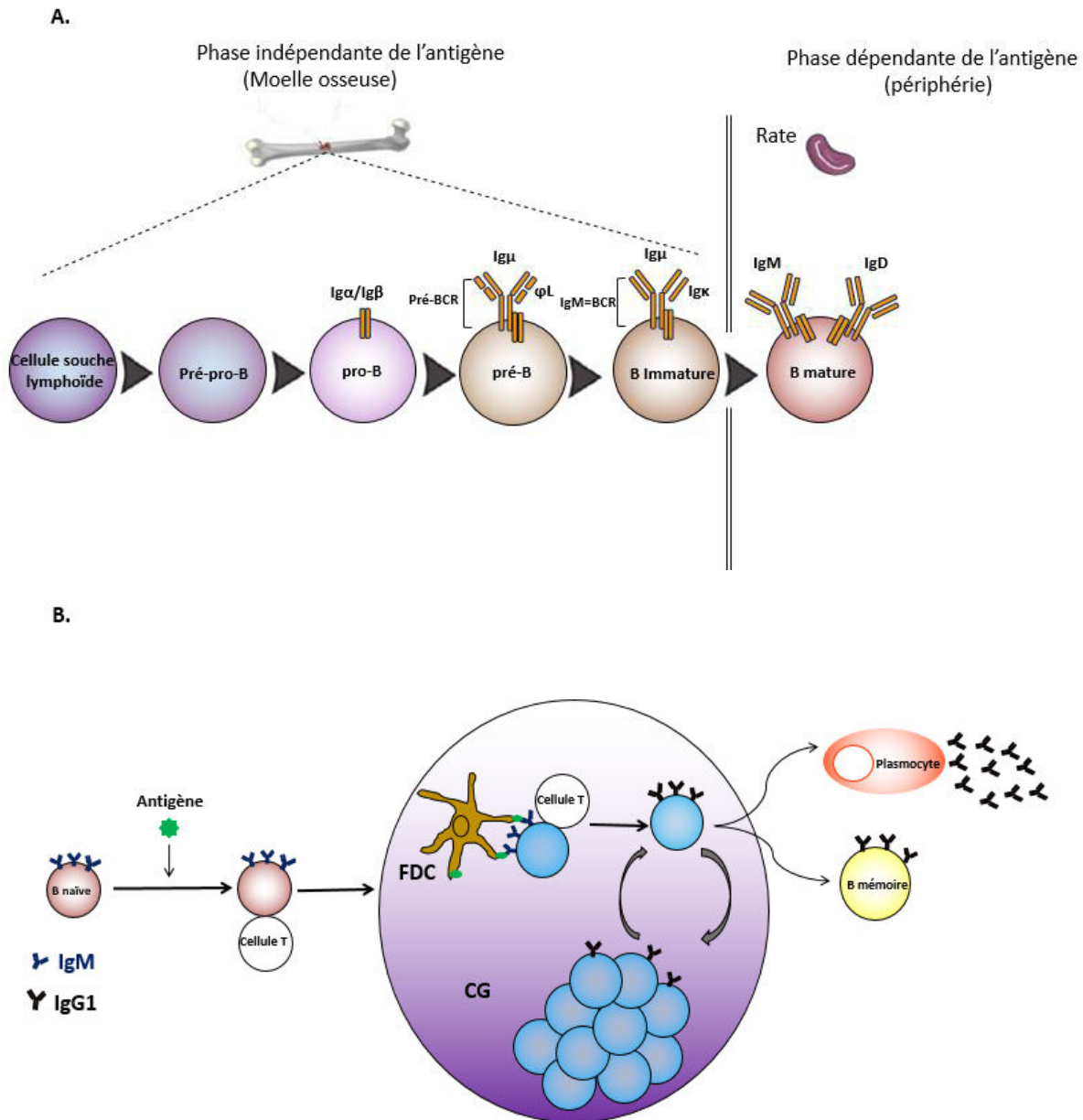


Figure 5 : Stades de développement lors de la lymphopoïèse B.

A. Schéma simplifié des principales étapes du développement B précoce. **B.** Présentation schématique de réaction dans le centre germinatif. Les cellules B naïves interagissent avec les cellules T et les cellules dendritiques folliculaires (FDC) conduisant à la prolifération et la commutation isotypique, par exemple vers IgG1. Les cellules B se différencient en cellules B mémoires ou en plasmocytes sécrétant des anticorps. D'après Kurosaki, 2010.

3. Description phénotypique lors de la lymphopoïèse B chez la souris

L'expression de marqueurs intracellulaires et membranaires (**Figure 6**) est une des caractéristiques du développement B. D'après la classification de Rolink/Melchers ([Osmond *et al.*, 1998](#)), le précurseur le plus précoce qui définit le stade pré-pro-B commence à exprimer le marqueur B220. Au stade pro-B les cellules expriment le CD43 et le CD117 (le récepteur à activité tyrosine kinase c-Kit). Les cellules pré-B perdent l'expression du CD117 et acquièrent le CD25. Au stade pre-B les cellules expriment un pré-BCR (chaîne lourde μ fonctionnelle associée avec une pseudo-chaîne légère et l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$). Le CD138, un marqueur classique des plasmocytes, se trouve être également transitoirement exprimé au stade proB/pré-B en association avec le CD117 et le CD43 ([Tung and Herzenberg, 2007](#)). Quand le réarrangement sur les loci des chaînes légères est productif, la cellule exprime à sa surface un BCR de type IgM (composé de deux chaînes lourdes μ et deux chaînes légères κ ou λ associées aux molécules de transduction de signal $Ig\alpha$ et $Ig\beta$). La cellule, à ce stade, est appelée « B immature ». Les cellules B immatures quittent la moelle osseuse et migrent vers les organes lymphoïdes périphériques et passent au stade transitionnel (cellules BT1 et T2), et commencent à exprimer l'IgD. Les cellules de type T1 ont le phénotype $IgM^{high}IgD^{low}CD21^{low}CD23^{-}$. Lorsqu'elles sont soumises à une sélection négative, elles deviennent des cellules T2 et occupent les follicules primaires de la rate ([Loder *et al.*, 1999](#)). Ces cellules ont un phénotype intermédiaire entre les cellules B T1 et des lymphocytes B matures. Elles sont de phénotype $IgM^{high}IgD^{high}CD21^{high}CD23^{+}$. Ce sont des cellules présentatrices d'antigènes performantes. Elles acquièrent un phénotype différent selon la structure histologique qu'elles colonisent. Elles peuvent être des cellules B folliculaires (FO) ou des cellules B de la zone marginale (MZ). Les cellules FO sont de phénotype $IgM^{low}IgD^{high}CD23^{+}$, alors que les cellules MZ sont de phénotype $IgM^{high}IgD^{low}CD21^{high}CD23^{-}$.

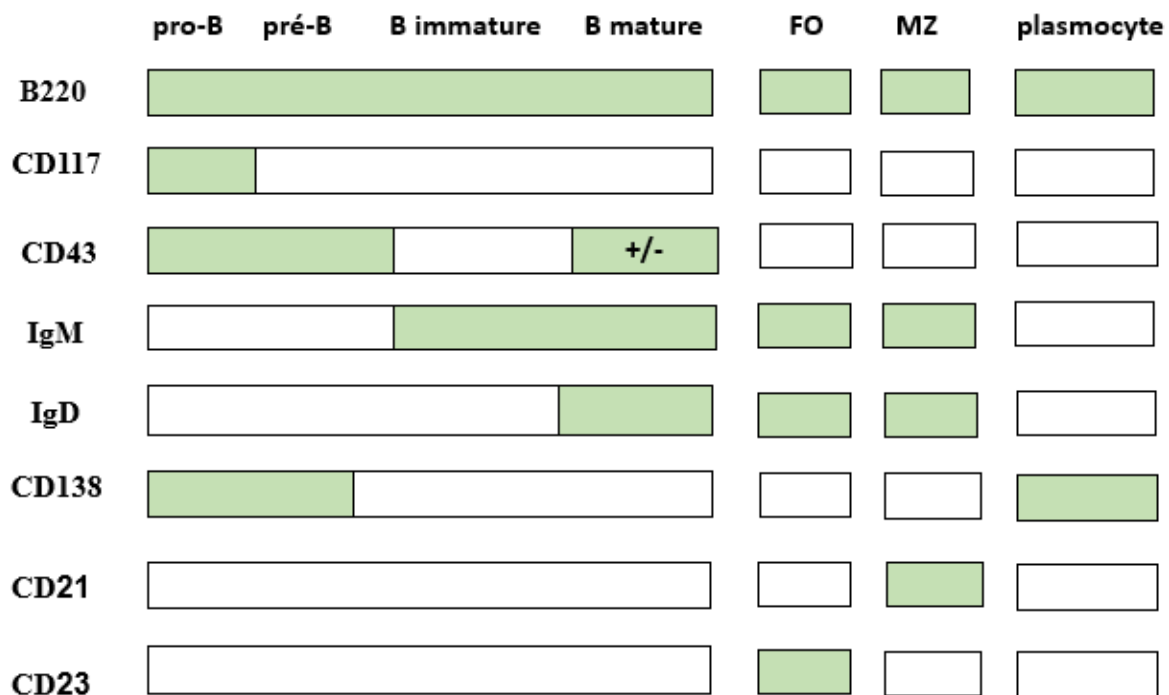


Figure 6 : Présentation schématique des marqueurs de surface lors de développement B chez la souris.

L'expression de chaque marqueur dans les différents stades de développement B est présentée en vert.

4. Les modifications géniques des loci d'Ig lors de la lymphopoïèse B

Il s'agit de plusieurs réarrangements et recombinaisons intra-géniques qui ciblent la région d'ADN codante pour la partie variable des chaînes lourdes et légères. Le premier réarrangement a lieu sur le locus IgH à partir du stade pro-B où un segment D et un segment J_H forment un segment D-J_H sur les deux allèles. Un second type de recombinaison a lieu au stade pré-B. Il s'agit de la formation d'un segment V(D)J codant la région variable de chaîne lourde. Ce remaniement correspond à l'aboutage aléatoire d'un segment V_H avec le segment joint D-J_H. Si ce réarrangement est productif, une chaîne μ est produite et exprimée sous la forme d'un **pré-BCR** membranaire en association avec une pseudo-chaîne légère codée par les gènes V pré-B et λ5 (Melchers *et al.*, 1993) et avec les molécules de transduction du signal Igα et Igβ. Puis des réarrangements V_L et J_L sont effectuées sur le locus des chaînes légères d'Ig. Ces

réarrangements s'effectuent tout d'abord sur les allèles des gènes des chaînes légères κ puis sur ceux des chaînes légères λ si les réarrangements κ ne sont pas fonctionnels. La chaîne légère créée va remplacer la pseudo-chaîne légère et donc une IgM de surface va être exprimée ce qui permet à la cellule de passer au stade B immature (IgM⁺IgD⁻)

Un seul type de pré-BCR associée aux molécules Ig α et Ig β est exprimée à la surface de la cellule B parce que les réarrangements des chaînes lourdes n'autorisent l'expression que d'un seul allèle.

5. Les mécanismes des réarrangements géniques des gènes des Ig

Les gènes des Ig pour pouvoir être transcrits doivent subir des réarrangements et des remaniements géniques. Ces événements se font d'abord dans les régions variables (recombinaison V(D)J) puis dans les régions constantes (commutation isotypique).

5.1. Les recombinaisons V(D) J

Ces réarrangements sont caractéristiques des stades précoces du développement B. Ils juxtaposent un gène V avec un segment J pour les chaînes L et, pour les chaînes H, un segment D avec un segment J puis un gène V avec le DJ réarrangé (**Figure 7**). Ces événements se font grâce aux produits des gènes RAG-1 et RAG-2 (pour Recombination Activation Gene) (Borghesi *et al.*, 2004). RAG-1 et RAG-2 reconnaissent des signaux de recombinaison heptamère et nanomère situés en 3' des gènes V, en 5' des segments J et de part et d'autre des segments D. Les motifs heptamères (sept nucléotides CACAGTG) et nanomère (neuf nucléotides ACAAAAACC) constituent des sites spécifiques nommés RSS (séquence signal de recombinaison). Les motifs heptamères sont séparés par des régions de 12 ou 23 nucléotides aléatoires (Tonegawa, 1983 ; Schlissel, 2003). C'est à ces sites que s'effectuent les recombinaisons des segments codant les régions variables des chaînes lourdes et légères. Ces recombinaisons se déroulent en deux phases : premièrement, la reconnaissance des sites RSS et la réalisation des cassures double brin de l'ADN ; deuxièmement, l'aboutage des segments et la réparation de la jonction occasionnée. Les protéines Rag1 et Rag2 en association avec d'autres complexes protéiques interviennent dans la génération des coupures de l'ADN. La réparation des cassures double brin de l'ADN se fait par la voie du Non Homologous End Joining (NHEJ). Cette voie de réparation fait intervenir plusieurs facteurs protéiques dont (entres autres) Ku70 et Ku80 qui ont pour rôle de protéger les extrémités d'ADN des activités exonucléasiques (Taccioli *et al.*, 1994), et de faciliter la ligature de la jonction en rapprochant

les segments d'ADN. La ligature est ensuite assurée par les facteurs ligase IV et XRCC4 (X-ray Repair Cross Complementing protein 4) (Calsou *et al.*, 2003 ; Hentges *et al.*, 2006). Les modifications produites au niveau de la jonction codante créent la diversité du répertoire antigénique. En plus, l'intervention de l'enzyme TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) augmente la diversité jonctionnelle en ajoutant aléatoirement des nucléotides aux extrémités des régions codantes (Desiderio *et al.*, 1984).

5.2. Diversification secondaire: la commutation de classe CSR (pour class-switch recombination) et l'hypermutation somatique (SHM)

Ces événements sont caractéristiques des phases tardives du développement B. Les diversifications secondaires permettent de créer des Ig plus affines et d'augmenter leur spécificité antigénique. L'enzyme clef de ces recombinaisons secondaires est AID (Activation-Induced cytidine Deaminase). Cette enzyme est B spécifique. Elle appartient à la famille des déaminases APOBEC (APOlipoprotein B mRNA-editing Enzyme Catalytic). Le rôle d'AID est confirmé dans le syndrome d'hyper IgM chez des patients portant une mutation du gène *Aicda* codant pour AID. Ce syndrome est caractérisé par un taux élevé d'IgM, une altération de la CSR et une absence de SHM des régions variables (Revy *et al.*, 2000). La délétion d'AID, chez la souris, n'altère pas le développement B mais entraîne un blocage des SHM et de la CSR (Muramatsu *et al.*, 2000).

5.2.1. Point de vue mécanistique sur le rôle d'AID

Les mécanismes de diversifications secondaires comme la SHM et la CSR se déroulent en deux étapes :

- La déamination de l'ADN après recrutement d'AID aux régions V.
- La réparation des lésions occasionnées par AID.

Lorsque AID est recrutée, elle va créer un mésappariement de l'ADN en déaminant une cytosine (dC) en uracile (dU). L'apparition d'un dU au sein de la molécule d'ADN engendre un mésappariement dU-dG. L'élimination de ce mésappariement peut être effectuée selon différentes voies de réparation et produire des mutations (SHM) ou des cassures double brin (CSR). La déamination des dC s'effectue préférentiellement lorsque les lésions introduites par AID sont situées dans des « hotspots » ayant pour séquence le motif WRCY (W=weak=dA/dT, R= purine = dA/dG, et Y = pyrimidine = dC/dT) (Betz *et al.*, 1993 ; Pham *et al.*, 2003). La fréquence des hotspots présente en plus grande quantité dans les régions S que dans les régions

variables des Ig peut expliquer la différence fondamentale entre SHM et CSR ([pour revue Di Noia and Neuberger, 2007 ; Alt et al., 2013](#)).

5.2.2. La commutation isotypique (CSR)

C'est une recombinaison spécifique de régions particulières de l'ADN appelées les régions switch (S). La CSR modifie les fonctions effectrices des anticorps en conservant leur spécificité antigénique. La CSR permet de remplacer le gène C_{μ} (gène de la région constante de l'IgM produit précocement au cours du développement B) par un gène C_H en aval (γ , ϵ ou α) (**Figure7**) et donc permet à la cellule B d'exprimer à sa surface un BCR d'un autre isotype qu'IgM : IgG, IgA ou IgE. Cette nouvelle Ig possède une fonction effectrice différente. Elle diffère par la nature de sa chaîne lourde (les gènes de la région variable ne sont pas affectés). La majorité des CSR vers les classes IgG, IgA et IgE dépend de la présence des lymphocytes T et de cytokines. Ces isotypes ont des fonctions différentes. Les IgA sont fortement résistantes à la protéolyse enzymatique. Les IgA se trouvent dans les sécrétions respiratoires, digestives ou génitales. Les IgG sont impliquées dans les défenses virales et parasitaires. Les IgE sont prédominantes dans la défense parasitaire ainsi que lors des réactions d'hypersensibilités. En absence de l'Ag, les mastocytes et les basophiles exprimant des récepteurs à haute affinité pour IgE (FcεRI) peuvent se lier aux IgE monomériques. L'agrégation de complexe IgE-FcεR, par un Ag spécifique, entraîne la sécrétion d'histamine responsable de l'hypersensibilité.

5.2.3. Les régions switch

La CSR s'effectue entre deux régions S, une région S donneuse et une région S accepteuse. Ces régions S sont localisées en 5' de chaque gène constant codant de la chaîne lourde à l'exception jusqu'à très récemment de C_{δ} (voir annexe). Les régions S sont constituées de séquences répétées riches en G/C dont la taille varie entre 1 et 12 kb. Les régions S se présentent en deux catégories : S_{μ} , S_{α} et S_{ϵ} composées de séquences pentamériques alors que $S_{\gamma 1}$, $S_{\gamma 2a}$, $S_{\gamma 2b}$ et $S_{\gamma 3}$ contiennent des motifs répétés de 49 à 52 paires de bases. Le rôle des régions S a été étudié grâce aux modèles de délétion pour ces régions. Ces modèles ont démontré que l'efficacité de la CSR dépend de l'orientation, de la longueur et du caractère répétitif de ces régions ([Shinkura et al., 2003](#)).

5.2.4. L'hypermutation somatique (SHM)

La SHM génère principalement des mutations ponctuelles. Ces mutations, dont la fréquence moyenne est d'environ 1 pour 1000 bases (Rada *et al.*, 2001), sont ciblées dans les régions variables des chaînes H et L d'Ig (**Figure 7**). Les mutations obtenues peuvent être de deux types :

- Les transitions qui sont le changement d'une base pyrimidine par une autre pyrimidine ou d'une purine par une autre purine soit dC/dT ou dA/dG.
- Les transversions qui sont le changement d'une base pyrimidine par une purine.

Les mésappariements générés par AID peuvent être éliminés par différentes voies. L'ADN peut être répliqué sans être réparé ou bien l'ADN contenant le mésappariement est reconnu par l'enzyme UNG (Uracil-N-glycosylase) et la molécule d'ADN est réparée par les voies BER (Base-Excision Repair) et/ou MMR (MisMatch Repair) (Di Noia and Neuberger, 2007 ; Peled *et al.*, 2008). Dans le premier cas, l'ADN est directement répliqué. L'ADN polymérase ignore la mutation et considère le dU comme dT générant alors une transition dC/dT et donc dG/dA sur le brin opposé. Dans le deuxième cas, la base U est reconnue et éliminée par la protéine UNG ce qui aboutit à l'apparition d'un site abasique. Celui-ci est pris en charge par le mécanisme de BER qui va, avec l'intervention des polymérases infidèles (REV1, Pol β ...), insérer aléatoirement A, C, T ou G à la place du site abasique, conduisant alors à des mutations de type transitions ou transversions (Rada *et al.*, 2002b ; Pérez Durán *et al.*, 2012). Dans un troisième cas, le mésappariement peut être pris en charge par la voie de réparation MMR. Cette voie fait intervenir l'hétérodimère MSH2/MSH6 (MutS Homolog) dont la liaison entraîne le recrutement des protéines MLH1 et PMS2 qui permettent l'élimination de l'Uracile en créant une cassure simple brin. Les nucléotides voisins de cette cassure sont ensuite éliminés par l'enzyme exonucléase 1 (EXO1). Des mutations de type transitions et transversions sont introduites ensuite par des polymérases infidèles (Delbos *et al.*, 2007).

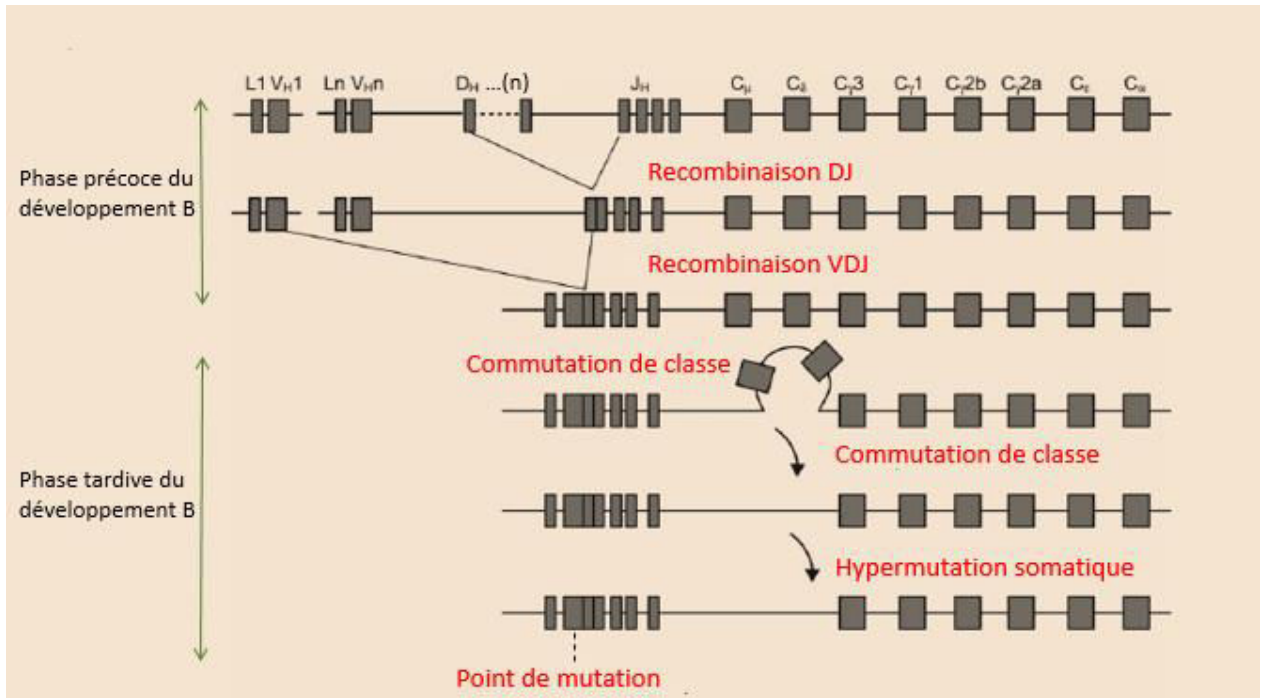


Figure 7 : Présentation schématique des recombinaisons V(D)J, des commutations de classe et de l'hypermutation somatique des gènes de la chaîne lourde des Ig de souris.

Lors des recombinaisons DJ, un segment D se juxtapose avec un segment J. Lors des recombinaisons V(D)J, un segment V se juxtapose avec le DJ réarrangé pour former l'unité V(D)J. Lors de la commutation de classe un changement d'isotype de chaîne lourde se met en place. Des points de mutations dans les régions variables contribuent au processus d'hypermutation somatique. D'après Kurosaki *et al.*, 2010.

Chapitre2. La lymphomagenèse B; quand le lymphocyte B bascule vers l'état pathologique

1. Lorsque le développement des lymphocytes B est perturbé

Le déséquilibre de la balance physiologique entre la prolifération et la mort cellulaire est une caractéristique majeure de tous les lymphomes. Certains types de lymphomes sont initiés par l'inhibition de l'apoptose (translocation du gène *bcl-2* lors des lymphomes folliculaires (FL) ou des gènes *BCL10* et *API2/MLT1* lors des lymphomes de tissu lymphoïde associé à la muqueuse (MALT)). D'autres types de lymphomes sont provoqués par un renforcement de l'activité proliférative qui résulte du dysfonctionnement d'oncogènes régulateurs du cycle cellulaire. C'est le cas des translocations affectant le gène *BCL6* lors des lymphomes à grandes cellules B (LBCL), le gène *c-myc* lors des lymphomes de Burkitt (BL) ou le gène cycline D1 lors des lymphomes du manteau (MCL) (**Figure 8**) (Sánchez-Beato *et al.*, 2003). 95% des lymphomes en France sont d'origine B. Ils diffèrent selon leur stade de développement et le programme oncogénique utilisé. Ces lymphomes B utilisent les caractéristiques régulatrices biologiques des cellules B normales pour leur transformation maligne. Chaque type de lymphomes dépend du stade de différenciation B (Lenz et Staudt., 2010).

Lymphome	Gène	Fonctionne	Altération	Fréquence%
FL	BCL2	inhibition de l'apoptose	t(14;18)	70-90
MALT	BCL10 API2/MLT1	inhibition de l'apoptose via NF-κB	t(1;14) t(1;18)	50
MCL	Cyclin D1	transition G1/S de cycle cellulaire	t(1;14)	90
LBCL	BCL6	l'activation des cellules B l'inflammation contrôle de cycle cellulaire l'inhibition de l'apoptose	t(3;N)	30-40
BL	c-myc	différenciation métabolisme contrôle de cycle cellulaire induction de l'apoptose l'adhésion	t(8;14) t(8;22) t(2;8)	80 10 10

Figure 8 : Exemples d'altérations chromosomiques de gènes régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose lors des lymphomes B.

2. Les dangers lors de la différenciation normale des cellules B

2.1. Le centre germinatif est un environnement favorable pour les lymphomes B

Après la stimulation des cellules B naïves par un antigène dépendant des cellules T, la réaction dans les centres germinatifs est caractérisée principalement par l'action d'AID (Activation-Induced cytidine Deaminase) qui induit deux événements génétiques essentiels lors de la différenciation des cellules B : la SHM et la CSR. La SHM entraîne des mutations dans la région variable des Ig. Ces mutations ont pour but d'augmenter l'affinité des Ig aux antigènes. La CSR change l'isotype de la chaîne lourde (IgM vers IgG, IgA ou IgE). Toutes ces modifications sont essentielles pour la réponse immune normale mais aussi sont une source importante de lésions géniques qui peuvent être pathologiques et conduisent à des lymphomes matures (Lenz and Staudt., 2010). Le processus de recombinaison V(D)J, initié par les enzymes RAG1 et RAG2, implique des cassures doubles brins d'ADN et leur réparation. Lorsque ces cassures d'ADN sont réparées de façon aberrante, des translocations chromosomiques, des amplifications, des mutations, des altérations peuvent être engendrées. En général, les lymphomes générés sont de types immatures (pro-B, pré-B).

2.2. Translocations chromosomiques oncogéniques et l'émergence de lymphome

Les translocations chromosomiques sont les principaux événements oncogéniques associés à la lymphomagenèse B. Ces processus ont pour origine l'instabilité génomique provoquée par les réarrangements génétiques des loci IgH et IgL lors de la lymphopoïèse B. Ces translocations mènent certains oncogènes aux loci d'Ig. Dans la plupart des cas l'oncogène transloqué passe sous la dépendance des éléments *cis*-régulateurs transcriptionnels du locus d'Ig.

2.3. L'origine des cassures d'ADN dans les loci d'Ig

Les translocations chromosomiques nécessitent des cassures doubles brins de l'ADN dans les loci d'Ig ainsi que dans les loci des oncogènes. Ces cassures sont réalisées par les enzymes RAG1 et RAG2 lors des recombinaisons V(D)J. De même, ces cassures peuvent être créées lors des SHM et de la CSR. Schématiquement trois points de cassures ont été observés aux loci des Ig lors des lymphomes B matures (Küpper, 2005) (Figure 9) :

- 1- Le point de cassure dans les segments D ou J. Il est dû à une erreur lors de la recombinaison V(D)J. Ce cas se retrouve lors des translocations bcl-2-IgH lors du lymphome folliculaire ou cycline D1-IgH lors de lymphome du manteau.
- 2- Le point de cassure est réalisé lors des SHM à l'intérieur ou à proximité de l'exon V(D)J réarrangé. Ce point de cassure est observé lors de la translocation c-myc-IgH lors du lymphome de Burkitt.
- 3- Le troisième point de cassure se trouve dans les régions S des segments géniques des régions constantes lors des CSR. Ce point de cassure est à l'origine de la translocation des gènes cycline D1 et cycline D3 lors de myélomes multiples.

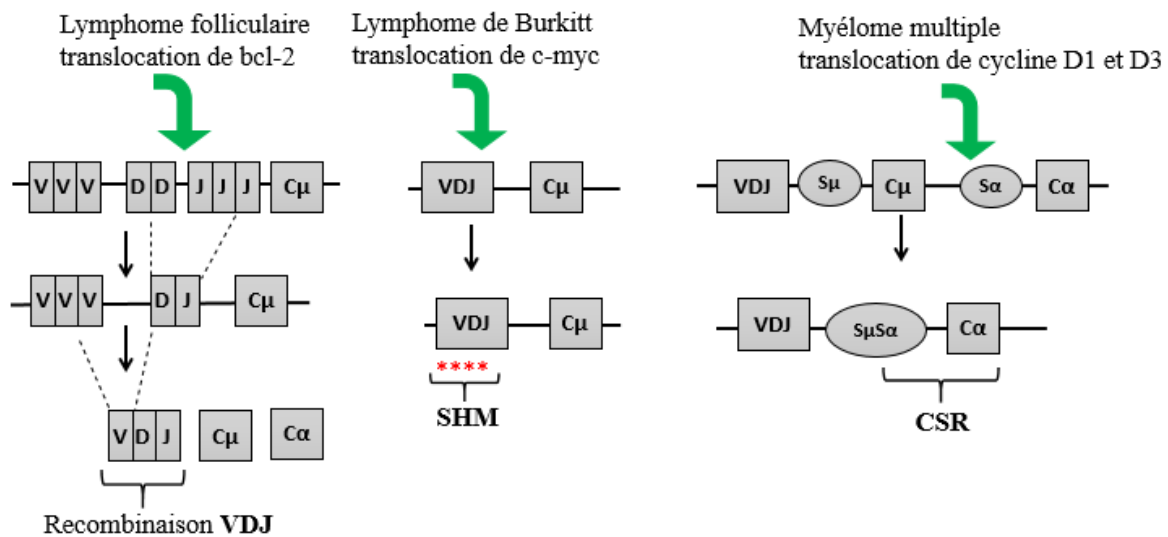


Figure 9 : Représentation schématique des translocations oncogéniques lors des recombinaisons V(D)J, de la SHM et de la CSR.

Les sites de la translocation des oncogènes dans le lymphome folliculaire, le lymphome de Burkitt et le myélome sont indiqués par les flèches en vert. D'après Küpper, 2005.

Chapitre3. Les éléments régulateurs du locus IgH; rôle de la région régulatrice 3'RR

La transcription des gènes d'Ig est sous le contrôle de séquences régulatrices : les promoteurs et les activateurs de transcription. Les promoteurs situés en 5' du site d'initiation de transcription sont des séquences riches en A et T (TATA box) qui contrôlent la fixation de l'ARN polymérase II. Les séquences activatrices appelées « enhancers » en anglais sont des sites de liaison de facteurs de transcription. Leur activité peut être induite par des signaux extérieurs et dépend du stade de différenciation de la cellule. Les « enhancers » peuvent réguler la transcription de façon positive ou négative (Pinaud *et al.*, 2011).

1. L'activateur intronique E μ

L'élément activateur E μ est constitué d'un « core activateur » (cE μ) de 220 pb, entouré de deux régions d'attachement à la matrice (MARs). E μ est localisé en 5' du locus IgH, au sein de l'intron entre le segment J_{H4} et le gène C μ en amont de S μ (Figure 3). E μ possède une activité quasi-spécifique du lignage B. Cette activité est observée aux stades précoces du développement B. L'élément E μ contrôle les recombinaisons V(D)J (Pinaud *et al.*, 2011 ; Perlot *et al.*, 2005). Le rôle d'E μ a été étudié grâce à des modèles de souris *Knock-out* (KO). Plusieurs modèles de souris transgéniques ont montré que E μ est capable de déréguler spécifiquement c-myc dans la lignée lymphocytaire B et de générer l'apparition de lymphomes immatures (Adams *et al.*, 1985).

2. La région régulatrice 3'RR de locus d'IgH

Il avait été observé, chez l'homme comme chez la souris, des translocations chromosomiques de l'oncogène c-myc au locus IgH qui n'intégraient pas l'élément E μ mais qui cependant entraînaient une forte expression de l'oncogène (Neuberger and Calabi, 1983). Ces observations laissaient soupçonner l'existence d'autres éléments régulateurs pouvant induire la surexpression de l'oncogène. De plus, une diminution de la transcription du locus IgH avait été observée lors de l'analyse d'un myélome de souris présentant une délétion d'environ 4kb en

aval de C α . Ceci suggérait l'existence d'une région en 3' de locus IgH contenant des éléments *cis*-régulateurs (Gregor and Morrison, 1986).

2.1. Structure unique de la 3'RR

La 3'RR est spécifiquement activée dans les cellules lymphocytaires B. Elle est l'élément clef pour des SHM (Rouaud *et al.*, 2013) et de la CSR (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a). Les « enhancers » de la 3'RR ont été mis en évidence grâce à la technique d'hypersensibilité à la DNase I. La 3'RR comprend 4 sites hs (hs3a, hs1,2, hs3b et hs4) (Figure 3), repartis sur plus de 30kb. Le séquençage de la 3'RR a montré que les trois premiers éléments forment une structure dite « quasi-palindromique » unique qui s'étend sur 20kb dont le centre est constitué par hs1,2. De part et d'autre de l'activateur hs1,2 se situent des séquences inversées répétées (IR1 à IR3) et des régions répétées en tandem (TR). Les extrémités du quasi-palindrome sont formées par les éléments hs3a et hs3b (Chauveau and Cogné, 1996 ; Seleque *et al.*, 1997). Les éléments hs3a et hs3b possèdent une très forte homologie (>97%) et sont en orientation inverse sur le chromosome. L'élément hs4 se trouve en aval (et en dehors) de la structure quasi-palindromique. Hs4 constitue le dernier activateur transcriptionnel de la 3'RR. Ces quatre activateurs transcriptionnels (hs3a, hs1,2, hs3b et hs4), spécifiques des cellules lymphocytaires B, sont suivis par une région constituée des sites hs5, hs6 et hs7. Ces sites possèdent une activité isolatrice grâce à la présence de nombreux sites de liaison pour CTCF (CCCTC-binding Factors) (facteurs liant les motifs CCCTC) (Garrett *et al.*, 2005). hs5, hs6 et hs7 ne participent pas à la régulation transcriptionnelle du locus IgH. Ainsi l'insertion d'une cassette *neo*^R entre hs4 et hs5 n'a pas de conséquence sur la transcription du locus IgH. (Manis *et al.*, 2003).

Ce qui caractérise le locus IgH chez l'homme est la duplication des gènes γ , ϵ et α qui définit deux ensembles en tandem : γ_3 , γ_1 , $\psi\epsilon$ et α_1 d'une part et $\psi\gamma$, γ_2 , γ_4 , ϵ et α_2 d'autre part. Chaque ensemble, en aval du gène C α , possède une région régulatrice homologue à la 3'RR de la souris. Le locus humain ne contient pas d'activateur équivalent à hs3b murin. Chaque région 3'RR chez l'homme contient 3 activateurs transcriptionnels semblables aux activateurs murin hs3, hs1,2 et hs4. L'élément hs1,2 est également flanqué de régions répétées inversées mais plus courtes que chez la souris. Les activateurs hs3, hs1,2 et hs4 humains suivent le même profil d'expression que les murins (Khamlichi *et al.*, 2000).

2.2. Rôle de la 3'RR lors du développement B normal

2.2.1. La 3'RR est une région B spécifique dont l'activation va du stade pré-B au stade B mature

L'élément $E\mu$ n'est pas totalement B spécifique. $E\mu$ s'exprime également dans les cellules T ainsi que dans les cellules non-lymphoïdes (Cook *et al.*, 1995). En est-il de même pour la 3'RR ? Pour répondre à cette question notre laboratoire a généré des souris GFP-3'RR. Dans ces souris la GFP (Green Fluorescent Protein) est placée sous la dépendance transcriptionnelle de la 3'RR (Figure 10). Toutes les cellules GFP⁺ sont B220⁺ montrant la stricte B spécificité de la 3'RR. L'analyse des souris GFP-3'RR montre également une expression de la GFP du stade pré-B (cellules B220⁺CD43⁺CD117⁻) dans le fémur au stade B mature (cellules B220⁺IgM⁺IgD⁺) dans la rate (Guglielmi *et al.*, 2003b). L'ajout de $E\mu$ dans le transgène GFP-3'RR (souris $E\mu$ -GFP-3'RR) montre son expression dès le stade pro-B (cellules B220⁺CD117⁺) (Guglielmi *et al.*, 2003a). Le transgène $E\mu$ -GFP s'exprime précocement aux stades pro-B et pré-B (Figure 11).

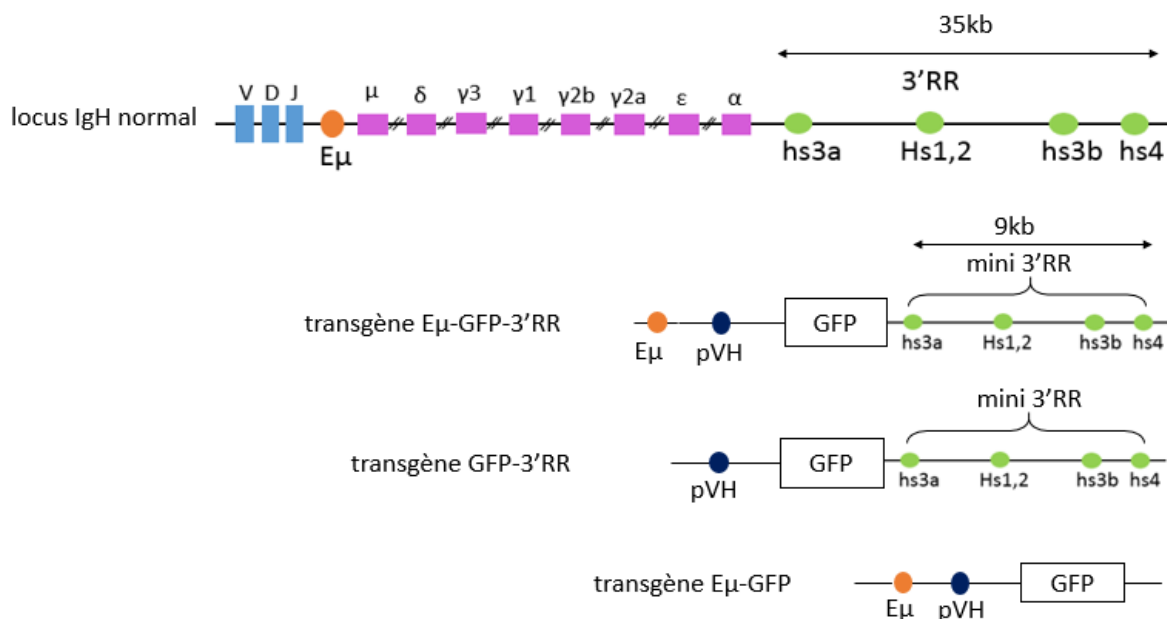


Figure 10 : Représentation schématique de locus IgH murin et des transgènes GFP-3'RR, $E\mu$ -GFP-3'RR et $E\mu$ -3'RR.

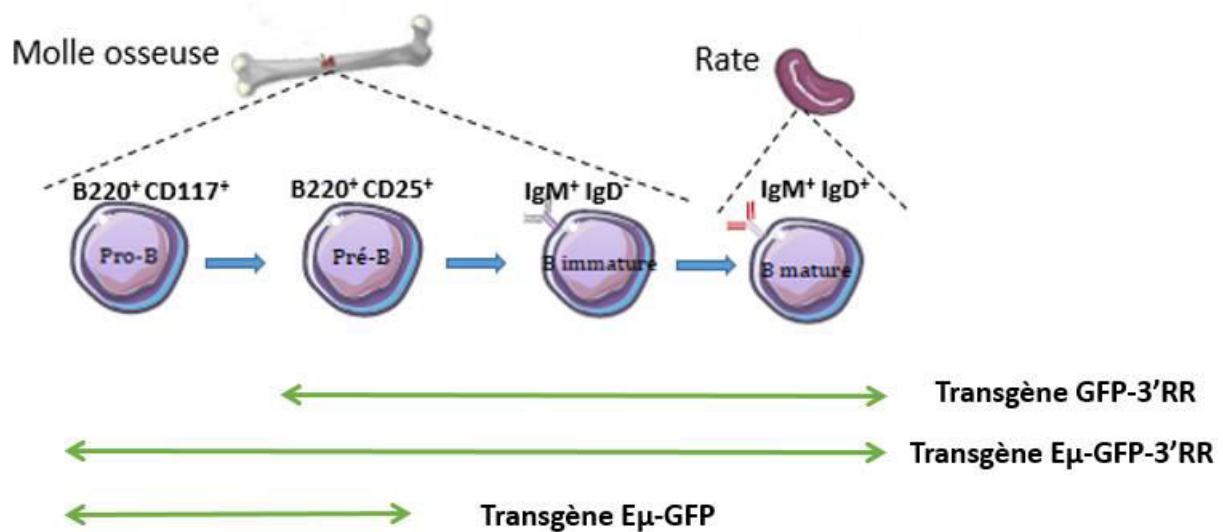


Figure 11 : Représentation schématique de la fenêtre d'activation transcriptionnelle de la 3'RR lors de la maturation B.

Le stade d'activation du transgène est présenté par une flèche double.

2.2.2. La 3'RR orchestre l'expression des gènes constants du locus IgH

Les délétions spontanées ou ciblées (modèles *Knock-out*) de la 3'RR avec les modèles transgéniques ont mis en lumière le rôle et la fonction de cette région. La délétion spontanée de la 3'RR dans une lignée productrice d'IgA a montré une diminution importante de sa transcription et de sa synthèse (Gregor and Morrison, 1986). Les souris porteuses d'une délétion de la 3'RR ou du remplacement d'éléments de la 3'RR (Figure 12) ont clarifié son rôle. Elles ont confirmé que la délétion propre (après élimination du gène Néo par la recombinaison Cre) des « enhancers » hs3a, hs1,2 ou hs3b n'affecte pas l'expression des Ig (Bébin et al., 2010 ; Manis et al., 1998). La délétion de l'élément hs4 baisse légèrement l'expression des IgM membranaires (Vincent-Fabert et al., 2009). La délétion individuelle des éléments hs3a, hs1,2, hs3b ou hs4, ne présente pas d'altération significative sur l'expression des autres gènes d'Ig (Manis et al., 1998 ; Bébin et al., 2010 ; Vincent-Fabert et al., 2009). L'analyse de la double délétion des « enhancers » hs3b/hs4 a démontré une altération sévère de la CSR vers tous les isotypes sauf $\gamma 1$, une baisse de la synthèse d'Ig vers tous les isotypes sauf IgM et IgG1 et aucun rôle sur la SHM des régions VDJ (Pinaud et al., 2001 ; Morvan et al., 2003).

La délétion de la totalité de la 3'RR accentue le phénotype hs3b/hs4 avec une baisse de la CSR vers tous les isotypes (y compris $\gamma 1$), une baisse de la synthèse d'Ig vers tous les isotypes (y compris IgG1 et IgM) et un blocage quasiment complet des SHM au locus IgH (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a ; Rouaud *et al.*, 2013). Par contre, aucun rôle de la 3'RR n'est observé sur les recombinaisons V(D)J (Rouaud *et al.*, 2012) ou la contraction DJ au locus IgH (Medvedovic *et al.*, 2013).

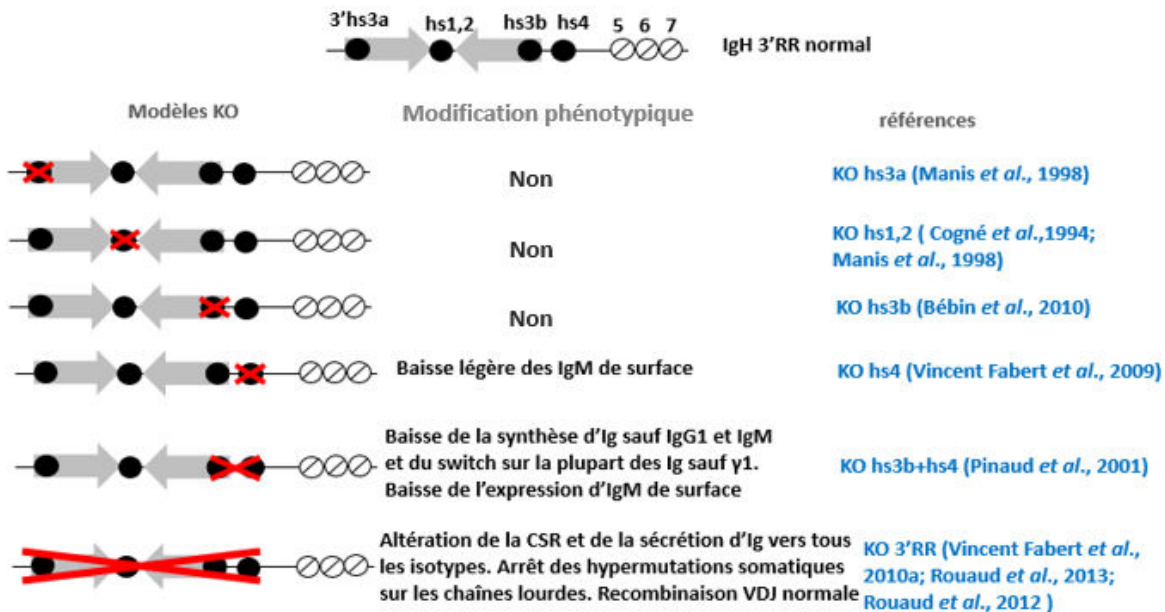


Figure 12 : Modèles murins KO affectant la 3'RR.

2.2.3. Rôle de la 3'RR dans la dérégulation oncogénique

2.2.3.1. Chez l'homme

Au cours du développement des lymphocytes B, les réarrangements géniques (recombinaisons V(D)J, CSR et SHM) du locus IgH le rendent sensible aux translocations chromosomiques. La majorité de lymphomes B de l'adulte porte des stigmates de translocations chromosomiques insérant des oncogènes au locus IgH (bcl-2 lors du lymphome folliculaire, cycline D1 lors du lymphome du manteau et c-myc pour le lymphome de Burkitt). La plus étudiée est la translocation c-myc qui est caractéristique du lymphome de Burkitt (Blum *et al.*, 2004). La dérégulation de c-myc constitue l'évènement majeur de la transformation cellulaire. Dans le lymphome de Burkitt l'élément *cis*-régulateur E_{μ} a été considéré au départ comme un régulateur critique du gène c-myc lors de la lymphomagenèse. Cependant, les souris transgéniques surexprimant c-myc sous le contrôle de E_{μ} , expriment c-myc dans les cellules B

au stade précoce et développent un lymphome B immature (Adams *et al.*, 1985), alors que les lymphomes de Burkitt humains ont un phénotype mature (Blum *et al.*, 2004). Donc l'élément *cis*-régulateur E μ n'était pas le bon candidat pour la dérégulation des oncogènes transloqués. Dans le lymphome de Burkitt, les points de cassure sur le locus IgH se produisent soit dans les régions V(D)J (lymphome de Burkitt endémique) soit dans les régions « switch » (lymphome de Burkitt sporadique). Ces derniers points de cassure éliminent E μ et maintiennent la 3'RR intacte. Cette observation a suggéré son rôle dans la dérégulation oncogénique.

2.2.3.2. Chez la souris

La translocation chromosomique t(8;14) du gène *c-myc* est un événement génétique caractéristique du plasmacytome (PCT) chez la souris (t(12;15)) et de l'immunocytome chez le rat (Janz, 2006). Cette translocation va placer le gène *c-myc* sous la dépendance des activateurs transcriptionnels actifs du locus IgH ce qui sera l'élément moteur de la lymphomagenèse. *c-myc* va être surexprimé avec comme conséquence la transformation maligne des lymphocytes B et l'apparition d'un lymphome.

Pour modéliser l'idée que la 3'RR est capable de déréguler *c-myc* et de conduire au lymphome, des expériences de « *knock-in* » ont été réalisées pour insérer la 3'RR en 3' du *c-myc* endogène (Figure 13). *c-myc* va apparaître écrit de diverses façons dans notre manuscrit. Il apparaîtra noté comme dans la publication scientifique originale de référence. Les souris transgéniques développent progressivement, au cours du temps, des lymphomes ganglionnaires de type Burkitt (B220⁺IgM⁺IgD⁺) avec un fort indice Ki67 (Wang and Boxer, 2005).

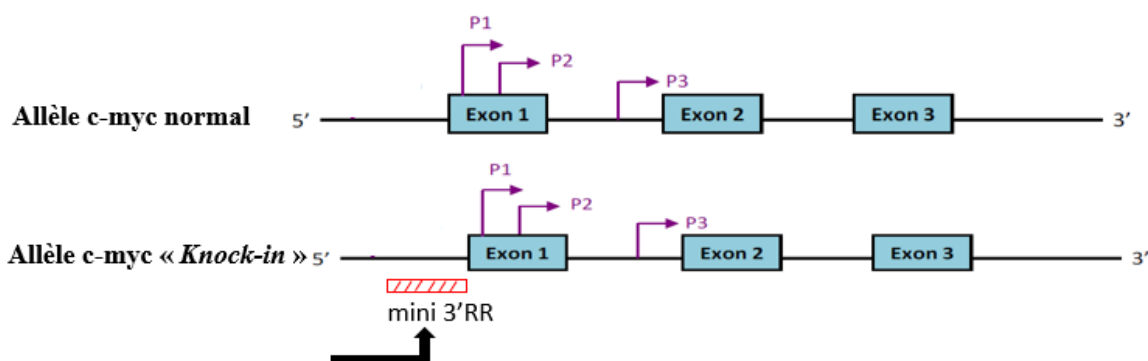


Figure 13 : Présentation schématique du modèle « *Knock-in* » de la 3'RR au locus du gène *c-myc*.

De la même façon, pour mimer chez la souris la translocation t(8;14) du Burkitt humain, une deuxième approche (modèle iMyc^{Eμ}) a été réalisée en mettant le gène c-myc humain sous la double dépendance transcriptionnelle de Eμ et de la 3'RR mais cette fois par l'insertion de c-myc en 5' de Eμ (**Figure 14**). L'insertion du gène c-myc induit chez les souris iMyc^{Eμ} une gamme des lymphomes B matures avec un index prolifératif Ki67 élevé (>70%). Les tumeurs identifiées ont un phénotype Burkitt (B220⁺IgM⁺IgD⁺CD5⁻) et plasmablastique (CD138⁺) (Park *et al.*, 2005a ; Park *et al.*, 2005b)..

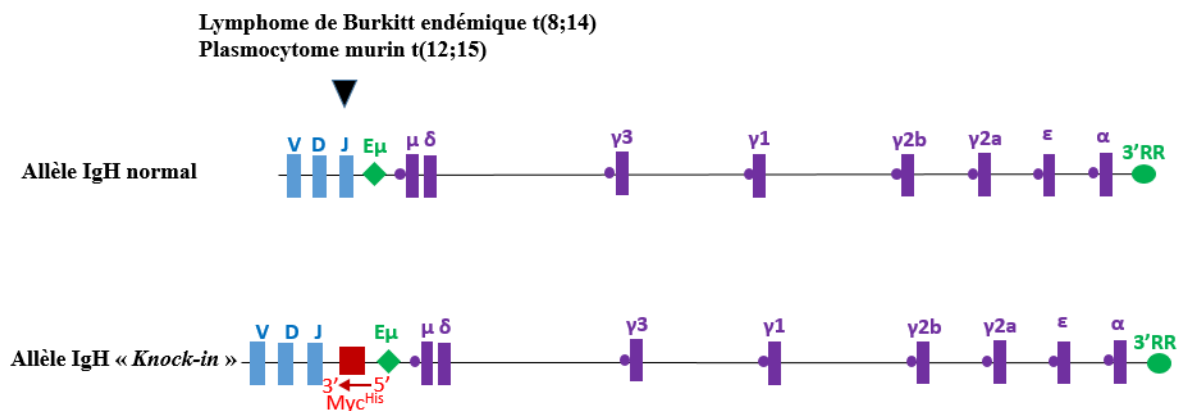


Figure 14 : Schéma non à l'échelle du modèle « Knock-in » Myc^{His} au locus IgH murin.

L'activateur Eμ et la 3'RR sont localisés de part et d'autre des gènes constants d'Ig.

Les travaux de Park et collaborateurs ont précédé le travail de Truffinet et collaborateurs qui a consisté à établir un modèle murin transgénique (c-myc-3'RR) de lymphome de Burkitt (**Figure 15**) où le gène c-myc était sous le seul contrôle de la 3'RR (Truffinet *et al.*, 2007). Cette approche « mini-locus » a permis l'expression du transgène c-myc-3'RR de façon spécifique dans les cellules B au stade tardif : 75% des souris transgéniques ont développé un lymphome de type Burkitt (B220⁺IgM⁺IgD⁺) et 25% de type plasmablastique. Cette étude a pu montrer que la 3'RR est, à elle seule, capable de déréguler c-myc et de conduire à l'émergence d'un lymphome B mature

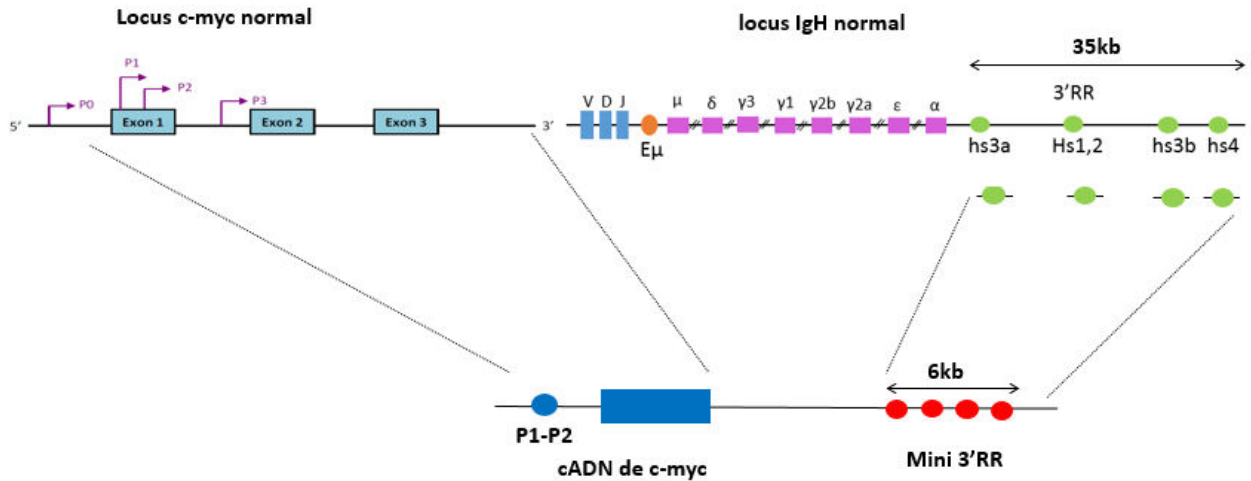


Figure 15 : Schéma non à l'échelle du transgène c-myc-3'RR.

A partir des souris transgéniques c-myc-3'RR, l'ajout de mutations supplémentaires dans des gènes régulateurs du cycle cellulaire (p53, CDK4) modifie la cinétique d'apparition des lymphomes et leur phénotype. Les souris c-myc 3'RR/CDK4^{R24C/R24C} (mutation dans CDK4 qui rend cette enzyme insensible à l'inhibition par INK4) développent des lymphomes de type manteau (B220⁺IgM⁺IgD⁺CD5⁺CD23⁻) avec un taux de prolifération faible (Ki67<50%) comparé au lymphome de Burkitt. Par contre, les souris c-myc 3'RR/p53^{-/+} (Fiancette *et al.*, 2011) développent un vaste panel de lymphomes: de type Burkitt classique (B220⁺IgM⁺ IgD⁺), Burkitt activé (B220⁺IgM⁺IgD⁺CD43⁺), manteau et plasmablastique. Dans ces modèles, la surexpression du c-myc induit par la 3'RR va coopérer avec soit une CDK4 hyperactive (car non inhibé par les INK4) soit une altération de la voie p53, cruciale dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose. Ces études montrent qu'à partir d'un même « hit » initial (ici la surexpression de c-myc), l'ajout de « hit » additionnels modifie le devenir de la lymphomagenèse.

Chapitre 4. L'oncogène c-myc; rôle de c-myc dans la lymphomagenèse

Les produits des oncogènes contrôlent des signaux d'activation, de mort et de prolifération cellulaire : récepteur de facteurs de croissance, protéines de transduction de signal, protéines impliquées dans les défenses anti-oxydantes, facteurs de transcription etc... . Ces oncogènes peuvent être activés par une mutation qui les rend résistants aux mécanismes physiologiques régulant leur expression. L'action des oncogènes peut être consécutive à une translocation chromosomique qui les associe à une séquence régulatrice d'un autre gène. Les translocations au locus IgH ont pour conséquence principale le rapprochement entre une séquence régulatrice B spécifique et un oncogène conduisant à son activation. L'étude des translocations chromosomiques dans certains lymphomes a conduit à mieux connaître la fonction et le rôle des oncogènes dont les produits contrôlent les signaux intracellulaires d'activation, de prolifération et d'apoptose. Le séquençage de l'ADN génomique transloqué a permis aussi de découvrir que les points de cassure n'étaient pas situés au hasard dans le locus IgH mais plus particulièrement dans les sites faisant l'objet de réarrangements de l'ADN au cours de la différenciation des cellules B. Comme c-myc est un oncogène multifonctionnel puissant et qu'il régule 10 à 15% des gènes humains, nous développerons plus particulièrement sa contribution dans les cellules B normales et lors de la lymphomagenèse B.

1. Rôle physiologique de gène c-myc

En plus de son rôle dans la progression du cycle cellulaire, c-myc réprime le programme de différenciation cellulaire, l'adhésion cellulaire (**Figure 16**) et il sensibilise les cellules à l'apoptose. Lors de l'apoptose, le gène c-myc stimule la libération du cytochrome *c* mitochondriale dans le cytoplasme cellulaire via l'activation de molécules pro-apoptotiques comme p53. Le cytochrome *c* va ensuite s'associer avec APAF1 (apoptotic protease-activating factor 1) qui active les voies des caspases conduisant à la mort cellulaire ([Pelengaris and Khan, 2003](#)).

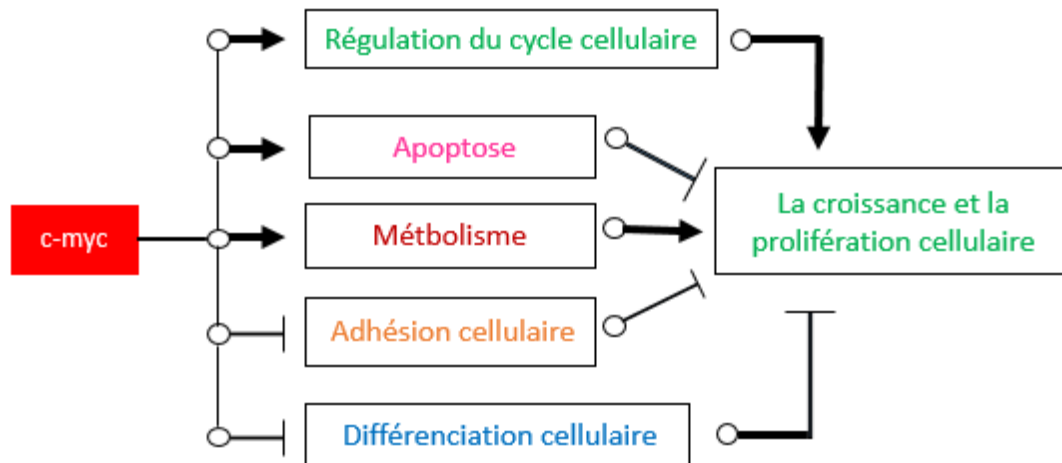


Figure 16 : Présentation schématique du rôle physiologique du gène c-myc.

C-myc affecte positivement la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et le métabolisme et négativement la différenciation et l'adhésion cellulaire. D'après Dang *et al.*, 1999.

c-myc une protéine multifonctionnelle pour les raisons suivantes :

- c-myc induit une réponse rapide de croissance après une stimulation par un mitogène. Il stimule la progression du cycle cellulaire. c-myc induit aussi l'activation directe ou indirecte de régulateurs du cycle cellulaire (les gènes cyclines D1, D2, E et A et les CDK). Le gène c-myc est capable aussi d'inhiber des gènes cibles impliqués dans la régulation négative du cycle cellulaire. c-myc augmente aussi la prolifération cellulaire en favorisant la croissance cellulaire. Il a été montré que la surexpression de c-myc dans les cellules B des souris transgéniques E μ -myc induit la croissance de ces cellules en l'absence de la progression du cycle cellulaire (Pelengaris and Khan, 2003).
- L'expression de c-myc, dans la majorité des cas, est associée à une baisse de la différenciation. En plus de sa régulation sur certaines propriétés des cellules souches, c-myc peut convertir des cellules différenciées en cellules souches pluripotentes. c-myc est capable aussi de maintenir des cellules souches cancéreuses dotées d'auto-renouvellement au sein d'une population tumorale (Larsson and Henriksson, 2010).
- c-myc possède une activité apoptotique en sensibilisant les cellules à l'apoptose (Evan *et al.*, 1992). c-myc l'induit par deux voies : soit par l'activation de gènes pro-apoptotiques comme p53 ; soit par l'inhibition de l'expression des facteurs anti-apoptotiques de la famille bcl-2.

2. La dérégulation de c-myc est associée avec la lymphomagenèse

La dérégulation de l'expression de c-myc est associée avec les tumeurs agressives et peu différenciées (Pelengaris and Khan, 2003). Dans environ 70% des tumeurs humaines ex-vivo, c-myc est fortement surexprimé. En effet, c-myc est activé dans une multitude de néoplasies lymphoïdes et de tumeurs solides agressives ex-vivo chez l'homme (Albihn *et al.*, 2010). En plus de la surexpression de c-myc, d'autres altérations sont nécessaires : la perte de son activité pro-apoptotique, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur comme p53 et pRb (pour protéine de Rétinoblastome) ou l'acquisition de la capacité proliférative sans limite. Tout ceci favorise la transformation cellulaire et l'émergence de tumeurs clonales (Eischen *et al.*, 1999). La désactivation de c-myc, dans différents types de cancers, est suffisante pour induire la régression tumorale (Wu *et al.*, 2007). Plusieurs mécanismes pouvant créer des altérations oncogéniques de c-myc sont nécessaires à l'émergence de la tumeur : des mutations additionnelles coopératives, des amplifications géniques, des translocations chromosomiques et l'augmentation de traduction (Meyer and Penn, 2008).

2.1. La translocation de c-myc au locus d'IgH

C'est une translocation réciproque équilibrée (Figure 17). C'est l'élément initiateur de la tumeur lors du lymphome de Burkitt chez l'homme (BL), du plasmocytome (PCT) chez la souris et de l'immunocytome chez le rat (IC).

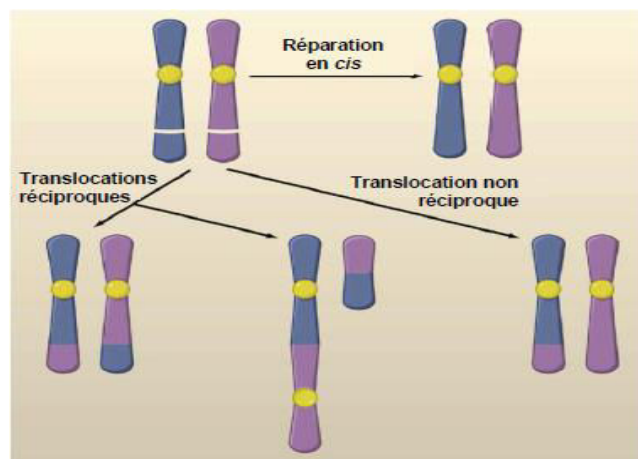


Figure 17 : Les translocations réciproques équilibrées ou déséquilibrées sont provoquées par une mauvaise réparation des cassures d'ADN.

Elles peuvent être réparées en cis. Ces translocations, dans la majorité des lymphomes, sont des translocations réciproques équilibrées. D'après Nussenzweig A and Nussenzweig MC, 2010.

Dans certains cas cette translocation peut être plus complexe au cours de la progression de la tumeur (cas rares des plasmocytomes chez la souris), des myélomes multiples humains (MM) et des lymphomes non-hodgkiniens humains (NHL) (Janz, 2006) (Figure 18) (Figure 19). Par exemple deux translocations indépendantes de c-myc : une translocation t(12;15) (IgH-Myc) suivit par une translocation t(15;16) (Myc-Igl) dans la même tumeur.

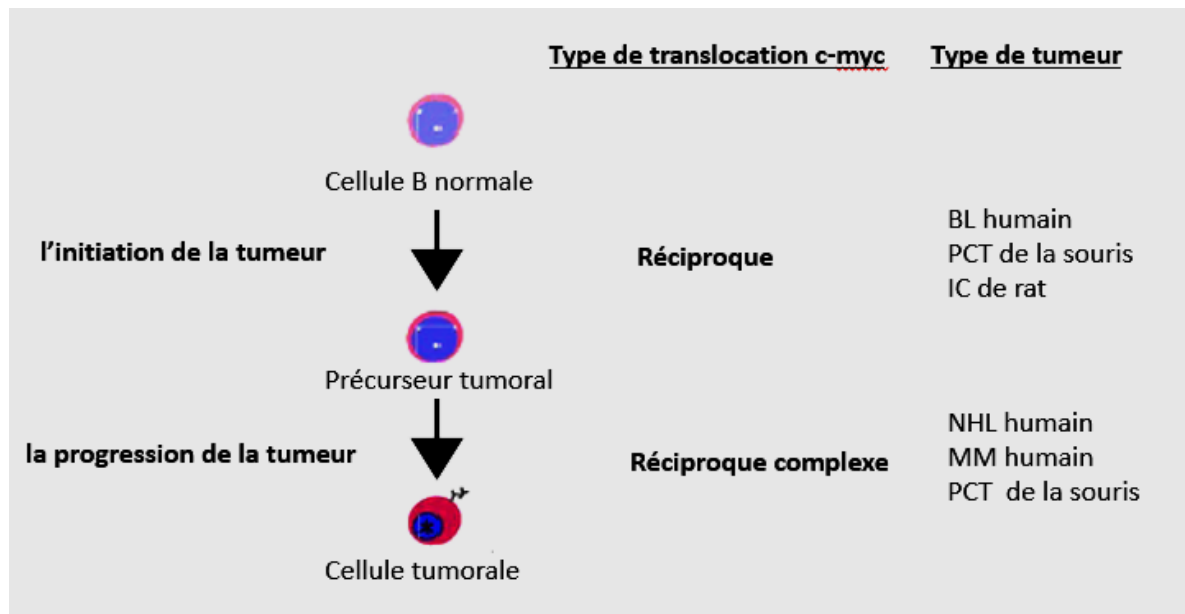


Figure 18 : La translocation de c-myc est un événement de l'initiation et de la progression de la tumeur dans les néoplasies des lymphocytes B chez l'homme et chez la souris.

Dans certaines tumeurs, la translocation de c-myc a lieu au cours de la progression tumorale. D'après Janz, 2006.

Espèce, tumeur	Translocation	Réarrangement
Homme, lymphome de Burkitt	t(8;14)	c-myc-IgH
Homme, lymphome de Burkitt	t(2;8)	IgK-c-myc
Homme, lymphome de Burkitt	t(8;22)	c-myc-Igλ
Souris, plasmocytome	t(12;15)	IgH-c-myc
Souris, plasmocytome	t(6;15)	IgK-c-myc
Souris, plasmocytome	t(15;16)	c-myc-Igλ
Rat, immunocytome	t(6;7)	IgH-c-myc

Figure 19 : Translocations chromosomiques dérégulant l'expression de c-myc dans trois espèces de mammifères (homme, souris, rat).

Cette translocation met en contact l'oncogène c-myc avec des séquences régulatrices du locus IgH (t(8;14), dans 80% des cas) ou des locus Igκ ou Igλ (t(2;8) ou t(8;22), dans 20% des cas) (Sánchez-Beato *et al.*, 2003) (Figure 19). Le gène c-myc, gène « précoce » d'activation cellulaire est surexprimé dans ces tumeurs, sous le contrôle des activateurs transcriptionnels des Ig. La fréquence de ces translocations chromosomiques est basse mais détectable dans les cellules B d'hommes sains et des souris saines. La translocation c-myc/IgH dans une souris normale se produit à une fréquence de $1/10^6$ et elle est détectée dans 2% de la population humaine (Küppers and Della-Favera, 2001).

2.2. La translocation (8;22) du gène c-myc au locus de la chaîne légère λ (modèle des souris Igλ-Myc

Dans 80% des Burkitt, on note une translocation de c-myc au locus IgH. Dans les 20% restant cette translocation de c-myc se fait au locus des chaînes légères λ (10%) ou κ (10%). Pour mimer cette translocation au sein des chaînes légères, des souris transgéniques ont été générées dans lesquelles le gène Myc humain (provenant d'une lignée de lymphome de Burkitt) est placé sous le contrôle de la séquence régulatrice de la chaîne légère λ (Figure 20) (Kovalchuk *et al.*, 2000). Les souris transgéniques possédant le transgène « Igλ-Myc » développent des lymphomes B de phénotype similaire au lymphome de Burkitt humain.

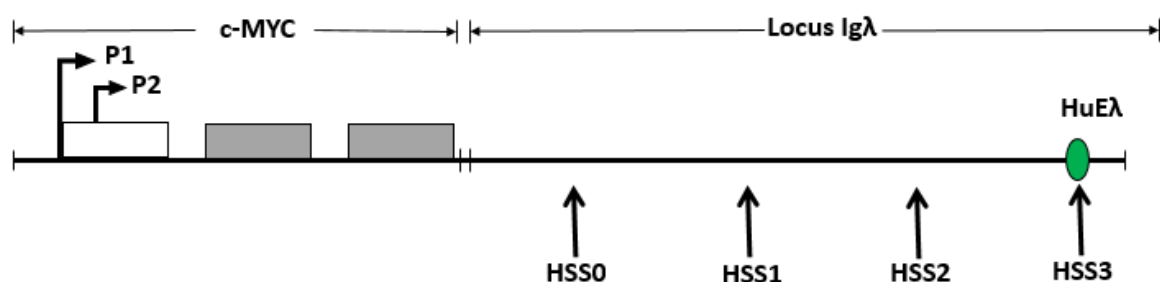


Figure 20 : Représentation schématique de la construction utilisée pour la génération des souris transgéniques Igλ-Myc.

Les flèches horizontales indiquent les deux promoteurs P1 et P2 du gène Myc situés dans l'exon non codant présenté en rectangle clair. Les deux exons codants le gène Myc sont présentés en rectangle gris. Les flèches verticales indiquent la localisation des quatre sites hypersensibilité à la DNaseI (HSS) au locus d'Igλ (Kovalchuk *et al.*, 2000).

Chapitre 5. La réaction inflammatoire induite par du pristane; modèle des souris BALB/c

1. Modèles des lymphomes induits par du pristane

L'huile de pristane ou TMPD (2, 6, 10,14-tetraméthylpentadécane) (**Figure 21A**) est un alcane isoprénoïde se trouvant principalement dans le foie de requins. Cet adjuvant immunologique puissant est synthétisé de façon chimique pour déclencher des maladies auto-immunes expérimentales. Le pristane est utilisé aussi pour induire l'apparition de lymphomes de phénotype mature chez les rats et les souris et pour la production d'Ig. Le pristane est un adjuvant immunologique très actif dont l'injection intrapéritonéale dans les souris BALB/c induit une réaction inflammatoire chronique locale (lipogranulome) (**Figure 21B**) avec un recrutement de cellules inflammatoires (T, B et monocytaires) dans la cavité péritonéale et le développement d'un liquide d'ascite ([Potter, 2003](#); [Byrd *et al.*, 1991](#)). C'est l'absorption intestinale de cet adjuvant qui est le responsable de la formation de lipogranulomes qui peuvent toucher le foie, la rate et les ganglions lymphatiques. Il a été montré aussi que les souris BALB/c injectées par du pristane développent une arthrite ([Potter and Wax, 1981](#)).

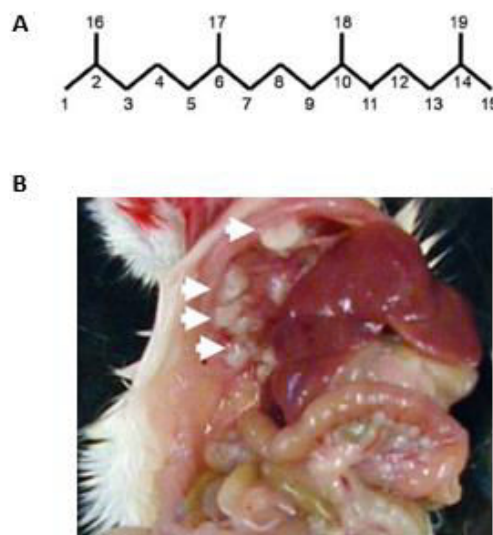


Figure 21 : Anomalies pathologiques induites par du pristane chez les souris BALB/c.

A. la structure chimique de 2, 6, 10,14-tetraméthylpentadécane (TMPD, $C_{19}H_{40}$) connue sous le nom de pristane.
B. Lipogranulomes (indiquée par les flèches blanches). D'après [Reeves *et al.*, 2009](#).

2. Modèle des souris BALB/c

L'utilisation du pristane est bien documentée comme induisant l'apparition de plasmocytomes chez les souris BALB/c après des injections répétées (Silva and Klein, 1999). Plusieurs études ont montré que le modèle BALB/c + pristane présente des caractéristiques communes avec le myélome multiple humain : rôle des translocations chromosomiques dans la dérégulation de c-myc, implication des gènes d'Ig, participation de facteurs chroniques inflammatoires comme l'IL-6 (Gado *et al.*, 2001).

2.1. La sensibilité génétique des souris BALB/c

La sensibilité génétique de développer un lymphome est souche spécifique. La majorité des souches de souris produites dans les laboratoires sont résistantes au développement de plasmocytomes par le pristane. Seules les souches murines BALB/c et NZB développent un plasmocytome (MPC, pour mouse plasmocytomas) en réponse au pristane. La capacité à induire une réponse au pristane varie entre les différentes souches de souris consanguines ainsi qu'entre les différentes souches de souris BALB/c (Potter, 1984). Par exemple, si les souris BALB/cJ développent une arthrite (Wooley *et al.*, 1998) en réponse au pristane, seule 10% développent un MPC alors qu'environ 50-60% des souris BALB/cAn développent un MPC après l'injection de pristane (Potter, 2003).

2.2. Les facteurs influençant l'apparition d'une réaction inflammatoire en réponse au pristane chez la souris

2.2.1. L'état sanitaire des souris

La réaction inflammatoire, en réponse au pristane, chez les souris BALB/c dépend de leur statut sanitaire. Il a été montré que les souris BALB/cAn traitées par du pristane et élevées dans des conditions conventionnelles, développent un plasmocytome avec une incidence de 60% alors que ces mêmes souris sont réfractaires à son développement quand elles sont dans des zones EOPS (exempt d'organisme pathogène spécifique) (Byrd *et al.*, 1991).

2.2.2. L'importance des cellules T

Chen et son équipe ont montré que les cellules T ne sont pas importantes pour la formation et la localisation de granulomes séreux et de granulomes mésentériques en réponse au pristane chez les souris C57BL/6J (**Figure 22**). Ceci a été démontré chez des animaux déficients pour les cellules T $\alpha\beta$ et les cellules T $\gamma\delta$ (Chen *et al.*, 2010).

2.2.3. Le rôle critique des cellules B

Le rôle des cellules B dans la formation de granulomes a été montré comme essentiel chez des souris C57BL/6J. En absence de cellules B matures, il est observé une baisse de la formation des granulomes séreux et mésentériques par rapport aux souris contrôles. Le nombre de cellules constituant ces granulomes est diminué de 90%. En absence des lymphocytes B chez ces souris on observe également une diminution du recrutement en lymphocytes T, cellules dendritiques et macrophages. Les cellules B induisent l'expression locale de chémokines et de cytokines qui stimulent le recrutement spécifique des cellules T/B, des macrophages et des neutrophiles. La réduction de l'expression des cytokines est corrélée avec la réduction du recrutement cellulaire au site inflammatoire chez les souris C57BL/6J déficientes en cellules B matures. Ceci suggère que les cellules B assurent la formation de granulomes (**Figure 22**), en réponse au pristane chez les souris C57BL/6J, en déclenchant un recrutement des leucocytes dans le tissu mésentérique et en induisant l'expression de cytokines et de chémokines spécifiques (Chen *et al.*, 2010).

2.2.4. Rôle de l'IL-6

L'inflammation induit une expression locale de cytokines et de chémokines qui recrutent les leucocytes au site inflammatoire (Douglas *et al.*, 2002). Lors d'un granulome, le pristane active les différentes cellules fonctionnelles dans le tissu granulomateux y compris les cellules B et les cellules endothéliales mésentériques conduisant à la sécrétion de cytokines inflammatoires comme le TNF α et l'IL-6 (**Figure 22**). L'IL-6 est connu pour son rôle clé dans l'inflammation (Gabay, 2006). L'IL-6 est un facteur de croissance, de différenciation et de survie des cellules B (Kishimoto, 2005). L'IL-6 joue un rôle central dans les modèles expérimentaux de plasmocytomagenèse dans lesquels le granulome péritonéal, induit par le pristane, présente un environnement favorable pour le développement d'un plasmocytome. L'expression de l'IL-6 est augmentée lors de la formation d'une réaction inflammatoire granulomateuse en réponse au pristane chez les souris C57BL/6J. Chez des souris déficientes en IL-6, il a été montré que la formation de granulomes mésentériques n'est pas affectée contrairement aux granulomes

séreux. Ceci montre que l'IL-6 contribue à la formation et au développement des granulomes séreux (Chen *et al.*, 2010). De même chez des souris BALB/c déficientes pour l'IL-6, l'apparition de liquide d'ascite en réponse au pristane est retardée par rapport aux souris normales. La réaction inflammatoire induit par le pristane est également moins marquée chez ces souris. Ceci montre que l'IL-6 est un facteur crucial pour le contrôle de la transformation plasmocytaire. De même, la surexpression de l'IL-6 chez des souris BALB/c transgéniques et injectées par du pristane et l'effet de certains facteurs génétiques sont importants pour le développement de plasmocytomes. L'injection de pristane chez des souris surexprimant l'IL-6 favorise la formation de granulomes et le développement de plasmocytomes (Suematsu *et al.*, 1992).

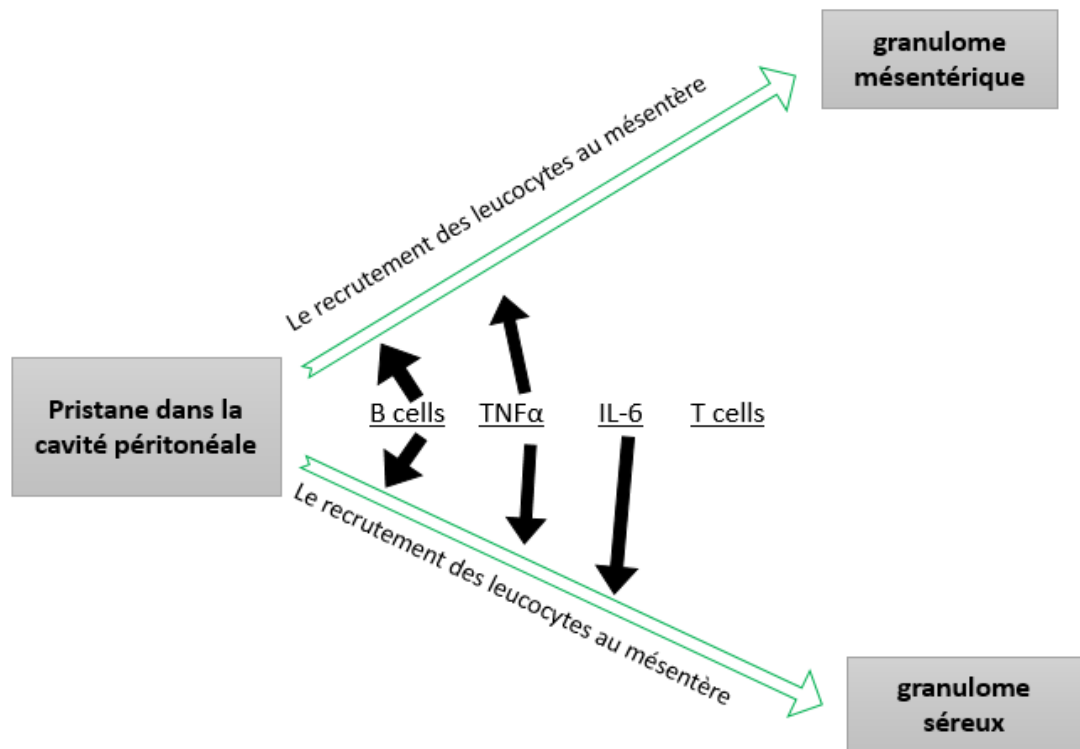


Figure 22 : Représentation schématique de la formation des granulomes en réponse au pristane.

Le pristane provoque la production de cytokines et de chémokines dans la cavité péritonéale conduisant au recrutement de leucocytes au mésentère et au développement de granulomes mésentériques et séreux. Les cellules B et le TNF α sont les facteurs les plus importants dans la formation des granulomes mésentériques et séreux. L'IL-6 est très importante pour la formation de granulomes séreux. Les cellules T ont peu de rôle dans la formation des deux types de granulomes. La masse des flèches noires schématisent l'effet relatif de chaque facteur sur la formation des deux types de granulomes. D'après Chen *et al.*, 2010.

Résultats

Liste des articles

Article 1

Targeting the B cell IgH 3' regulatory region does not impede the *in vivo* pristane-induced inflammatory response.

Faten Saad, Alexis Saintamand, Pauline Rouaud, Yves Denizot.

Oncoscience, 2014, volume 1, numéro 9, pages 591-598

Article 2

The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Ig λ -Myc mice.

Faten Saad, Alexis Saintamand, Michel Cogné, Yves Denizot.

Oncotarget, 2015 Apr 29 [Epub ahead of print]

Article 3

Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion.

Alexis Saintamand, Pauline Rouaud, Faten Saad, Géraldine Rios, Michel Cogné, Yves Denizot.

Nature Communications, 2015, volume 6, numéro 7084

Article 4

The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate.

Alexis Saintamand, Pauline Rouaud, Armand Garot, Faten Saad, Claire Carrion, Christelle Oblet, Michel Cogné, Eric Pinaud, Yves Denizot.

Oncotarget, 2015, volume 6, numéro 7, pages 4845-4852

Article 1

Targeting the B cell IgH 3' regulatory region does not impede the *in vivo* pristane-induced inflammatory response.

Faten Saad, Alexis Saintamand, Pauline Rouaud, Yves Denizot.

Oncoscience, 2014, volume 1, numéro 9, pages 591-598.

Une majorité des lymphomes B de l'adulte porte les stigmates de translocations chromosomiques insérant des oncogènes au locus IgH (c-myc lors du Burkitt, cycline D1 lors du lymphome du manteau, bcl-2 lors du lymphome folliculaire). La région régulatrice située en 3' du locus IgH (3'RR) a été décrite comme un activateur puissant des oncogènes dans les lymphomes B. C'est le passage de ces oncogènes sous la dépendance transcriptionnelle de la 3'RR qui semble être l'élément clef de la lymphomagenèse. Divers modèles murins confortent cette hypothèse. Ainsi les souris transgéniques c-myc-3'RR (porteuses ou non de mutations sur p53 et Cdk4) développent des lymphomes B matures ([Truffinet et al., 2007](#); [Fiancette et al., 2011](#)). L'insertion d'une « mini 3'RR » au locus c-myc conduit également à l'apparition de lymphomes B matures ([Wang and Boxer, 2005](#)). Le ciblage pharmacologique de la 3'RR pourrait donc se révéler une piste prometteuse pour tenter de diminuer la transcription de l'oncogène transloqué. Cependant cela ne pourrait se révéler une approche thérapeutique intéressante que si le ciblage pharmacologique de la 3'RR se révèle sans effet notable sur le développement de réactions immunes et/ou inflammatoires normales. Si une 3'RR fonctionnelle est nécessaire à la CSR ([Vincent-Fabert et al., 2010a](#)), à la SHM ([Rouaud et al., 2013](#)) et à la transcription d'une chaîne μ ([Saintamand et al., 2015](#)), son rôle lors du développement de réactions immunes et/ou inflammatoires n'a jamais été étudié. Dans une première approche, nous avons analysé l'impact de la délétion de la 3'RR sur le développement de réactions immunes et/ou inflammatoires en réponse au pristane.

L'injection de pristane dans la paroi péritonéale de la souris est décrite comme un modèle de choix pour l'étude des réactions inflammatoires et immunes localisées. Pour ce faire, la délétion de la 3'RR a été mise dans un fond génétique BALB/c (croisement pendant six générations avec des femelles BALB/c). Les souris BALB/c sauvages, hétérozygotes et homozygotes ont reçu trois injections de pristane (0,5 ml) sur une période de 4 semaines. Les souris ont été ensuite suivies sur une période de 12 mois.

Principaux résultats

La délétion de la 3'RR chez des souris BALB/c n'affecte pas le nombre de cellules B dans la rate, la moelle osseuse et le sang. L'absence de la 3'RR n'a pas d'effet également sur le pourcentage de cellules B spléniques marginales, folliculaires et transitionnelles. La délétion de la 3'RR n'affecte donc pas quantitativement le développement des diverses sous populations B matures. Ces résultats confirment, chez les souris BALB/c, les résultats obtenus chez les souris C57BL6.

Comme chez les souris C57BL6, la délétion totale de la 3'RR chez les souris BALB/c affecte les CSR et la sécrétion des Ig vers tous les isotypes. Une réduction dramatique des taux d'IgG, IgA, et IgE est observée *in vivo* dans le sérum de ces souris et après stimulation *in vitro*. Nos résultats démontrent que les effets de la 3'RR sur le « switch » et la sécrétion d'Ig ne sont pas restreints au fond génétique C57BL6. Cette donnée n'est pas anecdotique car il a été rapporté une capacité différente des cellules B à pratiquer la CSR *in vitro* en fonction du fond génétique des souris utilisées ([Kaminski and Stavnezer, 2007](#)).

Plusieurs mois après l'injection de pristane, un liquide d'ascite péritonéal apparaît. Sa cinétique de survenue est similaire chez les souris normales et déficientes pour la 3'RR. La pénétrance de la formation du liquide d'ascite est également quasi identique. Le volume du liquide d'ascite mesuré est non significativement différent entre des souris sauvages ou déficientes pour la 3'RR. La composition cellulaire du liquide d'ascite en cellules T (CD4⁺ ou CD8⁺), en cellules B et en cellules monocytaires (CD11b⁺) est également inchangée entre des souris sauvages ou déficientes pour la 3'RR. L'analyse par cytométrie en flux ne révèle également aucun impact sur les diverses sous populations lymphocytaires B étudiées (IgM⁺IgD⁺, CD138⁺, CD5⁺).

Le contenu du liquide d'ascite en diverse cytokines inflammatoires (IL-6, IL-21, IL-12/23, TNF- α) et anti-inflammatoires (IL-10, interferon- γ) est également quasi-identique. On note une petite augmentation significative ($p < 0,05$) pour l'IL-10 et interferon- γ . Cependant on peut se poser la question de sa relevance physiologique au regard des écarts types (pour interferon- γ) et des faibles valeurs d'IL-10 détectées. L'effet de l'absence d'une 3'RR fonctionnelle sur la CSR et la synthèse d'Ig se traduit, dans le liquide d'ascite de ces souris, par une chute très significative ($p < 0,0005$) des taux d'IgG, d'IgA et d'IgE détectés (comme celle observée dans le sérum). L'impact de la délétion de la 3'RR sur la CSR et la synthèse d'Ig est donc également observable sur les lymphocytes B péritonéaux.

En conclusion, l'absence de la 3'RR ne perturbe pas le développement d'une réaction inflammatoire et immune normale chez les souris BALB/c en réponse au pristane indiquant qu'en dehors de leur incapacité à « switcher », à produire des Ig et à hypermuter leurs autres fonctions physiologiques B semblent normales : capacité à participer au recrutement de cellules immunitaires et au développement d'une réaction inflammatoire avec synthèse de cytokines. Ces premiers résultats semblent suggérer que le ciblage pharmacologique de la 3'RR peut être une approche possible pour tenter de diminuer la transcription oncogénique dépendante de la 3'RR lors des lymphomes B matures. Toutefois il est évident que de futures études devront être menées sur d'autres modèles inflammatoires aigus ou chroniques pour confirmer la capacité des lymphocytes B déficients pour la 3'RR à pouvoir initier, conduire et amplifier une réaction inflammatoire et immune robuste.

Les résultats portants sur l'étude de la réaction inflammatoire chez des souris BALB/c déficientes pour la 3'RR en réponse au pristane ont également fait l'objet d'un éditorial (voir annexes) dans la revue « Cell Cycle ».

Targeting the oncogene B lymphoma deregulator IgH 3' regulatory region does not impede the *in vivo* inflammatory response in mice

Faten Saad¹, Alexis Saintamand¹, Pauline Rouaud¹, and Yves Denizot¹

¹ CNRS UMR 7276, CRIBL, Université de Limoges, Limoges, France

Correspondence to: Yves Denizot, email: yves.denizot@unilim.fr

Keywords: IgH 3' regulatory region; knock-out mice; pristine; inflammation; cytokines

Received: July 31, 2014

Accepted: September 14, 2014

Published: September 19, 2014

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The IgH 3' regulatory region (3'RR), encompassing the four transcriptional enhancers hs3a-hs1,2-hs3b-hs4, is a potent lymphoma oncogene deregulator but its role in B cell-mediated inflammatory responses is unknown. We investigated the 3'RR involvement in the *in vivo* pristane-induced inflammatory response in BALB/c mice. The lack of the 3'RR in BALB/c mice had no wide effect on the incidence, the kinetic of development and the cellular composition of peritoneal ascites. Ascite pro-inflammatory cytokines levels (IL-6, IL-21, IL-12/23, TNF- α) were unchanged while anti-inflammatory cytokines levels (IL-10, interferon- γ) were slightly increased in 3'RR-deficient BALB/c mice as compared to *wt* BALB/c mice. In conclusion, the 3'RR is dispensable for the efficient recruitment of immune cells and the normal development of an inflammatory response in the *in vivo* pristane-induced inflammatory model. The 3'RR might be considered as a potential suitable target for anti-lymphoma pharmacological therapy without potent adverse effect on normal immune and inflammatory responses.

INTRODUCTION

The IgH locus undergoes multiple changes along B cell differentiation, affecting transcription and accessibility to V(D)J recombination, somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR) [1, 2]. Since all Ig gene remodelling events require transcription, IgH *cis*-regulatory regions and especially transcriptional enhancers are major locus regulators. Mouse models carrying targeted genomic deletions highlights distinct roles for such regions. The *iE μ* and IGCR1 enhancers upstream of C μ mostly promote V(D)J recombination [3, 4], while IgH 3' regulatory region (3'RR) enhancers (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) promote SHM [5] and CSR [6] but not V(D)J recombination [7]. The 3'RR stimulates IgH transcription at the mature B cell stage [6]. The 3'RR is, thus, considered as a potential lymphoma oncogene deregulator. Strengthening this issue, transgenic mice models demonstrate the 3'RR implication in the development of several B cell

lymphomas such as Burkitt lymphomas, mantle cell lymphomas and anaplastic B cell lymphomas [8-15] leading to the conclusion that the 3'RR might be a potential target for anti-lymphoma pharmacological therapy. Such approach would be promising if targeting the 3'RR does not induce adverse effects such as altered normal immune and inflammatory responses. Until now, the role of the 3'RR in B cell-mediated inflammatory responses is unknown. To test this issue we investigated the impact of the total 3'RR deletion on the well-known *in vivo* pristane-induced inflammatory response. The pristane is a powerful and very long acting immunological adjuvant in BALB/c mice. The *i.p.* pristane injection induces the development of a chronic inflammatory response with an influx of T cells, B cells and granulocytic cells into the peritoneal cavity as well as the development of ascites; functional B cells being critical for all these events [16, 17].

RESULTS

Generation of 3'RR-deficient BALB/c mice

Although some phenotypes due to specific mutation are independent of the genetic background, phenotypic variability often becomes apparent only when a given mutation is studied on various genetic backgrounds [18-21]. The 3'RR deletion, done in a 129 ES cell line and developed in a C57BL/6 background, was thus established in a BALB/c background. Similarly to that found in 3'RR-deficient C57BL/6 mice [6], 3'RR-deficient BALB/c mice had similar numbers of bone marrow, spleen and circulating B cells than *wt* BALB/c mice (data not shown). As previously reported in 3'RR-deficient C57BL/6 mice

[6], 3'RR-deficient BALB/c mice showed a dramatic reduction ($p < 0.0005$, Mann-Whitney *U*-test) for their serum IgG (84% of decrease), IgA (95% of decrease) and IgE (97% of decrease) levels (Figure 1A). Their serum IgM levels were reduced ($p < 0.05$, Mann-Whitney *U*-test) to a lower extent (52% of decrease). Similarly to 3'RR-deficient C57BL/6 mice, their B splenocytes had a lower ($p = 0.008$, Mann-Whitney *U*-test) capacity to secrete IgM (71.4 ± 11.2 ng/ml, mean \pm SEM of 4 mice) after 3-days LPS stimulation *in vitro* than *wt* BALB/c mice (415.2 ± 140.4 ng/ml, mean \pm SEM of 4 mice). Heterozygous $\Delta 3'RR/wt$ BALB/c mice had similar serum levels of IgM, IgG, IgA and IgE than *wt* BALB/c mice (Figure 1A) confirming results with 3'RR-deficient C57BL/6 mice. Deletion of the 3'RR had no impact on the percentage of splenic marginal zone (MZ), follicular (FO) and transitional (TR) B cells (Figure 1B). Taken together these

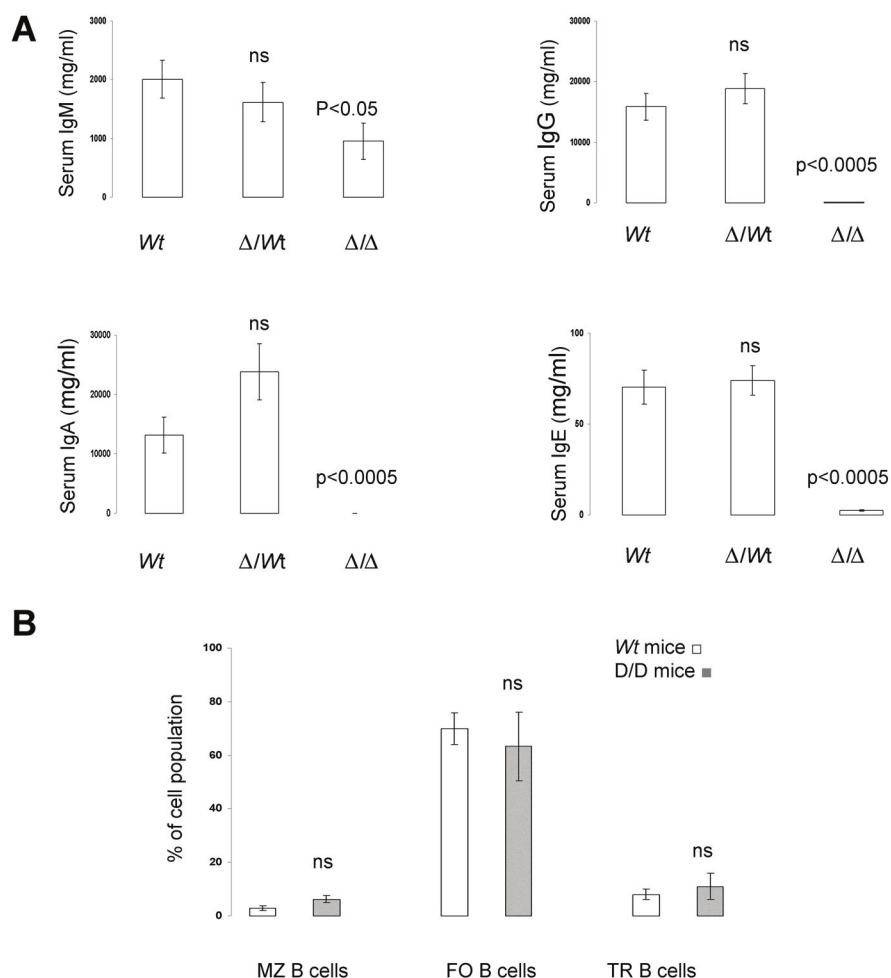


Figure 1: Serum Ig levels and B splenocyte phenotypes in 3'RR-deficient BALB/c mice. A: Serum IgM, IgG, IgE and IgA were investigated in six 3'RR-deficient BALB/c mice (Δ/Δ), eighteen heterozygous $\Delta 3'RR/wt$ BALB/c mice (Δ/wt), and sixteen *wt* BALB/c mice (*wt*). Significances (as compared with *wt* mice) were investigated by Mann-Whitney *U*-test. ns: not significant. All samples were appropriately diluted before each assay and data were corrected by the dilution factor. B: Flow cytometry analysis of the percentages of marginal zone (MZ, B220⁺CD21⁺CD23⁻) B cells, follicular (FO, B220⁺CD21⁺CD23⁺) B cells and transitional (TR, B220⁺CD21⁻CD23⁻) B cells in 3'RR-deficient BALB/c mice and *wt* BALB/c mice (3 months old). Mean \pm SEM of 3 experiments. ns: not significant as compared with *wt* mice.

results indicate that the 3'RR deletion induces globally the same phenotypic pattern in C57BL/6 and BALB/c backgrounds.

Generation of peritoneal ascites in 3'RR-deficient BALB/c mice

About several months after pristane injection, development of ascites can be observed (Figure 2A). *Wt* BALB/c mice, $\Delta 3'RR/wt$ BALB/c mice and homozygous 3'RR-deficient BALB/c mice were investigated. As shown

in Fig. 2B, deletion of the 3'RR had no dramatic effect on the time course of ascite formation. If a full penetrance (100% ascite incidence) was found in *wt* mice (23/23), these values were of 90% (19/21) and 71% (10/14) for heterozygous and homozygous 3'RR-deficient BALB/c mice, respectively. The volumes of peritoneal exudates varied between mice (Figure 2C) but additional symptoms were always present such as lethargy, ruffled coats, enlarged abdomen and restricted gait [22]. Peritoneal exudate volumes were no significantly different ($p > 0.05$, Mann-Whitney *U*-test) in *Wt* BALB/c mice (13.5 ± 1.6 ml, mean \pm SEM of 16 mice), $\Delta 3'RR/wt$ BALB/c mice

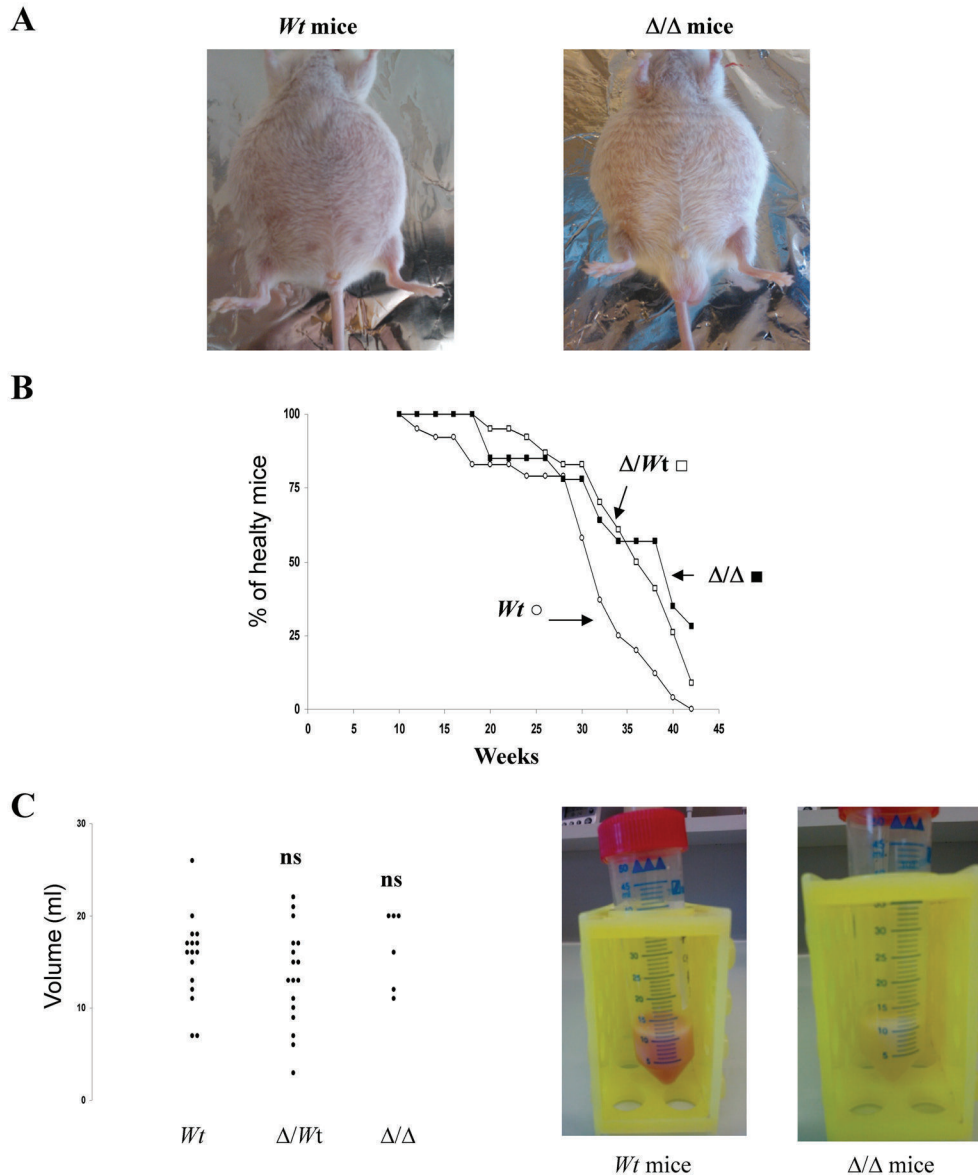


Figure 2: Ascite formation in 3'RR-deficient BALB/c mice. A: Several months after pristane injection the development of a peritoneal ascite can be observed in *wt* BALB/c mice and 3'RR-deficient BALB/c mice (Δ/Δ). B: Fourteen 3'RR-deficient BALB/c mice (Δ/Δ), twenty one heterozygous $\Delta 3'RR/wt$ BALB/c mice (Δ/wt) and twenty three *wt* BALB/c mice (*wt*) were treated with pristane and followed over a period of 10 months for peritoneal ascite development. C: Ascite volumes (in ml) obtained in Δ/Δ , Δ/wt and *wt* mice. ns: not significant as compared with *wt* mice (Mann-Whitney *U*-test). Pictures from peritoneal ascite samples from a *wt* mouse and a Δ/Δ mouse are presented.

(10.4 ± 1.6 ml, 17 mice) and homozygous 3'RR-deficient BALB/c mice (14.8 ± 2.4 ml, 6 mice) (Figure 2C). Mice with no ascite had normal viscera with clear peritonea and mesenteric tissue (data not shown).

Leukocyte infiltrate in the exudates of pristane-injected mice

Flow cytometry analysis indicated that granulocytic cells (CD11b⁺ cells), T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺ cells) and B lymphocytes (B220⁺ cells) were the predominant cell types in the exudates of pristane-injected mice (Figure 3A) with no differences between *Wt* BALB/c mice, heterozygous Δ 3'RR/*wt* BALB/c mice and homozygous 3'RR-deficient BALB/c mice. For T cells, no differences were documented for percentages of CD4⁺ and CD8⁺ cells. For B cells, no differences were documented for percentages of IgM⁺, IgD⁺, CD5⁺, CD43⁺ and CD138⁺ cells (Table 1). Finally, the total infiltrated cell numbers were not significantly different ($p > 0.05$, Mann-Whitney *U*-test) for the three mouse categories (Figure 3B).

Pro- and anti-inflammatory cytokines in the exudates of pristane-injected mice

We next investigated if deletion of the 3'RR altered the cytokine network in the exudates of pristane-injected mice. Six cytokines with potent pro- and anti-inflammatory effect were investigated: IL-6 [23], IL-21 [24], IL-12/23 [25], IL-10 [26, 27], interferon- γ [27] and TNF- α [28]. As shown in Table 2, similar TNF- α , IL-6, IL-21 and IL-12/23 levels (considered as pro-inflammatory compounds) were found in the exudates of pristane-injected 3'RR-deficient BALB/c mice, heterozygous Δ 3'RR/*wt* BALB/c mice and *wt* BALB/c mice. In contrast, IL-10 and INF- γ levels (considered as anti-inflammatory compounds) were slightly higher ($p < 0.05$, Mann-Whitney *U*-test) in pristane-injected 3'RR-deficient animals.

Ig levels in the exudates of pristane-injected mice

As shown in Table 2, Ig levels were dramatically lowered ($p < 0.0005$, Mann-Whitney *U*-test) in the exudates of pristane-injected 3'RR-deficient BALB/c mice as compared with *wt* BALB/c mice with a 92%, 99% and 96% of decrease for IgG, IgA and IgE, respectively. In contrast, Ig levels were similar ($p > 0.05$) for heterozygous Δ 3'RR/*wt* BALB/c mice and *wt* BALB/c mice (Table 2). These results demonstrated the reduced capability of 3'RR-deficient B cells to efficiently switch toward IgG, IgE and IgA *in vivo* and thus to secrete switched Ig. In contrast, and in agreement with the fact that 3'RR

deficiency did not impede plasma cell differentiation [6], IgM levels were not affected in 3'RR-deficient BALB/c as compared with *wt* BALB/c.

DISCUSSION

Although some phenotypes due to specific mutations are independent of the genetic background, phenotypic variability often becomes apparent only when a given mutation is studied on various genetic backgrounds

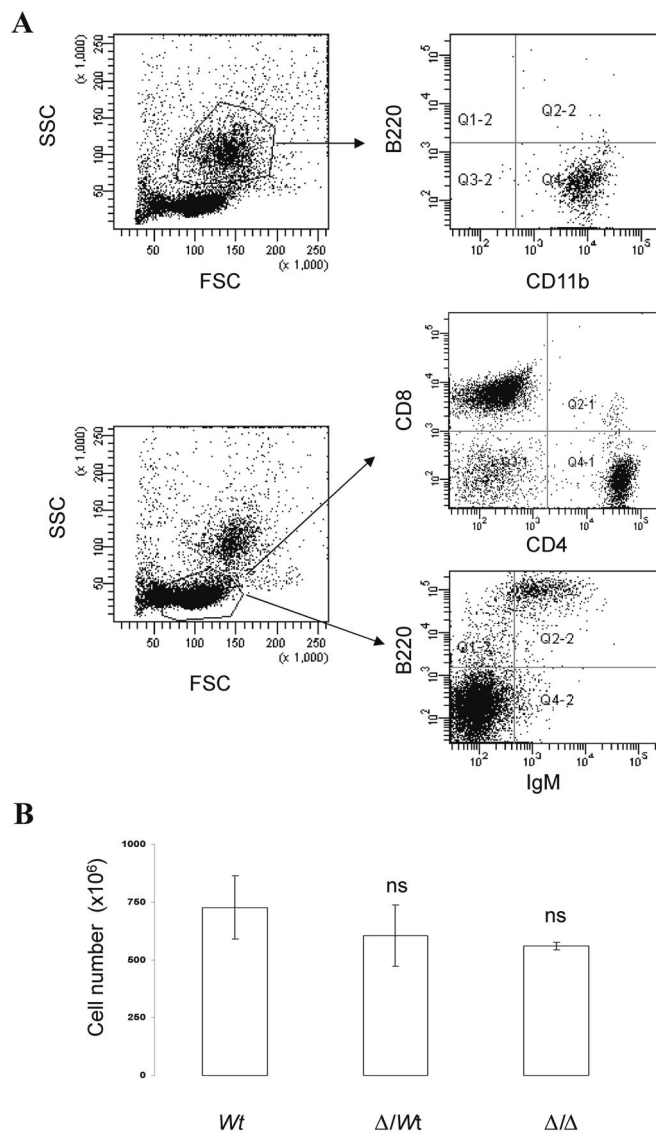


Figure 3: Leukocyte infiltrate in the exudates of pristane-injected mice. A: Flow cytometry analysis indicated that granulocytic cells (CD11b⁺ cells), T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺ cells) and B lymphocytes (B220⁺ cells) were the major cell species found in the peritoneal exudates of pristane-injected mice. A representative experiment is shown. B: Total cell number in the peritoneal exudates of pristane-injected mice. Mean \pm SEM of three 3'RR-deficient BALB/c mice, twelve heterozygous Δ 3'RR/*wt* BALB/c mice, and five *wt* BALB/c mice. ns: not significant (Mann-Whitney *U*-test) as compared with *wt* mice.

Table 1: Cellular composition in the peritoneal exudates of pristane-treated mice.

	<i>Wt</i> mice (n=19-23)	Heterozygous $\Delta 3'RR/wt$ mice (n=19-20)	$3'RR$ -deficient mice (n=9-10)
CD11b ⁺ cells	39.88 ± 4.03%	43.97 ± 5.79%	37.87 ± 6.70%
Total T cells	50.03 ± 3.14%	47.87 ± 4.87%	47.20 ± 7.14%
CD4 ⁺ T cells	66.28 ± 1.93%	64.23 ± 3.35%	62.49 ± 2.69%
CD8 ⁺ T cells	33.72 ± 1.93%	35.24 ± 3.12%	37.52 ± 2.69%
Total B cells	9.25 ± 0.88%	8.24 ± 1.30%	11.19 ± 2.0%
B220 ⁺ IgM ⁺ cells among B220 ⁺ cells	59.50 ± 3.20%	61.34 ± 4.53%	69.61 ± 4.06%
B220 ⁺ IgD ⁺ cells among B220 ⁺ cells	67.12 ± 2.88%	67.25 ± 2.87%	68.85 ± 4.71%
B220 ⁺ CD5 ⁺ cells among B220 ⁺ cells	30.57 ± 2.27%	33.14 ± 2.59%	30.92 ± 4.18%
B220 ⁺ CD43 ⁺ cells among B220 ⁺ cells	50.63 ± 4.42%	55.81 ± 4.76%	65.08 ± 4.04%
B220 ⁺ CD138 ⁺ cells among B220 ⁺ cells	17.98 ± 4.66%	9.03 ± 1.11%	10.02 ± 3.04%
Total CD138 ⁺ cells	2.28 ± 0.63%	1.49 ± 0.39%	1.69 ± 0.53%

Cells were recovered, labelled with specific antibodies and analysed by flow cytometry. Results are reported as the mean ± SEM of the indicated number (n) of experiments. No significant differences ($p > 0.05$) were found (Mann-Whitney *U*-test) between groups.

Table 2: Cytokine and Ig levels in the peritoneal exudates of pristane-treated mice.

	<i>Wt</i> mice (n=16)	Heterozygous $\Delta 3'RR/wt$ mice (n=17)	$3'RR$ -deficient mice (n=6)
IL-6 (ng/ml)	5.52 ± 1.02	6.18 ± 1.21	5.55 ± 0.83
IL-12/23 (ng/ml)	2.42 ± 0.60	2.44 ± 0.23	2.65 ± 0.33
IL-21 (pg/ml)	17.50 ± 5.10	29.16 ± 5.60	21.60 ± 9.50
TNF- α (pg/ml)	103.5 ± 11.17	113.01 ± 11.68	109.0 ± 40.30
IL-10 (ng/ml)	0.39 ± 0.15	1.02 ± 0.21 ($p < 0.05$)	1.21 ± 0.05 ($p < 0.05$)
INF γ (pg/ml)	63.00 ± 9.32	94.4 ± 11.98	569.1 ± 400.56 ($p < 0.05$)
IgM (mg/ml)	0.60 ± 0.06	0.63 ± 0.11	0.41 ± 0.12
IgG (mg/ml)	28.00 ± 2.88	29.72 ± 3.12	2.11 ± 0.41 ($p < 0.0005$)
IgE (μ g/ml)	21.94 ± 1.93	22.84 ± 1.83	0.05 ± 0.01 ($p < 0.0005$)
IgA (mg/ml)	19.12 ± 3.28	21.20 ± 4.07	0.65 ± 0.14 ($p < 0.0005$)

Cytokine and Ig levels were investigated with specific ELISA. Results are reported as the mean ± SEM of the indicated number (n) of experiments. Statistical significance (as compared with *wt* mice) was made with the Mann-Whitney *U*-test. All samples were appropriately diluted before each assay and data were corrected by the dilution factor.

[18-21]. Specifically for the $3'RR$, *c-myc-3'RR* transgenic mice developed Burkitt lymphomas in a C57BL/6 background but not in a BALB/c background [21]. Results of the present study indicate that the $3'RR$ deficiency induces similar phenotypic effects in a C57BL/6 and a BALB/c background: no effect on immature B cell stages, no impact on mature spleen B cell number, no impact in TR, FO and MZ B cell number, no effect on plasma cell differentiation but a severe CSR defect toward all isotypes resulting in depressed secretion of all Ig including IgM. If data report differences on spleen versus peritoneal B cell responses [22], similar impact of the $3'RR$ deletion is found for their switching and Ig secreting ability. Whether the $3'RR$ is considered as a potential lymphoma oncogene deregulator [8-15], no studies have focussed on its role in inflammatory processes. Do $3'RR$ -deficient B cells

capable of sustaining efficient inflammatory and immune responses? We have, thus, investigated the impact of the total $3'RR$ deletion on the well-known *in vivo* pristane-induced inflammatory response. The lack of $3'RR$ only marginally impacted (lower incidence) the development of ascite formation. When ascites were present, their cellular compositions and their kinetics of formation were similar to that found in *wt* mice. Among the different tested cytokines, pro-inflammatory cytokine levels (IL-6, IL-21, IL-12/23, TNF- α) were unchanged. In contrast, anti-inflammatory cytokine levels (IL-10, interferon- γ) were slightly increased in ascites of $3'RR$ -deficient animals showing an elevated anti-inflammatory reaction in $3'RR$ -deficient mice that might explain the lessened ascite development incidence. Clearly if the conventional versus pathogen free microenvironment status of mice is

of importance for development of ascite formation [17], it is not the case for enhancers of the 3'RR. Our results clearly indicate that the 3'RR is dispensable for the efficient recruitment of immune cells in pristane-induced inflammation and has minimal impact on inflammatory responses. Moreover, the ability of IgM⁺ B cell to switch toward γ , ϵ and α isotypes and, thus, to secrete IgG, IgE and IgA is also dispensable to the development of an efficient pristane-induced inflammation.

In conclusion, if the 3'RR is considered as a major lymphoma oncogene deregulator [8-15, 29], its deletion has no dramatic effect on immune and inflammatory responses in the pristane mouse model. It is, thus, tempting to speculate that the 3'RR might be considered as a potential suitable target for anti-lymphoma pharmacological therapy without significant impact on the normal immune and inflammatory networks. A limitation of the pristane mouse model is that inflammation is restricted to the peritoneal cavity. It is of evidence that other mouse models of inflammatory reactions must be tested before definitive validation of this hypothesis.

MATERIALS AND METHODS

Generation of transgenic mice

Our research has been approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and carried according the European guidelines for animal experimentation. The 3'RR deletion has been done in a 129 ES cell line and developed in a C57BL/6 background [6]. 3'RR-deficient C57BL/6 male mice were thus crossed with female BALB/c mice. The resulting male progeny were backcrossed with female BALB/c for more than six generations. The presence of the 3'RR-deleted allele was verified by PCR. 3'RR-deficient BALB/c mice, heterozygous Δ 3'RR/*wt* BALB/c mice and *wt* BALB/c mice were investigated.

PCR

PCR experiments for detection of the *wt* 3'RR allele were carried out with specific forward 5'-CCAAAAATGGCCAGGCCTAGG-3' and reverse 5'-GACCCTGTCCTATGGCT GAC-3' primers. PCR experiments for detection of the deficient 3'RR allele were carried out with specific forward 5'-TCCCTGGACAATCTGCACAT-3' and reverse 5'-GACCCTGTCTT ATGGCTGAC-3' primers. DNA was denatured 180 sec at 95°C, and then submitted to 35 cycles consisting in 94°C/30 sec, 60°C/30 sec and 72°C/60 sec. Amplification products were analysed on a 1.2% agarose gel. Expected sizes of amplified products were 250 bp and

587 bp for mutated and *wt* alleles, respectively.

Inflammatory reaction induced by pristane

8-weeks-old mice were treated with three 0.5 ml *i.p.* injections of pristane on day 0, 15 and 30. According to the French law for animal experimentations, mice were sacrificed after the first sign of illness for example enlarged abdomen as a characteristic of accumulation of peritoneal exudates. Mice were followed over a period of 8 months.

Flow cytometry analysis

Single-cell suspensions from spleen, bone marrow and cells of the peritoneal exudates were labelled with various antibodies (Southern Biotechnologies) and analyzed on a Fortessa LSR2 (Beckman Coulter).

Blood and peritoneal exudates sampling

Blood samples were recovered from mice at the day of sacrifice. Serum samples were recovered by centrifugation and stored at -20°C until used. After sacrifice, the peritoneal exudates were collected, centrifuged and stored at -20°C until used.

ELISA assays

Sera and peritoneal exudates were analysed for the presence of the various immunoglobulin (Ig) classes (IgM, IgG, IgE and IgA) by ELISA as previously described [8, 18]. IL-6, IL-10, IL-12/23, IL-21, TNF- α and INF- γ levels were determined in peritoneal exudates using specific ELISA (e-Bioscience). All samples were appropriately diluted before each assay and data were corrected by the dilution factor. Repeated ELISA determinations were submitted to a statistical analysis by using the Mann-Whitney *U*-test.

Spleen cell cultures for IgM production

Single-cell suspensions of spleen cells were cultured 3 days at 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum and 20 μ g/ml LPS. Supernatants were then harvested and stored at -20°C until IgM evaluations as reported above [8, 30].

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC SL 220.100.601332), ANR (Projets Blanc 2011) and Ligue Contre Cancer de la Corrèze

(subvention 2014). P. Rouaud has a fellowship from ARC (DOC201.306.06964).

Contribution section

F.S., A.S., P.R., and Y.D. actively participated to the experimental design of the study. Y.D. participated to the scientific discussion for manuscript writing, obtained financial grants and agreement of the ethic committee of our institution to perform the study.

REFERENCES

1. Henderson A, Calame K. Transcription regulation during B cell development. *Ann Rev Immunol.* 1998; 16: 163-200.
2. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, Cogné M. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol.* 2011; 110: 27-70.
3. Perlot T, Alt FW, Bassing CH, Suh H, Pinaud E. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 42: 14362-14367.
4. Guo C, Yoon HS, Franklin A, Jain S, Ebert A, Cheng HL, Hansen E, Despo O, Bossen C, Vettermann C, Bates JG, Richards N, Myers D et al. CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature.* 2011; 477: 424-430.
5. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, Reina-San-Martin B, Pinaud E, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J Exp Med.* 2013; 210: 1501-1507.
6. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood.* 2010; 116: 1895-1898.
7. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J Biol Chem.* 2012; 287: 8356-8360.
8. Truffinet V, Pinaud E, Cogné N, Petit B, Guglielmi L, Cogné M, Denizot Y. The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J Immunol.* 2007; 179: 6033-6042.
9. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Rouaud P, Baudet C, Truffinet V, Magnone V, Guillaudeau A, Cogné M, Dubus P, Denizot Y. A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and c-myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma (MCL)-like lymphoma formation in mice. *Am J Pathol.* 2012; 180: 1688-1701.
10. Fiancette R, Rouaud P, Vincent-Fabert C, Laffleur B, Magnone V, Cogné M, Denizot Y. A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene. *J Immunol* 2011; 187: 5772-5782.
11. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *European J Immunol.* 2010; 40: 3306-3311.
12. Rouaud P, Fiancette R, Vincent-Fabert C, Magnone V, Cogné M, Dubus P, Denizot Y. Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53+/- mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget.* 2012; 3: 586-593.
13. Park SS, Kim JS, Tessarollo L, Owens JD, Peng L, Han SS, Tae Chung S, Torrey TA, Cheung WC, Polakiewicz RD, McNeil N, Ried T, Mushinski JF, et al. Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res.* 2005; 65: 1306-1315.
14. Park SS, Shaffer AL, Kim JS, duBois W, Potter M, Staudt LM, Janz S. Insertion of Myc into Igh accelerates peritoneal plasmacytomas in mice. *Cancer Res.* 2005; 65: 7644-7652.
15. Wang J, Boxer LM. Regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain gene 3'-enhancers induce c-myc deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. *J Biol Chem.* 2005; 280: 12766-12773.
16. Potter M. Neoplastic development in plasma cells. *Immunol Rev.* 2003; 194: 177-195.
17. Byrd LG, McDonald AH, Gold LG, Potter M. Specific pathogen-free balb/cAn mice are refractory to plasmacytoma induction by pristane. *J Immunol.* 1991; 147: 3632-3637.
18. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichiti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, Barnard JA, Yuspa SH, Coffey RJ, et al. "Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science.* 1995; 269: 230-234.
19. Raineri I, Carlson EJ, Gacayan R, Carra S, Oberley TD, Huang TT, Epstein CJ. Strain-dependent high-level expression of a transgene for manganese superoxide dismutase is associated with growth retardation and decreased fertility. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31: 1018-30.
20. Lefesvre P, Attema J, van Bekkum D. Pharmacogenetic heterogeneity of transgene expression in muscle and tumours. *BMC Pharmacol.* 2003; 3: 11.
21. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Genetic background modulates susceptibility to oncogen-driven proliferation and lymphoma occurrence in mice carrying a deregulated c-myc transgene. *Leukemia Res.* 2009; 33: e203-e206.
22. Quinn K. Active immunization with EPF suppresses the formation of immune ascites in BALB/c mice. *Immunol Cell Biol.* 1991; 69: 1-6.
23. Mansell A, Jenkins BJ. Dangerous liaisons between

- interleukin-6 cytokine and toll-like receptor families: a potent combination in inflammation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013; 24: 249-256.
24. Sarra M, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-21 in chronic inflammatory diseases”, *Biofactors.* 2013; 39: 368-373.
 25. Ngiow SF, Teng MW, Smyth MJ. A balance of interleukin-12 and – 23 in cancer. *Trends Immunol.* 2013; 34: 548-555.
 26. Yao Y, Simard AR, Shi FD, Hao J. IL-10-producing lymphocytes in inflammatory disease. *Int Rev Immunol.* 2013;32:324-336.
 27. Wilke CM, Wei S, Wang L, Kryczek I, Kao J, Zou W. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon- γ . *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60: 1529-1541.
 28. Zelova H, Hosek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Res.* 2013; 62: 641-651.
 29. Amin R, Marfak A, Pangault C, Chanut A, Tarte K, Denizot Y, Cogné M. The class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a c-myc deregulation transgenic model. *Oncotarget.*
 30. Vincent-Fabert C, Truffinet V, Fiancette R, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol.* 2009; 182: 6926-6932.

Article 2

The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Igλ-Myc mice.

Faten Saad, Alexis Saintamand, Michel Cogné, Yves Denizot.

Oncotarget, 2015 Apr 29 [Epub ahead of print]

La lymphomagenèse B constitue un détournement de la physiologie de la différenciation B, avec 1) la mise en jeu anormale des processus de remaniement et de mutation des gènes d'Ig aboutissant à la dérégulation d'oncogènes comme *c-myc*, cycline D1, cycline D3 et *bcl-2* ; et 2) la dérégulation de facteurs transcriptionnels impliqués dans la protection contre l'apoptose ou le contrôle de la prolifération. Une majorité des lymphomes de l'adulte porte les stigmates d'une dérégulation des processus physiologiques avec notamment des recombinaisons aberrantes affectant les régions VDJ et "switch" (et promouvant des translocations d'oncogènes), des phénomènes d'instabilité génomique et des remaniements ou cassures de l'ADN liés à la SHM.

La maturation lymphocytaire B est sous le contrôle des éléments *cis*-régulateurs des gènes d'Ig. L'étude de la régulation physiologique des événements de remaniements au sein du locus IgH est rendue complexe par l'existence d'éléments *cis*-régulateurs en 5' (activateur Eμ) et en 3' (3'RR) du locus IgH. Au loci κ et λ se trouvent également des activateurs qui peuvent participer à des dérégulations oncogéniques et conduire à l'émergence de lymphomes. Les souris transgéniques Eμ-Myc ([Adams et al., 1985](#)), *c-myc*-3'RR ([Truffinet et al., 2007](#)) et Igλ-Myc ([Kovalchuk et al., 2000](#)) ont montré la contribution des « enhancers » des IgH et des IgL dans la lymphomagenèse B. Les modèles *c-myc*-3'RR et Igλ-Myc développent des lymphomes matures de type Burkitt. La 3'RR est essentielle aux processus de SHM et de CSR qui génèrent des cassures d'ADN, sites potentiels de mutations et/ou translocation oncogéniques. Nous nous sommes posé la question d'un éventuel rôle en « trans » de la 3'RR lors de la lymphomagenèse chez les souris Igλ-Myc par l'intermédiaire de son action lors de la SHM et la CSR. Bref, en absence de la 3'RR va-t-on observer un changement dans le phénotype des lymphomes chez les souris Igλ-Myc ?

La délétion de la 3'RR a été apportée aux souris transgéniques Igλ-Myc par croisements successifs avec des souris déficientes pour la 3'RR ([Vincent-Fabert et al., 2010b](#)). Les souris

Ig λ -Myc sont porteuses d'un gène Myc humain placé sous le contrôle transcriptionnel des séquences régulatrices de la chaîne λ d'Ig.

Principaux résultats

Trois cohortes de souris ont été suivies : des souris Ig λ -Myc normales, des souris Ig λ -Myc hétérozygotes ou homozygotes pour la délétion de la 3'RR. Après plusieurs semaines, nous avons observé l'apparition de lymphomes chez ces trois types de souris. Il est à noter que l'étude de la cinétique d'apparition de ces lymphomes n'a pu être faite, faute de l'obtention, en simultané, de cohortes suffisamment grandes. Nos trois lignées murines développent des lymphomes B localisés dans les ganglions mais également dans la rate ainsi que le sang confirmant les résultats préalablement publiés sur les souris Ig λ -Myc normales (Kovalchuk *et al.*, 2000). Aucun lymphome n'a d'extension digestive. Le caractère clonal des tumeurs a été vérifié par Southern Blot après hybridation d'ADN génomique (digéré EcoRI) avec une sonde localisée sur le segment J_{H4} et donc toujours présent en aval du V(D)J ou DJ recombiné.

L'analyse par cytométrie en flux des lymphomes provenant des souris Ig λ -Myc révèle un panel allant des stades pro-B/pré-B (B220⁺CD117⁺CD43⁺) aux stades B matures (B220⁺IgM⁺IgD⁺CD43^{+/-}CD138^{+/-}). Il est à noter que la publication originale (Kovalchuk *et al.*, 2000) ne rapporte la présence que de lymphomes B matures suggérant une petite dérive de ce modèle murin au cours des générations. La proportion des lymphomes B matures baisse significativement chez les souris 3'RR déficientes par rapport aux souris sauvages (16% vs 54%, p=0,01). La proportion des lymphomes matures activés CD43⁺ baisse significativement chez les souris 3'RR déficientes par rapport aux souris sauvages (0% vs 54%, p<0,05). La proportion de lymphomes CD5⁺ augmente significativement chez les souris homozygotes pour la délétion de la 3'RR par rapport aux souris sauvages (32% vs 12%, p<0,05). L'absence de la 3'RR modifie donc très sensiblement le panel de lymphomes générés chez les souris Ig λ -Myc. L'absence de la 3'RR diminue le caractère mature d'un grand nombre de lymphomes et de ce fait permet l'émergence d'un plus grand nombre de lymphomes B immatures. Parmi les lymphomes B matures l'absence de la 3'RR en diminue le caractère activé.

L'analyse par cytométrie en flux du caractère prolifératif des lymphomes montre qu'il n'est pas affecté par la délétion de la 3'RR. Ce caractère est évalué par l'analyse du pourcentage en

cellules exprimant l'Ag Ki67 (présent des phases G₁ à G₂ du cycle cellulaire). L'index Ki67 est toujours très fort (>80% de cellules Ki67⁺) montrant une grande majorité de cellules B lymphomateuses en cycle.

L'élément initiateur de la lymphomagenèse dans les souris Igλ-Myc est la surexpression d'un c-myc humain par les activateurs transcriptionnels du locus Igλ. L'analyse de la quantité de transcrits Myc humain par PCR quantitative montre leur augmentation entre des cellules B de rates normales et lymphomateuses mais pas de différence entre des lymphomes Igλ-Myc avec et sans 3'RR qu'ils soient immatures ou matures. Une altération de la transcription du c-myc humain n'est donc pas une explication plausible pour le shift mature : immature chez les souris Igλ-Myc sans 3'RR. De même, l'analyse des transcrits Myc murin n'apporte aucune donnée significative.

Les régions variables V issues des tumeurs des souris sauvages et déficientes pour la 3'RR ne sont pas mutées suggérant que la cellule à l'origine du lymphome murin est pré-centre germinatif alors que chez l'homme elle est post-centre germinatif. La délétion de la 3'RR n'affecte pas également l'utilisation des gènes des régions V, D et J confirmant que la 3'RR n'est pas impliquée dans ces recombinaisons (Rouaud *et al.*, 2012).

En conclusion, l'absence de la 3'RR modifie le degré de maturité tumoral dans les souris Igλ-Myc. Une première hypothèse pour expliquer ces résultats est que cette perturbation serait liée à une diminution de la vitesse de maturation démasquée par la présence du transgène Igλ-Myc. Ce résultat confirmerait l'effet de la 3'RR sur la cinétique d'utilisation de l'allèle μ pour la formation du BCR (Saintamand *et al.*, 2015). Une seconde hypothèse serait un rôle en « trans » de la 3'RR lors de la lymphomogenèse par l'intermédiaire de son action lors de la SHM et la CSR. La diminution drastique de mutations additionnelles générées lors de la CSR et de la SHM expliquerait l'augmentation du pourcentage de lymphomes B immature en absence de la 3'RR. Quelle que soit l'hypothèse, notre étude montre que la 3'RR agit sur la lymphomagenèse B, même quand l'oncogène n'est pas transloqué au locus IgH mais sur un locus IgL.

Les résultats portants sur l'étude du rôle de la 3'RR dans la lymphomagenèse chez les souris Igλ-Myc ont également fait l'objet d'un éditorial (voir Annexes) dans la revue « Cell Cycle ».

The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Igλ-Myc mice

Faten Saad¹, Alexis Saintamand¹, Michel Cogné¹ and Yves Denizot¹

¹ CNRS UMR 7276, CRIBL, Université de Limoges, Limoges, France

Correspondence to: Yves Denizot, email: yves.denizot@unilim.fr

Keywords: IgH 3' regulatory region; Igλ-Myc mice; B-cell lymphoma

Received: March 10, 2015

Accepted: April 10, 2015

Published: April 29, 2015

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The IgH 3' regulatory region (3'RR), encompassing the four transcriptional enhancers hs3a-hs1,2-hs3b-hs4, has a key role on class switch recombination, somatic hypermutation, IgH transcription and B-cell fate. In plasma cells, transcribed IgH and IgL loci often colocalized in transcription factories and an IgL transcription defect might translate into lowered IgH transcription. We explored whether the 3'RR would affect lymphomagenesis in Igλ-Myc transgenic mice prone to lymphoproliferations. Breeding Igλ-Myc transgenics in a background deficient for the 3'RR influences lymphomagenesis toward less mature lymphomas (16% vs 54%, $p = 0.01$, Z test for two population proportions). In a 3'RR-deficient background mature tumors less often expressed the CD43 antigen (54% vs 0%, $p = 0.02$), a membrane glycoprotein expressed on activated mature B-cells. In contrast, in a 3'RR-deficient background tumors more often expressed the CD5 antigen (32% vs 12%, $p = 0.05$) that may serve to control autoimmunity and that is suspected to play a role in leukemic transformation. Lymphoma myc transcript levels, the Ki67 index of proliferation, the clonality, the usage of V(D)J segments, and their somatic hypermutation status were not affected in the 3'RR-deficient background. In conclusion, most probably through its action during the maturation process, the 3'RR can influence lymphomagenesis even when not linked with an oncogene.

INTRODUCTION

The immunoglobulin heavy chain (IgH) locus undergoes multiple changes along B-cell differentiation, affecting transcription and accessibility to V(D)J recombination, somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR) [1, 2]. Since Ig gene remodelling events require transcription, *cis*-regulatory regions and especially transcriptional enhancers are major locus regulators. The IgH 3' regulatory region (3'RR) enhancers (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) promote IgH transcription [3], SHM [4] and CSR [5, 6] but not V(D)J recombination [7]. Ongoing recombination and mutation all along B-cell development make the IgH and Ig light (IgL) chain locus hotspots for translocations [8, 9]. Numerous lymphomas are thus marked by proto-oncogene translocation into the IgH locus such as cyclin D1, Bcl-2 and c-myc for mantle cell lymphoma, follicular lymphoma and Burkitt lymphoma, respectively. Convincing

demonstration of the key contribution of the IgH and IgL enhancers in mature B-cell lymphomagenesis has been done by transgenic animal models. Thus, c-myc-3'RR and Igλ-Myc transgenics developed Burkitt lymphoma-like proliferation [10-15]. IgH and IgL enhancers may thus be potent activators of IgH/IgL-translocated oncogene transcription, even when breakpoints lie several hundred kb away from the enhancers. Thus, long-range interactions between the two regions of chromatin, through formation of a loop structure constitute an important mechanism of normal and abnormal gene transcription regulation by the 3'RR [2, 16]. Although IgL and IgH chains are encoded by loci located in different chromosome, nuclear positions of Ig alleles are coordinated according to ordered V(D)J recombination [17]. During B-cell activation one IgH allele more often associates with the nuclear periphery [18], while the chromatin context of both alleles appears similar in 4C experiments [19]. Observation of frequent inter-allelic (*trans*-) CSR in mammals also implies inter-

allelic proximity favoring recombination and synapsis between alleles [20, 21]. In plasma cells, transcribed IgH and IgL loci often colocalized in transcription factories and an IgL transcription defect might translate into lowered IgH transcription [22]. Until now, the role of the 3'RR in the development of B-cell lymphomas due to a IgL enhancer-mediated oncogene deregulation is unknown. We have explored whether the 3'RR would affect lymphomagenesis in Igλ-Myc transgenic mice prone to lymphoproliferations. The Igλ-Myc transgene induces the B-cell specific overexpression of the human c-myc oncogene leading to the progressive development of B-cell lymphomas [14].

RESULTS AND DISCUSSION

Generation of 3'RR-deficient lymphoma mice

3'RR-deficient mice were crossed with Igλ-Myc mice (considered as *wt* in this study) to derive heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice. The presence of the Igλ-Myc transgene (Figure 1A) and of the 3'RR-deleted allele (Figure 1B) was followed by using specific PCR.

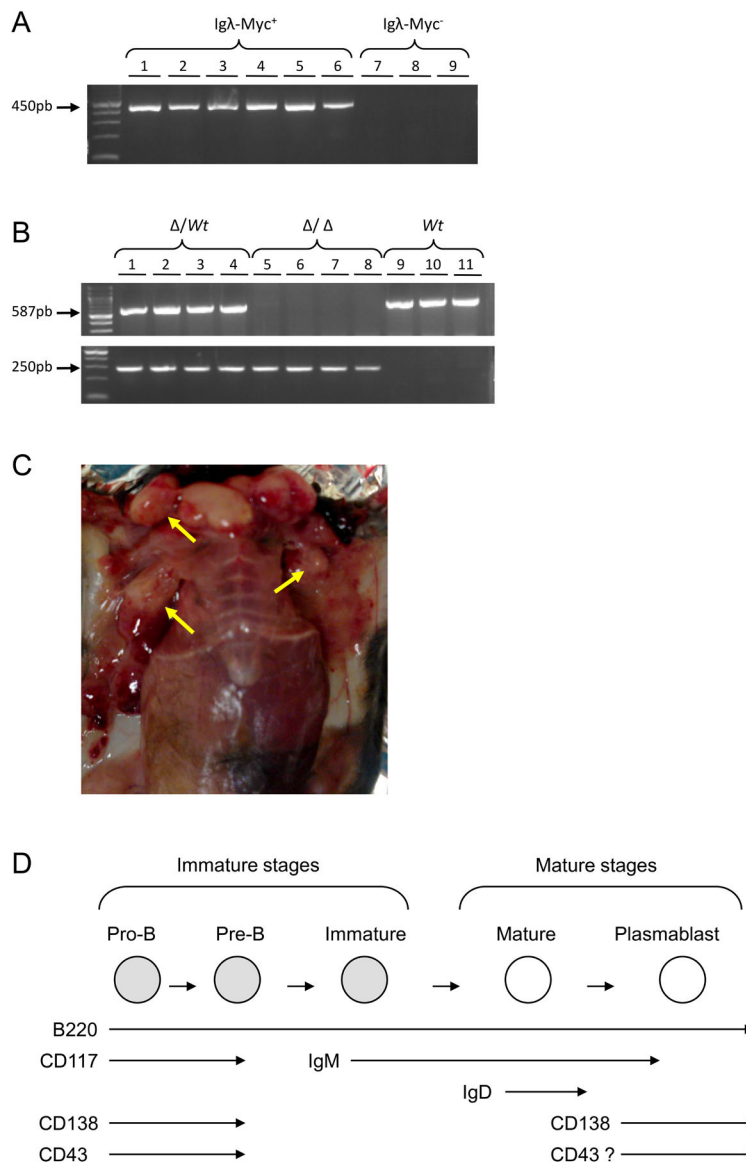


Figure 1: Igλ-Myc/3'RR-deficient lymphoma mice. **A.** A typical PCR profile for the detection of the Igλ-Myc transgene. Lines 1-6: six positive mice (amplification of a 450 bp fragment). Lines 7-9: three negative mice. **B.** A typical PCR profile for the detection of the 3'RR-deficient allele (amplification of a 250 bp fragment) and the 3'RR *wt* allele (amplification of a 587 bp fragment). Lines 1-4: four heterozygous 3'RR-deficient mice (Δ/wt). Lines 5-8: four homozygous 3'RR-deficient mice (Δ/Δ). Lines 9-11: three *wt* mice. **C.** Tumors in lymphoma mice. Arrows indicate lymphoma presence. **D.** Schematic representation of the B-cell development with the presence of several membrane cell markers. The “?” indicates the potential expression of the CD43 antigen on activated mature B-cells.

Characteristics of lymphomas in 3'RR-deficient lymphoma mice

After several weeks, mice developed lymphomas with obvious lymph node involvement (Figure 1C). According to the French law animal exhibiting tumors were sacrificed. At necropsy, lymphoma mice had enlarged lymph nodes and spleen. Mice with tumors showed leukemic peripheral blood involvement with circulating lymphoma cells. The numbers of total circulating white

blood cells were not different ($p > 0.05$, Mann-Whitney U -test) between Ig λ -Myc lymphoma mice ($136 \pm 28 \cdot 10^3$ cells/ μ l, $n = 10$), heterozygous 3'RR/Ig λ -Myc lymphoma mice ($495 \pm 194 \cdot 10^3$ cells/ μ l, $n = 17$) and homozygous 3'RR/Ig λ -Myc lymphoma mice ($175 \pm 33 \cdot 10^3$ cells/ μ l, $n = 18$) but elevated ($p = 0.02$, Mann-Whitney U -test) as compared with healthy Ig λ -Myc mice ($81 \pm 5 \cdot 10^3$ cells/ μ l, 4 mice) and healthy 3'RR-deficient mice ($71 \pm 7 \cdot 10^3$ cells/ μ l, 4 mice). Flow cytometry analysis of circulating lymphoma cells showed the same labelling pattern than spleen and lymph node lymphoma cells (Figure 2). Means

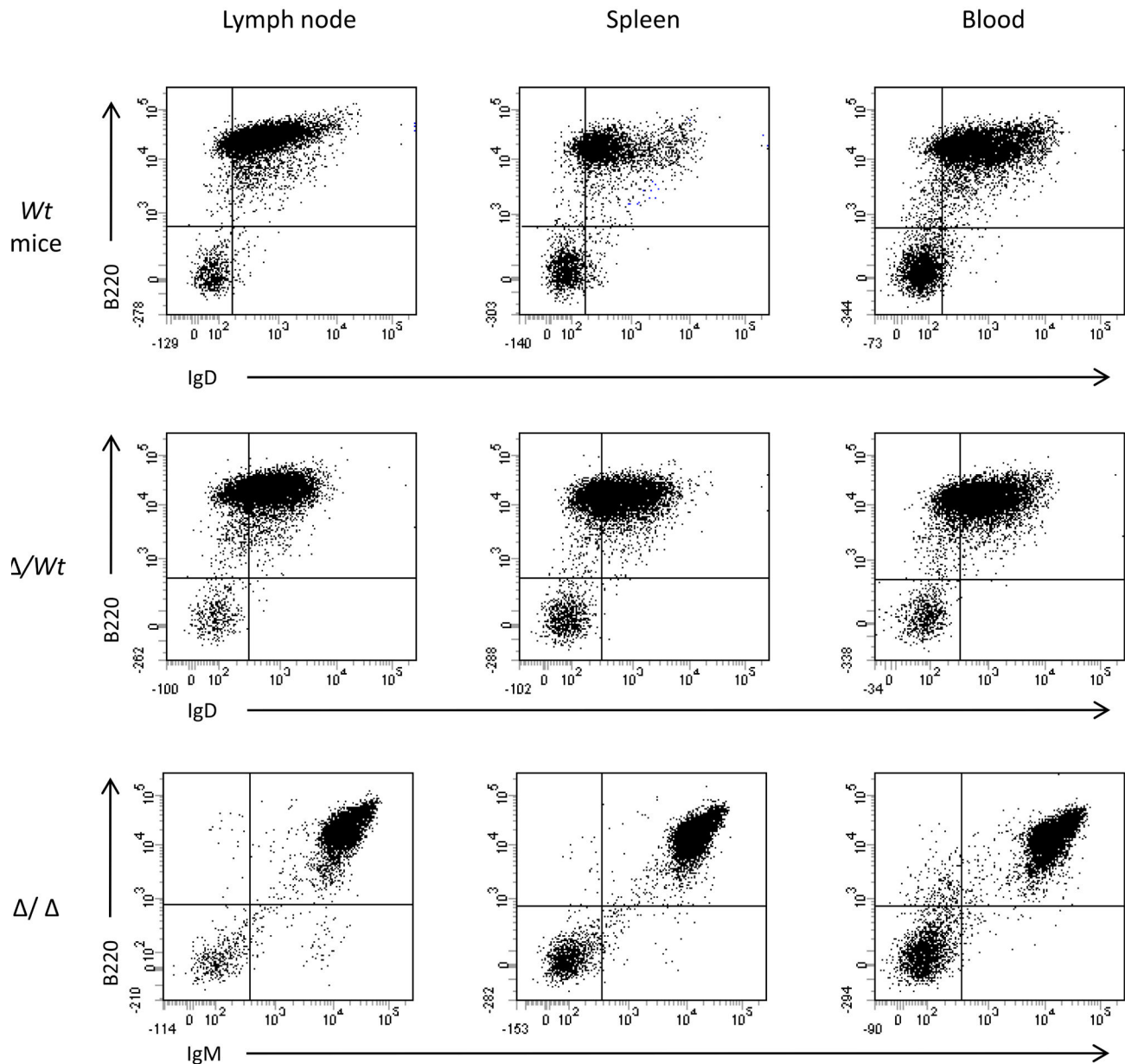


Figure 2: Flow cytometry analysis of lymphoma cells in spleen, lymph node and blood. Typical flow cytometry of lymphoma cells from lymph node, spleen and blood of lymphoma mice. Results of a B220/IgD labelling for an Ig λ -Myc mice (*wt*), of a B220/IgD labelling for a heterozygous 3'RR-deficient/Ig λ -Myc mice (Δ/wt) and a B220/IgM labelling for an homozygous 3'RR-deficient/Ig λ -Myc mice (Δ/Δ). Three representative profiles from 6 lymphoma mice (2 *wt*, 2 Δ/wt and 2 Δ/Δ).

of flow cytometry labelling were also similar (Figure 2) showing that lymphoma cells in lymph nodes, spleen and blood were identical. Lymphoma cells were not associated with liver and gut-associated lymphoid tissues (data not shown). All data reported below were obtained with lymph node lymphomas.

Lymphomas from 79 animals were investigated (24 *wt* mice, 30 heterozygous mice and 25 homozygous mice). During precursor B-cell differentiation, genes encoding H and L chains of an Ig molecule are somatically assembled from germline DNA. This process occurs in the bone marrow prior to antigenic challenge and leads to the successive formation of pro-B, pre-B and immature B-cells. B-cells mature in germinal centers and once

activated differentiate into Ig-secreting plasma cells (schematized in Figure 1D). Whether the membrane B220 marker is present all along B-cell maturation, stage specific markers characterise these different stages: expression of the membrane CD117/CD43/CD138 antigens on pro-B/pre-B-cells, expression of membrane IgM on immature B-cells, expression of membrane IgD on mature B-cells, re-expression of membrane CD138 on plasma cells and re-expression of membrane CD43 on activated mature B-cells (schematized in Figure 1D) [23]. Flow cytometry was used to monitor the immunophenotypic profile of lymphomas (typical profiles are reported in Figure 3). A B220⁺ population was characterized in all cases (100%, 79/79) while staining for T lineage (CD4 and

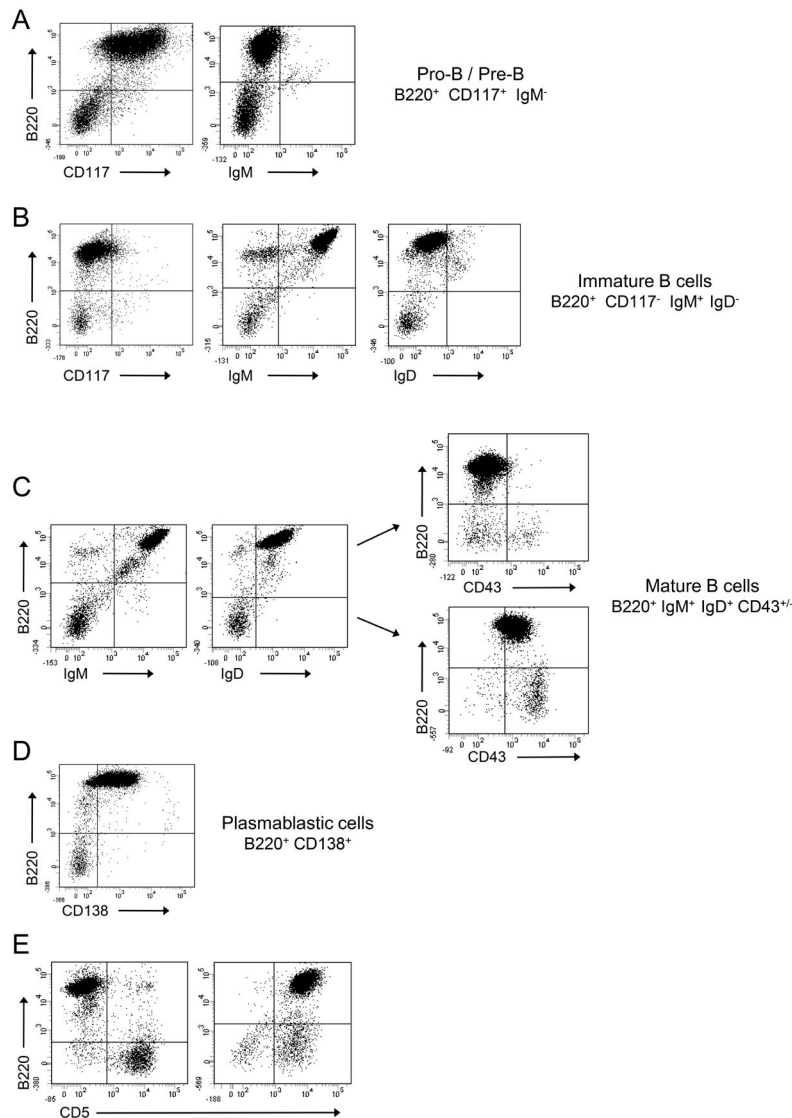


Figure 3: Flow cytometry analysis of Igλ-Myc lymphomas. Lymphomas were labelled with various antibodies and analyzed with flow cytometry. Lymphoma analysis revealed four major subtypes. **A.** pro-B/pre-B lymphomas (B220⁺CD117⁺IgM⁻); **B.** immature B-cell lymphoma (B220⁺CD117⁻IgM⁺IgD⁻); **C.** mature B-cell lymphoma (B220⁺IgM⁺IgD⁺ with or without CD43); **D.** plasmablastic B-cell lymphoma (B220⁺CD138⁺). **E.** Some lymphomas were CD5⁺. Representative B220/CD117, B220/IgM, B220/IgD, B220/CD43, B220/CD138 and B220/CD5 labelling were shown. Anti-B220 was conjugated with PC5. Anti-IgM, anti-IgD, anti-CD43 and anti-CD5 were conjugated with FITC. Anti-CD117 and anti-CD138 were conjugated with PE.

CD8) and monocyte/macrophage lineage (CD11b) was negative (data not shown). Percentages of pro-B/pre-B, immature B-cell, mature B-cell and plasmablastic B-cell lymphomas in Igλ-Myc, heterozygous 3'RR/Igλ-Myc and homozygous 3'RR/Igλ-Myc lymphoma mice are reported in Figure 4A. Deletion of the 3'RR significantly ($p = 0.01$, Z test for two population proportions) influenced the lymphoma maturation stage with reduced total (mature B-cell lymphomas plus plasmablastic B-cell lymphomas) mature lymphomas (16%, 4/25) compared to Igλ-Myc *wt* mice (54.1%, 13/24) (Figure 4B). Although reduced (36.6%, 11/30), mature lymphomas in heterozygous 3'RR/Igλ-Myc mice were not significantly different ($p > 0.05$, Z test for two population proportions) compared

to Igλ-Myc *wt* mice. CD43 is a sialylated single chain membrane glycoprotein expressed on activated mature B-cells [24]. Deletion of the 3'RR significantly ($p < 0.05$, Z test for two population proportions) reduced the number of CD43⁺ mature B-cell lymphomas. CD43 is thus present on 54% (7/13), 73% (8/11) and 0% (0/4) of total mature B-cell lymphomas of *wt*, heterozygous and homozygous 3'RR-deficient Igλ-Myc mice, respectively (Figure 4C). CD5 is a transmembrane glycoprotein on the surface of some B-cells associated with the B-cell receptor. CD5 might have a major negative influence on antigen receptor driven-B-cell function and may serve to control autoimmunity [25]. The number of CD5⁺ B-cell lymphomas is higher ($p < 0.05$, Z test for two population

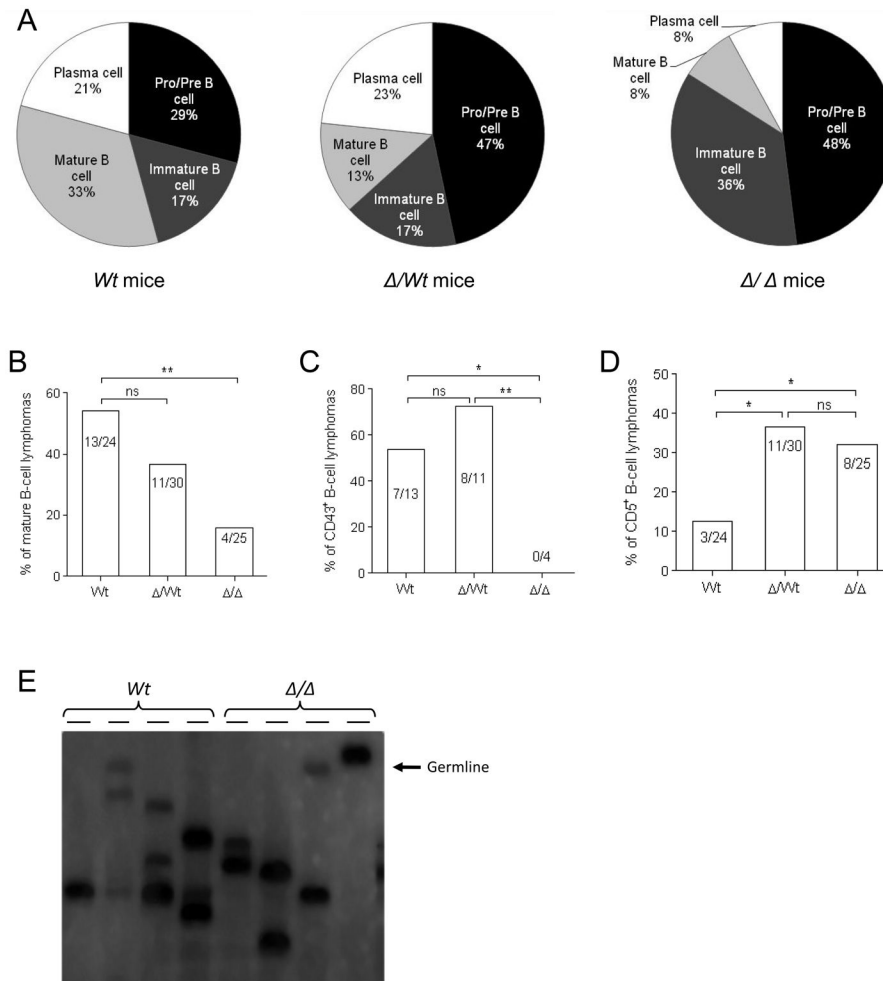


Figure 4: Igλ-Myc lymphomas in a 3'RR-deficient background. **A.** Percentage of pro-B/pre-B lymphomas, immature B-cell lymphomas, mature B-cell lymphomas and plasmablastic B-cell lymphomas in Igλ-Myc (*wt*), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc (Δ/wt) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). **B.** Percentage of total (mature B-cell lymphomas plus plasmablastic B-cell lymphomas) mature B-cell lymphomas in Igλ-Myc (*wt*), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc (Δ/wt) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). * $p < 0.05$, Z test for two population proportions. **C.** Percentage of total (mature B-cell lymphomas plus plasmablastic B-cell lymphomas) CD43⁺ mature B-cell lymphomas in Igλ-Myc (*wt*), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc (Δ/wt) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, Z test for two population proportions. **D.** Percentage of total CD5⁺ B-cell lymphomas in Igλ-Myc (*wt*), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc (Δ/wt) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). * $p < 0.05$, Z test for two population proportions. **E.** Lymphoma clonality. Southern blot analysis was used to examine lymphoma clonality with a J_{H4} probe. Genomic DNA was prepared and digested with *EcoRI* from lymph node cells of Igλ-Myc mice (*wt*) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). The arrow located the germinal band.

proportions) in heterozygous 3'RR-deficient Igλ-Myc mice (36%, 11/30) and homozygous 3'RR-deficient Igλ-Myc mice (32%, 8/25) than in *wt* Igλ-Myc mice (3/24, 12%) (Figure 4D).

All along B-lymphocyte development, cell survival is dependent from BCR expression and signalling. IgH transcription is markedly reduced in 3'RR-deficient mice even if BCR expression, signalling and B-cell compartments (except for marginal zone B-cell one) are roughly normal [3]. The lower percentage of total mature B-cell lymphomas in the 3'RR-deficient background might be linked to a lowered maturation speed unmasked by the *c-myc*-induced lymphoproliferation context. The lower percentage of CD43 activated mature B-cell lymphomas in the 3'RR-deficient background is coherent with this hypothesis. CD5⁺ B-cells have distinct functional properties compared with B-cells lacking CD5. In B-cells, CD5 associates with the BCR and is suspected to maintain energy in mouse B-cells. CD5 also promotes multiple intracellular signalling pathways in B-lymphocytes [26] and CD5⁺ B-cells are more resistant to apoptose than CD5⁻ B-cells [25]. The elevated CD5⁺ B-cell lymphomas in 3'RR-deficient Igλ-Myc mice might unmask a role of the CD5 antigen in leukemic transformation as previously suggested [26]. The role of the 3'RR deletion on the CD5⁺ B-cell fate deserves now further investigations. Finally, taken altogether these results reinforce a recent

study reporting that the class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a *c-myc* deregulation transgenic model [13].

Clonal origin of lymphomas

Southern analysis of V(D)J recombinations showed that all B-cell lymphomas had undergone clonotypic Ig rearrangements. Thus, the use of a J_{H4} probe revealed rearranged bands in addition to the germline band indicating the clonal origin of lymphomas from Igλ-Myc mice with or without the 3'RR (Figure 4E).

Ki67 expression of lymphomas

The proliferative activity of tumor cells was investigated with the nuclear protein Ki67 found during G₁, S, G₂ and M phase of the cell cycle. The percentage of Ki67⁺ cells was high and similar in Igλ-Myc mice (91%, 12 mice), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (87%, 21 mice) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (89%, 21 mice) showing that the intensive lymphoma proliferation was not affected by deletion of the 3'RR. These results are in agreement with the lack of effect of the 3'RR deletion on the growth of normal B-cells [5].

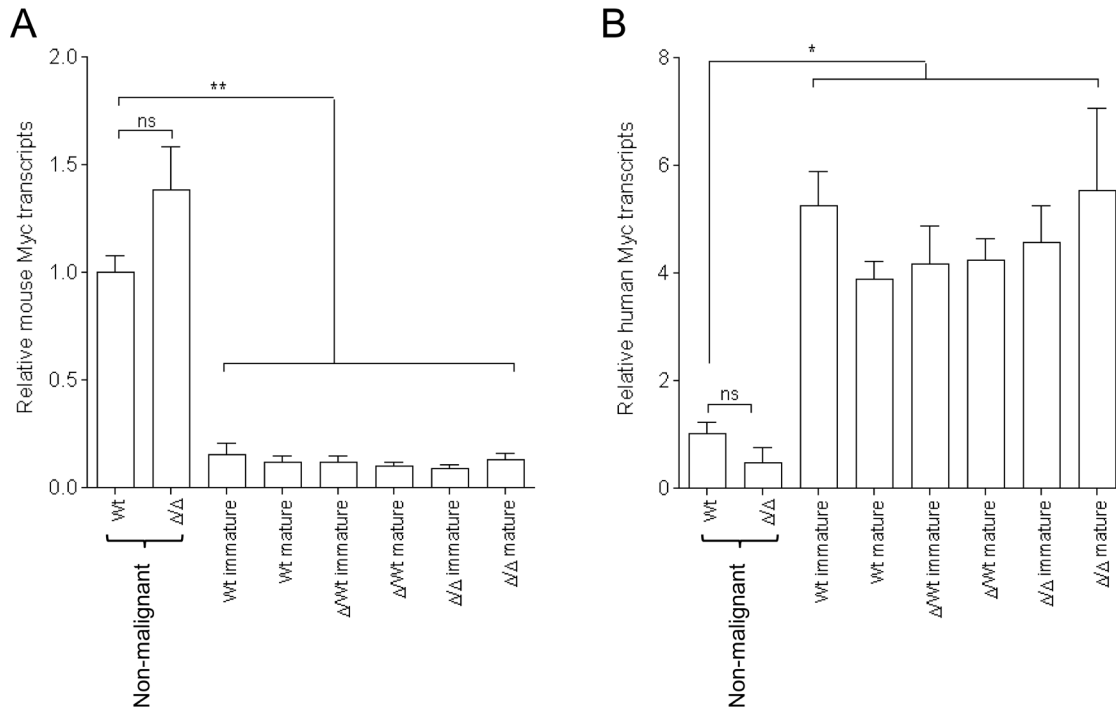


Figure 5: Murine and human *c-myc* transcripts in Igλ-Myc lymphomas in a 3'RR-deficient background. **A.** Murine *myc* transcripts **B.** Human *myc* transcript in immature and mature B-cell lymphomas in Igλ-Myc (*wt*), heterozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc (Δ/wt) and homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice (Δ/Δ). Five immature and five mature B-cell lymphomas for *wt* mice. Eight immature and eleven mature B-cell lymphomas for Δ/wt mice. Eleven immature and five mature B-cell lymphomas for Δ/Δ mice. Pre-malignant splenic B-cells of four *wt* and four Δ/Δ mice were used as controls. **p* < 0.01 and ***p* < 0.001 (Mann-Whitney *U*-test).

Mouse and human c-myc transcripts in lymphomas

Igλ-Myc mice carried an Igλ-Myc transgene containing a translocated MYC gene from the human Burkitt lymphoma cell line IARC-BL60 under the transcriptional control of the IgL λ chain regulatory sequences [14]. Thus the dual analysis of both human transgenic myc transcripts and endogenous mouse myc transcripts can be investigated in Igλ-Myc mice. We analyzed mouse splenic B-cells in 8 week old homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice and Igλ-Myc mice before any manifestation of disease. Mouse and human myc transcripts levels in splenic B-cells were not affected by the 3'RR-deficient background (Figure 5A and 5B). Similarly,

the shift between mouse and human myc transcript levels in B-cell lymphomas of Igλ-Myc mice was not affected. For these experiments purified splenic B-cells of 8-weeks old mice prior any manifestation of disease were used as controls. This was done because lymphomas arose from axillary, parotid, and submandibular lymph nodes (Figure 1C) and that in steady state conditions it is impossible to obtain sufficient amounts of purified lymph node B-cells from 8-weeks old mice. Finally, human myc transcript levels were similar in immature and mature B-cell lymphomas (Figure 5B). Taken together these results suggest that the tumoral process is not affected by the 3'RR-deficient background, reinforcing the hypothesis that the lowered lymphoma maturity in 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice is related to a difference on cell maturity of the cell of origin of the B-cell lymphoma.

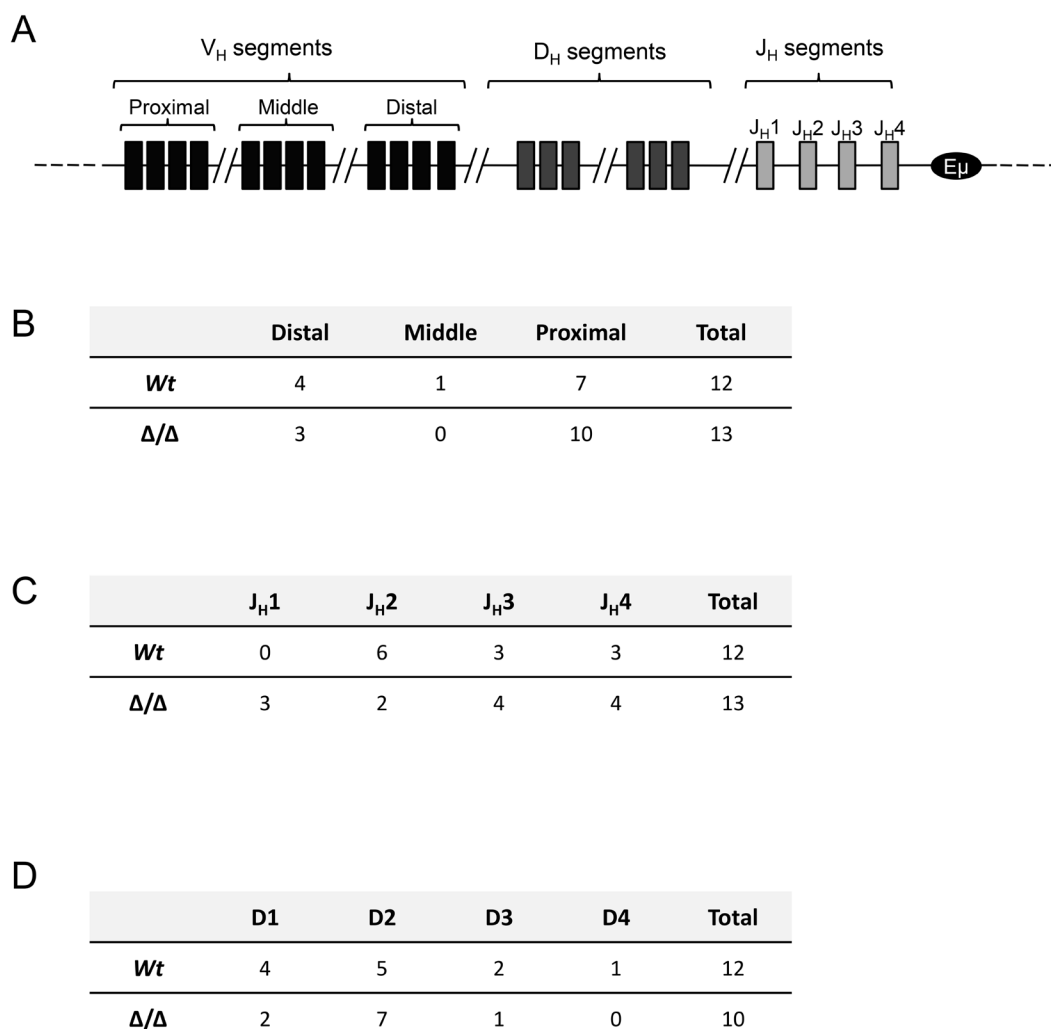


Figure 6: V(D)J usage in Igλ-Myc lymphomas in a 3'RR-deficient background. **A.** Schematic representation of segments of variability (V), diversity (D) and junction (J) in the IgH mouse locus. **B.** Analysis of distal, middle or proximal V genes in twelve lymphomas from Igλ-Myc mice and thirteen lymphomas from homozygous 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice. **C.** Analysis of J segments in twelve lymphomas from Igλ-Myc mice and thirteen lymphomas from 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice. **D.** Analysis of D segments in twelve lymphomas from Igλ-Myc mice and thirteen lymphomas from 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice. Three D segments from lymphomas from 3'RR-deficient/Igλ-Myc mice cannot be determined after amplification, cloning and sequencing of the V-D-J segment due to high mutations/insertions/deletions located at the V-D and D-J junctions.

Analysis of Ig VH mutations in lymphomas

We then analysed the mutation status of V_H rearranged genes in B-cell lymphomas. This study was made possible because of their clonal nature (Figure 4E). The 150 bp located downstream the J_{H4} exon were investigated as an hot spot of somatic hypermutation [4]. All lymphomas revealed unmutated sequences and thus featured a pre-germinal centre origin (results from four *wt* lymphomas, three heterozygous 3'RR lymphomas, three homozygous 3'RR lymphomas, ten sequences for each lymphoma) (data not shown). The lack of somatic hypermutations in lymphomas from Ig λ -Myc mice is in agreement with their absence in lymphomas from iMyc^{Ep} mice [27] and reinforced the hypothesis that most mice lymphomas arise from naïve B-cells. It is interesting to note that most human B-cell lymphomas are mutated suggesting that the cell of origin of human and mouse lymphomas differs suggesting multifactorial route to tumor development and that correlations between human lymphomas and mice models should be made cautiously.

Analysis of V(D)J recombination in lymphomas

The mouse IgH locus contains about 200 variable (V_H) genes subdivided into domain-organized gene families, including the distal V_H (the largest family) and the proximal V_H family. V_H genes are followed by a dozen of diversity (D) segments and four junction (J) segments. We then analysed if 3'RR deficiency affected the type of V, D and J used to express the B-cell receptor at the membrane of B-cell lymphomas. This study was made possible because of their clonal nature. As shown in Figure 6, lack of the 3'RR did not affect the use of either V, D and J segments. This study confirms that the 3'RR is not implicated in V(D)J recombination confirming previous studies using non lymphoma B-cells [7, 28].

CONCLUDING REMARKS

Results of the present study indicate that the IgH 3'RR influences lymphomagenesis in Ig λ -Myc mice. The 3'RR did not directly act on the lymphomagenetic process but on the maturity of the cell of origin of the lymphoma. The 3'RR is a major lymphoma oncogene deregulator [8, 10-13]. Targeted inhibition of the 3'RR could provides a therapeutic strategy for the treatment of a wide range of mature B-cell lymphomas, specifically those with oncogene translocation into the IgH locus [29, 30].

MATERIALS AND METHODS

Generation of transgenic mice

3'RR-deficient mice [5] were crossed with Ig λ -Myc mice [14] to derive heterozygous 3'RR-deficient/Ig λ -Myc mice and homozygous 3'RR-deficient/Ig λ -Myc mice. Mice exhibiting obvious tumors or presenting signs of illness were immediately sacrificed. Our research has been approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and carried according the European guidelines for animal experimentation.

PCR

PCR experiments for detection of the *wt* 3'RR allele were carried out with specific forward 5'-CCAAAAATGGCCAGGCCTAGG-3' and reverse 5'-GACCCTGTCCTATGGCT GAC-3' primers [23]. PCR experiments for detection of the deficient 3'RR allele were carried out with specific forward 5'-TCCCTGGACAATCTGCACAT-3' and reverse 5'-GACCCTGTCCTATGGCTGAC-3' primers [30]. Amplification products were analysed on a 1.2% agarose gel. Expected sizes of amplified products were 250 bp and 587 bp for mutated and *wt* alleles, respectively. PCR experiments for detection of the Ig λ -Myc transgene were carried out with specific forward 5'-GCTCGTCTCAGAGAAGCTGG-3' and reverse 5'-ATCTCTCCAGATCTGCTATCTC-3' primers. Amplification products were analysed on a 1.2% agarose gel. Expected size of amplified products was 450 pb.

Flow cytometry analysis

Single-cell suspensions from lymph node tumors and spleen were labelled with PC5 anti-B220, PE anti-CD117, FITC anti-CD43, FITC anti-IgM, FITC anti-IgD, FITC anti-CD5, PE anti-CD138, PE anti-CD4, PC5 anti-CD8 and FITC anti-CD11b antibodies (Southern Biotechnologies) and analyzed on a Fortessa LSR2 (Beckman Coulter) [31, 32]. For intracellular labelling experiments, cells were fixed and permeabilized with the IntraprepTM permeabilization reagent (Beckman Coulter) according to the manufacturer's recommendations prior to incubation with FITC anti-Ki67 (Becton Dickinson) or irrelevant antibodies (Cell signalling Technology, Inc).

Clonality assay

Genomic DNA prepared from lymph node lymphomas was digested with *EcoRI* and analysed by Southern blot with a ³²P-labeled J_H probe [10].

mRNA expression

Total RNA was extracted from lymph node lymphomas. RNA was reverse-transcribed into cDNA by addition of reverse transcriptase to 2 µg total RNA in a final volume of 20 µl. Real time PCR was performed in duplicate by using TaqMan assay reagents and analysed on an ABI Prism 7000 system (Applied Biosystems Foster City, CA) [32]. Product reference: mouse *c-myc*, Mm00487803-m1; human *c-myc*, Hs00153408-m1. Mouse actin (Mn00607939-s1) was used for normalization of gene expression levels (Applied Biosystems). In another set of experiments, RNA was extracted from splenic B-cells (purified by CD43 magnetic cell sorting) of 8 week old Igλ-Myc/3'RR-deficient mice and Igλ-Myc mice (*i.e.*, before any manifestation of disease).

Sequence analysis of expressed V(D)J rearrangements

Genomic DNA extracted from tumors was amplified by PCR. Forward primers: V_HJ558 5'-GCGAAGCTTARGCCTGGG RCTTCAGTGAAG-3', V_HQ52 5'-GCGAAGCTTCTCACAGAGCCTGTCCATCAC-3', V_H7183 5'-CGGTACCAAGAASAMCCTGTWCCTGCAAATGASC-3' and backward primer: J_{H4} 5'-AGGCTCTGAGATCCCTAGACAG-3'. The PCR products were cloned into the Zero Blunt® Topo® PCR cloning (Invitrogen). Plasmids were isolated using the NucleoSpin kit (Macherey-Nagel Eurl) and sequenced using an automated laser fluorescent ANA ABI-PRISM sequencer (Perkin-Elmer).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC PJA 20141201649), ANR (Projets Blanc 2011), Ligue Contre Cancer de la Corrèze (subvention 2015) and Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud. We thank Pr. Georg Bornkamm (Helmholtz Center, Munich, Germany) for sending us Igλ-Myc transgenics.

CONFLICTS OF INTEREST

None

CONTRIBUTION SECTION

F.S., A.S., M.C. and Y.D. actively participated to the experimental design of the study. M.C. and Y.D. participated to the scientific discussion for manuscript writing, obtained financial grants and agreement of the ethic committee of our institution to perform the study.

REFERENCES

1. Henderson A, Calame K. Transcription regulation during B-cell development. *Ann Rev of Immunol.* 1998; 16: 163-200.
2. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, Cogné M. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol.* 2011; 110: 27-70.
3. Saintamand A, Rouaud P, Garot A, Saad F, Carrion C, Oblet C, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region governs µ chain transcription in mature B lymphocytes and the B-cell fate. *Oncotarget.* (in press).
4. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, Reina-San-Martin B, Pinaud E, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J Exp Med.* 2013; 210: 1501-1507.
5. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood.* 2010; 116: 1895-1898.
6. Rouaud P, Saintamand A, Saad F, Carrion C, Lecardeur S, Cogné M, Denizot Y. Elucidation of the enigmatic IgD class switch recombination via germ-line deletion of the IgH 3' regulatory region. *J Exp Med.* 2014; 211: 975-985.
7. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J Biol Chem.* 2012; 287: 8356-8360.
8. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur J Immunol.* 2010; 40: 3306-3311.
9. Lin P, Jetly R, Lennon PA, Abruzzo LV, Prajapati S, Medeiros LJ. Translocation (18;22)(q21;q11) in B-cell lymphomas: a report of 4 cases and review of the literature. *Human Pathol.* 2008; 39: 1664-1672.
10. Truffinet V, Pinaud E, Cogné N, Petit B, Guglielmi L, Cogné M, Denizot Y. The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B-cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J Immunol.* 2007; 179: 6033-6042.
11. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Rouaud P, Baudet C, Truffinet V, Magnone V, Guillaudeau A, Cogné M, Dubus

- P, Denizot Y. A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and c-myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma (MCL)-like lymphoma formation in mice. *Am J Pathol.* 2012; 180: 1688-1701.
12. Rouaud P, Fiancette R, Vincent-Fabert C, Magnone V, Cogné M, Dubus P, Denizot Y. Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53+/- mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget.* 2012; 3: 586-593.
 13. Amin R, Marfak A, Pangault C, Chanut A, Tarte K, Denizot Y, Cogné M. The class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a c-myc deregulation transgenic model. *Oncotarget.* 2014; 5: 8995-9006.
 14. Kovalchuk AL, Qi CF, Torrey TA, Taddesse-Heath L, Feigenbaum L, Park SS, Gerbitz A, Klobeck G, Hoertnagel K, Polack A, Bornkamm GW, Janz S, Morse III, HC. Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med.* 2000; 192: 1183-1190.
 15. Fish K, Chen J, Longnecker R. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A enhances MYC-driven cell cycle progression in a mouse model of B lymphoma. *Blood.* 2014; 123: 530-540.
 16. Wuerffel R, Wang L, Grigera F, Manis J, Selsing E, Perlot T, Alt FW, Cogné M, Pinaud E, Kenter AL. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity.* 2007; 27: 711-722.
 17. Hewitt SL, Yin B, Ji Y, Chaumeil J, Marszalek K, Tenthorey J, Salvaggio G, Steinel N, Ramsey LB, Ghysdael J, Farrar MA, Sleckman BP, Schatz DG, Busslinger M, Bassing CH, Skok JA. RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat Immunol.* 2009; 10: 655-664.
 18. Skok JA, Brown KE, Azuara V, Caparros ML, Baxter J, Takacs K, Dillon N, Gray D, Perry RP, Merkenschlager M, Fisher AG. Nonequivalent nuclear position of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat Immunol.* 2001; 2: 848-854.
 19. Holwerda SJB, van de Werken HJG, de Almeida CR, Bergen IM, de Bruijn MJW, Verstegen MJAM, Simonis M, Splinter E, Wijchers PJ, Hendriks RW, de Laat W. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: 6905-6916.
 20. Laffleur B, Bardet SM, Garot A, Baylet A, Cogné M. Immunoglobulin undergo legitimate repair in human B cells not only after cis- but also frequent trans-class switch recombination. *Genes Immun.* 2014; 15: 341-346.
 21. Reynaud S, Delpy L, Fleury L, Dougier HL, Sirac C, Cogné M. Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J Immunol.* 2005; 174: 6176-6183.
 22. Park SK, Xiang Y, Feng X, Garrard WT. Pronounced cohabitation of active immunoglobulin genes from three different chromosomes in transcription factories during maximal antibody synthesis. *Genes Dev.* 2014; 28: 1159-1164.
 23. Tung JW, Herzenberg LA. Unraveling B-1 progenitors. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 150-155.
 24. Treasure J, Lane A, Jones DB, Wright DH. CD43 expression in B-cell lymphoma. *J Clin Pathol.* 1992; 45: 1018-1022.
 25. Sigal LH. Basic science for the clinician 45: CD5. *J Clin Rheumatol.* 2012; 18: 83-88.
 26. Mageed RA, Garaud S, Taher TE, Parikh K, Pers JO, Jamin C, Renaudineau, P. Youinou. CD5 expression promotes multiple intracellular signalling pathways in B lymphocytes. *Autoimmun Rev* 2012; 11: 795-798.
 27. Zhu D, Feng C, Morse III HC, Janz S, Stevenson FK. Deregulated expression of the Myc cellular oncogene drives development of mouse 'Burkitt-like' lymphomas from naïve B-cells. *Blood.* 2005; 105: 2135-2137.
 28. Medvedovic J, Ebert A, Tagoh H, Ido M, Tamir IM, Schwickert T, Novatchkova M, Sun Q, Huis in 'T Veld PJ, Guo C, Yoon HS, Denizot Y, Holwerda SJB, et al. Flexible long-range loops in the VH gene region of the Igh locus that likely facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity.* 2013; 39: 229-244.
 29. Saintamand A, Saad F, Denizot Y. 3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy? *Cell Cycle.* 2015; 14: 789-790.
 30. Saad F, Saintamand A, Rouaud P, Denizot Y. Targeting the oncogene B lymphoma deregulator IgH 3' regulatory region does not impede the *in vivo* inflammatory response in mice. *Oncoscience.* 2014; 1: 591-598.
 31. Vincent-Fabert C, Truffinet V, Fiancette R, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol.* 2009; 182: 6926-6932.
 32. Fiancette R, Rouaud P, Vincent-Fabert C, Laffleur B, Magnonne V, Cogné M, Denizot Y. A p53 defect sensitizes various stages of B-cell development to lymphomagenesis in myce carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene. *J Immunol.* 2011; 187, 5772-5782

Article 3

Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion.

Alexis Saintamand, Pauline Rouaud, Faten Saad, Géraldine Rios, Michel Cogné, Yves Denizot.

Nature Communications, 2015, volume 6, numéro 7084

En plus des travaux menés sur le rôle de la 3'RR dans les processus immuns et inflammatoires et sur le développement des lymphomes, j'ai également participé, durant ma thèse, à la mise en évidence du rôle fonctionnel de la 3'RR dans la CSR. La majeure partie des expérimentations a été réalisée par Alexis Saintamand dans le cadre de sa thèse.

La CSR permet de changer l'isotype d'une Ig tout en conservant sa spécificité antigénique. Elle nécessite le ciblage d'AID sur les régions S qui précèdent les gènes constants. La CSR utilise, par exemple, une région donneuse comme S μ et une receveuse comme S γ 3. *In vitro*, chez la souris, la CSR vers γ 3 et γ 2b est stimulée par le LPS, celle vers γ 1 et ϵ par le LPS+IL4, celle vers γ 2a par le LPS+INF- γ et celle vers α par le LPS+TGF- β . De nombreuses étapes successives sont indispensables à sa réalisation : l'activation de marques épigénétiques, une augmentation de la transcription par le recrutement de pol II, la génération de cassures doubles brins induites par AID, l'excision de l'ADN doubles brins entre les 2 régions S sous forme d'un épisode et le rabotage des 2 terminaisons d'ADN. La 3'RR gouverne la CSR (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a). Son absence abroge quasi totalement les CSR *in vitro* vers tous les isotopes à l'exception de γ 1 où une recombinaison résiduelle existe (environ 1%). Cependant à quel moment de la CSR agit la 3'RR? Lors de la transcription des régions S avec le recrutement de la pol II? Lors de la génération des cassures doubles brins avec le recrutement d'AID? Lors des étapes de rabotage de l'ADN? L'objectif de notre étude a été de clarifier le mode d'action de la 3'RR lors de la CSR.

Nous avons choisi la CSR vers γ 1 puisqu'il en reste un switch résiduel et puisque c'est le switch le plus fréquemment effectué *in vivo* chez l'homme. Pour ce faire, les splénocytes de souris sauvages et déficientes pour la 3'RR ont été isolés puis stimulés, *in vitro*, par un cocktail LPS+IL4 connu comme stimulant la CSR vers γ 1.

Principaux résultats

La réparation des cassures doubles brins de l'ADN se fait par la voie du Non Homologous End Joining (NHEJ). En cas d'altération, une voie alternative (AEJ) prend le relais. Un pourcentage important de jonctions directes est observé lors du NHEJ. Un pourcentage important de jonctions par micro-homologies et jonctions complexes est observé lors de l'AEJ. L'analyse après PCR/clonage/séquençage des jonctions $S\mu$ - $S\gamma 1$ a révélé des pourcentages de jonctions directes, par micro-homologies ou complexes identiques entre des souris sauvages et déficientes pour la 3'RR. En conclusion la 3'RR n'influence pas la mécanistique du raboutage final de l'ADN lors du switch.

L'analyse après PCR/clonage/séquençage des jonctions $S\mu$ - $S\gamma 1$ a révélé une baisse des stigmates AID dans les parties $S\mu$ et $S\gamma 1$ chez les souris déficientes pour la 3'RR suggérant une baisse du recrutement d'AID sur ces régions S. L'analyse par LM-PCR des cassures doubles brins montre leur baisse importante surtout dans la région $S\gamma 1$. L'analyse par ChIP confirme la baisse du recrutement d'AID sur la région $S\gamma 1$ chez les souris déficientes pour la 3'RR. En conclusion la 3'RR est importante pour le recrutement d'AID sur la région $S\gamma 1$ et donc pour la génération de cassures doubles brins. La 3'RR semble peu importante pour le recrutement d'AID sur la région donneuse $S\mu$.

L'analyse par PCR quantitative montre que l'absence de la 3'RR diminue la transcription des régions $S\mu$ et $S\gamma 1$ en réponse à une stimulation LPS+IL4. L'analyse par ChIP confirme, chez les souris sans 3'RR, la baisse du recrutement de la pol II et de la pol II pause surtout sur la région $S\gamma 1$. En conclusion la 3'RR est importante pour le recrutement de la pol II sur la région receveuse $S\gamma 1$. La 3'RR semble peu importante pour le recrutement de la pol II sur la région donneuse $S\mu$.

L'analyse par ChIP montre que l'absence de la 3'RR diminue considérablement l'activation de certaines marques épigénétique (H3K9ac, H3K4me3, H3ac) dans la région $S\gamma 1$ en réponse à une stimulation LPS+IL4. Par contre peu d'effets sont notés sur la région $S\mu$.

La baisse du recrutement d'AID, de pol II, de pol II pause et la fluctuation des marques épigénétiques ne sont pas spécifiques à la région $S\gamma 1$ mais sont aussi observées après une

stimulation appropriée sur les régions accepteuses $S\gamma_3$, $S\epsilon$ et $S\gamma_{2b}$. Ceci permet de conclure que les données observées sur la mécanistique de la CSR vers γ_1 sont extrapolables aux autres CSR.

En conclusion, lors de la CSR la 3'RR permet l'activation de marques épigénétiques sur la région S receveuse, l'augmentation de sa transcription via le recrutement de pol II et la génération de cassures doubles brins par le recrutement d'AID. Une fois l'ADN clivé, la 3'RR n'influence pas son raboutage. Enfin, l'action de la 3'RR est principalement ciblée sur la région S receveuse mais pas sur la région $S\mu$ donneuse.

ARTICLE

Received 9 Jan 2015 | Accepted 1 Apr 2015 | Published 11 May 2015

DOI: 10.1038/ncomms8084

Elucidation of *IgH* 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion

Alexis Saintamand^{1,2}, Pauline Rouaud^{1,2}, Faten Saad^{1,2}, Géraldine Rios³, Michel Cogné^{1,2,4} & Yves Denizot^{1,2}

In mature B cells, class switch recombination (CSR) replaces the expressed constant C_{μ} gene with a downstream C_H gene. How the four transcriptional enhancers of the *IgH* 3' regulatory region ($3'RR$) control CSR remains an open question. We have investigated IgG_1 CSR in $3'RR$ -deficient mice. Here we show that the $3'RR$ enhancers target the S_{γ_1} acceptor region (and poorly the S_{μ} donor region) by acting on epigenetic marks, germline transcription, paused RNA Pol II recruitment, R loop formation, AID targeting and double-strand break generation. In contrast, location and diversity of S_{μ} - S_{γ_1} junctions are not affected by deletion of the $3'RR$ enhancers. Thus, the $3'RR$ controls the first steps of CSR by priming the S acceptor region but is not implicated in the choice of the end-joining pathway.

¹Université de Limoges, CRIBL, UMR 7276, Limoges 87000, France. ²CNRS UMR 7276, Limoges 87000, France. ³CNRS et Université de Nice Sophia Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 6097, Sophia Antipolis 06560, France. ⁴Institut Universitaire de France, Paris 87025, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to Y.D. (email: yves.denizot@unilim.fr).

Lymphopoiesis is coupled with programmed accessibility of Ig genes to transcription and to several major transcription-dependent DNA remodelling events^{1,2}. Multiple *cis*-regulatory elements located 5' and 3' of constant (C) genes control B-cell ontogeny (schematised in the Supplementary Fig. 1a). Among 5' elements, the intronic E_{μ} enhancer is reported as a master control element of *V(D)J* recombination^{3,4}. The *IgH* 3' regulatory region (*3'RR*), that encompasses the four transcriptional enhancers *hs3a*, *hs1,2*, *hs3b* and *hs4*, controls μ transcription in mature B-cells⁵, and is the master element controlling conventional class switch recombination (CSR)^{6,7} and somatic hypermutation (SHM)⁸ but without role on *V(D)J* recombination^{9,10}. CSR is a *cis*-deletion or *trans*-recombination process that allows the C_{μ} gene to be replaced in mice with one of the downstream $C_{\gamma 3}$, $C_{\gamma 1}$, $C_{\gamma 2b}$, $C_{\gamma 2a}$, C_{δ} or C_{α} gene. These C genes are preceded by repetitive target sequences for CSR termed switch (S) regions. CSR thus usually joins the most 5' S donor region (S_{μ}) and one of the downstream S acceptor regions ($S_{\gamma 3}$, $S_{\gamma 1}$, $S_{\gamma 2b}$, $S_{\gamma 2a}$, S_{δ} or S_{α}) (schematised in the Supplementary Fig. 1a). CSR is a complex process involving epigenetic histone modifications for transcriptional accessibility, germline transcription, pausing of RNA Pol II, R loop formation, AID recruitment, AID-induced DNA double-strand breaks (DSBs) and their repair by means of end joining^{11–15}. CSR uses the classical non-homologous end joining (C-NHEJ) pathway that predominantly joins ends that lack homology (direct joints). However in C-NHEJ-deficient conditions, an alternative end-joining (A-EJ) pathway is left, which predominantly joins ends by using short homologies found in the proximity of broken ends (microhomology-based repair)^{11,13}. The *3'RR* is crucial for conventional CSR^{6,7} but its mechanistic contribution remains enigmatic. The main conclusions drawn from knock-out mice are that the *3'RR* plays a major role in promoting synapsis between S regions targeted by CSR¹⁶, and plays a partial role in promoting germline transcription of S regions initiating at I promoters^{6,17,18}. Whether the chromatin structure of S regions or the process of their repair after CSR are also dependent from the *3'RR* is currently unknown. The IgG₁ class displays a special status with regard to *3'RR* mutations, since it was the only Ig class whose expression was preserved after the first reported partial *3'RR* alterations or truncations^{17,18}. Even after complete deletion of the *3'RR*, while CSR to all other class-switched Ig was nearly abolished, residual low-level CSR to IgG₁ was maintained⁶. We thus now take advantage of this preserved IgG₁ switching in *3'RR*-deficient mice to explore whether it reveals additional *3'RR*-dependent mechanistic features during CSR. We report here that, even if some IgG₁ CSR still occurs, the *3'RR* defect impacts the $S_{\gamma 1}$ acceptor region (rather than the donor S_{μ} region) in multiple aspects that precede CSR. This includes alterations of epigenetic marks, germline transcription, R loop formation, paused RNA Pol II, AID targeting, and generation of DSBs. In contrast, once DSBs are generated, their repair is completely normal in *3'RR*-deficient animals. Altogether, this study precisely maps the activity of the *3'RR* at the early phases of CSR, until the generation of DSBs, and shows that it has no contribution in the process of DNA repair between synapsed broken ends.

Results

Deletion of the *3'RR* impairs C_{μ} - $C_{\gamma 1}$ CSR. The *IgH* $C_{\gamma 1}$ gene has long been claimed to carry some specific regulatory elements and notably an upstream $I_{\gamma 1}$ enhancer¹⁹. While the *IgH* *3'RR* is the major *cis*-element promoting synapsis between S regions and recruiting AID to the *IgH* locus, several previous descriptions of *3'RR* disruptions in the mouse indicated some persistence of CSR to $C_{\gamma 1}$ ^{6,16–18}, and we thus decided to analyse in details the

molecular features of this residual *3'RR*-independent CSR. We confirmed that splenocytes from *3'RR*-deficient mice showed a dramatically reduced ability to secrete IgG₁ *in vitro* in response to LPS + IL4 (Fig. 1a), which likely results from both decreased CSR in B-cells and the known defect of Ig secretion in plasma cells from such mice⁶. Parallel flow cytometry experiments evaluating membrane IgG₁ expression in B-cells confirmed that the deletion of the *3'RR* did not abolish but reduced by >90% *in vitro* IgG₁ CSR (Fig. 1b). This strong but incomplete defect was also indicated by Southern blot experiments (full blots are included in the Supplementary Fig. 2) evaluating hybrid S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ junctions in *3'RR*-deficient mice (Fig. 1c). Junctions were first amplified using a touch-down PCR followed with a nested PCR and revealed after hybridization with a ³²P-labelled probe. DNA from AID-deficient B-cells (devoid of any CSR) was used as germline control DNA. The IgG₁ CSR defect was also evidenced by real-time-PCR evaluation of post-switch IgG₁ transcripts (Fig. 1d). Finally, serum IgG₁ levels paralleled results obtained after *in vitro* stimulation (Fig. 1e) and confirmed that, altogether, the deletion of the *3'RR* strongly but only partially blocks IgG₁ CSR.

Intra S_{μ} deletion in *3'RR*-deficient B cells. It could be argued that the few S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ joints found in *3'RR*-deficient B-cells mask a defect in end-joining that would result in aborted CSR (and, therefore, no joint to analyse). To test this hypothesis we analysed intra S_{μ} deletions that frequently happen in mature B-cells during CSR²⁰. By using a PCR amplifying the whole S_{μ} region followed by Southern blotting, we checked that B-cell stimulation yielded fragments of different lengths corresponding to partial deletion of S_{μ} during CSR. A similar pattern was found for both *wt* mice and *3'RR*-deficient mice (Fig. 2a), eliminating any global defect in end joining in *3'RR*-deficient mice and also showing that S_{μ} is efficiently targeted by the CSR machinery in stimulated *3'RR*-deficient B cells.

Analysis of S-junctions in residual C_{μ} - $C_{\gamma 1}$ CSR. To analyse S-junctions, the amplified PCR S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ fragments were cloned, sequenced and aligned with the germline S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ sequences (Fig. 2b and Supplementary Table 2). The deletion of the *3'RR* had no effect on the structure of S junctions with regards to the relative amounts of direct joints, the frequency and length of microhomologies and the frequency of DNA insertion at the junction and of complex junctions. This suggests that beyond the AID targeting, DSBs and S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ synapsis steps, the late CSR resolution step is completely *3'RR*-independent and remains unbiased in the choice between either the C-NHEJ or the A-EJ pathways for repairing broken DNA ends. We then analysed whether the absence of the *3'RR* enhancers affected the position of the S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ breakpoints, which might indicate changes in the targeting or the synapsis of these regions. S_{μ} breakpoints appeared unaltered, with the vast majority of them located in the 5' part (0–600 bp) of S_{μ} (Fig. 3): 97% (33/34) and 91% (21/23) for *wt* and *3'RR*-deficient mice, respectively (Fig. 2c). The *3'RR* deletion by contrast affected the location of $S_{\gamma 1}$ breakpoints since 94% (32/34) of breaks cloned from *wt* cells were located in the 3' part (0–480 bp) of $S_{\gamma 1}$, while only 65% (15/23) were included in this segment in *3'RR*-deficient cells. The pattern of AID targeting that initiates the formation of DSBs is thus *3'RR*-independent within S_{μ} but partially *3'RR*-dependent within $S_{\gamma 1}$. The increased representation of DNA breaks in the 3' part of $S_{\gamma 1}$ (> 480 bp) was not linked to the presence of microhomologous sequences: 2/4 and 6/11 direct junctions for *wt* and *3'RR*-deficient mice, respectively. We conclude that the recombination of S_{μ} with $S_{\gamma 1}$ in *3'RR*-deficient B cells does not depend on the presence of microhomologous sequences and that the *3'RR* is not involved in

the resolution of CSR nor in the choice between C-NHEJ and A-EJ pathways.

Influence of the 3'RR on AID recruitment during C_{μ} - $C_{\gamma 1}$ CSR.

Before the occurrence of DSBs, CSR is initiated by AID and the initial outcome of AID targeting can be the occurrence of base substitutions following cytidine deamination^{12,14,15,21}. To gain an insight into this initial targeting, we analysed mutations in *S* regions and observed that both the S_{μ} donor and $S_{\gamma 1}$ acceptor regions are less targeted by AID during IgG₁ CSR in 3'RR-deficient mice as compared with *wt* animals (Fig. 2d). This showed up with mutation rates falling at 55 and 30% of their *wt* levels for S_{μ} and $S_{\gamma 1}$, respectively. This observation suggests a lower recruitment of AID in *S* regions in 3'RR-deficient animals, which is indeed also indicated by ChIP experiments showing a significantly decreased AID loading at both the S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ regions (after 2 days LPS + IL4 *in vitro* stimulation) in 3'RR-deficient mice compared with *wt* mice (Fig. 3a). A crucial step of CSR is the processing of AID lesions into DSBs, as a specific feature of *S* regions^{14,15}. Ligation-mediated PCR (LM-PCR, see Supplementary Fig. 1b) was used to highlight DSBs in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$. Thus, extracted genomic DNA was treated with T4 DNA

polymerase yielding blunt DNA ends, then ligated with T4 DNA ligase with a double-strand anchor linker²². DSBs were detected by semi-nested PCR (primers targeting the linker sequence and a primer specific to S_{μ} or $S_{\gamma 1}$) followed by hybridization with a ³²P-labelled probe. LM-PCR highlighted a small reduction of DSBs in S_{μ} but a dramatic one in $S_{\gamma 1}$ in 3'RR-deficient mice compared with *wt* mice (Fig. 3b; full blots are included in the Supplementary Fig. 2). Impaired induction of DNA lesions during CSR was suggested in patients to influence end joining²³. It is obviously not the case in 3'RR-deficient mice.

The substrate for AID is single-strand DNA (ssDNA) which is generated by germline transcription of *S* regions and Ig constant regions on both the transcribed and non-transcribed strands. Real-time PCR analysis only indicated a partial reduction of I_{μ} - C_{μ} and $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ transcripts in 3'RR-deficient mice (Fig. 3c), as previously suggested by semi-quantitative PCR⁶. This shows that the 3'RR does not promote CSR only by fostering germline transcription. Transcription through *S* regions generates R loops in which the RNA stably hybridizes to the template strands, displacing the non-template strand as ssDNA^{14,15}. For R loops experiments (see Supplementary Fig. 1c), extracted DNA was treated with bisulfite. Thus, only C located on ssDNA patches (that is, in R loops) could be converted in U. Bisulfite-treated DNA was

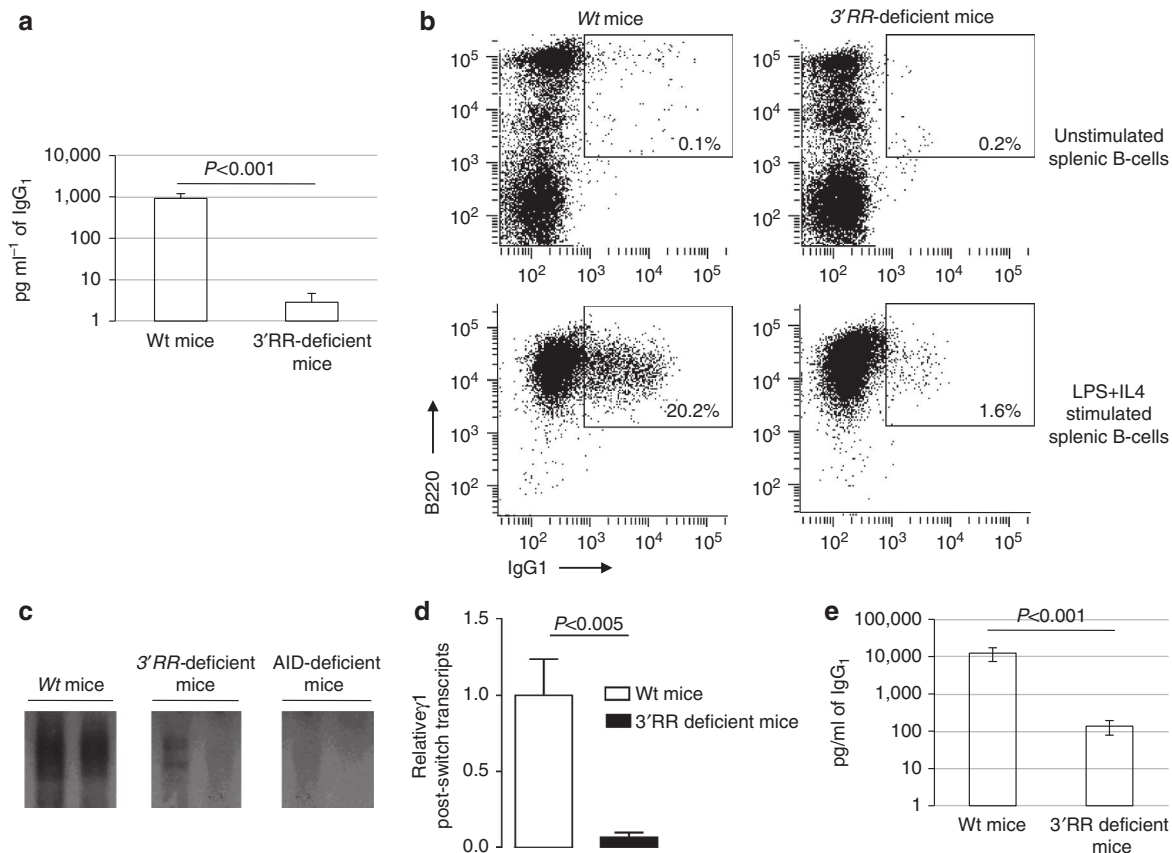


Figure 1 | Influence of the 3'RR deletion on IgG₁ CSR and secretion. (a) ELISA analysis of IgG₁ in supernatants of 3 days LPS + IL4 cultured B-cells. Data are the mean ± s.e.m. of 8 experiments with 1 mouse (Mann-Whitney *U*-test for significance). (b) B splenocytes of *wt* and 3'RR-deficient mice were isolated (upper panel) and stimulated with LPS + IL-4 for 3 days (lower panel). Cells were labelled with anti-B220-APC antibodies and anti-IgG₁-FITC antibodies. Percentage of B220⁺ IgG₁⁺ cells is reported in the gate. One representative experiment out of four (one mouse per experiment) is shown. (c) Southern blot analysis of S_{μ} - $C_{\gamma 1}$ junctions amplified by PCR and hybridized with a 5' $C_{\gamma 1}$ probe from 3 days LPS + IL4 stimulated splenocytes from *wt*, 3'RR-deficient mice and AID-deficient mice. DNA from AID-deficient B-cells (devoid of any CSR) was used as germline control DNA. Fifty nanograms and 20 ng of DNA were used for PCR experiments, respectively. One representative experiment out of four (one mouse per experiment) is shown. (d) Real-time PCR analysis of post switched IgG₁ transcripts in 3 days LPS + IL4 cultured B cells. Values were normalized to *Gapdh* transcripts. Data are the mean ± s.e.m. of 8 to 11 independent experiments with one mouse (Mann-Whitney *U*-test for significance). (e) ELISA analysis of IgG₁ in 12-week-old mice sera. Data are the mean ± s.e.m. of 8 mice for each genotype (Mann-Whitney *U*-test for significance).

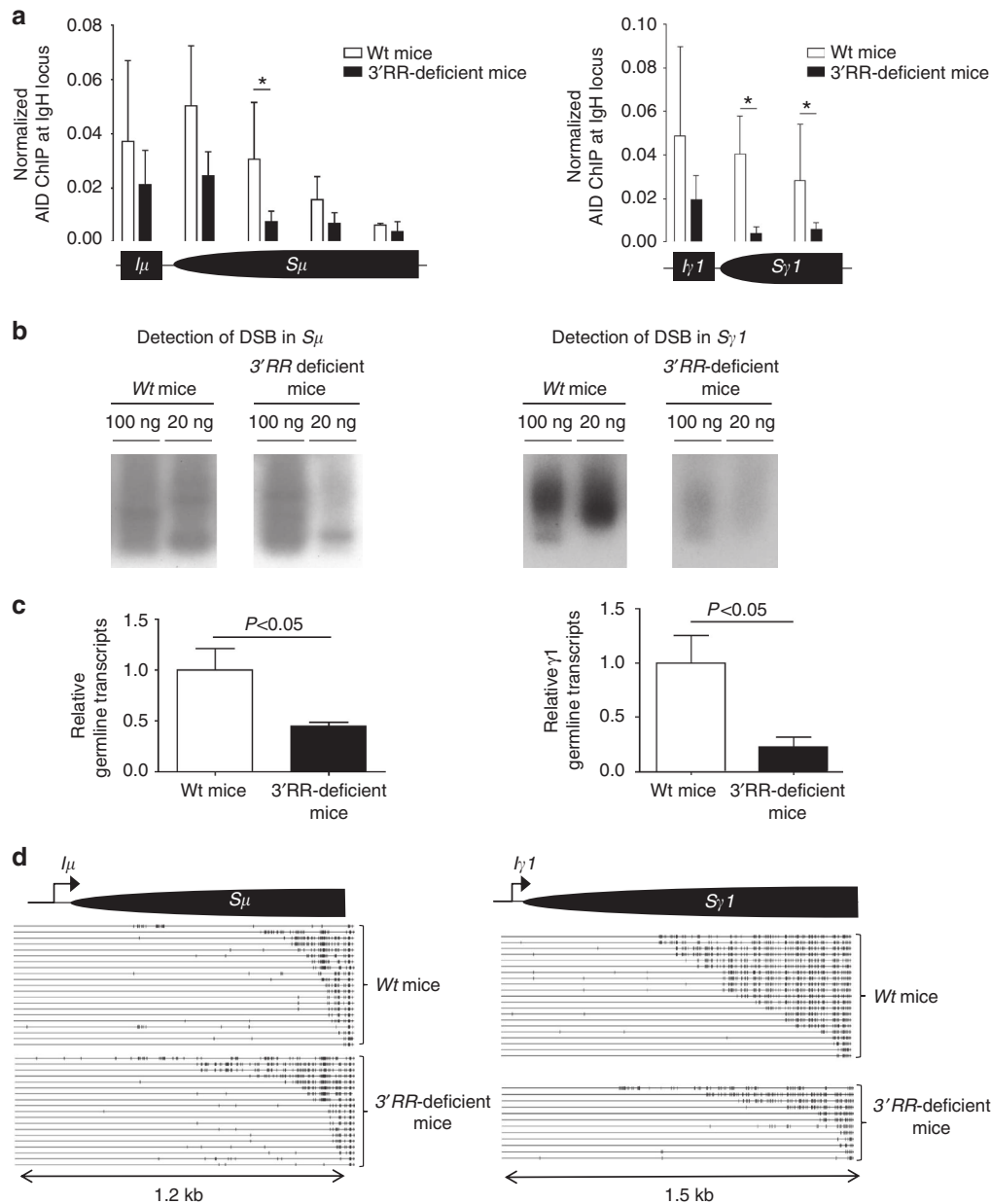


Figure 3 | AID and CSR in 3'RR-deficient mice. (a) AID ChIP assays were performed with splenic B cells from 3'RR-deficient and wt mice. Cells were stimulated with LPS + IL-4 for 2 days. Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to the total input DNA. Data are the mean ± s.e.m. of six independent experiments with two mice. * $P < 0.05$ (Mann-Whitney U -test). (b) Ligation-mediated PCR. Splenic B cells were stimulated with LPS + IL-4 for 2 days. Genomic DNA from wt and 3'RR-deficient mice were treated with T4 DNA polymerase (T4 Pol), ligated with T4 DNA ligase and probed for double-stranded breaks in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ by semi-nested PCR. Reactions with 100 and 20 ng of DNA are shown. Data are representative of four experiments each with one mouse per genotype. (c) Real-time PCR analysis of I_{μ} - C_{μ} and $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ transcripts in 3 days LPS + IL4 cultured B cells. Values were normalized to *Gapdh* transcripts. Data are the mean ± s.e.m. of 8 to 11 independent experiments with 1 mouse (Mann-Whitney U -test for significance). (d) Detection of R loops in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$. Cells were stimulated with LPS + IL-4 for 2 days. DNA was extracted, bisulfited, treated and sequenced to detect single strand in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ regions. Each long line represents an independent sequence. The small vertical bars on each line indicate a C on the sequence converted to a T, indicating that the sequence was in a single-strand conformation. Pooled results from six independent experiments each with one mouse per genotype.

implicated in the targeting of the CSR machinery (including AID and RNA Pol II) to S regions primed for CSR²⁵⁻²⁸. Altogether with DNA transcription, this remodelling of chromatin in S regions constitutes a hallmark of the accessibility to CSR factors. As shown in Fig. 5, except for acetylated lysine 9 in histone H3 (H3K9ac), levels of H3 acetylation (H3ac), H4 acetylation (H4ac) and trimethylated lysine 4 in histone H3 (H3K4me3) were not affected by the deletion of 3'RR enhancers in the I_{μ} - S_{μ} - C_{μ} region

during IgG₁ CSR induced by LPS + IL4 stimulation. In contrast, H3ac, H3K4me3 and H3K9ac were dramatically lowered in the $P_{\gamma 1}$ - $I_{\gamma 1}$ - $S_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ region (while H4ac was unchanged) (Fig. 5). Interestingly, the H3K4me3 and H3K9ac marks are required for efficient CSR and further AID recruitment^{27,28}. As reported above for AID and RNA Pol II, this study of the epigenetic marks required for CSR shows that the 3'RR mostly acts on accessibility of the acceptor $S_{\gamma 1}$ rather than the donor S_{μ} region during S_{μ} - $S_{\gamma 1}$

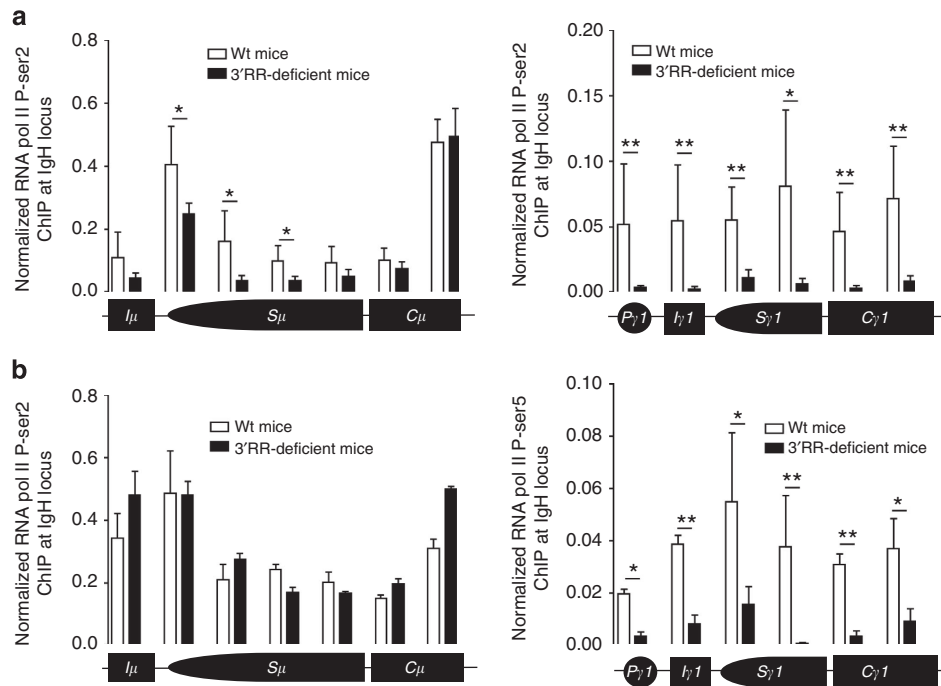


Figure 4 | RNA Pol II during CSR in 3'RR-deficient mice. ChIP assays were performed with splenic B cells from 3'RR-deficient and wt mice. Cells were stimulated with LPS + IL-4 for 2 days. RNA Pol II P-ser 2 (a). RNA Pol II P-ser 5 (b). Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to the total input DNA. Data are the mean \pm s.e.m. of three experiments with two mice for each genotype. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ (Mann-Whitney U -test).

CSR. This suggests that a reduction in histone acetylation is the most upstream defect after 3'RR deletion. The levels of histone acetylation are reversibly controlled by the balanced counteraction of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs). Although HDAC inhibitor treatment have been used to reverse the heterochromatin silencing of *Ig* minigenes²⁹, these drugs are potent inhibitors of the 3'RR in B cells. Thus, treatment of B cells with the HDAC inhibitor trichostatin A represses *IgH* gene transcription, CSR and Ig synthesis in B splenocytes³⁰. We confirmed that IgG₁ CSR was strongly decreased in activated B-cells treated with trichostatin A, valproic acid or SAHA; three HDAC inhibitors (Supplementary Fig. 3). Therefore, ChIP assays of epigenetic marks should be preferred over HDAC inhibitor treatments to study CSR in the *IgH* locus. How 3' RR recruits histone acetyltransferases (if any) remains an open question. Studies suggested that levels of histone acetylation in the *IgH* locus are predominantly controlled by HDACs, but that the various HDACs might have opposite effects. ChIP experiments reported HDAC1 recruitment by the central *hs1,2* enhancer of the 3'RR³⁰ and *IgH* transcription decreased in HDAC1-deficient chicken B cells³¹. By contrast, HDAC2 inhibited transcription and recombinational activities at the *IgH* locus³¹.

Effect of the 3'RR on $S_{\gamma_3/2b/e}$ acceptor regions during CSR.

Other CSR-related S acceptor regions are located all along the *IgH* locus (Supplementary Fig. 1a). As previously reported the 3'RR not only interacts with S_{γ_1} but also other S regions including S_{γ_3} , S_{γ_2b} and S_e ¹⁶. We evaluated what happens for S_{γ_3} , S_{γ_2b} and S_e after appropriate *in vitro* CSR stimulations. Similarly to S_{γ_1} , we found a dramatic decrease of AID, pol II, paused pol II recruitments and H3K9ac/H3K4me3 levels in S_{γ_3} , S_{γ_2b} and S_e in B cells of 3'RR-deficient mice compared with wt mice (Fig. 6). Taken altogether, these results reveal a similar mechanistic role of the 3'RR on S acceptor regions during CSR and confirm its key role on Ig production^{6,7}.

Transcriptional profiles of 3'RR-deficient B cells. Transcriptional profiles evidenced differences between splenic B cells of 3'RR-deficient and wt mice (Supplementary Table 3). Several genes implicated in interferon-related functions, inflammation, cell trafficking and B-cell homing were affected in resting B splenocytes of 3'RR-deficient mice (accession number GSE45230, Gene Expression Omnibus database). Since the *cis*-regulatory element 3'RR is not expected to modulate genes outside the *IgH* locus, these differences rather involve the recently reported decreased accumulation of marginal zone B cells in 3'RR-deficient mice³². Accordingly, functions of the affected genes fit well with roles of marginal zone B cells in infection, inflammation and immunity. After 3 days LPS + IL4 stimulation, some genes were differentially affected (Supplementary Table 4). In relations with the marked influence of the 3'RR on histone modifications during CSR, inhibitors of histone acetyltransferase (*Anp32a*, *Tle1*), histone demethylase (*Eco1*) and histone deacetylase (*Cbl-b*) are overexpressed in stimulated 3'RR-deficient splenocytes as compared with wt cells. In agreement with lower frequency of DSB, genes implicated in DSB detection and reparation were either downregulated (*Atm*, *Lig4*) or upregulated (*Parp-3*, *H2afx*, *Ino80* and *Esco1*). While a direct effect of the *cis*-regulatory 3'RR on genes located outside of the *IgH* locus is unlikely, gene variations rather appear related to incomplete CSR. Strikingly, RNA sequencing analysis did not identify similar gene variation in LPS + IL4 stimulated AID-deficient splenic B cells (thus lacking any AID-mediated DNA lesions) compared with wt³². This suggests that genes implicated in CSR repair are highly regulated and only transiently expressed in wt cells in response to DSBs in S_{μ} and S_{γ_1} . AID-deficient and 3'RR-deficient mice carry CSR defect by completely different mechanisms, with, respectively, a lack of DSBs (both on S_{μ} and S_{γ_1}) or a biased occurrence of DSBs (normally targeting S_{μ} but not S_{γ_1}). Gene variations in 3'RR-deficient mice are thus likely not reflecting simply the lack of CSR *per se*, but rather the status of cells poised for CSR, some of them displaying DSBs in S_{μ} , and unable to

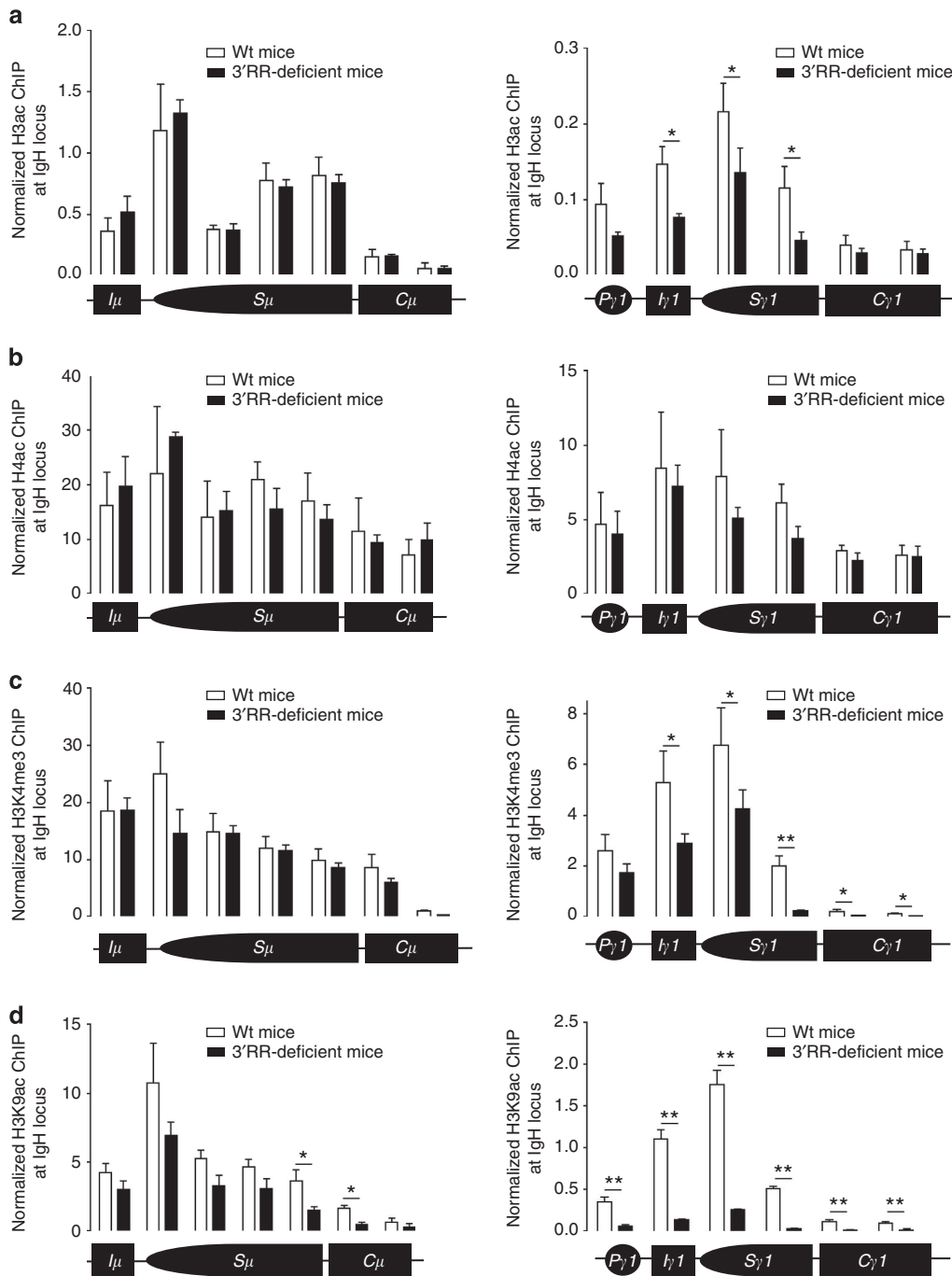


Figure 5 | Epigenetic marks (H3ac, H4ac, H3K4me3 and H3K9ac) in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ during IgG₁ CSR in 3'RR-deficient mice. ChIP assays were performed with splenic B-cells from 3'RR-deficient and wt mice. Cells were stimulated with LPS + IL-4 for 2 days. Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to the total input DNA. Data are the mean \pm s.e.m. of three (for 3'RR-deficient mice) and six (for wt mice) independent experiments with two mice (Mann-Whitney *U*-test for significance).

efficiently repair these DSBs through long-range recombination with a distant acceptor region. In conclusion, we favour the hypothesis that persistent DNA damage in S_{μ} would increase the expression of genes involved in DNA-repair in 3'RR-deficient B cells.

miRNA analysis in 3'RR-deficient B cells. If the hypothesis that persistent DNA damages in S_{μ} affect gene expression profiles in 3'RR-deficient B-cells is correct, variation might also be evidenced

at the miRNA level. To further explore how the 3'RR deletion impacts the activation of B cells during CSR, we measured the expression of a panel of 84 miRNA known to be involved in B-cell development and activation. We investigated miRNA in LPS + IL4 stimulated AID-deficient splenic B-cells and found 18 downregulated miRNA and 2 up-regulated miRNA compared with wt mice (Supplementary Fig. 4). In contrast, 0 miRNA were downregulated and 11 miRNA were up-regulated in 3'RR-deficient mice (Supplementary Fig. 4) compared with wt mice. Up-regulated miRNA in 3'RR-deficient mice have hundreds of

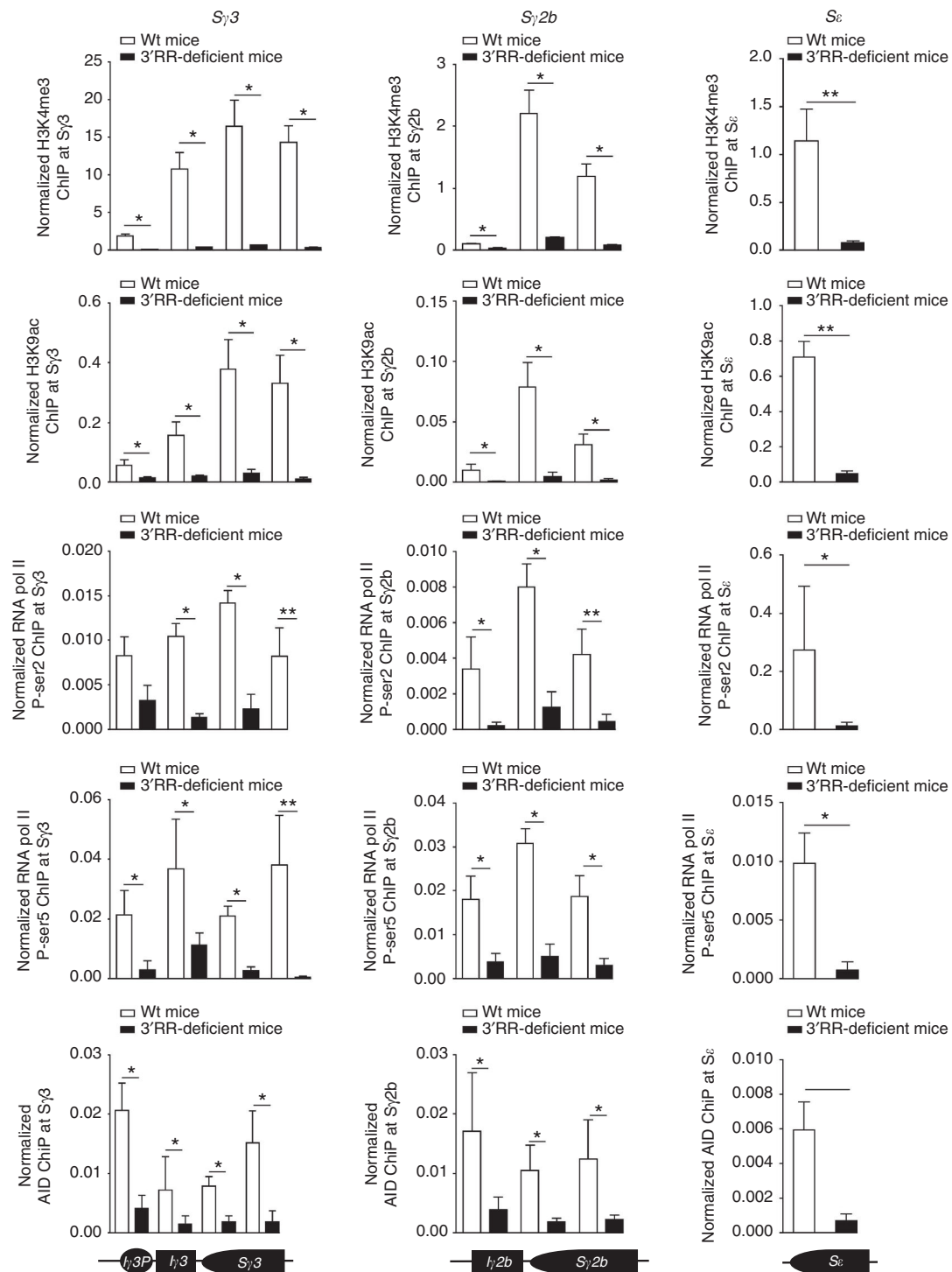


Figure 6 | Epigenetic marks, AID and pol II recruitments in $S_{\gamma 3}$, $S_{\gamma 2b}$ and S_{ϵ} during CSR in 3'RR-deficient mice. ChIP assays were performed with splenic B-cells from 3'RR-deficient and wt mice. Cells were stimulated with LPS \pm IL4 for 2 days for $S_{\gamma 3}$ and $S_{\gamma 2b}$. Cells were stimulated with LPS \pm IL4 for 2 days for S_{ϵ} . Background signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. Values were normalized to the total input DNA. Data are the mean \pm s.e.m. of three to six independent experiments with two mice for each genotype (Mann-Whitney U -test for significance).

predicted targets, including *Atm*, *Ssb1*, *Ino80*, *Exo1*, *Smarcd1*, *Dclre1b* and *Atmin*, which have been shown to regulate DSB resection and homologous recombination^{33–38}, and histone modifying enzymes *Hdac9* and *Esco1*. Interestingly, HDAC9 is required for DSB reparation by homologous recombination³⁹, and its deletion affects antibody secretion⁴⁰. Altogether, this might inhibit A-EJ, by downregulating gene implicated in micro-

homology based DSB repair (*Atm*, *Atmin*, *Ssb1* and *Hdac9*), and to favour NHEJ by upregulating *Parp-3*⁴¹, and *Esco1*, which influence the interaction between cohesion complex and DNA required for efficient NHEJ^{42,43}. A-EJ has been shown to facilitate oncogenic translocations to *IgH* locus and to be less restricted to intrachromosomal joining than NHEJ²⁰. This might be a protective mechanism limiting oncogenic translation to S_{μ} , in

which DSBs appear quite frequently while there are few in downstream acceptor regions. In parallel, LM-PCR did not show accumulation of DSBs in S_{μ} in $3'RR$ -deficient mice, despite the lack of complete CSR, suggesting that intraswitch junctions, which occur normally, are the usual mean that can be used by B cells to resolve abortive CSR issues. Finally, taken altogether results of miRNA analysis reinforce the hypothesis that the prolonged presence of DNA damage in S_{μ} would affect gene expression in $3'RR$ -deficient B-cells rather than the hypothetical loss of $3'RR$ trans-interactions with these genes in the nuclei.

Discussion

In the present study we show that the $3'RR$ promotes IgG₁ CSR not only by fostering germline transcription but also histone modifications (especially H3K4me3 and H3K9ac), formation of R loops, loading and pausing of RNA Pol II, AID recruitment and finally generation of DSBs in the $S_{\gamma 1}$ region, indicating that the $3'RR$ enhancers act as soon as these initial steps of the CSR process. In contrast to the $S_{\gamma 1}$ region, S_{μ} appears as more or less $3'RR$ -independent, suggesting that other regulatory elements are required for its CSR formatting. In a previous study Wuerffel *et al.*¹⁶ demonstrated with 3C assay and *hs3b/hs4*-deficient mice that the $3'RR$ interacted with the $S_{\gamma 1}$ region whereas S_{μ} was closely associated with E_{μ} . Moreover the non conventional IgD CSR (between S_{μ} and a S_{δ} -like region) occurs independently of the $3'RR$ ⁷. Our study thus validates at the DNA level the hypothesis that during CSR, the $3'RR$ especially targets the S acceptor region rather than the S_{μ} donor region. Although the E_{μ} enhancer could be proposed to support S_{μ} accessibility when the $3'RR$ is deleted, it is noteworthy that it is not itself mandatory for CSR³. The $3'RR$ -independence of S_{μ} is also somehow striking comparing with the known $3'RR$ -dependence of pV_H promoters and rearranged *VDJ* regions with regards to AID recruitment and SHM⁸. Finally, that $S_{\gamma 1}$ accessibility to CSR is only partly altered in the absence of the $3'RR$ allowed to study residual CSR junctions, showing that their molecular features were indiscernible from those of *wt* junctions studied in parallel. This suggests that the $3'RR$ contribution to CSR is restricted to the early steps of accessibility, AID recruitment and synapsis of target regions, but with no role in the repair and final resolution of CSR. Our analysis also showed that B-cells are able to transiently modify their transcriptome and miRNome during CSR to foster rapid and precise repair of DSBs, thus diminishing the risk of potentially oncogenic translocation.

Methods

Mice. The 129 *wt* mice (from Charles Rivers Laboratories, France) and $3'RR$ -deficient mice (from UMR CNRS 7276, Limoges, France; in a 129 background) were used. Mice of 2–3 months old (male and female) were investigated. Our research has been approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Éthique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and carried according to the European guidelines for animal experimentation.

Spleen cell cultures for CSR. Single-cell suspensions of CD43[−] spleen cells were cultured 3 days at 1×10^6 cells ml^{−1} in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum, $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ LPS with or without 20 ng ml^{-1} IL-4 (PeproTech, Rocky Hill, NJ)⁶.

Cell cytometry analysis. Single-cell suspensions of cultured B cells were incubated with anti-B220-SpectralRed (PC5)-labelled antibodies (Biolegends, ref:103210, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ final) and anti-IgG₁-fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labelled antibodies (Southern Biotechnologies, ref:107002, $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ final) and analysed on a Fortessa LSR2 (Beckton-Dickinson)^{44,45}.

Cloning and sequencing of S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ junctions. Three days *in vitro* stimulated splenocytes were harvested and DNA was extracted for investigation of S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ junctions. Junctions were studied using a touch-down PCR followed with a nested PCR using the following parameters: Touch-down PCR: Forward primer 5'-AGA GACCTGCAGTTGAG GCC-3' and backward primer 5-AGGATGTCCACCCT

CACCCAGGC -3' (1 cycle, 98 °C for 30 s; 2 cycles, 98 °C for 10 s, 69 °C for 30 s, 72 °C for 90 s; 2 cycles, 98 °C for 10 s, 67 °C for 30 s, 72 °C for 90 s; 2 cycles, 98 °C for 10 s, 65 °C for 30 s, 72 °C for 90 s; 25 cycles, 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 90 s 1 cycle, 72 °C for 7 min). Nested PCR: Forward primer 5'-CCAGCCACA GTAATGACCCAG-3' and backward primer 5'-TTGTTATCCCCCATCTCTGTC ACCT-3' (1 cycle, 98 °C for 30 s; 35 cycles, 98 °C for 10 s, 65 °C for 30 s, 72 °C for 90 s; 1 cycle, 72 °C for 7 min). The PCR products were cloned into the Zero Blunt Topo PCR cloning (Invitrogen). Plasmids were isolated using the NucleoSpin kit (Macherey-Nagel Eurl) and sequenced using an automated laser fluorescent ANA ABI-PRISM sequencer (Perkin-Elmer).

Southern blotting of C_{μ} - $C_{\gamma 1}$ junctions. S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ junctions amplified as previously described were subjected to 1% agarose gel electrophoresis, and transferred overnight on a positively charged Nylon hybridization membrane (MP Biomedicals). A 507 bp probe was amplified using the following primers: Forward primer 5'-GGCAGATTAGAATGAATGCACCTG-3', backward primer 5'-TTGTTATCCC CATCTCTGTCACCT and ³²P-labelled using Amersham Rediprime II Random Prime Labelling System (GE Healthcare) according to the manufacturer protocol. The membranes were saturated with salmon sperm DNA (4 mg ml^{-1}) and incubated with the labelled probe overnight at 42 °C. Membrane were then washed for 15 minutes twice at room temperature in 2X SSC buffer + 0.1% SDS, then 5 minutes at 52 °C in 0.1X SSC + 0.5% SDS. Membranes were autoradiographed on X50 hyperfilm MP (GE Healthcare) at −80 °C for 6 hours and revealed using Carestream Kodak autoradiography GBX developer and fixer (Sigma Aldrich).

IgG₁ Elisa assays. Blood samples were recovered from 12 weeks-old transgenic mice and *wt* controls. Serum samples were recovered by centrifugation and stored at −20 °C until used. B splenocytes were cultured for 3 days with LPS + IL4. At day 3, 1×10^6 cells were cultured for 24 h in growth medium without LPS + IL4. Culture supernatants were recovered and stored at −20 °C until used. Culture supernatants and sera were analysed for the presence of IgG₁ by ELISA^{6,44,45}. ELISA assays were performed in polycarbonate 96 multiwell plates, coated overnight at 4 °C ($100 \mu\text{l}$ per well) with $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ IgG₁ (Cell Lab, ref:731863) in 0.05 M Na₂CO₃ buffer. After three successive washing steps in phosphate-buffered saline (PBS) buffer, a blocking step was performed (3% bovine serum albumin (BSA) in PBS) for 30 min at 37 °C. After three washing steps, $50 \mu\text{l}$ of sera (first diluted to 1:50), supernatants or standard IgG₁ (Beckman Coulter, ref:731907, 1 mg ml^{-1} , first diluted to 1:50) were diluted into successive wells in 1% BSA/PBS buffer and incubated for 2 h at 37 °C. After three washing steps, $100 \mu\text{l}$ per well of $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ AP-conjugated goat anti-mouse IgG₁ (Southern Biotechnologies, ref: 1070041) were incubated for 2 h at 37 °C. After washing, AP activity was assayed on 1 mg ml^{-1} AP substrate, and blocked with addition of 3 M NaOH. Optic density was then measured at 400 nm.

Quantitative PCR of $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ and I_{μ} - $C_{\gamma 1}$ transcripts. Two days *in vitro* stimulated splenocytes were collected and RNA was extracted for investigation of $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ transcripts. RNA and cDNA were prepared using standard techniques. Quantitative PCR was performed using power SYBR green (Applied Biosystems): $I_{\gamma 1}$ forward primer: 5'-GGCCCTCC AGATCTTTGAG-3'; $C_{\gamma 1}$ reverse primer: 5'-ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCA-3'. I_{μ} forward primer: 5'-ACCTGGGAAT GTATGGTTGTGGCTT-3'. C_{μ} reverse primer 5'-TCTGAACCTCAAGGATGC TCTTG-3'. $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$ and I_{μ} - $C_{\gamma 1}$ transcripts were normalized to *Gapdh* transcripts (reference Mm99999915-g1).

ChIP experiments. Splenic B cells were purified by CD43 magnetic cell sorting from nonimmunized mice and cultured *in vitro* with $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ LPS with or without 20 ng ml^{-1} IL4 for 2 days. ChIP experiments were done essentially as previously described⁸. In brief, 3×10^7 stimulated B cells were cross-linked at 37 °C for 15 min in 15 ml PBS with 1% formaldehyde. The reaction was quenched with 0.125 M glycine. After lysis, chromatin was sonicated to 0.5–1 kb using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher Scientific). After 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 2 h at 4 °C with $100 \mu\text{l}$ of 50% protein A/G slurry (0.2 mg ml^{-1} sheared salmon sperm DNA, 0.5 mg ml^{-1} BSA, and 50% protein A/G; Sigma). $0.3 - 0.5 \times 10^6$ cell equivalents were saved as input, and $3 - 5 \times 10^6$ cell equivalents were incubated overnight with specific 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 0.2% SDS and chromatin was phenol/chloroform extracted. PCR primers used for Q-PCR are detailed in the Supplementary Table 2. The following antibodies were used: anti-H3K4me3 (Millipore, 07-473), anti-H3K9ac (Millipore, 06-942), anti-H3ac (Millipore, 06-599), anti-H4ac (Millipore, 06-866), anti-RNA Pol II P-ser2 (Abcam, ab5095) and anti-RNA Pol II P-ser 5 (Abcam, ab5131). Anti-AID antibodies were kindly provided by Dr P. Gearhart.

Ligation-mediated PCR. LM-PCR was used to highlight the presence of DSBs in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$. LM-PCR experiments were schematized in the Supplementary Fig. 1b. Splenocytes were stimulated with LPS + IL4 for 2 days. Genomic DNA was

extracted and treated with T4 DNA polymerase which trims back 3' overhangs while 'filling in' 3'-recessed ends, thereby yielding blunt 5'-phosphorylated DNA ends. DNA was then ligated with T4 DNA ligase with the double-strand anchor linker BW²². DSBs were detected by semi-nested LM-PCR using BW1 primer targeting the BW linker sequence and a primer specific to S_μ or S_{γ1}. DSB were studied after hybridization with ³²P-labelled probes located on S_μ and S_{γ1}, respectively.

R loops. R loops were analysed using bisulfite conversion of single-strand DNA⁴⁶. R loop experiments were schematized in the Supplementary Fig. 1c. Splenic B-cells from *wt* and 3'RR-deficient mice were stimulated *in vitro* with 5 μg ml⁻¹ LPS and 20 ng ml⁻¹ IL4 for 2 days. DNA was extracted and purified using Phase Lock gel (5 Prime), and digested with EcoRI (New England Biolabs) for 8 h. DNA was bisulfite converted using the EpiMark Bisulfite Conversion Kit (New England Biolabs). Five micrograms were incubated in Bisulfite mix at 37 °C for 15 h. Converted DNA was then desulfonated and purified according to the manufacturer protocol, and resuspended in 60 μl H₂O. We made touch-down PCR reaction (One Taq Hot start DNA polymerase, NEB) using a forward native primer and a reverse primer designed to match the converted sequence. For S_μ: forward primer 5'-GCTGCTCTTAAAGCTTGT AAACGTGTTCT-3' and backward primer 5-CTCACCC CATCTCAACTACTCCAAAA TAA-3'; (1 cycle, 94 °C for 30 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 56 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 55 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 54 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 25 cycles, 94 °C for 15 s, 53 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 1 cycle, 68 °C for 5 min). For S_{γ1}: forward primer 5'-TTCCAGATCTTTGAGTCATCCTATC-3' and backward primer 5-CACCCATCAACTCTA ACCATATAATATTTACTC-3'; (1 cycle, 94 °C for 30 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 52 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 51 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 3 cycles, 94 °C for 15 s, 50 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 25 cycles, 94 °C for 15 s, 49 °C for 30 s, 68 °C for 120 s; 1 cycle, 68 °C for 5 min). The PCR products were cloned and sequenced as described for S_μ-S_{γ1} junctions.

Transcriptome analysis. mRNA was extracted from B220⁺ splenic B-cells of 3'RR-deficient mice and *wt* mice before and after 3 days LPS + IL4 stimulation. Microarray experiments were done in 'Nice - Sophia Antipolis Microarray Facility' (France). Statistical analysis was made with the Biocductor open source software, particularly its Limma package^{47–50}. The microarray data presented in this article have been submitted to the Gene Expression Omnibus database (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) under the accession numbers GSE45230.

miRNA analysis. Splenic B cells from *wt*, AID-deficient mice and 3'RR-deficient mice were stimulated *in vitro* with 5 μg ml⁻¹ LPS and 20 ng ml⁻¹ IL4 for 2 days, and total RNA was extracted. cDNA was prepared using QIAGEN miScript II RT kit, and expression of a panel of 84 miRNA was determined using QIAGEN miScript miRNA PCR Array Mouse T-Cell and B-Cell activation, according to the manufacturer's protocol. miRNA targets predictions were made using the <http://mirdb.org/> website⁵¹.

References

- Henderson, A. & Calame, K. Transcription regulation during B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 163–200 (1998).
- Pinaud, E. *et al.* The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* **110**, 27–70 (2011).
- Perlot, T., Alt, F. W., Bassing, C. H., Suh, H. & Pinaud, E. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **42**, 14362–14367 (2005).
- Marquet, M. *et al.* The Eμ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response *in vivo*. *J. Immunol.* **193**, 1171–1183 (2014).
- Saintamand, A. *et al.* The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget* **6**, 4845–4852 (2015).
- Vincent-Fabert, C. *et al.* Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* **116**, 1895–1898 (2010).
- Rouaud, P. *et al.* Elucidation of the enigmatic IgD class switch recombination via germ-line deletion of the IgH 3' regulatory region. *J. Exp. Med.* **211**, 975–985 (2014).
- Rouaud, P. *et al.* The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J. Exp. Med.* **210**, 1501–1507 (2013).
- Rouaud, P. *et al.* Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* **287**, 8356–8360 (2012).
- Medvedovic, J. *et al.* Flexible long-range loops in the VH gene region of the Igh locus that likely facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity* **39**, 229–244 (2013).
- Yan, T. C. *et al.* IgH class switching and translocations used a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* **449**, 478–483 (2007).
- Stavnezer, J., Björkman, A., Du, L., Cagigi, A. & Pan-Hammarström, Q. Mapping of switch recombination junctions, a tool for studying DNA repair pathways during immunoglobulin class switching. *Adv. Immunol.* **108**, 45–109 (2010).
- Boboila, C., Alt, F. W. & Schwer, B. Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv. Immunol.* **116**, 1–45 (2012).
- Matthews, A. J., Zheng, S., DiMenna, L. J. & Chaudhuri, J. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv. Immunol.* **122**, 1–57 (2014).
- Vaidyanathan, B., Yen, W. F., Pucella, J. N. & Chaudhuri, J. AIDing chromatin and transcription-coupled orchestration of immunoglobulin class-switch recombination. *Front. Immunol.* **5**, 120 (2014).
- Wuerffel, R. *et al.* S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* **27**, 711–722 (2007).
- Cogné, M. *et al.* A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* **77**, 737–747 (1994).
- Pinaud, E. *et al.* Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* **15**, 187–199 (2001).
- Xu, M. & Stavnezer, J. Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line γ1 RNA: analysis of the promoter/enhancer. *EMBO J.* **11**, 145–155 (1992).
- Boboila, C. *et al.* Alternative end-joining catalyses robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and ku70. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 3034–3039 (2010).
- Laffleur, B. *et al.* AID-induced remodelling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* **5**, 1118–1131 (2014).
- Zan, H. & Casali, P. AID- and UNG-dependent generation of staggered double-strand DNA breaks in immunoglobulin class switch DNA recombination: a post-cleavage role for AID. *Mol. Immunol.* **46**, 45–61 (2008).
- Kracker, S. *et al.* Impaired induction of DNA lesions during immunoglobulin class-switch recombination in humans influences end-joining repair. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 22225–22230 (2010).
- Kenter, A. L. AID targeting is dependent on RNA polymerase II pausing. *Semin. Immunol.* **24**, 281–286 (2012).
- Kuang, F. L., Luo, Z. & Scharff, M. D. H3 trimethyl K9 and H3 acetyl K9 chromatin modifications are associated with class switch recombination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 5288–5293 (2009).
- Stanlie, A., Masatoshi, A., Muramatsu, M., Honjo, T. & Begum, N. A. Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 22190–22195 (2010).
- Jeevan-Raj, B. P. *et al.* Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* **208**, 1649–1660 (2011).
- Daniel, J. A. & Nessenzweig, A. Roles for histone H3K4 methyltransferase activities during immunoglobulin class-switch recombination. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 733–738 (2012).
- Bühler, M., Mohn, F., Stalder, L. & Mühlemann, O. Transcriptional silencing of nonsense codon-containing immunoglobulin minigenes. *Mol. Cell.* **18**, 307–317 (2005).
- Lu, Z. P., Ju, Z. L., Shi, G. Y., Zhang, J. W. & Sun, J. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 204–209 (2005).
- Kurosawa, K., Lin, W. & Ohta, K. Distinct roles of HDAC1 and HDAC2 in transcription and recombination at the immunoglobulin loci in the chivken B cell line DT40. *J. Biochem.* **148**, 201–207 (2010).
- Fritz, E. L. *et al.* A comprehensive analysis of the effects of the deaminase AID on the transcriptome and methylome of activated B cells. *Nat. Immunol.* **14**, 749–755 (2013).
- Yang, S. H. *et al.* The SOSS1 single-stranded DNA binding complex promotes DNA end resection in concert with Exo1. *EMBO J.* **32**, 126–139 (2013).
- Loizou, J. I. *et al.* ATMIN is required for maintenance of genomic stability and suppression of B cell lymphoma. *Cancer Cell.* **19**, 587–600 (2011).
- Bolderson, E. *et al.* Phosphorylation of Exo1 modulates homologous recombination repair of DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1821–1831 (2010).
- Bennett, G., Papamichos-Chronakis, M. & Peterson, C. L. DNA repair choice defines a common pathway for recruitment of chromatin regulators. *Nat. Commun.* **4**, 2084 (2013).
- Costelloe, T. *et al.* The yeast Fun30 and human SMARCAD1 chromatin remodellers promote DNA and resection. *Nature* **489**, 581–586 (2012).
- Wu, P., Takai, H. & de Lange, T. Telomeric 3'overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. *Cell* **150**, 39–52 (2012).
- Kotian, S., Liyanarachchi, S., Zelent, A. & Parvin, J. D. Histone deacetylases 9 and 10 are required for homologous recombination. *J. Biol. Chem.* **286**, 7722–7726 (2011).

40. Yan, K. *et al.* Histone deacetylase 9 deficiency protects against effector T cell-mediated systemic autoimmunity. *J. Biol. Chem.* **286**, 28833–28843 (2011).
41. Rulten, S. L. *et al.* PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Mol. Cell.* **41**, 33–45 (2011).
42. Sjögren, C. & Ström, L. S-phase and DNA damage activated establishment of sister chromatid cohesion-importance for DNA repair. *Exp. Cell. Res.* **316**, 1445–1453 (2010).
43. Thomas-Claudepierre, A. S. *et al.* The cohesion complex regulates immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* **210**, 2495–2502 (2013).
44. Truffinet, V. *et al.* The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol.* **179**, 6033–6042 (2007).
45. Vincent-Fabert, C. *et al.* Ig synthesis and class switching do not require the presence of the *hs4* enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J. Immunol.* **182**, 6926–6932 (2009).
46. Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C. L., Wilson, T. E. & Lieber, M. R. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.* **4**, 442–451 (2003).
47. Rouaud, P. *et al.* Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53 +/- mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget* **3**, 586–593 (2012).
48. Le Brigand, K. & Barbry, P. MEDIANTE: a web-based microarray data manager. *Bioinformatics* **23**, 1304–1306 (2007).
49. Le Brigand, K. *et al.* An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic Acids Res.* **34**, e87 (2006).
50. Smyth, G. K. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **3**, article 3 (2004).
51. Wang, X. & El Naqa, I. M. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics* **24**, 325–332 (2008).

Acknowledgements

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (SL 220100601332 and PJA 20141201649), ANR (Projets Blanc 2011), Ligue Contre le Cancer (comité de la Corrèze), and 'Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud'. Epigenetic experiments were supported by a specific grant from INCa-Cancéropôle GSO (2014). M. Cogné is supported by Institut Universitaire de France and Fondation pour la Recherche Médicale. P. Rouaud had a fellowship from ARC (DOC20130606964). We acknowledge the technological expertise of the Nice Sophia-Antipolis Functional Genomics Platform, supported by MICROENVIMET, FP7-HEALTHF2-2008-201279, the ARC, and the INCa. We thank Dr P. Barbry for helpful discussions and support during this work. We thank S. Desorges and B. Remerand for help with animal care. We thank Dr P. Gearhart for sending us anti-AID antibodies.

Author contributions

P.R., A.S., F.S., M.C. and Y.D. actively participated to the experimental design of the study. G.R. performed transcriptome experiments. M.C. and Y.D. participated in the scientific discussion for manuscript writing, obtained financial grants and agreement of the ethic committee of our institution to perform the study.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Saintamand, A. *et al.* Elucidation of *IgH* 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat. Commun.* 6:7084 doi: 10.1038/ncomms8084 (2015).

Article 4

The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate.

Alexis Saintamand, Pauline Rouaud, Armand Garot, Faten Saad, Claire Carrion, Christelle Oblet, Michel Cogné, Eric Pinaud, Yves Denizot.

Oncotarget, 2015, volume 6, numéro 7, pages 4845-4852

En plus des travaux menés sur le rôle de la 3'RR dans les processus immuns et inflammatoires et sur le développement des lymphomes, j'ai également participé, durant ma thèse, à la mise en évidence du rôle de la 3'RR sur le devenir du lymphocyte B. La majeure partie des expérimentations a été réalisée par Alexis Saintamand dans le cadre de sa thèse.

L'absence de la 3'RR ne perturbe pas, de façon notable, la lymphopoïèse B chez la souris. On ne note pas d'altération du nombre de cellule B dans la moelle, la rate et le sang ([Vincent-Fabert et al., 2010a](#)). Si les compartiments pro-B, pre-B et B immature sont normaux dans la moelle osseuse de souris déficientes pour la 3'RR, aucune donnée n'est disponible sur l'impact de la délétion de la 3'RR sur la transcription de la chaîne μ et l'expression du pré-BCR au stade immature et du BCR au stade mature. Si le nombre total de cellule B est normal dans la rate de souris déficientes pour la 3'RR, aucune donnée précise n'est connue sur les compartiments transitionnels, folliculaires et marginaux dans la rate. Diverses études ont montré que la force du BCR influence le devenir de la cellule B avec un BCR faible favorisant la voie marginale et un BCR fort la voie folliculaire ([Pillai and Cariappa, 2009](#)). L'étude des compartiments marginaux et folliculaire est complexe car il existe une grande disparité entre les pourcentages de cellules B folliculaires (CD21⁻CD23⁺) et marginales (CD21⁺CD23⁻) entre les diverses lignées de souris. Ainsi la rate de souris 129 contient 4 fois plus de lymphocytes B de la zone marginale que des souris C57BL6 ([Kaminski and Stavnezer, 2007](#)). En retour, la rate de souris C57BL6 contient plus de lymphocytes B folliculaires. Pour comprendre le rôle de la 3'RR dans le devenir de la cellule B nous avons étudié l'impact de sa délétion sur la transcription de la chaîne μ , sur l'expression du pré-BCR, sur l'expression du BCR et sur le ratio cellules folliculaires/marginales dans la rate.

Pour pallier la différence entre les pourcentages de cellules B marginales et folliculaires entre les lignées murines nous avons utilisé une astuce liée à la conception des souris 3'RR déficientes. La délétion de la 3'RR a été réalisée sur une cellule ES de souris 129 exprimant une IgM d'allotype *a* (IgM^a). Les souris C57BL6 expriment une IgM d'allotype *b* (IgM^b). Nous avons donc généré des souris hétérozygotes IgH a^{Δ3'RR}/b^{wt} que nous avons comparé avec des souris IgH a^{wt}/b^{wt}.

Principaux résultats

Nous avons confirmé la différence dans le pourcentage de cellules B marginales et folliculaires entre des souris 129 et C57BL6. L'étude des souris hétérozygotes IgH a^{wt}/b^{wt} nous a permis de montrer que la transcription des allèles *a* et *b* est identique dans la moelle osseuse et la rate. Il y a autant de cellules B immatures exprimant une IgM^a qu'une IgM^b. Les pourcentages de cellules B transitionnelles, marginales et folliculaires exprimant une IgM^a ou une IgM^b sont identiques dans la rate. En conclusion, dans un fond mixte 129/C57BL6 les allèles *a* et *b* sont utilisés de la même façon.

L'étude des souris hétérozygotes IgH a^{Δ3'RR}/b^{wt} a montré que la transcription des allèles *a* et *b* est identique dans la moelle osseuse et que le pourcentage de cellules B immatures exprimant une IgM^a est identique à celui exprimant une IgM^b. Les intensités moyennes de fluorescence pour les IgM^a et les IgM^b sont identiques à celles observées chez les souris IgH a^{wt}/b^{wt} montrant que la délétion de la 3'RR sur l'allèle *a* n'affecte pas l'expression du pre-BCR.

L'étude des souris hétérozygotes IgH a^{Δ3'RR}/b^{wt} a montré que la transcription de l'allèle *a* est diminuée dans les cellules B transitionnelles, marginales et folliculaires de rate par rapport à l'allèle *a* de souris IgH a^{wt}/b^{wt}. Les moyennes de fluorescence des IgM^a sont également diminuées montrant que la délétion de la 3'RR affecte la transcription et l'expression du BCR au stade B mature. Par comparaison aucune différence n'est observée pour l'allèle *b* entre des souris a^{Δ3'RR}/b^{wt} et a^{wt}/b^{wt}.

L'analyse des compartiments marginaux et folliculaires montre une diminution significative du nombre de cellules B marginales exprimant une IgM^a chez les animaux a^{Δ3'RR}/b^{wt} par comparaison aux souris a^{wt}/b^{wt}. Cette baisse n'est pas observée chez les souris a^{wt}/b^{wt}. La force du signal BCR a été suggérée comme étant liée au devenir des lymphocytes B (un fort signal

BCR défavorisant le devenir d'un B de la zone marginale). Une transduction du signal quasi normale est observée chez les souris $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$ par rapport à des souris a^{wt}/a^{wt} suggérant que la force du BCR n'est pas à l'origine de la variation observée.

En conclusion, l'étude des souris hétérozygotes pour la 3'RR a permis de montrer que l'allèle déficient est correctement utilisé lors des stades précoces de la lymphopoïèse (stades pro-B, pré-B, B immature) dans la moelle osseuse. Par contre, au stade B mature, l'utilisation de l'allèle déficient est diminuée (baisse de la transcription de la chaîne μ) conduisant à une altération du compartiment des cellules B de la zone marginale. La 3'RR est donc impliquée dans le devenir des cellules B (folliculaires versus marginales).

The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate

Alexis Saintamand¹, Pauline Rouaud¹, Armand Garot¹, Faten Saad¹, Claire Carrion¹, Christelle Oblet¹, Michel Cogné^{1,2,3}, Eric Pinaud¹, Yves Denizot¹

¹CNRS, CRIBL, UMR 7276, Limoges, France

²Université de Limoges, CRIBL, UMR 7276, Limoges, France

³Institut Universitaire de France, Paris, France

Correspondence to:

Yves Denizot, e-mail: yves.denizot@unilim.fr

Keywords: BCR, B cell fate, IgH 3' regulatory enhancers, knock-out mice

Received: December 17, 2014

Accepted: December 21, 2014

Published: March 03, 2015

ABSTRACT

We report that the IgH 3' regulatory region (3'RR) has no role on μ chain transcription and pre-BCR expression in B cell progenitors. In contrast, analysis of heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice indicated that the 3'RR controls μ chain transcripts in mature splenocytes and impacts membrane IgM density without obvious effect on BCR signals (colocalisation with lipid rafts and phosphorylation of Erk and Akt after BCR crosslinking). Deletion of the 3'RR modulates the B cell fate to less marginal zone B cells. In conclusion, the 3'RR is dispensable for pre-BCR expression and necessary for optimal commitments toward the marginal zone B cell fate. These results reinforce the concept of a dual regulation of the IgH locus transcription and accessibility by 5' elements at immature B cell stages, and by the 3'RR as early as the resting mature B cell stage and then along further activation and differentiation.

INTRODUCTION

Lymphopoiesis is coupled with programmed accessibility of Ig genes to transcription and to several major transcription-dependent DNA remodelling events [1, 2]. While 5' *cis*-regulatory elements (E_{μ} and IGCR1) control V(D)J recombination [2–4], the IgH 3' regulatory region (3'RR) controls class switch recombination (CSR) [2, 5] and IgH somatic hypermutation (SHM) [6]. B cells are continuously instructed by B cell receptor (BCR) signals to make crucial cell fate decisions at several checkpoints during their development [7, 8]. Such an important choice made by immature B cells is to become either a follicular (FO) or a marginal zone (MZ) B cell. Influence of the BCR strength on B cell fate has been investigated by various experimental approaches (such as mutations affecting BCR components and proteins implicated in BCR signalling) both affecting pre-BCR and BCR signals and thus resulting in multiple anomalies at various stages of B cell maturation [7, 8]. The commonly accepted hypothesis is that the BCR strength controls B cell fate with weak BCR signalling inducing MZ B cell development while strong BCR signalling

favours the development of FO B cells [7, 8]. We studied heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice. We report that the 3'RR has no role on the pre-BCR expression but governs μ gene transcription and thus BCR expression specifically in mature B cells where its deletion affects the B cell fate toward less MZ B cells.

RESULTS AND DISCUSSION

Expression of a 3'RR-deleted allele in bone marrow B cells

Mouse substrains have dissimilar differentiation programs culminating in different B cell fate and BCR expression [9] (Figure 1). To assess B cell differentiation issues linked to genetic background, our study was carried out in heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice, compared to *wt* F1 IgH a^{wt}/b^{wt} mice. Analysis of bone marrow B cells with IgM-allotype specific antibodies indicated similar percentages and numbers of B cells expressing either *a* or *b* allotype in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice; as a negative control IgM^a-expressing B cells were not detected in mice carrying heterozygous deletion of the E_{μ} region ($a^{\Delta E_{\mu}}/b^{wt}$) [10]

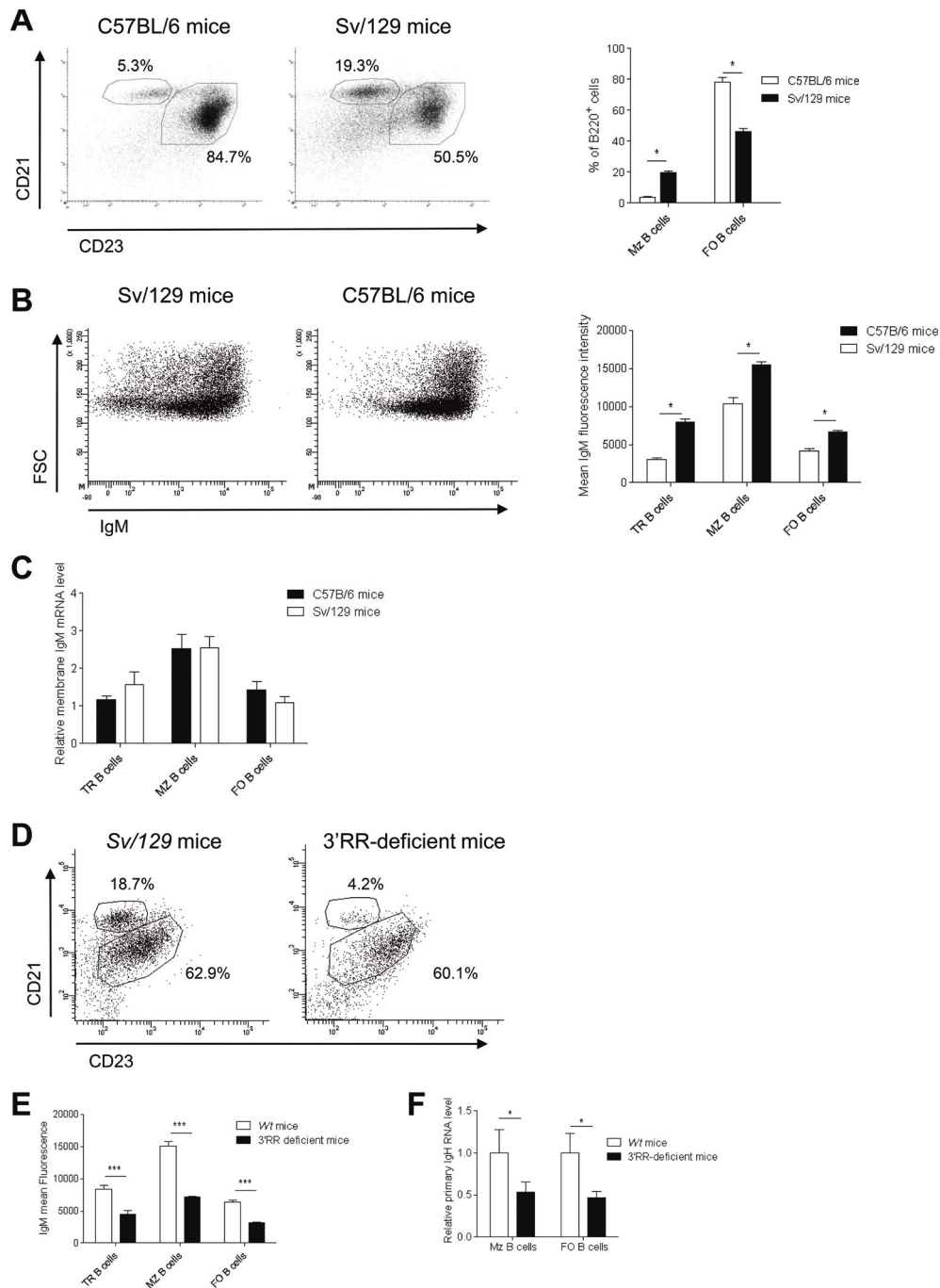


Figure 1: B cell fate and IgM expression in C57BL/6 and Sv/129 mice. (A) Left part - flow cytometry analysis of follicular (FO) B cells ($B220^+CD21^{low}CD23^{high}$) and marginal zone (MZ) B cells ($B220^+CD21^{high}CD23^{low}$) in spleen of C57BL/6 (IgH b^{wt}/b^{wt}) and Sv/129 (IgH a^{wt}/a^{wt}) *wt* mice. Cells were gated on $B220^+$ cells. One representative experiment of three Sv/129 and seven C57BL/6 mice is shown. Right part - percentage of splenic FO and MZ B cells. Mean \pm SEM of three and seven values for Sv/129 and C57BL/6 mice, respectively. $*p < 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test). (B) Left part - flow cytometry analysis of $B220^+IgM^+$ B cells in spleen of C57BL/6 and Sv/129 mice. One representative experiment of three Sv/129 and seven C57BL/6 mice is shown. Cells were gated on $B220^+$ cells. The anti-IgM labelled antibody binds both the *a* and the *b* allotypes. Right part - Mean IgM intensities on FO, MZ and transitional (TR, $B220^+AA4.1^+$) B cells in spleen of Sv/129 and C57BL/6 mice. Mean \pm SEM of three and seven values for Sv/129 and C57BL/6 mice, respectively. $*p < 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test). (C) Similar μ transcription in sorted TR, FO and MZ B cells of Sv/129 and C57BL/6 mice. Mean \pm SEM of 5 mice. Values were normalized to GAPDH transcripts. (D) Flow cytometry analysis of FO and MZ B cells in spleen of homozygous 3'RR-deficient mice (IgH $a^{\Delta 3RR}/a^{\Delta 3RR}$) and Sv/129 (IgH a^{wt}/a^{wt}) mice. Cells were gated on $B220^+$ cells. One representative experiment out of six is shown. (E) Percentages of splenic TR, FO and MZ B cells in 3'RR-deficient mice and Sv/129 mice. Mean \pm SEM of six mice. $*p < 0.001$ (Mann-Whitney *U*-test). (F) Real time PCR analysis of primary IgH transcripts in sorted FO and MZ B cells of 3'RR-deficient mice and Sv/129 mice. Mean \pm SEM of five mice. $*p < 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test). Values were normalised to GAPDH transcripts.

(Figure 2A and 2B). The mean membrane IgM^a (but not IgM^b) density was reduced in heterozygous $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ compared to a^{wt}/b^{wt} mice (Figure 2C). Analysis of immature B220⁺AA4.1⁺ B cells indicated a slight increase of the percentage (but not the numbers) of cells expressing the *a* allotype in heterozygous $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice (Figure 2D). A decreased membrane IgM^a (but not IgM^b) density was found in heterozygous $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice compared to a^{wt}/b^{wt} mice (Figure 2E). Finally, real time PCR analysis indicated a reduced transcription of the *a* allele (but not *b*) in B220⁺AA4.1⁺ sorted B cells from $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice compared to a^{wt}/b^{wt} mice (Figure 2F). Taken altogether these results are indications that the 3'RR-deficient allele underwent V(D)J recombination at a rate and a timeframe similar to the *wt* allele. Indeed any delay in IgH chain expression from the mutated allele would be expected to result in unbalanced expression of IgH alleles in immature B cells from heterozygous mice (as found with the $a^{\Delta E\mu}$ allele) [10]. Bone marrow IgMa ^{$\Delta 3'RR$} B cells had a lower IgH transcription and membrane IgM expression confirming an early 3'RR transcriptional control immediately after the pre-B cell stage [11]. The slight accumulation of newly formed IgMa ^{$\Delta 3'RR$} B cells may imply a B cell fate decision defect.

Expression of a 3'RR-deleted allele in peripheral B cells

In contrast to bone marrow B-lineage cells, a strong disadvantage of the mutated *a* allotype finally manifested in mature splenic B cells of IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice (Figure 3A–3C). This precisely identified the transition from immature to mature B cells as the time point where the 3'RR-deficiency altered B cell differentiation and introduced a biased representation of the mutant IgH allele. In $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice, proportion (but not numbers) of splenic IgM^aAA4.1⁺ transitional (TR) B cells was increased when compared to a^{wt}/b^{wt} mice (Figure 3D, left part). Deletion of the 3'RR had no effect on FO B cells (B220⁺CD21^{low}CD23^{high}) (Figure 3D, middle part) while a marked reduction of MZ B cells (B220⁺CD21^{high}CD23^{low}) was found (Figure 3E, right part). The mean IgM^a (but not IgM^b) intensity was significantly reduced in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ compared to a^{wt}/b^{wt} mice in TR, FO and MZ B cells (Figure 3E). Real time PCR analysis showed a reduced IgM^a (but not IgM^b) transcription in sorted TR, FO and MZ B cells from $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ (Figure 3F). Thus, deletion of the 3'RR affected membrane IgM expression in mature B cell and the B cell fate toward the MZ phenotype. These results markedly contrast with the lower FO phenotype resulting from hypomorphic expression of either Ig α or of an IgH-chain allele, both affecting pre-BCR and BCR expression and resulting in multiple anomalies at various stages of B cell maturation [12, 13]. The cell fate decision made by immature B cells to become a FO or a MZ B cell is controlled by the BCR strength [7, 8]. We

investigated BCR signalling in homozygous $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$ mice that had lower levels of MZ B cells and IgM density than in a^{wt}/a^{wt} Sv/129 mice (Figure 1). Engagement of BCR with anti-IgM stimulation efficiently induced the co-localisation between BCR and lipid rafts in 3'RR-deficient splenocytes (Figure 4) that is a prerequisite for an efficient BCR signalling [14, 15]. We show that surface Ig cross-linking induces amounts of BCR signalling (Erk and Akt phosphorylations) in 3'RR-deficient B cells without obvious differences to *wt* mice (Figure 4).

CONCLUSION

Deletion of the 3'RR had no impact on bone marrow B cell populations on the use of a 3'RR-deficient allele in competition with a *wt* allele. This reinforced studies highlighting the key role of 5' IgH locus regulatory elements in recombination and transcription at immature stages leading to pre-BCR expression [2, 3, 10, 16]. In contrast, a late developmental defect appears in peripheral B lymphocytes with an impact of the 3'RR deletion on IgH chain expression. Whether several models reported that lowered tonic BCR signalling alters B cell fate by favouring the development of MZ B cells in the detriment of FO B cells [7, 8], other studies do not [17, 18]. We show that deletion of the 3'RR lowered IgH transcription, BCR density, and BCR signalling with consequences on B cell fate, disadvantaging MZ subset in favour to FO B cells. This suggests that B cell fate might not be only governed by the BCR tonic signal but relies on fine IgH chain tuning, by multiple regulatory elements including the 3'RR, at specific stages of B cell development. While 5' IgH elements solely control IgH (and thus pre-BCR) expression at immature stages, the 3'RR comes into IgH (and thus BCR) transcriptional control in mature B cells.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Our research has been approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and carried according the European guidelines for animal experimentation. The disruption of the 3'RR was carried out in a Sv/129 embryonic stem cell line [5]. Mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions. Age-matched littermates (8 weeks old) were used in all experiments.

Cell cytometry analysis

Cells were incubated with anti-B220-BV510, anti-CD21-BV650, anti-CD23-PC7, anti-IgM-APC, anti-IgMa-FITC, anti-IgMb-PE, anti-CD19-APCH7 and anti-AA4.1-APC antibodies (Southern Biotechnologies and

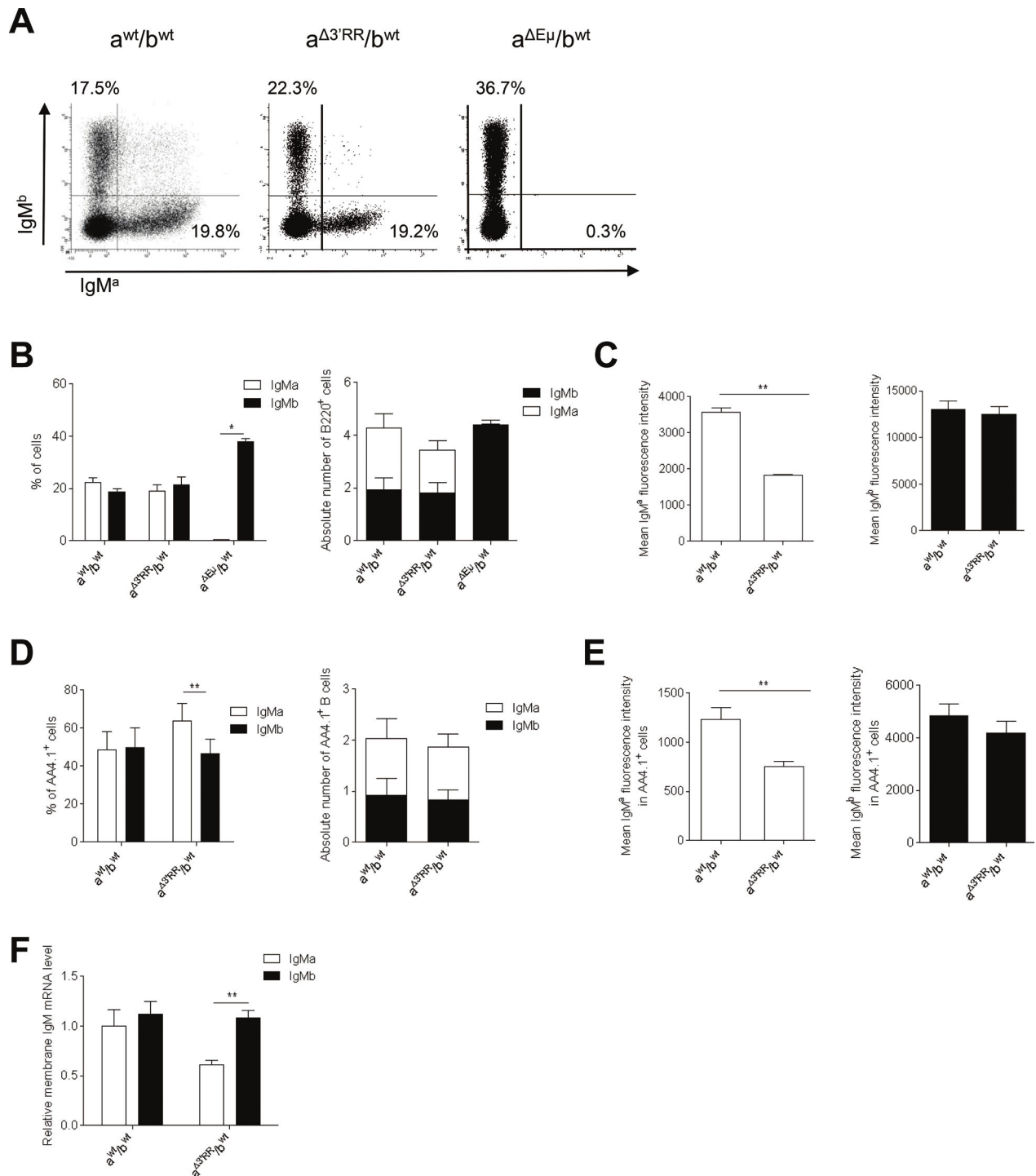


Figure 2: Expression of a 3'RR-deleted allele in bone marrow B cells. (A) Flow cytometry analysis of IgM^a and IgM^b on B220⁺ bone marrow cells of heterozygous $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$, a^{wt}/b^{wt} and $a^{\Delta E\mu}/b^{wt}$ mice. One representative experiment out of ten is shown for $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment out of four is shown for $a^{\Delta E\mu}/b^{wt}$ mice. Cells were gated on B220⁺ cells. (B) Percentages (left part) and numbers (right part) of B220⁺ bone marrow B cells expressing the *a* or *b* allele in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$, a^{wt}/b^{wt} and $a^{\Delta E\mu}/b^{wt}$ mice. Mean \pm SEM of ten $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice, ten a^{wt}/b^{wt} and four $a^{\Delta E\mu}/b^{wt}$ mice. Millions of bone marrow B cells are reported. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test). (C) IgM^a and IgM^b fluorescence intensity on B220⁺ B cells of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of ten mice. ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney *U*-test). (D) Percentages (left part) and numbers (right part) of B220⁺AA4.1⁺ bone marrow B cells in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of ten mice. ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney *U*-test). (E) IgM^a and IgM^b fluorescence intensity on B220⁺AA4.1⁺ bone marrow B cells in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of ten mice. ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney *U*-test). (F) Real time PCR analysis of μ membrane transcripts in sorted B220⁺AA4.1⁺ bone marrow B cells of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Values were normalized to GAPDH transcripts. Mean \pm SEM of six mice. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test).

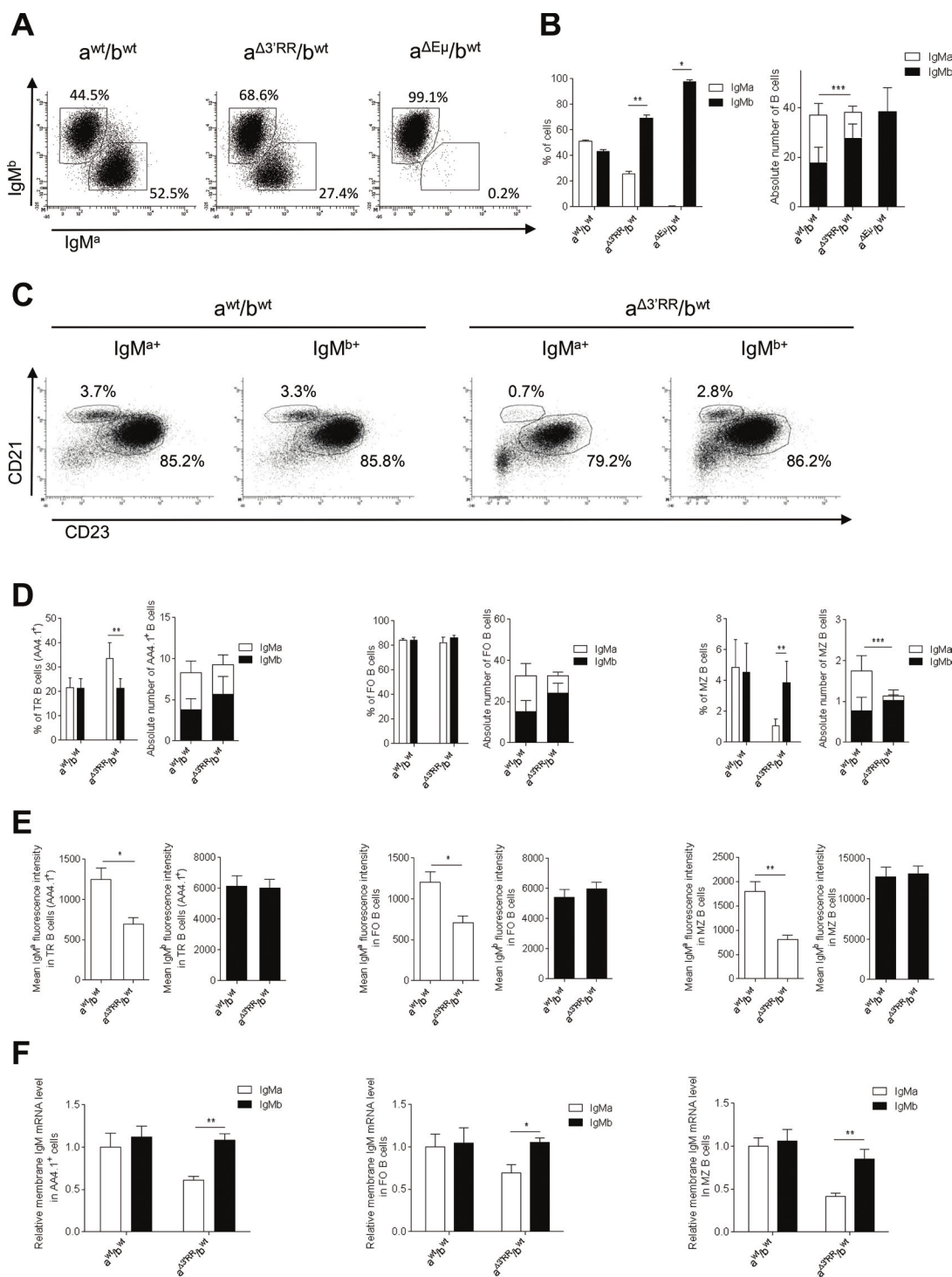


Figure 3: Expression of a 3'RR-deleted allele in splenic B cells. (A) Flow cytometry analysis of IgM^a and IgM^b in spleen of heterozygous $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$, a^{wt}/b^{wt} and $a^{\Delta E\mu}MARS/b^{wt}$ mice. One representative experiment out of ten is shown for $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment out of four is shown for $a^{\Delta E\mu}MARS/b^{wt}$ mice. Cells were gated on B220⁺ cells. (B) Percentages (left part) and numbers (right part) of B220⁺ splenic B cells expressing the *a* or *b* allele in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$, a^{wt}/b^{wt} and $a^{\Delta E\mu}MARS/b^{wt}$ mice. Mean \pm SEM of ten $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice, ten a^{wt}/b^{wt} and four $a^{\Delta E\mu}MARS/b^{wt}$ mice. Millions of splenic B cells are reported. The significance is for IgM^a cells in the right part. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney *U*-test). (C) Flow cytometry analysis of follicular (FO) B cells (B220⁺CD21^{low}CD23^{high}) and marginal zone (MZ) B cells (B220⁺CD21^{high}CD23^{low}) in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment out of ten is shown. Cells were gated on B220⁺ cells. (D) Percentages and numbers (in millions) of TR (AA4.1⁺), FO and MZ B cells in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of ten mice. Million numbers of cells are reported. The significance is for MZ IgM^a cells in the right part. ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney *U*-test). (E) IgM^a and IgM^b densities on TR, FO and MZ B cells in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of ten mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney *U*-test). (F) μ transcription in sorted TR, FO and MZ B cells of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of 6 mice. Values were normalized to GAPDH transcripts. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Mann-Whitney *U*-test).

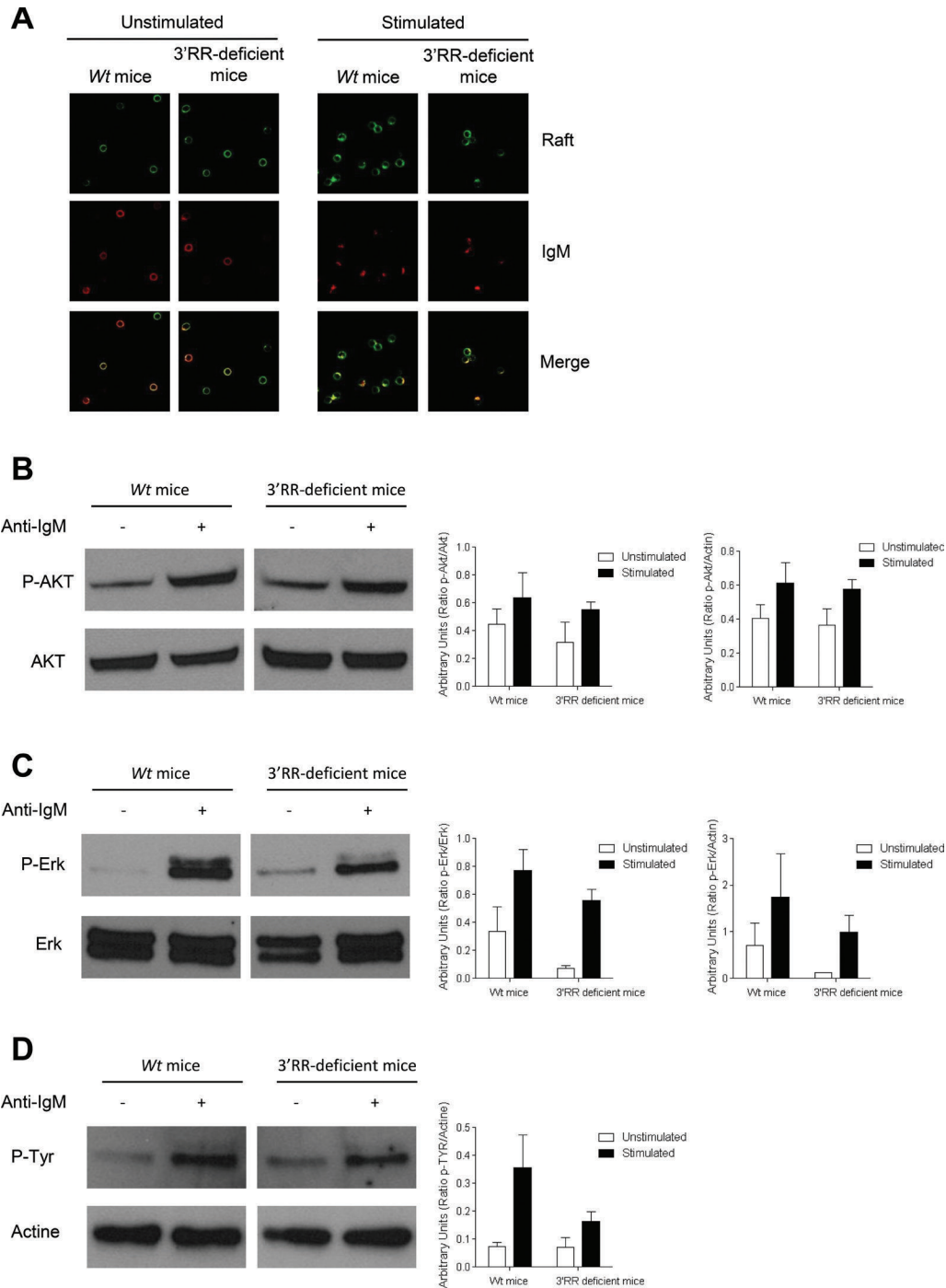


Figure 4: BCR signalling response in 3'RR-deficient B splenocytes. (A) BCR and lipid rafts colocalization experiments. 3'RR deficient mice ($a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$) and Sv/129 wt mice (a^{wt}/a^{wt}) were investigated. CD43⁻ B cells were stained with cholera toxin Alexa 488 followed by stimulation with anti-IgM Alexa 594 labelled antibodies. Arrows point to areas where lipid rafts colocalise with membrane BCR. One representative experiment out of four is shown. (B) BCR signalling in 3'RR-deficient mice. CD43⁻ splenic B cells (3×10^6 cells/ml) from wt Sv/129 mice (a^{wt}/a^{wt}) and 3'RR-deficient mice ($a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$) were stimulated with 15 μ g/ml of anti-IgM at 37°C for 10 min. Western Blot experiments were performed with 30 μ g of proteins. Actin was used as an internal loading control. phosphor-Akt and Akt were investigated with specific anti-phosphor-Akt and anti-Akt antibodies, respectively. One representative experiments out of 3. Relative intensity of phosphor-Akt bands were related to Akt and actin bands (located in D). (C) phosphor-Erk and Erk were investigated with specific anti-phosphor-Erk and anti-Erk antibodies, respectively. One representative experiments out of 3. Relative intensity of phosphor-Erk bands were related to Erk and actin bands (located in D). (D) Total phosphor-Tyr was investigated with specific anti-phosphor-Tyr antibodies. One representative experiments out of 3. Relative intensity of phosphor-Tyr bands were related to actin bands. No significant differences for p-Akt, Akt, p-Erk, Erk and p-Tyr between 3'RR-deficient mice and wt mice (Mann-Whitney *U*-test).

Beckton Dickinson) and analysed on a Fortessa LSR2 (Beckton Dickinson) [19–21]. Heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice generated by crossing homozygous 3'RR-deficient mice (IgH $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$) with C57BL/6 mice (IgH b^{wt}/b^{wt}) were investigated. Mixed Sv/129 \times C57BL/6 mice (IgH a^{wt}/b^{wt}) were used as control mice.

Transcript analysis

Bone marrow B220⁺AA4.1⁺IgMa⁺ and B220⁺AA4.1⁺IgMb⁺ cells were sorted with specific anti-B220, anti-IgMa, anti-IgMb and anti-AA4.1 labelled antibodies using a BD FACSAria III. Splenic follicular (FO) B cells (B220⁺CD21^{low}CD23^{high}), marginal zone (MZ) B cells (B220⁺CD21^{high}CD23^{low}) and transitional (TR) B cells (B220⁺AA4.1⁺) were sorted with specific anti-B220-, anti-CD21-, anti-CD23 and anti-AA4.1 labelled antibodies. Total RNA was extracted and real time PCR was performed in duplicate by using TaqMan and SYBR assay reagents and analysed on an ABI Prism 7000 system (Applied Biosystems) [22]. μ membrane forward (in exon μ 4): 5'-TGGAACTCCGAGAGACCTA-3'; μ membrane reverse (in exon μ membrane 1): 5'-TTCCTCCTCAGCATTCACCT-3'. GAPDH was used for normalization of gene expression levels (reference Mm99999915-g1). Heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice and mixed Sv/129 \times C57BL/6 mice (IgH a^{wt}/b^{wt}) were used for cell sorting experiments.

Western blot analysis

CD43⁻ B splenocytes (15×10^6) were stimulated with 15 μ g of goat anti-mouse κ (Southern Biotech) for 10 min at 37°C. Cell lysates (30 μ g) were analysed by SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore) as previously reported [22, 23]. After blocking, membranes were incubated with anti-phosphor-Tyr (Cell signalling), anti-phosphor-Erk (Cell signalling), anti-Erk (Cell signalling), anti-phosphor-Akt (Cell signalling), anti-Akt (Cell signalling) and anti-actin antibodies (Sigma), and revealed with HRP-labelled goat anti-rabbit Ig (Biorad) by chemoluminescence (ECL plus, Amersham). Results were analysed with the Java-based image processing program ImageJ that can calculate area and pixel value statistics of user-defined selections and intensity thresholded objects. Homozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$ and Sv/129 mice (IgH a^{wt}/a^{wt}) were used for western blot experiments.

Lipid raft aggregation

For BCR and lipid raft colocalization experiments, splenic B cells were purified by hypotonic lysis of red blood cells followed by incubation with anti-CD43-coated MicroBeads (Miltenyi Biotec), which bind to all splenic cells except resting mature B cells. B cells were obtained by passing the cells through a negative depletion

column attached to an OctoMACS magnet (Miltenyi Biotec). 1×10^6 CD43⁻ B splenocytes (100 μ l) were stained with 80 ng of cholera toxin B, a marker of lipid rafts, conjugated to Alexa 488 and 20 μ g of goat anti-mouse IgM conjugated to Alexa 594 (Molecular Probes) for 30 min on ice then 5 min at 37°C for the stimulated conditions. Cells were then fixed with 4% PFA. For non stimulated conditions cells were incubated 30 min with an anti-IgM-PE on ice and analysed with a Zeiss LSM 510 META confocal microscope. Homozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$ and Sv/129 mice (IgH a^{wt}/a^{wt}) were used for experiments.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC SL 220100601332), Ligue Contre le Cancer de la Corrèze, ANR (Projets Blanc 2011) and “Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud”. P. Rouaud has a fellowship from ARC (DOC20130606964). We thank S. Desforges and B. Remerand for help with animal care.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Editorial note

This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in Oncotarget.

REFERENCES

1. Henderson A, Calame K. Transcription regulation during B cell development. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:163–200.
2. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, Cogné M. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol.* 2011; 110:27–70.
3. Perlot T, Alt FW, Bassing CH, Suh H, Pinaud E. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2005; 42:14362–14367.
4. Guo C, Yoon HS, Franklin A, Jain S, Ebert A, Cheng HL, Hansen E, Despo O, Bossen C, Vettermann C, Bates JG, Richards N, Myers D, et al. CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature.* 2011; 477:424–430.
5. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, hs4)

- dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood*. 2010; 116:1895–1898.
6. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, Reina-San-Martin B, Pinaud E, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J Exp Med*. 2013; 210:1501–1507.
 7. Niirio H, Clark EA. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2:945–956.
 8. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:767–777.
 9. Kaminski DA, Stavnezer J. Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice. *Int Immunol*. 2007; 19:545–556.
 10. Marquet M, Garot A, Bender S, Carrion C, Rouaud P, Lecardeur S, Denizot Y, Cogné M, Pinaud E. The E μ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response *in vivo*. *J Immunol*. 2014; 193:1171–1183.
 11. Guglielmi L, Le Bert M, Truffinet V, Cogné M, Denizot Y. Insulators to improve expression of a 3'IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 307:466–471.
 12. Rowland SL, DePersis CL, Torres RM, Pelanda R. Ras activation of Erk restores impaired tonic BCR signalling and rescues immature B cell differentiation. *J Exp Med*. 2010; 207:607–621.
 13. Brenner S, Drewel D, Steinbart T, Weisel F, Härtel E, Pöttsch H, Yu P, Mudde GC, Schweizer A, Nitschke L, Winkler TH. A hypomorphic IgH-chain allele affects development of B-cell subsets and favours receptor editing. *EMBO J*. 2011; 30:2705–2718.
 14. Sedwick CA, Altman A. Ordered just so: lipid rafts and lymphocyte function. *Sci STKE*. 2002; 122:re2.
 15. Cheng PC, Cherukuri A, Dykstra M, Malapati S, Sproul T, Chen MR, Pierce SK. Floating the raft hypothesis: the roles of lipid rafts in B cell antigen receptor function. *Semin Immunol*. 2001; 13:107–114.
 16. Peng C, Eckhardt LA. Role of the Igh intronic enhancer E μ in clonal selection at the pre-B to immature B cell transition. *J Immunol*. 2013; 191:4399–4411.
 17. Liu X, Manser T. Antinuclear antigen B cells that down-regulate surface B cell receptor during development to mature, follicular phenotype do not display features of energy *in vitro*. *J Immunol*. 2005; 174:4505–4515.
 18. Martin F, Kearney JF. Marginal zone B cells. *Nature Rev*. 2002; 2:323–335.
 19. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogné M, Pinaud E, Denizot Y. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J Biol Chem*. 2012; 287:8356–8360.
 20. Truffinet V, Pinaud E, Cogné N, Petit B, Guglielmi L, Cogné M, Denizot Y. The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J Immunol*. 2007; 179:6033–6042.
 21. Vincent-Fabert C, Truffinet V, Fiancette R, Cogné N, Cogné M, Denizot Y. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol*. 2009; 182:6926–6932.
 22. Rouaud P, Fiancette R, Vincent-Fabert C, Magnone V, Cogné M, Dubus P, Denizot Y. Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53 \pm mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget*. 2012; 3:586–593.
 23. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Rouaud P, Baudet C, Truffinet V, Magnone V, Guillaudeau A, Cogné M, Dubus P, Denizot Y. A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and c-myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma (MCL)-like lymphoma formation in mice. *Am J Pathol*. 2012; 180:1688–1701.

Discussion & Perspectives

Outre son intérêt physiologique lors de la maturation B, l'étude de la 3'RR a aussi une grande pertinence pour la compréhension de la lymphomagenèse B. Des modèles *Knock-out*, *Knock-in* et transgéniques ont révélé un rôle crucial de la 3'RR dans la lymphomagenèse B mature en la considérant comme un activateur puissant de la transcription des oncogènes transloqués au locus IgH (Truffinet *et al.*, 2007). L'effet régulateur de la 3'RR sur les oncogènes transloqués au locus IgH se fait même lorsque les points de cassure se trouvent à longues distances de celle-ci. D'un point de vue théorique, l'inhibition de la 3'RR pourrait fournir une stratégie thérapeutique pour le traitement d'une grande gamme de lymphomes B matures. Pour valider cette hypothèse nous avons posé les questions suivantes :

- 1- Les cellules B déficientes pour la 3'RR sont-elles capables d'engendrer une réaction inflammatoire normale *in vivo* ?
- 2- La 3'RR influence-t-elle la lymphomagenèse *in vivo*?

La réponse à la première question est oui (**Article 1**) : l'absence de la 3'RR affecte marginalement la formation d'ascite chez les souris BALB/c en réponse au pristane. La composition cellulaire du liquide d'ascite et sa cinétique d'apparition sont identiques à celles de souris BALB/c sauvages. La libération des cytokines pro- et anti-inflammatoires testées dans le liquide d'ascite (IL-6, IL-21, IL-12/23, IL-10, TNF- α et interféron- γ) est quasiment inchangée. Les résultats apportés par ce travail indiquent qu'une 3'RR fonctionnelle semble dispensable au recrutement efficace des cellules immunes lors de la réaction inflammatoire induite par du pristane. Nos résultats montrent également que la capacité des cellules B à « switcher » vers les différents isotypes d'Ig est dispensable à son développement. En outre ces travaux confirment, dans un fond génétique BALB/c, les travaux précédemment observés dans un fond génétique C57BL/6 sur le rôle de la 3'RR lors du « switch » et la synthèse d'Ig.

Perspectives

L'inflammation en réponse au pristane est limitée à la cavité péritonéale. Il serait intéressant

- **premièrement** : de tester d'autres modèles de réactions inflammatoires.
- **deuxièmement** : d'étudier le rôle de la 3'RR dans la formation de granulomes.

Des études ont montré que l'injection de pristane par une voie intrapéritonéale induit en 3 semaines la formation de granulomes au niveau du mésentère. Cette réaction peut être définie comme une réponse inflammatoire cellulaire protectrice de l'hôte contre les pathogènes et les

substances étrangères. Deux types de granulomes sont décrits : le granulome sérique localisé sur la paroi intestinale et le granulome mésentérique localisé au centre des tissus mésentériques (Chen *et al.*, 2010).

Le groupe de Chen a pu montrer que, chez des souris déficientes en cellules B, il y avait un blocage de la formation des granulomes sériques et une diminution de la formation des granulomes mésentériques (Chen *et al.*, 2010). Ceci suggère un rôle des cellules B dans la régulation de la formation des deux types de granulomes. Ce rôle a été schématisé dans la **Figure 22**.

Des résultats préliminaires montrent que la délétion de la 3'RR affecte l'apparition des granulomes sériques et mésentériques par comparaison à des souris BALB/c sauvages. L'analyse par cytométrie en flux de la composition cellulaire des granulomes dans les souris 3'RR déficientes montre la présence de macrophages (cellules CD11b⁺), une baisse en cellules T (cellules CD4⁺ et CD8⁺) et en cellules B matures (cellules B220⁺IgD⁺) (**Figure 23**).

Ces résultats très préliminaires, à confirmer et à affiner, montrent la nécessité de lymphocytes B totalement fonctionnels pour la formation de granulomes et révèlent, pour la première fois, que la délétion de la 3'RR affecte la capacité des lymphocytes à induire une réaction inflammatoire correcte.

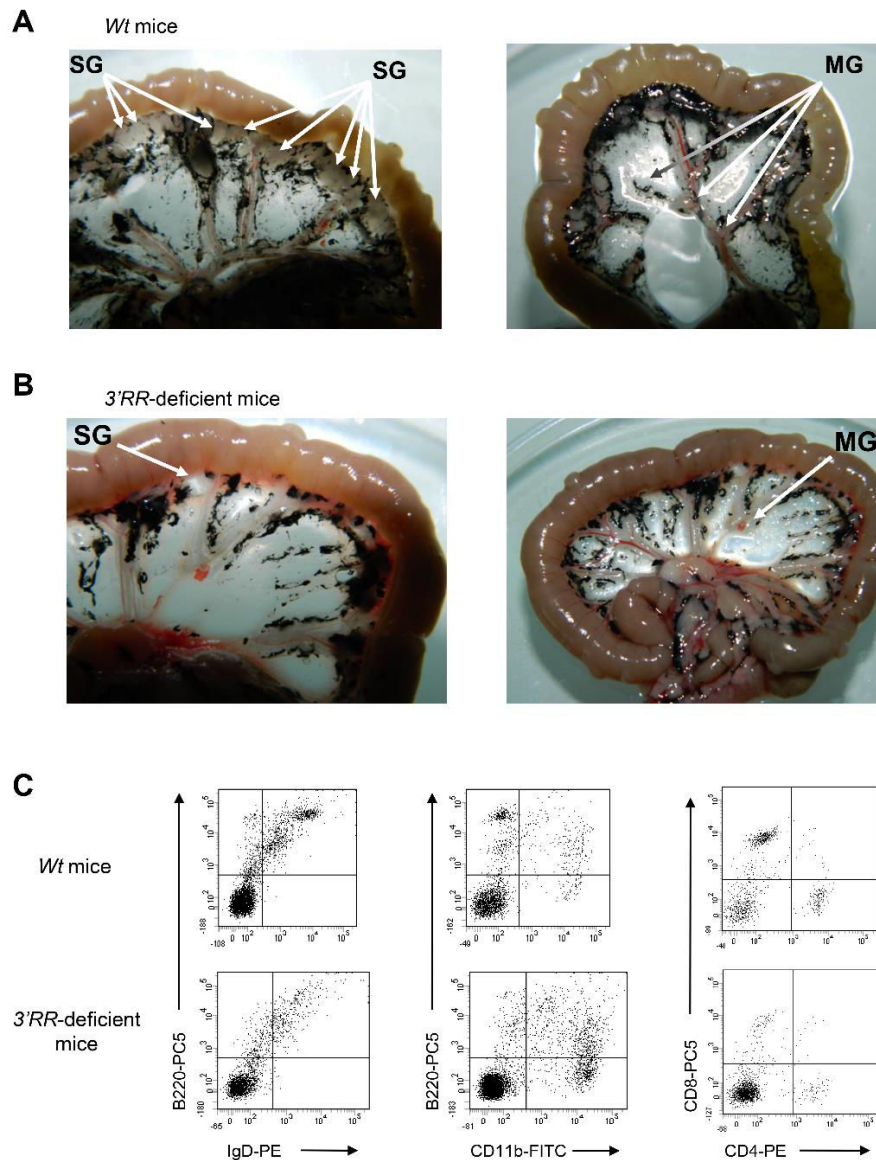


Figure 23 : La réponse granulomateuse chez les souris BALB/c déficientes pour la 3'RR.

Des souris BALB/c sauvages (*wt*) (**A**) et déficientes pour la 3'RR (**B**) ont reçu 500 μ l de pristane par voie intrapéritonéale. Ces souris, avant le sacrifice, ont reçu une injection d'encre de chine pour mieux visualiser les granulomes. L'ensemble du tissu intestinal mésentérique a été excisé et photographié. Les flèches blanches localisent les granulomes sériques ou mésentériques. (**C**): L'analyse par cytométrie en flux montre des cellules T ($CD4^+$ et $CD8^+$), des macrophages ($CD11b^+$) et des cellules B matures ($B220^+IgD^+$) dans le tissu granulomateux des souris BALB/c sauvages (*wt*) et des souris déficientes pour la 3'RR.

Pour ce qui concerne la deuxième question, la réponse est oui (**Article 2**). L'absence de la 3'RR chez les souris $Ig\lambda$ -Myc n'a pas d'effet direct sur les processus de lymphomagenèse mais son absence modifie la maturité tumorale. Les pourcentages de lymphomes B matures totaux ainsi que de lymphomes B matures activés ($CD43^+$) sont diminués chez ces souris. Ceci serait en relation avec une plus faible vitesse de maturation dans les cellules B déficientes pour la 3'RR et/ou une altération dans les « hits » induit par les SHM et les CSR. Le pourcentage élevé des lymphomes $CD5^+$ est surprenant et pourrait être expliqué par le rôle de l'antigène CD5 dans la transformation leucémique (Mageed *et al.*, 2012). Le CD5 est aussi associé avec le BCR où il intervient dans de multiples voies de signalisation.

Perspectives

Les résultats apportés par ce travail montrent que les lymphomes développés chez les souris $Ig\lambda$ -Myc sauvages ainsi que déficientes pour la 3'RR sont non mutés dans les régions V(D)J. Il serait intéressant de regarder la présence de mutations dans d'autres gènes cibles d'AID comme BCL6 et c-Myc. Ces expériences sont en cours au laboratoire. Elles devraient nous permettre de savoir si la 3'RR participe à l'émergence de lymphomes par l'intermédiaire de mutations additionnelles. Elles devraient également nous renseigner sur l'existence, ou non, de mutations particulières chez les lymphomes matures par rapport aux lymphomes immatures. Enfin, elles nous renseigneront plus précisément sur le statut pré ou post centre germinatif des lymphomes murins générés.

Le pourcentage de lymphome B $CD5^+$ est augmenté chez les souris $Ig\lambda$ -Myc en absence de la 3'RR. Il serait intéressant d'étudier plus précisément le rôle de la 3'RR sur la maturation des cellules B $CD5^+$ et le rôle de ce marqueur de surface dans les voies de signalisation des lymphocytes B déficients pour la 3'RR. Bientôt il va être entrepris, au laboratoire, une étude sur le rôle de la 3'RR lors de la maturation des cellules B1a, B1b et B2. Nous utiliserons le même protocole que pour « l'article 4 » sur le rôle de la 3'RR sur le devenir du lymphocyte B. Nous étudierons l'impact de la délétion de la 3'RR chez les souris hétérozygotes $IgH a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ par comparaison aux souris $IgH a^{wt}/b^{wt}$. Des marquages en cytométrie de flux seront réalisés sur les lymphocytes B du péritoine, de la moelle et de la rate pour étudier la présence des cellules B1a ($IgM^{high}IgD^{low}B220^{low}CD11b^+CD23^-CD5^+$), B1b ($IgM^{high}IgD^{low}B220^{low}CD11b^+CD23^-CD5^-$) et B2 ($IgM^{low}IgD^{high}B220^{high}CD11b^-CD23^+CD5^-$). Ces expériences nous permettront de savoir si la 3'RR régule de la même façon le devenir des cellules B $CD5^+$ et $CD5^-$.

Nos expériences ont renforcé nos connaissances sur le rôle potentiel de la 3'RR dans la lymphomagenèse. Cependant si l'utilisation d'un transgène est une méthode simple et efficace pour étudier une dérégulation oncogénique, elle n'est pas la plus physiologique. L'insertion de c-myc par « *Knock-in* » au locus IgH réalisée par le groupe de Janz (Park *et al.*, 2005a ; Park *et al.*, 2005b) reste de loin la plus « physiologique » pour étudier le rôle des éléments *cis*-régulateurs du locus IgH sur la dérégulation oncogénique. Cette insertion de c-myc, juste devant E μ , induit après quelques mois, l'apparition de lymphomes B matures. Il serait intéressant de comprendre *in vivo* les interactions transcriptionnelles entre, d'une part, E μ et la 3'RR dans un contexte normal et leucémique et, d'autre part, les interactions entre l'oncogène transloqué avec E μ et la 3'RR. Pour ce faire, trois lignées transgéniques vont être développées au laboratoire. Elles consistent en l'insertion de c-myc au locus IgH dans un contexte normal ou déficient pour E μ ou la 3'RR (**Figure 24**). Les cellules embryonnaires murines portant la délétion de la 3'RR (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a) ou d'E μ (Marquet *et al.*, 2014) seront utilisées pour faire un « *knock-in* » de c-myc au locus IgH pour voir l'impact exact des activateurs E μ et 3'RR sur la surexpression de c-myc et l'émergence de lymphomes. Nous pourrions ainsi répondre à des questions importantes comme : L'absence de E μ ou de la 3'RR modifie-t-elle la cinétique d'apparition des lymphomes B? L'absence de E μ ou de la 3'RR modifie-t-elle le phénotype des lymphomes obtenus (pro-B/pre-B, B immature, B mature, plasmocytaire)? L'absence d'E μ ou de la 3'RR modifie-t-elle l'index de prolifération et les signatures transcriptomiques et mutationnelles des lymphomes? Comment communiquent E μ et la 3'RR en condition normales et leucémiques? L'absence de E μ perturbe-t-elle le fonctionnement de la 3'RR et réciproquement? Ce projet permettra la mise au point de nouveaux outils méthodologiques pour l'étude des interactions E μ -3'RR et ouvrira un nouveau champ de recherche sur la dérégulation oncogénique lors des lymphomes. Un blocage pharmacologique de l'une ou l'autre de ces entités activatrices (ou un arrêt de leur coopération) pourrait se révéler une approche prometteuse pour le traitement de certains lymphomes. Notre hypothèse est qu'E μ et la 3'RR influencent la conformation de la chromatine et ainsi son activité transcriptionnelle. La modification du « code chromatinien » (acétylation et méthylation des histones) pourrait influencer sur les fonctions activatrices de ces deux éléments. Ainsi l'histone déacétylase HDAC1 est recrutée par la 3'RR et son activité modifie la transcription du locus IgH via celles de E μ et de la 3'RR, confirmant le lien entre la 3'RR et la modification des histones (Lu *et al.*, 2005). La trichostatine A, un inhibiteur des HDACs diminue la transcription au locus IgH en diminuant spécifiquement l'activité transcriptionnelle des éléments E μ et 3'RR (Lu *et al.*, 2005). Le ciblage spécifique de la 3'RR par des inhibiteurs de HDACs pourrait ainsi se révéler une approche potentielle pour réduire l'augmentation transcriptionnelle oncogénique observée dans les lymphomes B matures (Lu *et al.*, 2005).

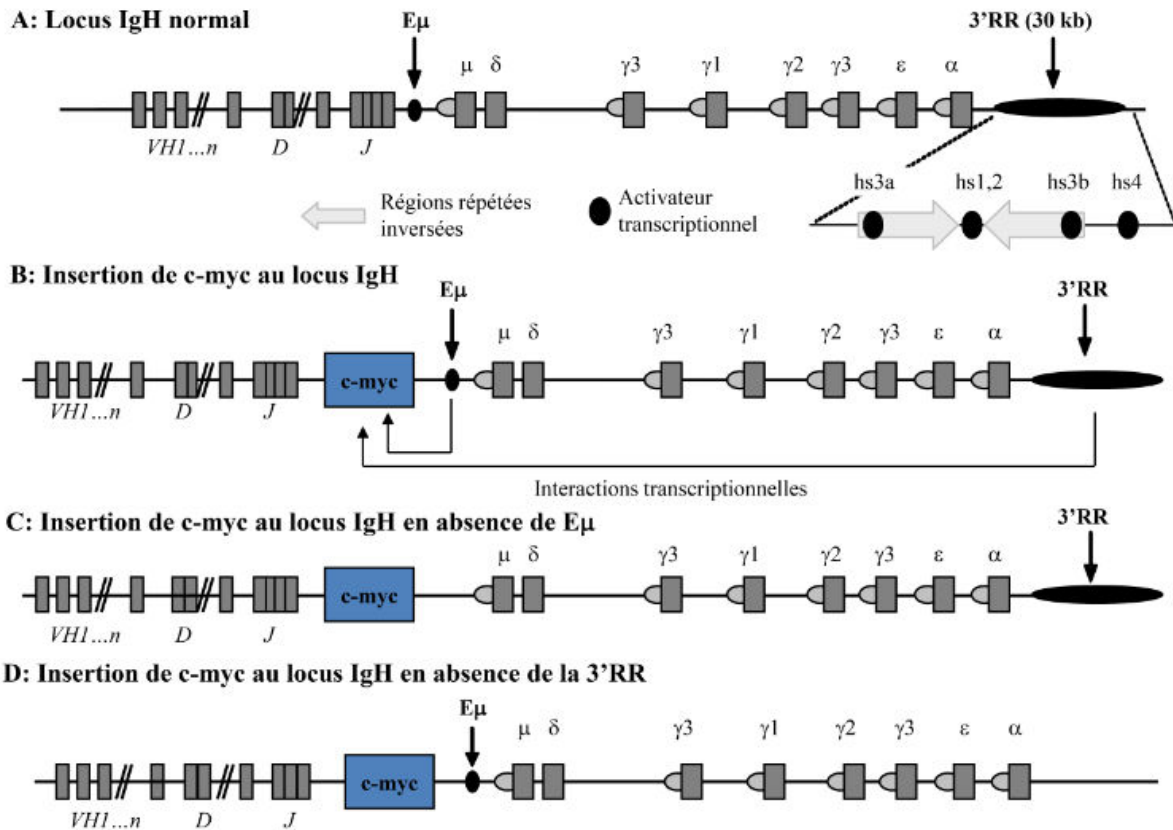


Figure 24 : Lignées transgéniques surexprimant c-myc.

A. Représentation schématique du locus IgH de la souris avec les segments variables (VDJ), les segments constants (μ , δ , $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, $\gamma 3$, ϵ et α) et les activateurs transcriptionnels $5'E\mu$ et $3'RR$ repartis sur 30 kb (schéma non à l'échelle). **B.** Insertion par « *Knock in* » de l'oncogène c-myc au locus IgH sur un allèle normal. **C.** Insertion de l'oncogène c-myc sur un allèle déficient pour $5'E\mu$. **D.** Insertion de l'oncogène c-myc sur un allèle déficient pour la $3'RR$.

Annexes

Mes travaux de thèse sur les articles 1 et 2 ont fait l'objet de deux éditoriaux dans la revue « Cell Cycle » (**Article 5**) et (**Article 6**)

Article 5

3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy.

Alexis Saintamand, Faten Saad, Yves Denizot.

Cell Cycle, 2015, volume14, numéro 6, pages 1-3.

La 3'RR est capable de déréguler c-myc et d'induire l'apparition de lymphomes matures ([Truffinet et al., 2007](#)). De même, plusieurs études ont rapporté les interactions entre la 3'RR et des oncogènes transloqués au locus d'IgH. L'inhibition de la 3'RR pourrait être une stratégie thérapeutique potentielle pour certains lymphomes B matures sans avoir un effet significatif sur les réponses immunes et inflammatoires normales. L'analyse des souris BALBc/3'RR-déficientes a montré qu'en absence de la 3'RR, des réactions inflammatoires et immunes quasi-normales en réponse au pristane. Ceci renforce l'hypothèse que le ciblage de la 3'RR pourrait être une approche intéressante pour diminuer son activité transcriptionnelle pro-oncogénique et ainsi lutter contre l'émergence d'un lymphome.

This article was downloaded by: [Université de Limoges]

On: 23 March 2015, At: 08:52

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Cell Cycle

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/kccy20>

3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy?

Alexis Saintamand, Faten Saad^a & Yves Denizot^a

^a CNRS UMR 7276; CRIBL; Université de Limoges; Limoges, France

Published online: 19 Mar 2015.



CrossMark

[Click for updates](#)

To cite this article: Alexis Saintamand, Faten Saad & Yves Denizot (2015) 3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy?, *Cell Cycle*, 14:6, 789-790

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1010964>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy?

Alexis Saintamand, Faten Saad, and Yves Denizot*

CNRS UMR 7276; CRIBL; Université de Limoges; Limoges, France

During precursor B-cell differentiation, heavy (H) and light chain genes of an immunoglobulin (Ig) molecule are somatically assembled from germline DNA. This V(D)J recombination process occurs in the bone marrow prior to antigenic challenge (Fig. 1). In germinal centers, variable (V) regions become the target of somatic hypermutation (SHM) in activated B-cells generating high-affinity Ig (Fig. 1). In mature B-cells, class-switch recombination (CSR) deletes the constant (C) μ region and replaces it with a downstream C_H gene. This enables B-cells to express various Ig isotypes without affecting antigen specificity (Fig. 1). Once activated, B-cells differentiate into Ig-secreting plasma cells. During B-cell development, V(D)J recombination, SHM, CSR and Ig synthesis are coupled with transcriptional accessibility of the IgH loci. IgH transcription is controlled by complex functional interactions of multiple enhancers, promoters and insulators spread among the 2.5 megabases of the locus. Among them, the 3' regulatory region (3'RR) stands out as a major player during late stages of B-cell maturation (*i.e.*, SHM, CSR and Ig synthesis).^{1,2}

Ongoing recombination and mutation all along B-cell development make the IgH locus a hotspot for translocations. Numerous lymphomas are marked by proto-oncogene translocation into the IgH locus. Cyclin D1 and Bcl-2 translocations, found respectively in mantle cell lymphoma and follicular lymphoma, take place during the V(D)J recombination. Cyclin D1/D3 or *c-maf* translocations

observed in myeloma are obviously linked to CSR. *c-myc* translocation, the typical hallmark of Burkitt lymphoma, is linked to SHM or CSR. The mouse 3'RR, located downstream of the IgH $C\alpha$ gene, shares a strong structural homology with the regulatory regions located downstream of each human IgH $C\alpha$ gene ($C\alpha 1$ and $C\alpha 2$). Mouse models exploring the role of the 3'RR in B-cell physiology and in B-cell malignancies should provide useful indications about the pathophysiology of human B-cell proliferations. Convincing demonstration of the key contribution of the 3'RR in mature B-cell lymphomagenesis has been done by transgenic animal models. *c-myc*-3'RR transgenics developed Burkitt lymphoma-like proliferation,³ and the knock-in of a 3'RR cassette upstream of the endogenous *c-myc* gene induced B-cell lymphomas.⁴ Interestingly the phenotype of lymphoproliferations induced by the *c-myc*-3'RR transgene is affected by the presence of associated mutations in key cell cycle dependent genes such as p53 or Cdk4.⁵

Knock-out models have clarified the functions of the 3'RR as essential for high-rate IgH transcription at the plasma cell stage.² 3'RR may thus be a potent activator of IgH-translocated oncogene transcription, even when the breakpoints lie several hundred kb away from the 3'RR. Long-range interactions between the 2 regions of chromatin, through formation of a loop structure, constitute an important mechanism of normal and abnormal gene transcription regulation by the 3'RR. Studies have reported interactions between the 3'RR and the IgH

variable region in normal and lymphoma-genetic contexts. Therefore, targeted inhibition of the 3'RR could theoretically provide a therapeutic strategy for the treatment of a wide range of mature B-cell lymphomas. However, the first step before considering the 3'RR as a potential suitable target for anti-lymphoma pharmacological therapy is to demonstrate the innocuousness of such an approach, and notably the absence of potent adverse effect on normal immune and inflammatory B-cell mediated responses. Induction of negative alterations on the physiological anti-lymphoma immune or inflammatory networks would be obviously a counterproductive approach. We have recently tested this prerequisite by investigating the *in vivo* pristane-induced inflammatory response in 3'RR-deficient BALB/c and *wt* BALB/c mice.⁶ The lack of the 3'RR in BALB/c mice has no significant effect on the incidence, the kinetic of development and the cellular composition (IgM⁺IgD⁺ B-cells, CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells, monocyte/macrophage cells) of peritoneal ascites. Moreover ascite pro- and anti-inflammatory cytokine levels (IL-6, IL-21, IL-12/23, TNF- α IL-10, interferon- γ) are unaffected by the 3'RR-deficiency. Thus, a fully functional 3'RR is dispensable for the efficient recruitment of immune cells and the development of a normal inflammatory response in the *in vivo* pristane-induced inflammatory model.

In conclusion, the 3'RR is considered as a major lymphoma oncogene deregulator,³⁻⁵ and its deletion has no effect on immune and inflammatory responses in

*Correspondence to: Yves Denizot; Email: yves.denizot@unilim.fr

Submitted: 11/20/2014; Accepted: 11/20/2014

<http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1010964>

Comment on: Saad F, et al. Targeting the oncogene B lymphoma deregulator IgH 3' regulatory region does not impede the *in vivo* inflammatory response in mice. *Oncoscience* 2014; 1: 591-8; PMID:25594069.

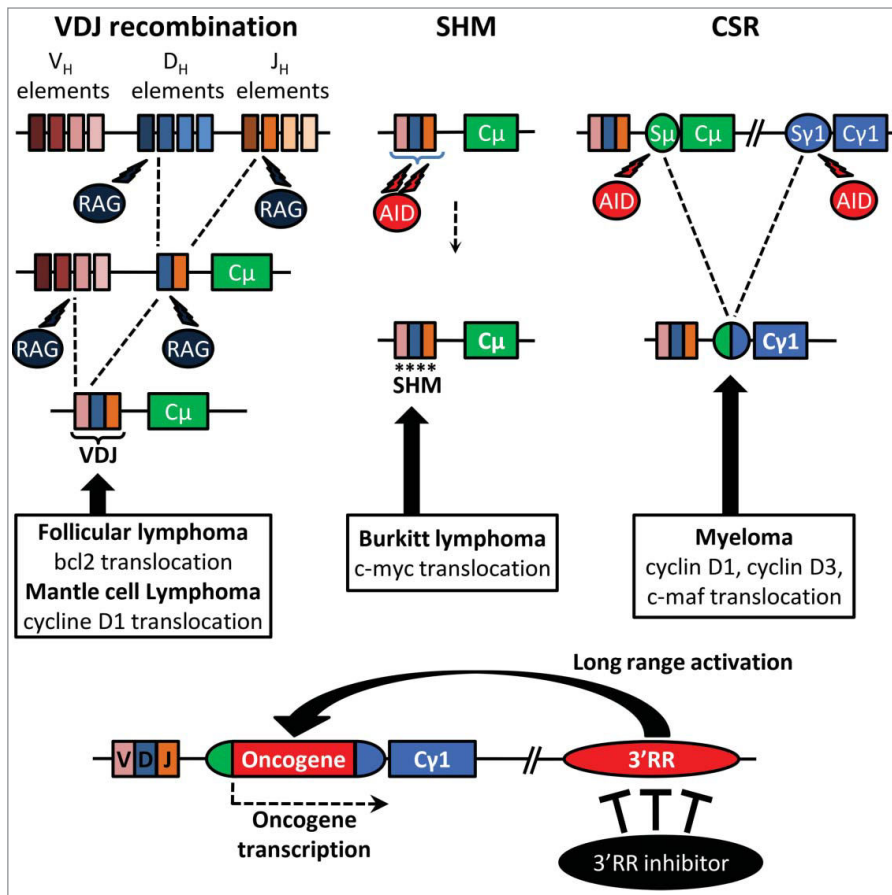


Figure 1. DNA recombination and mutations occur during B-cell maturation. RAG-induced (during VDJ recombination) and AID-induced (during CSR and SHM) DNA breaks are potential sites of oncogene translocations. The IgH 3'RR may act as an oncogene deregulator by its long range transcriptional activity. Targeting 3'RR transcriptional activity might be a therapeutic strategy for the treatment of mature B-cell lymphomas.

the pristane mouse model. It is, thus, tempting to speculate that the 3'RR might be considered as a potential suitable target for anti-lymphoma pharmacological therapy without significant impact on the normal immune and inflammatory networks. Previous results have reported that the 3'RR is a sensitive immunological target and that 3'RR activation and transcriptional activity can be altered by a diverse range of chemicals, including ones with anti-carcinogenic properties such as isothiocyanates,⁷ strengthening the hypothesis that altering 3'RR activity by chemicals could modulate the occurrence and severity of lymphomas. A limitation of the pristane mouse model is that inflammation is restricted to the peritoneal cavity. It is of evidence that other mouse models of inflammatory reactions must be tested before definitive validation of this hypothesis. Finally given the strong sequence homology between human and mouse 3'RR enhancers, mouse models could reveal useful tools for an *in vivo* study of lymphoma treatments based on IgH 3'RR down-regulation.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

References

- Vincent-Fabert C, et al. *Blood* 2010; 116:1895-8; PMID:20538806; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-264689>
- Rouaud P, et al. *J Exp Med* 2013; 210:1501-7; PMID:23825188; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20130072>
- Truffinet V, et al. *J Immunol* 2007; 179:6033-42; PMID:17947677; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6033>
- Wang J, et al. *J Biol Chem* 2006; 280:12766-73; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M412446200>
- Rouaud P, et al. *Oncotarget* 2012; 3:586-93; PMID:22592113
- Saad F, et al. *Oncoscience* 2014; 1:591-8; PMID:25594069
- Henseler RA, et al. *Toxicology* 2009; 261:9-18; PMID:19447539; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.03.015>

Article 6

A new 3'RR regulatory role during lymphomagenesis.

Alexis Saintamand, Faten Saad, Yves Denizot.

Cell Cycle, 2015 Apr 30:0. [Epub ahead of print]

Les souris Igλ-Myc ont permis de mettre en évidence le rôle potentiel de la 3'RR dans la lymphomagenèse tardive au travers de ses effets sur les processus de SHM et de CSR. Lors de ceux-ci, des mutations additionnelles dépendantes de la 3'RR, se produiraient conduisant à l'émergence de lymphomes B matures.

En plus des travaux menés sur le rôle de la 3'RR dans les processus immuns et inflammatoires et sur le développement des lymphomes, j'ai également participé, durant ma thèse, à la mise en évidence de la CSR vers IgD chez la souris (**Article 7**) dont la majeure partie des expérimentations a été réalisée par Pauline Rouaud dans le cadre de sa thèse.

This article was downloaded by: [Université de Limoges]

On: 11 June 2015, At: 02:15

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK

CellCycle



Cell Cycle

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/kccy20>

A new 3'RR regulatory role during lymphomagenesis

Alexis Saintamand^a, Faten Saad^a & Yves Denizot^a

^a UMR CNRS 7276; CRIBL; Université de Limoges; France

Accepted author version posted online: 30 Apr 2015. Published online: 30 Apr 2015.



[Click for updates](#)

To cite this article: Alexis Saintamand, Faten Saad & Yves Denizot (2015): A new 3'RR regulatory role during lymphomagenesis, Cell Cycle, DOI: [10.1080/15384101.2015.1046789](https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1046789)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1046789>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

A new 3'RR regulatory role during lymphomagenesis

Alexis Saintamand, Faten Saad, and Yves Denizot*

UMR CNRS 7276; CRIBL; Université de Limoges; France

During B-cell ontogeny and maturation, Ig loci undergo successive transcription coupled remodeling events: V(D)J recombination and class switch recombination (CSR) for the IgH locus, and VJ recombination for IgL loci. Both loci also undergo somatic hypermutation (SHM) to improve antibody affinity. RAG-mediated V(D)J recombination occurs during the early antigen-independent step of B-cell development. AID-mediated CSR and SHM occur later, and require interaction with cognate antigen. These transcription-induced events involve a succession of DNA breaks and repairs, and thus represent potentially oncogenic events, hence implying a strict regulation. Ig *cis*-regulatory elements and especially transcriptional enhancers are major locus regulators. While 5' *cis*-regulatory elements (E μ and E κ for IgH and Igk locus, respectively) control V(D)J recombination, SHM is controlled by the IgH 3' regulatory region (3'RR)¹ (for IgH locus) and the 3'E κ (for Igk locus). The 3'RR is also the master regulator of CSR.² Although less documented, transcriptional enhancers are present in the Ig λ locus.³ Chromosomal translocations linking oncogenes to these elements are implicated in various B-cell malignancies.^{3–5}

If the deregulation of the translocated oncogene by enhancer elements located in *cis* was extensively studied,^{4,5} little is known about a potential *trans* effect of the Ig enhancers, for example the role of the IgH 3'RR on lymphomagenesis caused by an oncogene

translocation to the IgL locus. Indeed, studies have shown that deletion of the 3'RR modulates the B-cell fate by lowering the BCR signaling,⁶ which is of key importance in B-cell malignancies. We recently studied the impact of the absence of the 3'RR in mice carrying a transgene mimicking the translocation of *c-myc* under the transcriptional control of the Ig λ enhancers.⁷ Our results indicate a wide alteration of B-cell lymphoma phenotypes. While *wt* mice indifferently develop mature or immature lymphomas, 3'RR-deficient mice exhibit a strong preference for immature lymphomas. Furthermore, 3'RR-deficiency leads to a lowered frequency of CD43⁺ activated mature B-cell lymphomas and to an increased frequency of CD5⁺ B-cell lymphomas. Transcription level of the *c-myc* transgene is identical in B-cell lymphomas from *wt* and 3'RR-deficient mice, suggesting that the 3'RR does not directly regulate the expression of the oncogene bring under the control of the Ig λ enhancers.⁷

Two main models are suggested to explain the heterogeneity of B-cell malignancies: the various tumor subtypes may arise from different mutations within the same target B-cell or from the same mutation occurring during different stages of B-cell differentiation. Although these models are not mutually exclusive, our results reinforce the second hypothesis that the same initial oncogenic event occurring in B-cells with different maturity degree can lead to different B-lymphoma subtypes.

Indeed, while *wt* and 3'RR deficient mice bear the same “mini-locus translocation” (*i.e.* *c-myc* under the transcriptional control of Ig λ enhancers), they develop different tumor subtypes. The only difference that could explain this variation is the slightly altered B-cell maturation and the abolition of CSR and SHM in 3'RR-deficient mice. B-cells from both genetic backgrounds over express the *myc* oncogene, but need to accumulate secondary mutations to develop B-cell lymphomas (Fig. 1). Secondary mutations principally occur during the different genetic events that punctuate B-cell ontogeny. In *wt* B-cells, these oncogenic events can occur either during early step of maturation (*i.e.*, during V(D)J recombination) or during the later stages (*i.e.* during CSR or SHM). CSR and SHM are abrogated in 3'RR-deficient mice,^{1,2} lowering the probability of oncogenic mutations during these later stages of B-cell maturation, hence their increased frequency of immature B-cell lymphomas as compared with *wt* mice.

Taken together (Fig. 1), our results confirm the importance of considering both the cell of origin and the genetic alterations to determine the B-cell lymphoma phenotype and its behavior. Indeed, B-cells bearing the same initial oncogenic events can lead to different B-cell lymphoma subtypes if their development is impaired, while different mutations occurring in the same cell of origin can induce similar tumors.⁴ In this context, we also show that the 3'RR can affect the phenotype of B-cell

*Correspondence to: Yves Denizot; Email: yves.denizot@unilim.fr

Submitted: 04/24/2015; Accepted: 04/28/2015

<http://dx.doi.org/10.1080/15384101.2015.1046789>

Comment on: Saad F, et al. The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Ig λ Myc mice. *Oncotarget* 2015; PMID:25742787.

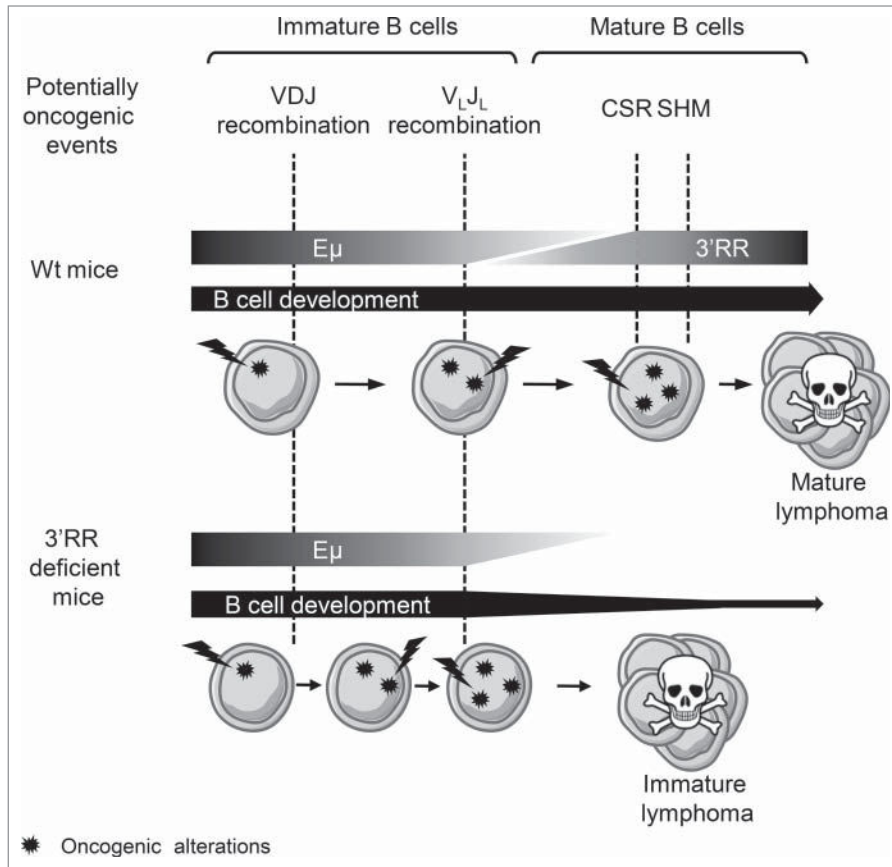


Figure 1. Schematic hypothesis on the implication of the 3'RR in the development of B-cell lymphomas induced by oncogene translocation in IgL locus. While not directly impacting the expression of the translocated oncogene, the absence of the 3'RR modifies B-cell lymphoma phenotypes by impairing the later steps of B-cell ontology.

lymphomas due to oncogene translocation in other loci than the IgH one, by acting on B-cell maturation and regulating potentially oncogenic recombination and mutations during late B-cell differentiation.

References

1. Rouaud P, et al. *J Exp Med* 2013; 21:1501-7; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20130072>
2. Vincent-Fabert C, et al. *Blood* 2010; 116:1895-8; PMID:20538806; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-264689>
3. Gerbitz A, et al. *Oncogene* 1999; 4:1745-53; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1202468>
4. Rouaud P, et al. *Oncotarget* 2012; 3:586-93; PMID:22592113
5. Amin R, et al. *Oncotarget* 2014; 5:8995-9006; PMID:25229630
6. Saintamand A, et al. *Oncotarget* 2015; 6:4845-52; PMID:25742787
7. Saad F, et al. *Oncotarget* 2015; PMID:25742787

Article 7

Elucidation of the enigmatic IgD class switch recombination via germ-line deletion of the IgH 3' regulatory region.

Pauline Rouaud, Alexis Saintamand, Faten Saad, Claire Carrion, Sandrine Lecardeur, Michel Cogné, Yves Denizot.

The Journal of Experimental Medicine, 2014, volume 211, numéro 5, pages 975-985.

La 3'RR est le principal élément régulateur de la CSR vers γ , ϵ et α (Vincent-Fabert *et al.*, 2010a). Peu de données sont disponibles sur la CSR vers IgD. Le but de ce travail a été de déterminer si la 3'RR est impliquée dans cette CSR. Après amplification (par PCR) puis clonage et séquençage, il a été montré l'existence d'une CSR de μ vers δ dans les ganglions mésentériques de souris normales. Celle-ci utilise S_{μ} et une petite région acceptrice $\sigma\delta$ présente devant $C\delta$ pour se réaliser. Curieusement cette CSR vers δ est amplifiée en absence de la 3'RR. L'hypothèse est que le blocage quasi-total de la CSR vers γ , ϵ et α démasque celle vers δ .

Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region

Pauline Rouaud,¹ Alexis Saintamand,¹ Faten Saad,¹ Claire Carrion,¹ Sandrine Lecardeur,¹ Michel Cogné,^{1,2} and Yves Denizot¹

¹UMR CNRS 7276, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Limoges, 87025 Limoges, France

²Institut Universitaire de France, 75000 Paris, France

Classical class-switch recombination (cCSR) substitutes the C_μ gene with C_γ , C_ϵ , or C_α , thereby generating IgG, IgE, or IgA classes, respectively. This activation-induced deaminase (AID)-driven process is controlled by the IgH 3' regulatory region (3'RR). Regulation of rare IgD CSR events has been enigmatic. We show that $\mu\delta$ CSR occurs in mouse mesenteric lymph node (MLN) B cells and is AID-dependent. AID attacks differ from those in cCSR because they are not accompanied by extensive somatic hypermutation (SHM) of targeted regions and because repaired junctions exhibit features of the alternative end-joining (A-EJ) pathway. In contrast to cCSR and SHM, $\mu\delta$ CSR is 3'RR-independent, as its absence affects neither breakpoint locations in S_μ - and S_δ -like (σ_δ) nor mutation patterns at S_μ - σ_δ junctions. Although mutations occur in the immediate proximity of the $\mu\delta$ junctions, SHM is absent distal to the junctions within both S_μ and rearranged VDJ regions. In conclusion, $\mu\delta$ CSR is active in MLNs, occurs independently of 3'RR-driven assembly, and is even dramatically increased in 3'RR-deficient mice, further showing that its regulation differs from cCSR.

After functional V(D)J recombination, bone marrow immature B cells express a BCR made up of surface IgM. In secondary lymphoid organs, mature B cells simultaneously express surface IgD of the same specificity as surface IgM through alternative splicing of a pre-mRNA composed of V(D)J and both C_μ and C_δ heavy chain constant exons (Moore et al., 1981; Preud'homme et al., 2000; Chen and Cerutti, 2010). After encountering antigen, in adequate lymphoid tissue structures providing accessory signals (direct interactions with T cells and follicular dendritic cells and binding of cytokines secreted by such cells), activated B cells undergo classical class-switch recombination (cCSR) and substitute the C_μ gene with C_γ , C_α , or C_ϵ , thereby generating secondary IgG, IgA, and IgE BCR and antibody classes with the same antigenic specificity but new effector functions. This recombination targets specific stretches of repetitive DNA (S regions) preceding C_μ and all C_γ , C_α , and C_ϵ genes and requires the DNA-editing enzyme activation-induced deaminase (AID; Pavri and Nussenzweig, 2011). Transcription and, to

an even higher extent, accessibility of the IgH locus S regions to cCSR is under the control of the IgH 3' regulatory region (3'RR), located downstream of C_α , and encompassing the four transcriptional enhancers $hs3a$, $hs1,2$, $hs3b$, and $hs4$ (Vincent-Fabert et al., 2010a; Pinaud et al., 2011). Genomic disruption or complete deletion of the 3'RR in the mouse abrogates cCSR to all IgG, IgA, and IgE classes (Vincent-Fabert et al., 2010a,b; Pinaud et al., 2011). Recently the 3'RR was also reported to be transcribed and itself undergo AID-mediated mutation and recombination around phylogenetically conserved switch-like DNA repeats, highlighting its close functional partnership with AID (Péron et al., 2012).

Despite the absence of a repetitive S region upstream of C_δ and similar to class switching from IgM to IgG, IgA, and IgE, some CD38⁺ human B cells from tonsils carry an IgH locus switched to IgD expression after an AID-mediated deletion

CORRESPONDENCE

Yves Denizot:
yves.denizot@unilim.fr

Abbreviations used: 3'RR, 3' regulatory region; A-EJ, alternative end-joining; AID, activation-induced deaminase; cCSR, classical class-switch recombination; C-NHEJ, classical nonhomologous end joining; DSB, double-strand break; GC, germinal center; LM-PCR, ligation-mediated PCR; MLN, mesenteric LN; SHM, somatic hypermutation.

P. Rouaud and A. Saintamand contributed equally to this paper.

© 2014 Rouaud et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jem.rupress.org/content/suppl/2014/04/18/jem.20131385.DC1.html>

of C_μ (Arpin et al., 1998; Brandtzaeg and Johansen, 2005; Johansen et al., 2005; Chen et al., 2009). Secreted IgD originating from such cells with CSR from C_μ to C_δ ($\mu\delta$ CSR) enhances immune surveillance and can exert proinflammatory and antimicrobial effects (Chen et al., 2009). Although there is no canonical switch region 5' to the C_δ gene in mammals (Preud'homme et al., 2000; Chen and Cerutti, 2010), rudimentary S_δ -like (σ_δ) sequences have been described at C_μ - C_δ junctions but CSR from μ to δ stands as a rare event whose regulation is obscure (Chen and Cerutti, 2010). To explore the role of the 3'RR on such C_μ - C_δ recombinations, in the context of the endogenous locus, we analyzed IgH 3'RR-deficient mice lacking the 30-kb extent of the 3'RR, a deletion which we previously characterized as inducing a severe cCSR defect toward IgG, IgA, and IgE (Vincent-Fabert et al., 2010b), a severe somatic hypermutation (SHM) defect (Rouaud et al., 2013) but with normal V(D)J recombination (Rouaud et al., 2012).

RESULTS

IgD secretion in mice occurs at low levels and is poorly understood. Germline transcription of I_μ - C_μ enrolls the S_μ regions as a substrate for DNA modification by the cCSR machinery including AID (Chen and Cerutti, 2010). I_μ - C_δ transcripts can originate either from alternate splicing of a pre-mRNA encompassing C_μ and C_δ exons or from primary C_δ transcripts after $\mu\delta$ CSR. Fig. 1 schematizes these processes and locates PCR primers and probes used in this study.

$\mu\delta$ CSR occurs in normal mesenteric LNs (MLNs) of *wt* mice and 3'RR-deficient mice

$\mu\delta$ CSR is currently not documented in mice (Chen and Cerutti, 2010). Although little is known about the role of soluble IgD in physiology, a well-known inflammatory disease in humans features high serum IgD levels and was thus called hyper-IgD syndrome, a disease also featuring enlargement of MLNs (Oretti et al., 2006). In a search for IgD⁺IgM⁻ cells after $\mu\delta$ CSR in *wt* mice, we thus focused our attention on MLN B cells. S regions consist of tandem repeats of short G-rich sequences. While readily showing S_μ repeats, dot plot analysis of the mouse DNA fragment encompassing the E_μ enhancer to C_δ only revealed few DNA repeats upstream of C_δ in a short 0.5-kb-long region that was thereby named σ_δ (Preud'homme et al., 2000; Fig. 2 A). Using a nested PCR-based strategy (location of primers in Fig. 1) followed by Southern blotting (location of the probe in Fig. 1) of PCR products, we were able to detect S_μ - σ_δ junctions as a result of S_μ to σ_δ CSR (Fig. 2 B). We definitely authenticated S_μ - σ_δ junctions by cloning them and analyzing their sequences (Fig. 2 C and Table S1). Because 3'RR-deficient mice are known to be almost completely defective for cCSR (Vincent-Fabert et al., 2010b), we also checked them for $\mu\delta$ CSR. To our surprise, Southern blotting of PCR product revealed the presence of S_μ - σ_δ junctions as a result of S_μ to σ_δ CSR (Fig. 2 B). These junctions were again authenticated by cloning and sequencing (Fig. 2 C and Table S1).

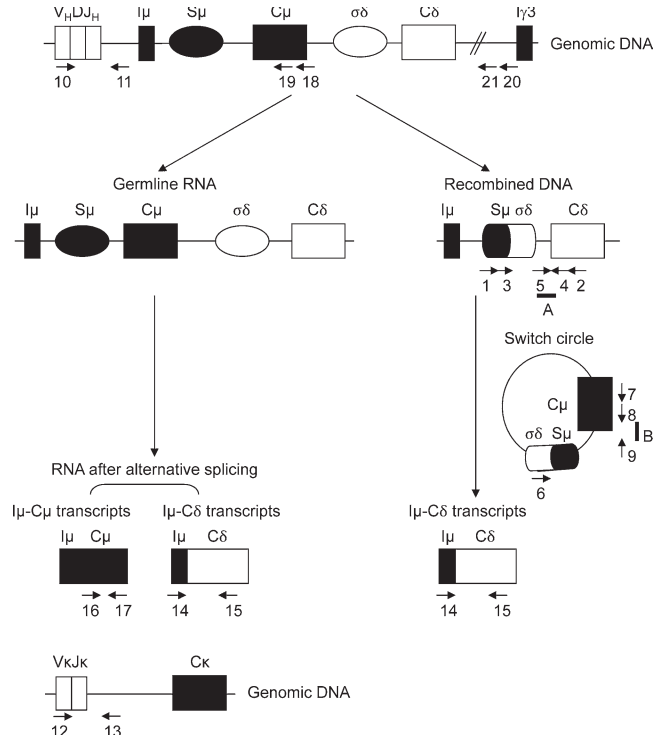


Figure 1. Two pathways for IgD synthesis. IgD can originate either from the alternate splicing of a pre-mRNA encompassing C_μ and C_δ exons (left) or from primary C_δ transcripts after $\mu\delta$ CSR (right). CSR from S_μ to σ_δ includes germline I_μ - C_μ and I_μ - C_δ transcripts and σ_δ - S_μ switch circles. Arrows located primers used in the study. Numbers and letters refer to the indicated primers and probes, respectively, as reported in Materials and methods.

Molecular features of $\mu\delta$ CSR junction sequences

The locations of S_μ - σ_δ breaks in S_μ and σ_δ for *wt* mice and 3'RR-deficient animals are reported in Fig. 2 D. Among S_μ - σ_δ junctions in *wt* mice (Fig. 2 C and Table S1), 13/21 (61.9%) showed 1–8-bp-long junctional microhomology. Complex junctions were also frequent (6/21, 28.6%). Similarly to *wt* mice, junctions with short nucleotide insertions and complex junctions were found in 3'RR-deficient mice. Junctions with microhomologies 1–8 bp long represented 45.7% (16/35) of junctions (Fig. 2 C and Table S1). Complex junctions represented 31.4% (11/35) of junctions. Direct S_μ - σ_δ joining was slightly increased in 3'RR-deficient mice (7/35, 20%) as compared with *wt* mice (2/21, 9.2%). To compare $\mu\delta$ CSR junctions cloned from MLN cells from *wt* mice with cCSR junctions, splenocytes from *wt* mice were stimulated with LPS or LPS + IL4 to generate C_μ - $C_{\gamma3}$ and C_μ - $C_{\gamma1}$ cCSR, respectively (Vincent-Fabert et al., 2009). Sequences of S_μ - $C_{\gamma3}$ and S_μ - $C_{\gamma1}$ junctions resulting from S_μ to $S_{\gamma3}$ and $S_{\gamma1}$ cCSR were reported in Fig. 2 C and Table S1. Features of S_μ - S_γ CSR junctions (i.e., relative frequencies of direct joints, microhomologies, insertions, and complex junctions) were similar to those classically reported (Stavnezer et al., 2010). Sequences from S_μ - σ_δ junctions of *wt* mice showed strikingly different features in that they more rarely exhibited a direct joining (2/21, 9.5%)

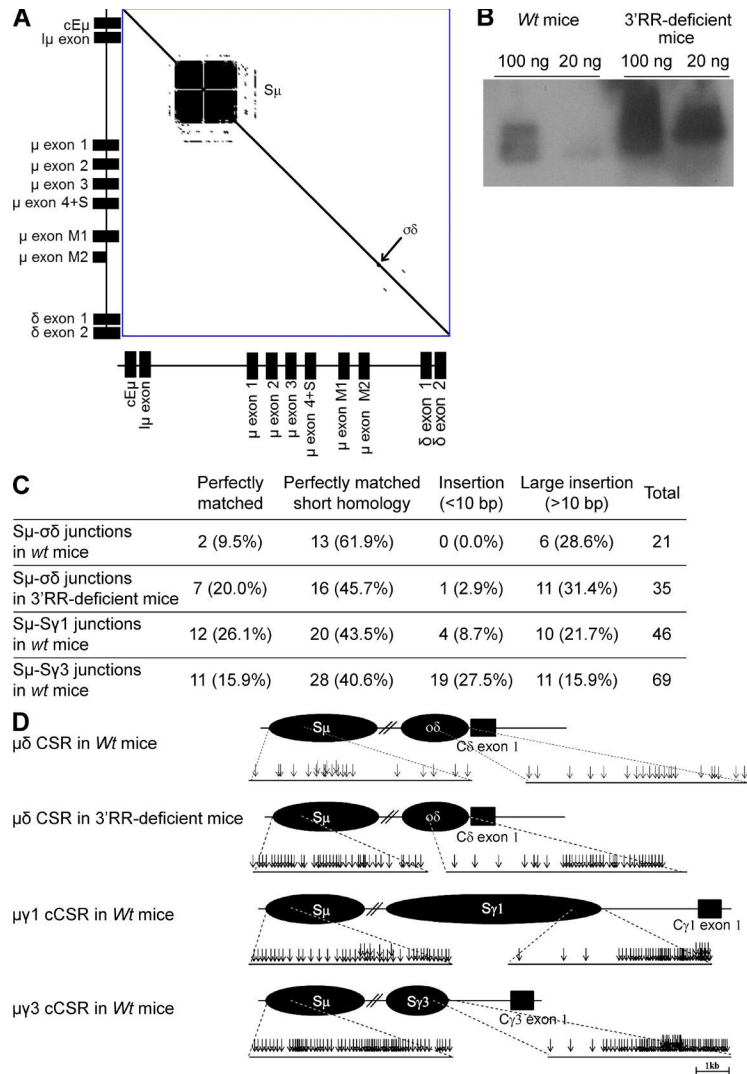


Figure 2. MLN B cells undergo $\mu\delta$ CSR. (A) DNA dot plot analysis of the genomic sequence encompassing a fragment from the E_{μ} enhancer to the δ exon 2 from a 129 *wt* mouse (GenBank accession no. AJ851868.3). The sequence was compared with itself and dots off the diagonal represent repetitive patterns within the sequence. S_{μ} and σ_{δ} regions are indicated. (B) Southern blot analysis of S_{μ} - C_{δ} junctions amplified by PCR and hybridized with a 5' C_{δ} probe from MLN B cells of 3'RR-deficient mice and *wt* mice. 100 and 20 ng DNA were used for PCR experiments. Data are representative of 6 independent experiments with 1 mouse per group. (C) $\mu\delta$ junctions obtained from *wt* mice (data are pooled from 13 independent experiments with 1 mouse per experiment) and 3'RR-deficient mice (data are pooled from 10 independent experiments with 1 mouse per experiment) were cloned and sequenced. Percentages of junctions with insertion and junctional microhomology are reported. $\mu\gamma 1$ and $\mu\gamma 3$ junctions from *wt* mice (data are pooled from 6 independent experiments with 1 mouse per experiment) obtained after in vitro LPS \pm IL4 stimulation of splenocytes are reported. The sequenced junctions depicted from all the mice combined. (D) Location of S_{μ} - σ_{δ} breaks in 13 *wt* and 10 3'RR-deficient mice and S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ and S_{μ} - $S_{\gamma 3}$ breaks during in vitro cCSR in 6 *wt* mice (same junctions and mice as in Fig. 2C).

than either S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ (12/46, 26.1%) or S_{μ} - $S_{\gamma 3}$ (11/70, 15.9%) junctional sequences. Apart from that, the location of S_{μ} breaks was similar in C_{μ} - C_{δ} , C_{μ} - $C_{\gamma 1}$, and C_{μ} - $C_{\gamma 3}$ junctions (Fig. 2 D). Finally, the cloned σ_{δ} breaks were mostly located in the 3' part of the σ_{δ} region similar to breaks in the downstream part of $S_{\gamma 1}$ and $S_{\gamma 3}$ for cCSR junctions (Fig. 2 D). The increased representation of DNA breaks in the 5' part of S_{μ} and the 3' part of σ_{δ} or S_{γ} might involve a methodological bias whereby PCR cloning of the shortest recombined DNA segment would be favored.

Identical phenotype of IgD^+IgM^- B cells in 3'RR-deficient and *wt* mice

Flow cytometry analysis indicated that IgD^+IgM^- B cells accounted for only $\sim 0.2\%$ of total MLN cells in *wt* mice (Fig. 3 A). Consistent with published human data (Chen et al., 2009), a low percentage of IgD^+IgM^- B cells expressed CD138 (syndecan-1), a hallmark of mature plasma cells (Fig. 3, B and C). Furthermore, the vast majority of IgD^+IgM^- B cells did not express surface B220, CD11b, CD19, CD21, and CD23 markers which

are usually down-regulated by differentiated plasma cells (Fig. 3, B and C). IgD^+IgM^- B cells also lacked PNA and GL7 staining and thus differed from germinal center (GC) B cells (Fig. 3 C). In contrast to human IgD^+IgM^- B cells (Arpin et al., 1998; Chen et al., 2009), no bias for surface λ -light chain was found (not depicted). Similarly to human IgD^+IgM^- B cells (Chen et al., 2009), mouse IgD^+IgM^- B cells expressed CD5, an activation-induced B cell molecule (Fig. 3, B and C), and had a low proliferation rate (Ki67 index of $\sim 50\%$; Fig. 3 C). IgD^+IgM^- B cells were not detected in splenocytes, bone marrow B cells, and circulating B cells of *wt* mice (unpublished data). Flow cytometry analysis indicated the presence of IgD^+IgM^- B cells in MLNs of 3'RR-deficient mice and that they accounted for $\sim 2\%$ of total MLN cells (Fig. 3 A), i.e., a 10-fold increase as compared with *wt* mice. Increased IgD switching was also confirmed after Southern blotting of S_{μ} - σ_{δ} junctions (Fig. 2 B). Besides their increased abundance, IgD^+IgM^- B cells from 3'RR-deficient animals qualitatively differed from those in *wt* mice by showing a lower expression of the B cell surface markers B220, CD19, CD21, and CD23 (Fig. 3, B and C), although

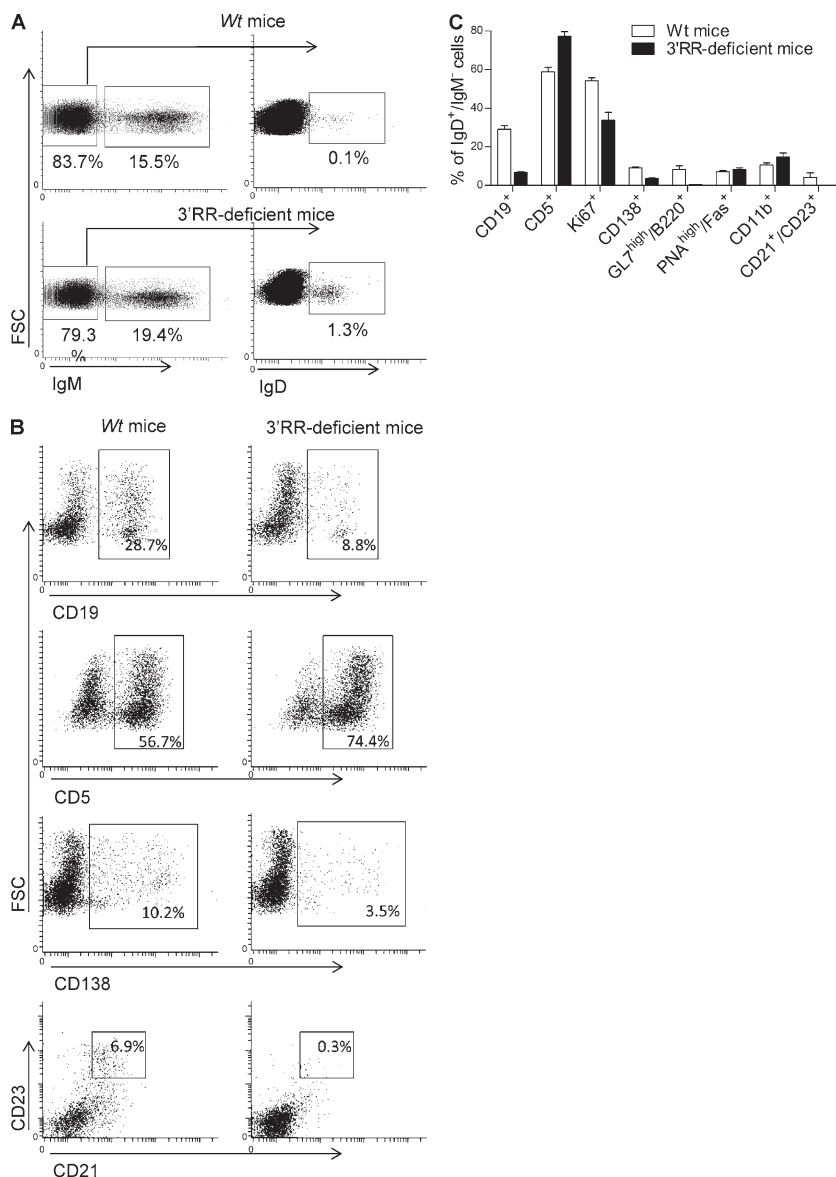


Figure 3. IgD⁺IgM⁻ B cell phenotype. (A) Flow cytometry analysis of IgM⁻IgD⁺ cells in MLN of wt mice and 3'RR-deficient mice. Cells were fixed and permeabilized before IgM and IgD staining. Cells were first gated on IgM⁻ cells and second on IgD⁺ cells highlighting the presence of IgM⁻IgD⁺ cells. Plots are representative of 6 independent experiments with 1 mouse per group. (B) Cytometry analysis of CD19, CD5, CD138, and CD23/CD21 cell surface markers in IgD⁺IgM⁻ cells from wt mice and 3'RR-deficient mice. Plots are representative of 6 independent experiments with 1 mouse per group. (C) Percentage of mouse IgD⁺IgM⁻ cells expressing CD19, CD5, Ki67, CD138, GL7/B220, PNA/Fas, CD11b, and CD21/CD23 in wt and 3'RR-deficient mice. Data are the mean ± SEM from 6 independent experiments with 1 mouse per group.

they overwhelmingly (80%) expressed CD5 and poorly proliferated (<40% were Ki67⁺) as for wt IgD⁺IgM⁻ cells. Due to their low levels in MLNs, IgD⁺IgM⁻ B cells did not show up in wt mice using immunohistochemistry but were detected in 3'RR-deficient mice. In agreement with their PNA⁻ and GL7⁻ status, IgD⁺IgM⁻ cells were located in the marginal zone of GC (Fig. 4 A) and had a typical ovaloid-elongated plasma cell shape, medium to large size, and an abundant cytoplasm containing C δ IgH chains (Fig. 4 A). In contrast to humans (Chen et al., 2009), and confirming results with wt mice, we did not find any bias in the κ ⁺/ λ ⁺ ratio when specifically studying those cells that express IgD in the absence of IgM expression (Fig. 4 B). Similarly to wt mice, such cells were not detected in blood, bone marrow, spleen, and Peyer's patches of 3'RR-deficient mice (unpublished data). A large fraction of B cells from the anti-mesenteric wall of the mouse small intestine displays an IgD⁺IgM⁻ phenotype (Hamada et al., 2002). We confirmed

the presence of IgD⁺ B cells by immunostaining all along the mouse small intestine but, again, more noticeably in 3'RR-deficient mice than in wt mice (Fig. 4 C).

$\mu\delta$ CSR has numerous characteristics of cCSR

To ensure whether the IgD⁺ phenotype is linked to $\mu\delta$ CSR, PCR analysis of $\mu\delta$ CSR in sorted IgD⁺IgM⁻ cells (from three mice) was performed in 3'RR-deficient mice (where these cells are more abundant and accessible to cell sorting). After cloning and sequencing we detected 11 different $\mu\delta$ sequences among 22 analyzed sequences (i.e., 50%). No junctions were found with sorted IgD⁻IgM⁺ cells, reinforcing the hypothesis that the IgD⁺IgM⁻ phenotype is linked to $\mu\delta$ CSR. Real-time PCR analysis indicated a dramatic decrease (62%, $P = 0.005$, Mann-Whitney U test) of C μ transcripts in sorted IgD⁺IgM⁻ cells as compared with sorted IgD⁺IgM⁺ cells, reinforcing the hypothesis that the IgD⁺IgM⁻ phenotype is linked to $\mu\delta$ CSR

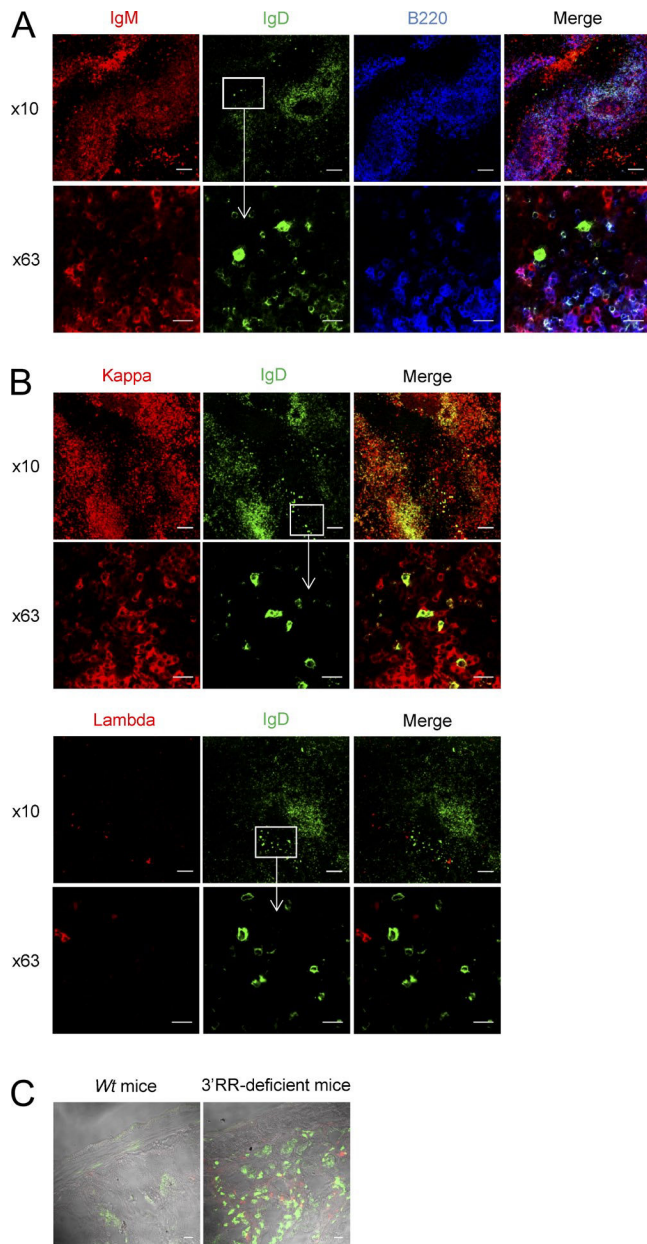


Figure 4. Immunohistochemistry analysis of IgD⁺IgM⁻ cells. (A) MLN tissue of 3'RR-deficient mice stained for IgM (red), IgD (green), and B220 (blue). Images are representative of 4 independent experiments with 1 mouse per experiment. Bars: (10 \times) 100 μ m; (63 \times) 10 μ m. (B) MLN tissue stained for IgD (green), κ light chain (red), and λ light chain (red) in 3'RR-deficient mice. Images are representative of 4 independent experiments with 1 mouse per experiment. Bars: (10 \times) 100 μ m; (63 \times) 10 μ m. (C) Intestine tissue stained for IgD (green) and IgM (red) in 3'RR-deficient mice and *wt* animals. Images are representative of 4 independent experiments with 1 mouse per group. Bar, 100 μ m.

(Fig. 5 A). During CSR, there are abundant double-strand breaks (DSBs) in S_{μ} . A fraction of these DSBs may be joined to rare DSBs in other parts of the genome, especially within flanking regions on the same chromosome. To demonstrate a specific association of $\sigma\delta$ with $\mu\delta$ CSR, PCR analysis was performed

with other reverse PCR primers (location in Fig. 1) corresponding to C_{μ} and a region between C_{δ} and $I_{\gamma 3}$. Using these primers, we were unable to detect any $\mu\delta$ junctions (out of 200 independent junk sequences analyzed) in MLN DNA of four 3'RR-deficient mice with detectable $\mu\delta$ CSR, demonstrating that the joining between S_{μ} and $\sigma\delta$ represents a specific recombination event. Using a PCR amplification (location of primers in Fig. 1), followed by Southern blotting (location of the probe in Fig. 1), we identified extrachromosomal $\sigma\delta$ - S_{μ} circles in MLN B cells of 3'RR-deficient mice (Fig. 5 B), indicating ongoing $\mu\delta$ CSR and a looping-out and deletion mechanism analogous to cCSR (in conditions where ongoing $\mu\delta$ CSR was not detectable in MLN DNA from *wt* mice). The identity of the PCR product was confirmed by sequencing (location of primers in Fig. 1; not depicted). The hallmark of cCSR is its dependence on AID for DSBs formation in S regions. Ligation-mediated PCR (LM-PCR) highlighted the presence of DSBs in $\sigma\delta$ in *wt* mice and 3'RR-deficient mice but not in AID-deficient mice (Fig. 5 C). Using the same experimental strategy as for *wt* and 3'RR-deficient mice, we were unable to detect any S_{μ} - $\sigma\delta$ junction in genomic DNA from MLNs of AID-deficient mice by Southern blotting of PCR products designed to amplify such junctions (Fig. 5 D). Despite the lack of significant hybridization, we further tried to clone potential junctions from AID-deficient mice (by the same protocol as for *wt* mice) and failed to identify any (out of 288 independent junk sequences analyzed) indicating that $\mu\delta$ CSR in mice requires AID as previously suggested by analyses in human AID-deficient patients (Arpin et al., 1998; Chen et al., 2009). Finally, an I_{μ} - C_{δ} transcript was previously identified in human (Chen et al., 2009). Real-time PCR analysis confirmed its presence not only in IgD⁺IgM⁺ (where it can originate from alternate splicing of a pre-mRNA encompassing C_{μ} and C_{δ} exons) but also in IgD⁺IgM⁻ where it is the reflect of the post-IgD CSR transcription (Fig. 5 E).

Mutations in IgD⁺IgM⁻ cells

Interactions with cognate antigens recruit activated B cells into GC and can induce AID-mediated modifications. These include SHM in V(D)J exons for the generation of high-affinity antibodies and cCSR (Henderson and Calame, 1998; Durandy, 2003; Hackney et al., 2009). cCSR and SHM are linked to transcription, dependent from some common actors, and both blocked by AID deficiency. SHM can also be considered as the usual mark for antigen-experienced B cells having participated to a GC reaction (Chan and Brink, 2012). We purified IgD⁺IgM⁻ cells from 3'RR-deficient mice (where these cells are more abundant and accessible to cell sorting) to evaluate V κ J κ SHM and identify them as pre- or post-GC B cells. To stimulate SHM, mice were immunized both orally with sheep red blood cells and intraperitoneally with LPS (i.e., in conditions known to yield in vivo activated spleen and Peyer's patches B cells with V κ J κ SHM both in *wt* and 3'RR-deficient mice; Péron et al., 2012; Rouaud et al., 2013). Rearranged IgH VDJ and V κ J κ regions from MLN IgD⁺IgM⁻ cells of 3'RR-deficient mice were cloned and sequenced. No SHM

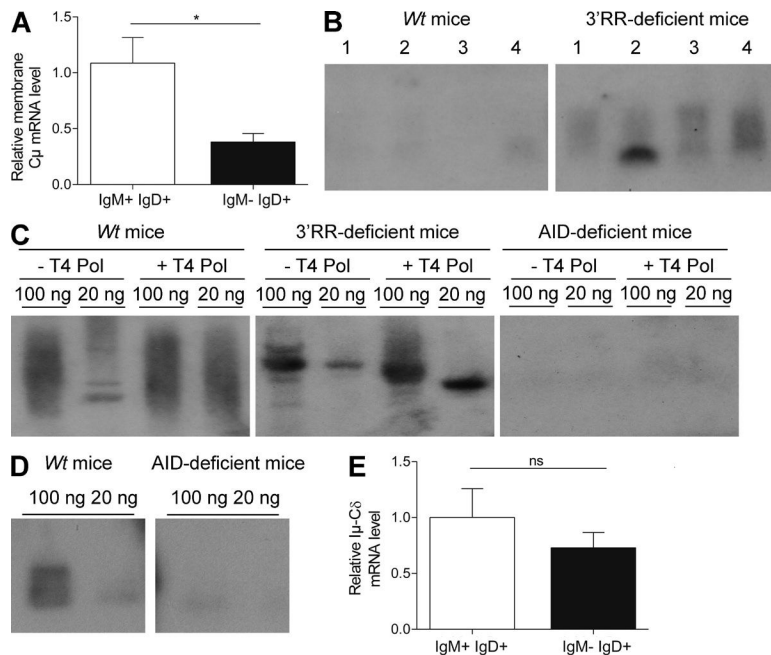


Figure 5. $\mu\delta$ CSR in 3'RR-deficient mice. (A) Real-time PCR analysis of membrane C_μ transcripts in sorted IgD⁺IgM⁺ and IgD⁺IgM⁻ cells from 3'RR-deficient mice. Data are the mean \pm SEM of 7 independent experiments with 1 mouse and 8 independent experiments with 1 mouse for IgD⁺IgM⁺ and IgD⁺IgM⁻ cells, respectively. *, P < 0.01 (Mann-Whitney U test). (B) Southern blot analysis of σ_8 -S_μ switch circles amplified by PCR and hybridized with a C_μ-labeled probe from MLN B cells of 3'RR-deficient and wt mice. Results from four mice (lines 1–4) in each group are reported. Data are representative of 6 independent experiments with 1 mouse per group. (C) LM-PCR. Genomic DNA from wt, 3'RR-deficient, and AID-deficient mice were left untreated or treated with T4 DNA polymerase (T4 Pol), ligated with T4 DNA ligase and probed for double-strand breaks in $\sigma\delta$ after by semi-nested PCR. Reactions with 100 and 20 ng DNA are shown. Data are representative of 6 independent experiments each with 1 mouse per genotype. (D) Southern blot analysis of S_μ-C₈ junctions amplified by PCR and hybridized with a 5'C₈ probe from MLN B cells of wt mice and AID-deficient mice. 100 and 20 ng DNA were used for PCR experiments. Data are representative of 6 independent experiments with 1 mouse per group. (E) Real-time PCR analysis of I_μ-C₈ transcript in sorted IgD⁺IgM⁺ and IgD⁺IgM⁻ cells from 3'RR-deficient mice. Data are of the mean \pm SEM of 6 independent experiments with 1 mouse and 8 independent experiments with 1 mouse for IgD⁺IgM⁺ and IgD⁺IgM⁻ cells, respectively. ns = not significant.

could be documented out of 90 VDJ sequences analyzed (3 mutations among 68,582 bp analyzed, 0.0044%) and 58 κ sequences analyzed (7 mutations among 36,134 bp analyzed, 0.0194%). Although the absence of SHM in VDJ rearranged region was expected in 3'RR-deficient mice recently demonstrated with and IgH locus-specific SHM defect (Rouaud et al., 2013), the lack of SHM in the κ light chain locus clearly indicate that those B cells with $\mu\delta$ CSR have not undergone conventional antigen-driven maturation as usually occurring into GC. By comparison, 3'RR-deficient animals recently analyzed after the same immunization protocol showed a >70-fold higher (1.39%) SHM rate in V κ J κ segment from Peyer's patches GC B cells (Rouaud et al., 2013). The lack of mutation in VDJ segments fitted well with their PNA⁻GL7⁻ status and their localization in the marginal zone of GC. Contrasting with mice, human IgD⁺IgM⁻ had extensive SHM in their IgV genes that indicated their clonal relatedness (Arpin et al., 1998). Mouse IgD⁺IgM⁻ had no SHM in their IgV genes and the use of a J_{H4} probe on Southern blots from IgD⁺IgM⁻ cell DNA revealed no rearranged bands in addition to the germline band indicating no potential clonal relatedness (unpublished data). We finally analyzed mutations during $\mu\delta$ CSR in wt mice as compared with cCSR to find if intensity of AID attack is similar between them. The mutation frequency at S_μ breakpoints and 5' to S_μ breakpoints were lower in $\mu\delta$ CSR than in IgG₁ and IgG₃ cCSR (although the latter control was chosen using in vitro conditions poorly inducing SHM; Fig. 6, A and B). A decrease of 25 and 52% in the frequency of mutations in the S_μ donor region was found during $\mu\delta$ CSR as

compared with IgG₃ and IgG₁ cCSR, respectively. The numbers of mutations at σ_8 breakpoints and 3' to σ_8 breakpoints were also much lower than in target S_γ region of cCSR (a decrease of 89 and 86% of those found in S_{γ1} and S_{γ3}, respectively; Fig. 6, A and B). Thus, not only the S_μ donor region but also the σ_8 acceptor region implicated in $\mu\delta$ CSR exhibited lower AID-induced mutations than S_μ, S_{γ1}, and S_{γ3} during IgG₁ and IgG₃ cCSR. Interestingly, the pattern of mutations at S_μ- σ_8 junctions, 5' to S_μ, and 3' to σ_8 was similar in wt mice and 3'RR-deficient animals (Fig. 6 B), showing that the absence of the 3'RR did not affect the AID-targeting at the S_μ donor and σ_8 acceptor regions during $\mu\delta$ CSR.

DISCUSSION

cCSR is a very complex process during which accessibility to recombination is regulated by both cis-acting factors (such as germline I promoters and 3'RR enhancers) and trans-acting factors (most of which are induced by cytokine-dependent signals and/or B cell activation; Stavnezer et al., 2010; Boboila et al., 2012). Analysis of DNA sequence at or around the recombination sites has helped us to understand the mechanisms first generating DSBs after targeting of S regions by AID and then allowing synapsis and repair of chromosomal breaks mostly through a classical nonhomologous end joining (C-NHEJ) pathway or to a lower extent through the alternative end-joining (A-EJ) pathway (Yan et al., 2007; Boboila et al., 2012). Although various disruptions of the 3'RR partially compromised cCSR (Cogné et al., 1994; Manis et al., 1998; Pinaud et al., 2001; Vincent-Fabert et al., 2009; Bébin et al., 2010), its complete

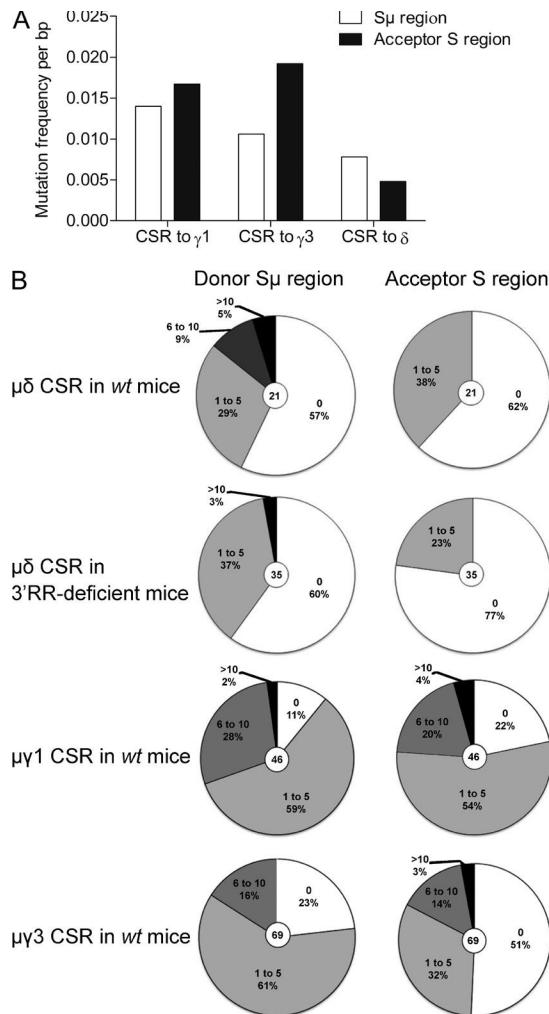


Figure 6. Mutation in S_μ and σ_δ during $\mu\delta$ CSR. Mutation frequency in the donor region (S_μ) and the acceptor region (σ_δ , S_{γ_1} , or S_{γ_3}) during $\mu\delta$ CSR and cCSR. (A) Mutation frequency per mutated bp. 46 S_μ - C_{γ_1} , 69 S_μ - C_{γ_3} , and 21 S_μ - C_δ junctions from *wt* mice were investigated. S_μ - C_{γ_1} and S_μ - C_{γ_3} junctions were obtained after in vitro stimulation of splenocytes from *wt* mice (data are pooled from 6 independent experiments with 1 mouse). S_μ - C_δ junctions were obtained after genomic extraction of MLN from *wt* mice (data are pooled from 13 independent experiments with 1 mouse). (B) Number of mutation in each S acceptor and S donor regions. 35 S_μ - C_δ junctions were obtained after genomic extraction of MLN from 3'RR-deficient mice (data are pooled from 10 independent experiments with 1 mouse).

deletion has clarified its mandatory role for cCSR toward IgG, IgA, and IgE isotypes (Vincent-Fabert et al., 2010b) as well as for SHM in rearrangedVDJ exons (Rouaud et al., 2013).

Phylogenetic studies indicate that IgD is as ancient as IgM but, in contrast to IgM, IgD is evolutionarily labile showing, for instance, many duplications/deletions of domains and splice forms (Ohta and Flajnik, 2006; Rauta et al., 2012). Due to the lack of an authentic S_δ region, B cells exclusively expressing IgD are extremely rare in humans and almost absent in mice (Owens et al., 1991). Our study clearly shows that

despite the lack of canonical S_δ region, CSR from μ to δ occurs in MLNs from *wt* mice. Sequences of $\mu\delta$ CSR junctions reveal a lower percentage of direct end junctions in $\mu\delta$ CSR than in cCSR together with a higher percentage of junctions with either microhomologies between recombined ends or showing insertions of various lengths at the recombination site. Notably, this pattern is strongly reminiscent of the junctions affected by the A-EJ pathway and previously reported during cCSR in B cells lacking key components of the C-NHEJ pathway, its main characteristic being a dramatic reduction of CSR direct joints and frequent junctions with microhomologies and insertions (Yan et al., 2007). Although the A-EJ pathway has only recently been shown to contribute to cCSR, it has been shown that in the absence of C-NHEJ, cCSR can be performed by A-EJ at up to 50% of *wt* levels (Yan et al., 2007). Notably, the same A-EJ-based pattern of junctions is also observed when referring to a few mouse IgD-secreting hybridomas documented in the past (Owens et al., 1991).

Similarly to cCSR, the absence of $\mu\delta$ CSR in AID-deficient mice confirms it also requires AID. The hallmark of CSR is its dependence on AID for DSBs formation in S regions. LM-PCR experiments found the presence of DSBs in σ_δ in *wt* mice and 3'RR-deficient mice but not in AID-deficient mice. $\mu\delta$ CSR is also AID-dependent in human (Chen et al., 2009). However, this does not imply that all IgD-producing plasma cells have undergone $\mu\delta$ CSR. Indeed, serum IgD persists and is even augmented in some AID-deficient patients, probably as a result of the activation of an alternative pathway involving the emergence of plasma cells that produce both IgM and IgD via alternative splicing, particularly at mucosal sites (Chen et al., 2009). Our data indicated that during $\mu\delta$ CSR the S_μ and (still more clearly) the σ_δ acceptor region are less actively targeted by AID than S_μ , S_{γ_1} , and S_{γ_3} during IgG₁ and IgG₃ cCSR. This suggests, aside from differences in junction diversity, that $\mu\delta$ CSR is regulated differently from cCSR. Individual S regions range in size from 10 kb for S_{γ_1} (IgG₁ being the most abundant Ig class) to 2.5 kb for S_{γ_3} and to only 1 kb for S_δ . Studies pointed the S region size as an important factor in determining endogenous cCSR efficiency because cCSR frequencies correlated with S region length (Zarrin et al., 2005). The very low level of $\mu\delta$ CSR in *wt* mice may be linked to the short length (0.5 kb) of the σ_δ region and to a less active targeting by AID than S_{γ_1} and S_{γ_3} during cCSR.

An intronic (I) exon is positioned upstream of each C_H gene except C_δ both in mice and humans. I_H - C_H germinal transcripts render S_H regions substrate for DNA modifications by the CSR machinery, including AID. As previously identified in humans (Chen et al., 2009), an I_μ - C_δ transcript is identified in mice. This I_μ - C_δ transcript is of importance to render both S_μ and σ_δ regions substrate for DNA modifications, especially because no I_δ exon is documented in the mouse and the human IgH locus. In contrast to mice and humans, an I_δ exon has been recently reported in the bovine IgH locus (Xu et al., 2012). This I_δ exon derives from the recent duplication of an I_μ - C_μ 1 genomic fragment (Zhao et al., 2002). Of interest, the bovine δ gene can be expressed by

CSR; analysis of S_{μ} - S_{δ} junctions demonstrated, as in mice, a preference for using the microhomology-based end-joining pathway (Xu et al., 2012). After $\mu\delta$ CSR, I_{μ} - C_{δ} transcripts are still detected and are the reflection of the post-IgD CSR transcription and not simply a germinal transcript of importance to render both S_{μ} and σ_{δ} regions substrate to CSR-induced DNA modifications.

The 3'RR is mandatory for cCSR toward IgG, IgA, and IgE isotypes (Vincent-Fabert et al., 2010b). This is obviously not the case for IgD. Patients with hyper-IgM syndromes have higher $\mu\delta$ CSR that may stand as a compensatory response due to the absence of other switched isotypes (Chen and Cerutti, 2010). It appears that deletion of the 3'RR, most probably through a compensatory response due to the absence of other switched isotypes, enhances IgD CSR without widely impacting the patterns of S_{μ} - σ_{δ} junctions. Thus, AID-induced $\mu\delta$ CSR occurs independently of the IgH 3'RR, a result that markedly contrasts with S_{μ} - S_{γ} , S_{μ} - S_{ϵ} , and S_{μ} - S_{α} cCSR. The lower AID-induced mutations both in S_{μ} and σ_{δ} region during $\mu\delta$ CSR (as compared with those in S_{μ} , $S_{\gamma 1}$, and $S_{\gamma 3}$ during S_{μ} - $S_{\gamma 1}$ and S_{μ} - $S_{\gamma 3}$ cCSR) suggest that AID might be recruited to the IgH locus by different means than cCSR. This result partially fits with recent data showing, in addition to cCSR, that the 3'RR is also a key element for AID recruitment during AID-induced SHM both in VDJ-expressed sequences and S_{μ} (Rouaud et al., 2013). The analysis of SHM in VDJ expressed sequences of 3'RR-deficient B cells that have undergone $\mu\delta$ CSR confirms that the 3'RR is essential to the SHM process on V(D)J exons and that a physiological dissociation exists between SHM and CSR in primary B cells of 3'RR-deficient mice as in T cell-independent responses (Phan et al., 2005).

CSR to IgD is obviously a rare event and we now show that it occurs independently of the IgH 3'RR. It might be of interest to notice that in this special case, and in contrast to SHM of VDJ and of S_{μ} regions during cCSR, the rate of mutations affecting the target regions of $\mu\delta$ CSR is not affected by the 3'RR deletion. This observation, together with the unique location of IgD switching only in the mucosa-associated lymphoid tissue, argues for a specific regulation of this event, allowing AID recruitment to the IgH locus in a 3'RR-independent manner and in response to stimuli that remains to be determined. Transcription being required for AID targeting, the simultaneous accessibility of S_{μ} and σ_{δ} to AID likely needs constitutive I_{μ} - C_{δ} transcription (encompassing both S_{μ} to σ_{δ}). However, because I_{μ} - C_{δ} transcription is common in all naive B cells and during their initial entry into GC, it is obviously not sufficient by itself for inducing accessibility to $\mu\delta$ CSR and another stimulus uniquely occurring into mouse MLNs and into human tonsils likely allows the 3'RR-independent recruitment of AID on the IgH locus in some B cells. Until now, our knowledge concerning $\mu\delta$ CSR in mice only derived from studies of myeloma and hybridoma cell lines (Owens et al., 1991; Preud'homme et al., 2000). 3'RR-deficient mice give us the first opportunity to investigate it in primary B cells.

Location of $IgD^{+}IgM^{-}$ cells in the marginal zone, but not in the follicular zone, together with their $PNA^{-}GL7^{-}$ status

and their lack of SHM in the VDJ segment might be suggestive of T cell-independent non-GC origin for cells with $\mu\delta$ CSR, as previously documented in physiology for some mucosa-associated lymphoid tissue B cells undergoing T cell-independent IgA CSR (Bergqvist et al., 2010). In addition, cCSR in the absence of SHM was reported in some cases of chronic lymphocytic leukemia B cells (Oppezio et al., 2003) upon N-terminal mutation of AID (Shinkura et al., 2004) and, recently, in $Ung^{-/-}$ mice during an acute antigenic challenge (Zahn et al., 2013). Our data with $\mu\delta$ CSR further indicates that AID can be recruited to the IgH locus under various different forms, eventually associated with some different partners to mediate either cCSR and VDJ SHM (both processes requiring the 3'RR), or in the present case $\mu\delta$ CSR (where the 3'RR is at least superfluous; Ronai et al., 2007). According to the concept that such IgD-only cells may locally participate in immune surveillance against pathogens present at mucosal sites, their increase in 3'RR-deficient mice with an IgA production defect might be a compensatory mechanism as previously suggested in IgA-deficient patients (Brandtzaeg and Johansen, 2005).

$IgD^{+}IgM^{-}$ B cells in mice exhibited numerous similarities with human ones. Consistent with published human data (Chen et al., 2009), they were $CD138^{-}$, expressed the activation-induced (or B1 compartment-related) molecule CD5, and down-regulated several B cell-specific markers usually down-regulated by differentiated plasma cells. Whether human $IgD^{+}IgM^{-}$ cells show a strong bias toward the preferential expression of the λ -light chains (Arpin et al., 1998; Chen et al., 2009), it is not the case in mice, a result which might be linked to the κ^{+}/λ^{+} ratio, globally reported in mouse B cells around 95/5 (Arakawa et al., 1996). Whether human $IgD^{+}IgM^{-}$ cells are reported to have undergone extensive SHM and display clonal relatedness (Arpin et al., 1998), mice $IgD^{+}IgM^{-}$ cells are unmutated in their VDJ regions with no evident sign of clonality. These latter results are in accordance with their localization in the marginal zone of GC, a region with cells not submitted to an intensive SHM process or exhibiting a high rate of proliferation (mice $IgD^{+}IgM^{-}$ cells had a low Ki67 index).

In conclusion, IgD CSR occurs in B cells of MLNs of *wt* mice. There is extensive somatic mutation of the IgHV region in human IgD^{+} cells (Arpin et al., 1998) but not in mouse. The effects of physiological location of switching cells might explain this difference as well as the structural differences in mouse and human 3'RR. The molecular features of S_{μ} - σ_{δ} junctions suggest a predominant involvement of the A-EJ pathway in this process. In contrast to IgG, IgA, and IgE classes, IgD CSR occurs independently of the IgH 3'RR and now stands as an amazing exception contrasting with all the other AID-dependent modifications of the IgH locus previously shown to formally involve the 3'RR in mouse B cells.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Generation of 3'RR-deficient mice has been previously reported (Vincent-Fabert et al., 2010b). *wt* mice and 3'RR-deficient mice were 8–12 wk old except when specified. Mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions. Mice immunizations were done orally with sheep red blood cells for 2 wk and intraperitoneally with 10 μ g LPS for 3 d.

Cell cytometry analysis. Single-cell suspensions from MLNs were fixed and permeabilized with the Intraprep permeabilization reagent (Beckman Coulter) before incubation with FITC-labeled IgD (SouthernBiotech) or irrelevant antibody and analyzed on a Fortessa LSR2 (BD; Truffinet et al., 2007; Vincent-Fabert et al., 2009). Phenotyping of IgD⁺IgM⁻ cells were made with the following antibodies: v450-IgD, APC-IgM, FITC-B220, FITC-CD5, PE-CD11b, PE-CD19, PE-CD21, PC7-CD23, PE-CD138, PE-GL7 and FITC-PNA, and PE-Fas and FITC-Ki67.

Dot plot analysis. Dot plot analysis of the mouse DNA fragment encompassing the 5' E μ intronic enhancer and the C δ exon 2 was done with the Nucleic Acid Dot Plot Program. Window size and mismatch limit were set to 23 and 3, respectively.

Amplification, cloning, and sequencing of S μ - σ δ junctions. S μ - σ δ junctions were studied using a touchdown PCR, followed by a nested PCR on fresh MLN cells using the following parameters. Touchdown PCR: primer 1, 5'-CAGTTGAGGCCAGCAGGT-3' and primer 2, 5'-CCAATTACTAACAGCCCAGGT-3' (1 cycle, 98°C for 3 min; 3 cycles, 98°C for 30 s, 64°C for 40 s, and 72°C for 90 s; 3 cycles, 98°C for 30 s, 62°C for 40 s, and 72°C for 90 s; 25 cycles, 98°C for 30 s, 60°C for 40 s, and 72°C for 90 s; and 1 cycle, 72°C for 7 min). Nested PCR: primer 3, 5'-CAGGTCGGCTGACTAACTC-3' and primer 4, 5'-CAGCCCAGGTTTATCTTTTCA-3' (1 cycle, 98°C for 3 min; 35 cycles, 98°C for 30 s, 65°C for 40 s, and 72°C for 90 s; and 1 cycle, 72°C for 7 min). The PCR products were cloned into the Zero Blunt Topo PCR cloning (Invitrogen). Plasmids were isolated using the NucleoSpin kit (Macherey-Nagel Eurl) and sequenced using an automated laser fluorescent ANA ABI-PRISM sequencer (Perkin-Elmer; Fiancette et al., 2011). To demonstrate a specific association of σ δ with μ δ CSR, nested PCR analysis was carry out with sense 1 and sense 3 primers and other reverse PCR primers corresponding to C μ (primer 18, 5'-GTGGGACGAACACATTTACATTGG-3' and primer 19, 5'-GTTTCATCTCTGCGACAGCTG-3') and a region between C δ and I γ 3 (primer 20, 5'-GCTCATAGCCTCCTTAGGTCC-3' and primer 21, 5'-GAGACTGTTCACTCTATCTTTACCAC-3').

Amplification, Southern blotting, and sequencing of μ δ CSR circles. μ δ CSR circles were amplified by PCR using the following parameters: primer 6, 5'-GGACTCGTACCAAATTCCA-3' (located at the beginning of σ δ) and primer 7, 5'-GAAGACATTTGGGAAGGACTGACT-3' (located in C μ exon 1; 1 cycle, 95°C for 2 min; 40 cycles, 95°C for 15 s, 55°C for 20 s, and 72°C for 180 s; and 1 cycle, 72°C for 7 min). Hybridization of μ δ CSR circles was performed with a 240 bp probe (probe B) located in the C μ exon1 (Péron et al., 2012). The C μ exon1 probe was cloned as a PCR fragment according to the following parameters: primer 8, 5'-CGTTCGAAGAAGGCTTCAAAGTC-3' and primer 9, 5'-TTATCGATGAGGACCAGAGAGGG-3' (1 cycle, 94°C for 3 min; 30 cycles, 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s; and 1 cycle, 72°C for 7 min). The circle PCR products were cloned into the Zero Blunt Topo PCR cloning (Invitrogen) and sequenced with and ANA ABI-PRISM sequencer (Perkin-Elmer; Fiancette et al., 2011).

Southern blotting of C μ -C δ junctions. C μ -C δ junctions were studied after hybridization with a ³²P-labeled probe (460 bp length, probe A). This C δ probe was cloned as a PCR fragment located in-between primer 5 (5'-CCCAGAACCCTGAGAAGGAAG-3'), located in the intron 5' of C δ and primer 4 (5'-CAGCCCAGGTTTATCTTTTCA-3'), located in C δ exon 1 (1 cycle, 94°C for 3 min; 30 cycles, 93°C for 45 s, 52°C for 45 s, and 72°C for 30 s; and 1 cycle, 72°C for 7 min).

DNA extraction and amplification for SHM experiments. Genomic DNA was extracted from sorted B220⁺IgD⁺IgM⁻ cells (85% of purity). IgH VDJ-rearranged fragments were amplified by PCR using the following primers and multistep programs as previously reported (Rouaud et al., 2013): primer 10, 5'-GCGAAGCTTARGCCTGGGRCCTCAGTGAAG-3' complementary to the VHJ558 segment and primer 11, 5'-AGGCTCTGAGATCCCTAGACAG-3' corresponding to a sequence 517 bp downstream

of the J_{H4} segment using 1 cycle (98°C for 30 s), 33 cycles (98°C for 10 s, 67°C for 30 s, and 72°C for 90 s), and 1 cycle (72°C for 10 min). Igk light chain VJ-rearranged fragments were amplified by PCR as previously reported (Rouaud et al., 2013) using the following primers and multistep programs: primer 12, 5'-GGCTGCAGSTTCAGTGGCAGTGGRTCWGRAC-3' (consensus for V κ) and primer 13, 5'-AGCGAATCAACTTAGGAGACAAAAGAGAGAAC-3' (found 557 bp downstream of the J_{k5} segment) using 1 cycle at 98°C for 30s, 33 cycles (98°C for 10 s, 66°C for 30 s and 72°C for 90 s), and 1 cycle at 72°C for 10 min. PCR products were cloned and sequenced as described (Fiancette et al., 2011).

Immunohistochemistry. Frozen 8- μ m sections were thawed at room temperature and dried before being hydrated in PBS. Slides were fixed with cold acetone for 20 min at -20°C, dried for 10 min, and incubated with PBS BSA 3% for 45 min. Rat anti-mouse APC-CD45R (BD; clone RA3-6B2, 560472), rat anti-mouse Alexa Fluor 488-IgD (BioLegend; clone 11-26c-2a, 405718), and rat anti-mouse PE-IgM (eBioscience; clone II/41, 17-5790-82) were used at 1:50 for 1 h at 37°C in PBS BSA 0.3%. Goat anti-mouse κ (Beckman Coulter; 731871) or anti-mouse λ (SouthernBiotech; 1060-01) was used at 1:100 and revealed with a DyLight 594 rabbit anti-goat IgG (Thermo Fisher Scientific; 072-09-13-06) used at 1:250. Slides were mounted with moviol medium.

Real-time PCR analysis of membrane C μ and I μ -C δ transcripts. Total RNA was prepared from freshly isolated IgD⁺IgM⁻ and IgD⁺IgM⁺ MLN B cell. Reverse transcription was performed with 500 ng of total RNA. RT-PCR experiments were done with SuperScript III reverse transcription (Invitrogen). Real-time PCR analysis (on an ABI Prism 7000 system; Applied Biosystems) was made with the Syber Green method using 10 ng cDNA using the following primer: I μ primer 14, 5'-CTCTGGCCTGCTTATGTTG-3' and C δ primer 15, 5'-GCTCCCAGCTGATTTTCAGT-3'; μ membrane primer 16 (in exon μ 4), 5'-TGGAAGTCCGGAGAGACCTA-3' and μ membrane primer 17 (in exon μ membrane 1), 5'-TTCCTCCTCAGCATTCACCT-3'. GAPDH was used for normalization of gene expression levels (TaqMan reference Mm99999915-g1).

Spleen cell cultures for CSR. Single-cell suspensions of spleen cells were cultured 3 d at 10⁶ cells/ml in RPMI 1640 with 10% FCS and 20 μ g/ml LPS, with or without addition of 20 ng/ml IL-4 (PeproTech). 3-d in vitro-stimulated splenocytes were harvested and DNA was extracted for investigation of S μ -S γ 1 and S μ -S γ 3 junctions (Vincent-Fabert et al., 2009).

LM-PCR. Genomic DNA from *wt* mice, 3'RR-deficient mice, and AID-deficient mice was extracted and purified using Phase Lock gel. 10 μ g was treated with T4 DNA polymerase (New England Biolabs, Inc.), which trims back 3' overhangs while filling in 3'-recessed ends, thereby yielding blunt 5'-phosphorylated DNA ends. 1 μ g DNA was then ligated with T4 DNA ligase (New England Biolabs, Inc.) in a 20- μ l reaction volume with the double-strand anchor linker BW (Zan and Casali, 2008). DSBs were detected by semi-nested LM-PCR using BW1 primer targeting the BW linker sequence (5'-GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATTC-3') and primer 2, specific to σ δ (5'-CCAATTACTAAACAGCCCAGGT-3'), using the following parameters: (1 cycle, 94°C for 30 s; 25 cycles, 94°C for 10 s, 55°C for 20 s, and 65°C for 2 min; and 1 cycle, 65°C for 7 min). DSBs were studied after hybridization with the same ³²P-labeled probe as for Southern blotting of C μ -C δ junctions.

Clonality assay. Genomic DNA prepared from IgD⁺IgM⁻ cells of 3'RR-deficient mice was digested with EcoRI and analyzed by Southern blot with a ³²P-labeled J_{H1} probe (Truffinet et al., 2007).

Online supplemental material. Table S1 shows S μ - σ δ , S μ -S γ 1, and S μ -S γ 3 junctions.

This paper is dedicated to Michael S. Neuberger in memoriam.

We thank S. Desforges and B. Remerand for help with animal care.

P. Rouaud was supported by a grant from ARC. This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC SL 220100601332) and ANR (Projets Blanc 2011).

The authors declare no competing financial interests.

Contributions: P. Rouaud, A. Saintamand, S. Lecardeur, F. Saad, C. Carrion, M. Cogné, and Y. Denizot actively participated to the experimental design of the study. M. Cogné and Y. Denizot participated in the scientific discussion for manuscript writing, and obtained financial grants and agreement of the ethics committee of our institution to perform the study.

Submitted: 2 July 2013

Accepted: 1 April 2014

REFERENCES

- Arakawa, H., T. Shimizu, and S. Takeda. 1996. Re-evaluation of the probabilities for productive arrangements on the κ and λ loci. *Int. Immunol.* 8:91–99. <http://dx.doi.org/10.1093/intimm/8.1.91>
- Arpin, C., O. de Bouteiller, D. Razanajaona, I. Fugier-Vivier, F. Brière, J. Banchereau, S. Lebecque, and Y.J. Liu. 1998. The normal counterpart of IgD myeloma cells in germinal center displays extensively mutated IgVH gene, C μ -C δ switch, and λ light chain expression. *J. Exp. Med.* 187:1169–1178. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.187.8.1169>
- Bébin, A.G., C. Carrion, M. Marquet, N. Cogné, S. Lecardeur, M. Cogné, and E. Pinaud. 2010. In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol.* 184:3710–3717. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901978>
- Bergqvist, P., A. Stenstrom, N.Y. Lycke, and M. Bemark. 2010. T cell-independent IgA class switch recombination is restricted to the GALT and occurs prior to manifest germinal center formation. *J. Immunol.* 184:3545–3553. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0901895>
- Boboila, C., F.W. Alt, and B. Schwer. 2012. Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv. Immunol.* 116:1–49. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394300-2.00001-6>
- Brandtzaeg, P., and F.E. Johansen. 2005. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol. Rev.* 206:32–63. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00283.x>
- Chan, T.D., and R. Brink. 2012. Affinity-based selection and the germinal center response. *Immunol. Rev.* 247:11–23. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01118.x>
- Chen, K., and A. Cerutti. 2010. New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunol. Rev.* 237:160–179. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00929.x>
- Chen, K., W. Xu, M. Wilson, B. He, N.W. Miller, E. Bengtén, E.S. Edholm, P.A. Santini, P. Rath, A. Chiu, et al. 2009. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* 10:889–898. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1748>
- Cogné, M., R. Lansford, A. Bottaro, J. Zhang, J. Gorman, F. Young, H.L. Cheng, and F.W. Alt. 1994. A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell.* 77:737–747. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90057-4](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90057-4)
- Durandy, A. 2003. Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation. *Eur. J. Immunol.* 33:2069–2073. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200324133>
- Fiancette, R., P. Rouaud, C. Vincent-Fabert, B. Laffleur, V. Magnone, M. Cogné, and Y. Denizot. 2011. A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene. *J. Immunol.* 187:5772–5782. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1102059>
- Hackney, J.A., S. Misaghi, K. Senger, C. Garris, Y. Sun, M.N. Lorenzo, and A.A. Zarrin. 2009. DNA targets of AID: evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv. Immunol.* 101:163–189. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)01005-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2776(08)01005-5)
- Hamada, H., T. Hiroi, Y. Nishiyama, H. Takahashi, Y. Masunaga, S. Hachimura, S. Kaminogawa, H. Takahashi-Iwanaga, T. Iwanaga, H. Kiyono, et al. 2002. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J. Immunol.* 168:57–64.
- Henderson, A., and K. Calame. 1998. Transcriptional regulation during B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 16:163–200. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.163>
- Johansen, F.E., E.S. Baekkevold, H.S. Carlsen, I.N. Farstad, D. Soler, and P. Brandtzaeg. 2005. Regional induction of adhesion molecules and chemokine receptors explains disparate homing of human B cells to systemic and mucosal effector sites: dispersion from tonsils. *Blood.* 106:593–600. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-12-4630>
- Manis, J.P., N. van der Stoep, M. Tian, R. Ferrini, L. Davidson, A. Bottaro, and F.W. Alt. 1998. Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J. Exp. Med.* 188:1421–1431. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.188.8.1421>
- Moore, K.W., J. Rogers, T. Hunkapiller, P. Early, C. Nottenburg, I. Weissman, H. Bazin, R. Wall, and L.E. Hood. 1981. Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:1800–1804. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.78.3.1800>
- Ohta, Y., and M. Flajnik. 2006. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:10723–10728. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0601407103>
- Oppezio, P., F. Vuillier, Y. Vasconcelos, G. Dumas, C. Magnac, B. Payelle-Brogard, O. Pritsch, and G. Dighiero. 2003. Chronic lymphocytic leukemia B cells expressing AID display dissociation between class switch recombination and somatic hypermutation. *Blood.* 101:4029–4032. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2002-10-3175>
- Oretti, C., E. Barbi, F. Marchetti, L. Lepore, A. Ventura, A. D'Osualdo, M. Gattorno, S. Martelossi, and A. Tommasini. 2006. Diagnostic challenge of hyper-IgD syndrome in four children with inflammatory gastrointestinal complaints. *Scand. J. Gastroenterol.* 41:430–436. <http://dx.doi.org/10.1080/00365520500327743>
- Owens, J.D. Jr., F.D. Finkelman, J.D. Mountz, and J.F. Mushinski. 1991. Nonhomologous recombination at sites within the mouse J μ -C δ locus accompanies C μ deletion and switch to immunoglobulin D secretion. *Mol. Cell. Biol.* 11:5660–5670.
- Pavri, R., and M.C. Nussenzweig. 2011. AID targeting in antibody diversity. *Adv. Immunol.* 110:1–26. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387663-8.00005-3>
- Péron, S., B. Laffleur, N. Denis-Lagache, J. Cook-Moreau, A. Tinguely, L. Delpy, Y. Denizot, E. Pinaud, and M. Cogné. 2012. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science.* 336:931–934. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1218692>
- Phan, T.G., S. Gardam, A. Basten, and R. Brink. 2005. Altered migration, recruitment, and somatic hypermutation in the early response of marginal zone B cells to T cell-dependent antigen. *J. Immunol.* 174:4567–4578.
- Pinaud, E., A.A. Khamlichi, C. Le Morvan, M. Drouet, V. Nalesso, M. Le Bert, and M. Cogné. 2001. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity.* 15:187–199. [http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00181-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00181-9)
- Pinaud, E., M. Marquet, R. Fiancette, S. Péron, C. Vincent-Fabert, Y. Denizot, and M. Cogné. 2011. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110:27–70. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8>
- Preud'homme, J.L., I. Petit, A. Barra, F. Morel, J.C. Lecron, and E. Lelièvre. 2000. Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Mol. Immunol.* 37:871–887. [http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00006-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00006-2)
- Rauta, P.R., B. Nayak, and S. Das. 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: a model for higher organisms. *Immunol. Lett.* 148:23–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>
- Ronai, D., M.D. Iglesias-Ussel, M. Fan, Z. Li, A. Martin, and M.D. Scharff. 2007. Detection of chromatin-associated single-stranded DNA in regions targeted for somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* 204:181–190. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20062032>
- Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, R. Fiancette, M. Cogné, E. Pinaud, and Y. Denizot. 2012. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* 287:8356–8360. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.341024>

- Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, A. Saintamand, R. Fiancette, M. Marquet, I. Robert, B. Reina-San-Martin, E. Pinaud, M. Cogné, and Y. Denizot. 2013. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 210:1501–1507. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20130072>
- Shinkura, R., S. Ito, N.A. Begum, H. Nagaoka, M. Muramatsu, K. Kinoshita, Y. Sakakibara, H. Hijikata, and T. Honjo. 2004. Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 5:707–712. <http://dx.doi.org/10.1038/ni1086>
- Stavnezer, J., A. Björkman, L. Du, A. Cagigi, and Q. Pan-Hammarström. 2010. Mapping of switch recombination junctions, a tool for studying DNA repair pathways during immunoglobulin class switching. *Adv. Immunol.* 108:45–109. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-380995-7.00003-3>
- Truffinet, V., E. Pinaud, N. Cogné, B. Petit, L. Guglielmi, M. Cogné, and Y. Denizot. 2007. The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol.* 179:6033–6042.
- Vincent-Fabert, C., V. Truffinet, R. Fiancette, N. Cogné, M. Cogné, and Y. Denizot. 2009. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J. Immunol.* 182:6926–6932. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0900214>
- Vincent-Fabert, C., R. Fiancette, M. Cogné, E. Pinaud, and Y. Denizot. 2010a. The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur. J. Immunol.* 40:3306–3311. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201040778>
- Vincent-Fabert, C., R. Fiancette, E. Pinaud, V. Truffinet, N. Cogné, M. Cogné, and Y. Denizot. 2010b. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood.* 116:1895–1898. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-264689>
- Xu, B., J. Wang, M. Zhang, P. Wang, Z. Wei, Y. Sun, Q. Tao, L. Ren, X. Hu, Y. Guo, et al. 2012. Expressional analysis of immunoglobulin D in cattle (*Bos taurus*), a large domesticated ungulate. *PLoS ONE.* 7:e44719. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044719>
- Yan, C.T., C. Boboila, E.K. Souza, S. Franco, T.R. Hickernell, M. Murphy, S. Gumaste, M. Geyer, A.A. Zarrin, J.P. Manis, et al. 2007. IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature.* 449:478–482. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06020>
- Zahn, A., M. Dagan, S. Safavi, D. Godin, C. Cheong, A. Lamarre, and J.M. Di Noia. 2013. Separation of function between isotype switching and affinity maturation in vivo during acute immune responses and circulating auto-antibodies in UNG-deficient mice. *J. Immunol.* 190:5949–5960. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1202711>
- Zan, H., and P. Casali. 2008. AID- and Ung-dependent generation of staggered double-strand DNA breaks in immunoglobulin class switch DNA recombination: a post-cleavage role for AID. *Mol. Immunol.* 46:45–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.003>
- Zarrin, A.A., M. Tian, J. Wang, T. Borjeson, and F.W. Alt. 2005. Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:2466–2470. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409847102>
- Zhao, Y., I. Kacskovics, Q. Pan, D.A. Liberles, J. Geli, S.K. Davis, H. Rabbani, and L. Hammarstrom. 2002. Artiodactyl IgD: the missing link. *J. Immunol.* 169:4408–4416.

Références Bibliographiques

A

Adams J.M., Harris A.W., Pinkert C.A., Corcoran L.M., Alexander W.S., Cory S., Palmiter R.D. and Brinster R.L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*. **318**, 533-538.

Albihn A., Johnsen J.I. and Henriksson M.A. (2010). MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Advances in Cancer Research*. **107**, 163-224.

Alessandrini A. and Desiderio, S.V. (1991). Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Molecular and Cellular Biology*. **11**, 2096-2107.

Alt F.W., Zhang Y., Meng F.L., Guo C. and Schwer B. (2013). Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell*. **152**, 417-429.

B

Bébin A.G., Carrion C., Marquet M., Cogné N., Lecardeur S., Cogné M. and Pinaud E. (2010). In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *Journal of Immunology*. **184**, 3710-3717.

Betz A.G., Rada C., Pannell R., Milstein C. and Neuberger M.S. (1993). Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **90**, 2385-2388.

Blum K.A., Lozanski G. and Byrd J.C. (2004). Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. **104**, 3009-3020.

Borghesi L., Hsu L.Y., Miller J.P., Anderson M., Herzenberg L., Herzenberg L. and Gerstein R.M. (2004). B lineage-specific regulation of V(D)J recombinase activity is established in common lymphoid progenitors. *The Journal of Experimental Medicine*. **199**, 491-502.

Byrd L.G., McDonald A.H., Gold L.G. and Potter M. (1991). Specific pathogen-free BALB/cAn mice are refractory to plasmacytoma induction by pristane. *The Journal of Immunology*. **147**, 3632-3637.

C

Calsou P., Delteil C., Frit P., Drouet J. and Salles B. (2003). Coordinated assembly of Ku and p460 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment. *Journal of Molecular Biology*. **326**, 93-103.

Chauveau C. and Cogné M. (1996). Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nature Genetics*. **14**, 15-16.

Chen H., Liao D., Matt Holl T., Snowden P., Ueda Y. and Kelsoe G. (2010). Genetic regulation of pristane-induced oil granuloma responses. *International Journal of Experimental Pathology*. **91**, 472-483.

Chen, H., Liao, D., Cain, D., McLeod, I., Ueda, Y., Guan, Z., Raetz C. and Kelsoe, G. (2010). Distinct granuloma responses in C57BL/6J and BALB/cByJ mice in response to pristane. *International Journal of Experimental Pathology*. **91**, 460-471.

Cogné M., Lansford R., Bottaro A., Zhang J., Gorman J., Young F., Cheng H.L. and Alt F.W. (1994). A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell*. **77**, 737-747.

Cook G.P., Meyer K.B., Neuberger M.S. and Pettersson S. (1995). Regulated activity of the IgH intron enhancer (E mu) in the T lymphocyte lineage. *International Immunology*. **7**, 89-95.

Corfe S.A., and Paige C.J. (2012). The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. *Seminars in Immunology*. **24**, 198-208.

D

Dang C.V., Resar L.M., Emison E., Kim S., Li Q., Prescott J.E., Wonsey D. and Zeller, K. (1999). Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Experimental Cell Research*. **253**, 63–77.

Delbos F., Aoufouchi S., Faili A., Weill J.C. and Reynaud C.A. (2007). DNA polymerase eta is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *The Journal of Experimental Medicine*. **204**, 17-23.

Desiderio S.V., Yancopoulos G.D., Paskind M., Thomas E., Boss M.A., Landau N., Alt F.W. and Baltimore D. (1984). Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature*. **311**, 752-755.

Di Noia J.M. and Neuberger M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annual Review of Biochemistry*. **76**, 1-22.

Douglas M.R., Morrison K.E., Salmon M. and Buckley C.D. (2002). Why does inflammation persist: a dominant role for the stromal microenvironment? *Expert Reviews in Molecular Medicine*. **4**, 1-18.

E

Eischen C.M., Weber J.D., Roussel M.F., Sherr C.J. and Cleveland J.L. (1999). Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes and Development*. **13**, 2658-2669.

Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M. and Hancock D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*. **69**, 119–128.

F

Featherstone K., Wood A.L., Bowen A.J. and Corcoran A.E. (2010). The mouse immunoglobulin heavy chain V-D intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V(D)J recombination. *Journal of Biological Chemistry*. **285**, 9327-9338.

Fiancette R., Rouaud P., Vincent-Fabert C., Laffleur B., Magnone V., Cogné M. and Denizot Y. (2011). A p53 defect sensitizes various stages of B cell development to lymphomagenesis in mice carrying an IgH 3' regulatory region-driven c-myc transgene. *Journal of Immunology*. **187**, 5772-5782.

G

Gabay C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*. **8** (Suppl 2), S3.

Gado K., Silva S., Paloczi K., Domjan G. and Falus A. (2001). Mouse plasmacytoma: an experimental model of human multiple myeloma. *Haematologica*. **86**, 227-236.

Garrett F.E., Emelyanov A.V., Sepulveda M.A., Flanagan P., Volpi S., Li F., Loukinov D., Eckhardt L.A., Lobanenkov V.V. and Birshtein B.K. (2005). Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Molecular and Cellular Biology*. **25**, 1511-1525.

Gaudin E., Hao Y., Rosado M.M., Chaby R., Girard R. and Freitas A.A. (2004). Positive selection of B cells expressing low densities of self-reactive BCRs. *The Journal of Experimental Medicine*. **199**, 843-853.

Gregor P.D. and Morrison, S.L. (1986). Myeloma mutant with a novel 3' flanking region: loss of normal sequence and insertion of repetitive elements leads to decreased transcription but normal processing of the alpha heavy-chain gene products. *Molecular and cellular Biology*. **6**, 1903-1916.

Guglielmi L., Le Bert M., Comte I., Dessain M.L., Drouet M., Ayer Le Lievre C. and Denizot Y. (2003a). Combination of 3' and 5' IgH regulatory elements mimics the B-specific endogenous expression pattern of IgH genes from pro-B cells to mature B cells in a transgenic mouse model. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. **1642**, 181-190.

Guglielmi L., Le Bert M., Truffinet V., Cogné M. and Denizot, Y. (2003b). Insulators to improve expression of a 3'IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **307**, 466-471.

H

Hentges P., Ahnesorg P., Pitcher R.S., Bruce C.K., Kysela B., Green A.J. and Doherty A.J. (2006). Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *Journal of Biological Chemistry*. **281**, 37517-37526.

J

Janz S. (2006). Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA Repair*. **5**, 1213-1224.

K

Kaminski D. A. and Stavnezer J. (2007). Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice. *International Immunology*. **19**, 545-556.

Khamlichi A.A., Pinaud E., Decourt C., Chauveau C. and Cogné M. (2000).the 3'IgH regulatory region: A complexe structure in a search for a function. *Advances in immunology*. **75**, 317-345.

Kishimoto T. (2005). Interleukin-6: from basic science to medicine-40 years in immunology. *Annual Review of Immunology*. **23**, 1–21.

Kovalchuk A.L., Qi C.-feng., Torrey T.A., Taddesse-heath L., Feigenbaum L., Park S.S., Gerbitz A., Klobeck G., Hoertnagel K., Polack A., Bornkamm G.W., Janz S. and Morse III H.C. (2000). Burkitt Lymphoma in the Mouse. *Journal of Experimental Medicine*. **192**, 1183-1190.

Küppers R. and Dalla-Favera R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. **20**, 5580-5594.

Küppers R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Reviews. Cancer.* **5**, 251-262.

Kurosaki T. (2010). The study of B cells and antibodies in Japan: a historical perspective. *International Immunology.* **22**, 217-226.

L

Larsson L.G. and Henriksson M.A. (2010). The Yin and Yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as targets for therapy. *Experimental Cell Research.* **316**, 1429-1437.

Lefranc M.P. and Lefranc G. (2004). Immunoglobulin lambda (IGL) genes of human and mouse. In Honjo T., Alt F.W. and Neuberger M., 2004.

Lenz G. and Staudt L.M. Aggressive lymphomas. (2010). *The New England Journal of Medicine.* **362**, 1417-1429.

Loder F., Mutschler B., Ray R.J., Paige C.J., Sideras P., Torres R. and Carsetti R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *The Journal of Experimental Medicine.* **190**, 75-89.

Lu Z.P., Ju Z.L., Shi G.Y., Zhang J.W. and Sun J. (2005). Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **330**, 204–209.

M

Mageed R.A., Garaud S., Taher T.E., Parikh K., Pers J.O., Jamin C. and Youinou P. (2012). CD5 expression promotes multiple intracellular signaling pathways in B lymphocyte. *Autoimmunity Reviews.* **11**, 795-798.

Manis J.P., van der Stoep N., Tian M., Ferrini R., Davidson L., Bottaro a. and Alt F.W. (1998). Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *The Journal of Experimental Medicine.* **188**, 1421-1431.

- Manis J.P., Michaelson J.S., Birshtein B.K. and Alt F.W.** (2003). Elucidation of a downstream boundary of the 3' IgH regulatory region. *Molecular Immunology*. **39**, 753-760.
- Marquet M., Garot A., Bender S., Carrion C., Rouaud P., Lecardeur S. and Pinaud, E.** (2014). The E μ Enhancer Region Influences H Chain Expression and B Cell Fate without Impacting IgVH Repertoire and Immune Response In Vivo. *Journal of Immunology*. **193**, 1171-1183
- McGarry M.P., Protheroe C.A., Lee J.J:** Mouse Hematology: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2010.
- Medvedovic J., Ebert A., Tagoh H., Tamir I., Schwickert T.A., Novatchkova M. and Busslinger M.** (2013). Flexible long-range loops in the VH gene region of the Igh locus facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity*. **39**, 229-244.
- Melchers F., Karasuyama H., Haasner D., Bauer S., Kudo A., Sakaguchi N. and Rolink A.** (1993). The surrogate light chain in B-cell development. *Immunology Today*. **14**, 60-68.
- Meyer N. and Penn L.Z.** (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews. Cancer*. **8**, 976-990.
- Morvan C.L, Pinaud E., Decourt C., Cuvillier A. and Cogné M.** (2003). The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood*. **102**, 1421-1427.
- Muramatsu M., Sankaranand, V.S., Anant S., Sugai M., Kinoshita K., Davidson N.O. and Honjo T.** (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *Journal of Biological Chemistry*. **274**, 18470-18476.

N

- Neuberger M.S. and Calabi F.** (1983). Reciprocal chromosome translocation between c-myc and immunoglobulin gamma 2b genes. *Nature*. **305**, 240-243.

Nussenzweig A. and Nussenzweig M.C. (2010). Origin of Chromosomal Translocations in Lymphoid Cancer. *Cell*. **141**, 27-38.

O

Ollila J. and Vihinen, M. (2005). B cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **37**, 518-523.

Osmond D.G., Rolink A. and Melchers F. (1998). Murine B lymphopoiesis: Towards a unified model. *Immunology Today*. **19**, 65-68.

P

Park S.S., Kim J.S., Tessarollo L., Owens J.D., Peng L., Han S.S., Tae Chung S., Torrey T.A., Cheung W.C., Polakiewicz R.D., McNeil N., Ried T., Mushinski J.F., Morse III H.C. and Janz S. (2005a). Insertion of c- Myc into Igh Induces B-Cell and Plasma-Cell Neoplasms in Mice Insertion of c-Myc into Igh Induces B-Cell and Plasma-Cell Neoplasms in Mice. *Cancer Research*. **65**, 1306-1315.

Park S.S., Shaffer A.L., Kim J.S., duBois W., Potter M., Staudt L.M. and Janz, S. (2005b). Insertion of Myc into Igh Accelerates Peritoneal Plasmacytomas in Mice. *CancerResearch*. **65**, 7644-7652.

Pawlitzky I., Angeles C.V., Siegel, A.M., Stanton M.L., Riblet R. and Brodeur P.H. (2006). Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse Igh locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A. *Journal of immunology*. **176**, 6839-6851.

Peled J.U., Kuang F.L., Iglesias-Ussel M.D., Roa S., Kalis S.L., Goodman M.F. and Scharff M.D. (2008). The biochemistry of somatic hypermutation. *Annual Review of Immunology*. **26**, 481-511.

Pelengaris S. and Khan M. (2003). The many faces of c-MYC. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **416**, 129-136.

- Pérez-Durén P., Belver L., de Yebenes V.G., Delgado P., Pisano D.G. and Ramiro A.R.** (2012). UNG shapes the specificity of AID-induced somatic hypermutation. *Journal of Experimental Medicine*. **209**, 1379-1389.
- Perlot T. and ALT F.W.** (2008). Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangement of the IgH locus. *Advances in immunology*. **99**, 1-32.
- Perlot T., Alt F.W., Bassing C.H., Suh H. and Pinaud E.** (2005). Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**, 14362-14367.
- Pham P., Bransteitter R., Petruska J. and Goodman M.F.** (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature*. **424**, 103-107.
- Pillai S and. Cariappa A.** (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature Reviews. Immunology*. **9**, 767-777.
- Pinaud E., Khamlichi A.A., Le Morvan C., Drouet M., Nalesso V., Le Bert M. and Cogné M.** (2001). Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity*. **15**, 187-199.
- Pinaud E., Marquet M., Fiancette R., Péron S., Vincent-Fabert C., Denizot Y. and Cogné, M.** (2011). The IgH locus 3' regulatory region: Pulling the strings from behind. *Advances in Immunology*. **110**, 27-70.
- Potter M.** (2003). Neoplastic development in plasma cells. *Immunological Reviews*. **194**, 177-195.
- Potter M. and Wax J.S.** (1981). Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAn: reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane-induced arthritis. *Journal of Immunology*. **127**, 1591-1595.
- Potter M.** (1984). Genetics of susceptibility to plasmacytoma development in BALB/c mice. *Cancer Surv.* **3**, 247-264.

R

- Rada C. and Milstein C.** (2001). The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *European Molecular Biology Organization*. **20**, 4570-4576.
- Rada C., Williams G.T., Nilsen H., Barnes D.E., Lindahl T. and Neuberger M.S.** (2002b). Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Current Biology*. **12**, 1748-1755.
- Reeves W.H., Lee P.Y., Weinstein J.S., Satoh M. and Lu L.** (2009). Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends in Immunology*. **30**, 455-464.
- Revy P., Muto T., Levy Y., Geissmann F., Plebani A., Sanal O., Durandy A.** (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*. **102**, 565-575.
- Riblet R.** (2004). Immunoglobulin heavy chain genes of mouse. In Honjo T., Alt F.W. and Neuberger M., 2004.
- Rouaud P., Vincent-Fabert C., Fiancette R., Cogné M., Pinaud E. and Denizot Y.** (2012). Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 8356-8360.
- Rouaud P., Vincent-Fabert C., Saintamand A., Fiancette R., Marquet M., Robert I. and Denizot Y.** (2013). The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *The Journal of Experimental Medicine*. **210**, 1501-1507.

S

- Saintamand A., Rouaud P., Garot A., Saad F., Carrion C., Oblet C. and Cogné M.** (2015). The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget*. **6**,4845-4852.
- Sánchez-Beato M., Sánchez-aguilera A. and Piris M.A.** (2003). Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood*. **101**, 1220-1235.
- Saleque S., Singh M., Little R.D., Giannini S.L., Michaelson J.S. and Birshtein B.K.** (1997). Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3'E and hs3). *Journal of Immunology*. **158**, 4780-4787.
- Schlissel M.S.** (2003). Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nature Reviews Immunology*. **3**, 890-899.
- Schroeder H.W.Jr. and Cavacini, L.** (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical immunology*. **125**, S41-S52.
- Shinkura R., Tian M., Smith M., Chua K., Fujiwara Y. and Alt F.W.** (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nature Immunology*. **4**, 435-441.
- Silva S. and Klein G.** (1999). Plasmacytoma induction in specific pathogen-free (SPF) bcl-2 transgenic BALB/c mice. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **246**, 379-385.
- Suematsu S., Matsusaka T., Matsuda T., Ohno S., Miyazaki J., Yamamura K. and Kishimoto T.** (1992). Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**, 232-235.

T

- Taccioli G.E., Gottlieb T.M., Blunt T., Priestley A., Demengeot J., Mizuta R. and Jeggo P.** A. (1994). Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science*. **265**, 1442-1445.

Tonegawa S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*. **302**, 575-581.

Truffinet V., Pinaud E., Cogné M., Petit B., Guglielmi L. and Denizot, Y. (2007). The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *Journal of Immunology*. **179**, 6033-6042.

Tung J.W., and Herzenberg L.A. (2007). Unraveling B-1 progenitors. *Current Opinion in Immunology*. **19**, 150-155.

V

Vincent-Fabert C., Truffinet V., Fiancette R., Cogné N., Cogné M. and Denizot, Y. (2009). Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *Journal of Immunology*. **182**, 6926-6932.

Vincent-Fabert C., Fiancette R., Cogné M., Pinaud E. and Denizot Y. (2010b). The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *European Journal of Immunology*. **40**, 3306-3311.

Vincent-Fabert C., Fiancette R., Pinaud E., Truffinet V., Cogné N., Cogné M. and Denizot Y. (2010a). Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood*. **116**, 1895-1898.

W

Wang J. and Boxer L.M. (2005). Regulatory Elements in the Immunoglobulin Heavy Chain Gene 3'-Enhancers Induce c-myc Deregulation and Lymphomagenesis in Murine B Cells. *The Journal of Biological chemistry*. **280**, 12766-12733.

Wooley P.H., Sud S., Whalen J.D. and Nasser S. (1998). Pristane-induced arthritis in mice. V. Susceptibility to pristane-induced arthritis is determined by the genetic regulation of the T cell repertoire. *Arthritis and Rheumatism*. **41**, 2022-2031.

Wu C.H., van Riggelen J., Yetil A., Fan A.C., Bachireddy P. and Felsher D.W. (2007). Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**, 13028-13033.

Z

Zachau H.G. (2004). Immunoglobulin κ genes of human and mouse. In Honjo T., Alt F.W. and Neuberger M., 2004.

