



HAL
open science

Eléments cis-régulateurs du locus IgH et lymphomagenèse B

Nour Ghazzaoui

► **To cite this version:**

Nour Ghazzaoui. Eléments cis-régulateurs du locus IgH et lymphomagenèse B. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2018. Français. NNT : 2018LIMO0058 . tel-01988409

HAL Id: tel-01988409

<https://theses.hal.science/tel-01988409v1>

Submitted on 21 Jan 2019

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.



Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

UMR CNRS 7276 - INSERM 1262 - CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

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

Discipline : Science Biologie Santé/Spécialité : Immunogénétique

Présentée et soutenue par

Nour GHAZZAUI

Le 18 décembre 2018

Eléments *cis*-régulateurs du locus IgH et lymphomagenèse B

Thèse dirigée par Dr. Yves DENIZOT

Présidente du jury

Mme. Marie-Odile Jauberteau, Professeur des Universités, HDR, Université de Limoges

Rapporteurs

Mme. Edith Chevret, Professeur des Universités, HDR, Université de Bordeaux

M. Pierre Dubus, Professeur des Universités, HDR, Université de Bordeaux

Examineur

M. Yves Denizot, Directeur de Recherche Inserm, HDR, Université de Limoges



Université de Limoges
Ecole Doctorale Sciences Biologiques et Santé (ED 615)
Centre de Biologie et de Recherche en Santé

UMR CNRS 7276-Inserm U1262
Laboratoire 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

Spécialité : Immunogénétique

Présentée et soutenue par
Nour GHAZZAUI

Le 18 Décembre 2018

Thèse dirigée par Dr. Yves DENIZOT

Eléments *cis*-régulateurs du locus IgH et lymphomagenèse B

JURY :

Présidente du jury

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

Rapporteurs

Pierre Dubus, Professeur des Universités, HDR, Université de Bordeaux

Edith Chevret, Professeur des Universités, HDR, Université de Bordeaux

Examineur

Yves Denizot, Directeur de Recherche Inserm, HDR, Université de Limoges

Université de Limoges
Ecole Doctorale Sciences Biologiques et Santé (ED 615)
Centre de Biologie et de Recherche en Santé

UMR CNRS 7276-Inserm U1262
Laboratoire 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

Spécialité : Immunogénétique

Présentée et soutenue par
Nour GHAZZAUI

Le 18 Décembre 2018

Thèse dirigée par Dr. Yves DENIZOT

Eléments *cis*-régulateurs du locus IgH et lymphomagenèse B

JURY :

Présidente du jury

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

Rapporteurs

Pierre Dubus, Professeur des Universités, HDR, Université de Bordeaux

Edith Chevret, Professeur des Universités, HDR, Université de Bordeaux

Examineur

Yves Denizot, Directeur de Recherche Inserm, HDR, Université de Limoges





Au cours de mes trois premières années de thèse, j'ai été financé par L'Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique. Puis j'ai obtenu une aide individuelle de la Société Française d'Hématologie afin de continuer mes travaux pendant six mois supplémentaires.



Résumé

Le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) subit trois processus de remaniements géniques durant la lymphopoïèse B. Ces événements induisent des cassures de l'ADN potentiellement oncogéniques, d'où la nécessité d'une régulation extrêmement stricte. Ceci est dû aux deux principaux éléments *cis*-régulateurs du locus IgH. L'*enhancer* 5'E μ régule les recombinaisons V_HDJ_H qui établissent un répertoire antigénique fonctionnel lors des phases précoces. La région régulatrice en 3' (3'RR) est essentielle aux hypermutations somatiques (SHM) et à la recombinaison de classe (CSR) aux stades tardifs, modifiant respectivement, l'affinité et les fonctions effectrices de l'Ig. La plupart des lymphomes B matures portent les stigmates de translocations d'oncogènes au locus IgH. Le but de ma thèse a été de mieux comprendre les interactions transcriptionnelles entre les *enhancers* E μ et 3'RR et évaluer si le ciblage de cette dernière pourrait se révéler une approche thérapeutique potentielle. Nous avons démontré que la 3'RR est l'élément essentiel qui contrôle la transcription du locus IgH dans les lymphocytes B matures. Elle est dispensable lors des phases initiales (recombinaisons V_HDJ_H), mais agit comme *silencer* sur l'expression des segments DJ_H. L'analyse de la lymphomagenèse dans trois modèles murins porteurs d'une insertion de Myc en trois points du locus IgH a montré des différences dans les cinétiques d'émergence des lymphomes, leurs phénotypes et index de prolifération. L'effet de la 3'RR sur l'oncogène est suffisant pour l'émergence de lymphomes B. Son absence ne semble pas être préjudiciable au développement de réactions inflammatoires/immunes. Son ciblage pourrait donc se révéler une approche thérapeutique intéressante pour diminuer son activité transcriptionnelle sur l'oncogène transloqué. Un rôle potentiel des inhibiteurs des histones désacétylases est à l'étude.

Mots clés : Locus IgH, 3'RR, Myc, Lymphomes B matures, Activateurs transcriptionnels.

Abstract

The immunoglobulin heavy chain locus (IgH) undergoes several changes along B-cell differentiation. V_HDJ_H recombinations during the early stages give the diversity of the antigenic repertoire. Somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR) during late stages allow affinity maturation and the acquisition of new effectors functions. These rearrangements are highly regulated and are under the control of the IgH locus *cis*-regulatory elements. The 5' E_μ enhancer is important for V_HDJ_H recombination. The 3' regulatory region (3' RR) is essential for both CSR and SHM. These events induce breaks into the IgH locus, making it a hotspot for oncogenic translocations. The aim of my thesis was to understand the transcriptional interactions between E_μ and 3'RR enhancers and to evaluate whether the targeting of the latter could be of a potential therapeutic approach. We have demonstrated that 3'RR is essential to control IgH transcription in mature B cells. It is dispensable during the initial stages of development (V_HDJ_H recombinations). At the pro-B cell stage, it has a silencer effect rather than a transcriptional one on the DJ_H segments expression. The analysis of lymphomagenesis in three mice models carrying an insertion of Myc in different locations at the IgH locus showed significant differences in lymphoma kinetics, phenotypes and proliferation index. 3'RR alone, as a major transcriptional activator of the IgH locus, is capable of leading to B-cell lymphomas. Its absence is not detrimental for the development of classical inflammatory/immune reactions. Its targeting may be of a potentially interesting therapeutic approach to decrease its transcriptional activity on the translocated oncogene. A potential role for histone deacetylase inhibitors is under study.

Keywords: IgH locus, 3'RR, Myc, Mature B-cell lymphomas, Transcriptional enhancers.

À mes parents ♥,

Maman

Papa

Rola

Naddoush

Farrouh

Lynne

Shady

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon amour éternel.

*« L'art de la connaissance c'est de
savoir ce qui doit être ignoré. »*

Rûmi

*« La réussite ne se trouve pas dans la meilleure des places, la plus haute ou la plus payante,
mais dans le maximum qu'on peut tirer de soi-même. »*

Renaud Tremblay

*« Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas.
C'est parce que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles. »*

Sénèque, Lettres à Lucilius, Livre XVII

Remerciements

J'aimerai en premier remercier mon directeur de thèse le Dr Yves DENIZOT pour son encadrement, tout le temps qu'il m'avez consacré, son aide, ses conseils et sa disponibilité. Merci pour la confiance que vous m'aviez accordée, votre bonne humeur, votre encouragement, toutes les discussions scientifiques, les blagues et « vos principes » que je n'oublierai jamais. Ces trois années de thèse sont passées très vite (comme vous m'aviez prévenu le premier jour de mon arrivée). J'ai été ravi de travailler avec vous.

Je tiens également à remercier le Pr Michel COGNÉ pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance envers les membres de mon jury. Merci aux Pr Pierre DUBUS et Pr Edith CHEVRET de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail et d'être les rapporteurs de cette thèse. Merci au Pr Marie-Odile JAUBERTIEAU de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie sincèrement tous les membres de l'UMR 7276 CRIBL pour ces trois années à vos côtés. J'espère n'oublier personne.

Merci à l'ensemble de l'équipe de Michel COGNÉ. Merci à tous les teams Eric, Christophe, Laurent, Jean-Claude, Sophie, Jeanne (merci pour les discussions en anglais), Anne, July et Tiffany. Merci Claire, amoureuse des gateaux libanais, pour la cyto et pour ta sympathie. J'adresse aussi mes remerciements à Cendrine, Sandrine, Mylène, Stephanie, Zhélia (l'énergétique), Christelle O (pour ton aide dans les manipes de western et le prism), Marie M (habb), Marine et Marie C.

Mention spéciale à Zeinab, Iman, Batoul et Leena (ma voisine et « shopping » partner). Une pensée également à Nivine, Omar, Armand, Nicolas, Ophélie, Hend, Héloïse, Anderson, Audrey, Jean-Marie, Anne, Victoria, Sébastien et Morgan. Bon courage à vous pour la suite. Je voudrais sincèrement remercier François Boyer, sans toi c'était impossible de faire toutes les analyses bio-informatiques.

Merci pour tout l'équipe d'hémato pour votre sympathie : Jean, Chantal, Nathalie, Cathy, Christelle V-F, Héloïse, Valéria (pout toutes les danses et l'énergie), Emilie, Oussama, Nicolas (merci pour ton humour), Hazar, Pauline, Jonathan et Lillian. Robin, « Robin des bois », merci pour ton humour et toutes les blagues. Reccho merci pour tous les bons moments, les massages et les sourires que nous avons partagés.

Une pensée pour toutes les personnes qui font tourner notre laboratoire. Merci aux personnels de l'animalerie qui prennent soin de nos amis les souris. Un grand merci pour Sylvie pour sa gentillesse et sa sympathie. Je tiens à remercier également Séverine et Rhypsine de s'être occupé de nos verreries. Merci à Aurore, Sarah et Christian.

Un merci très particulier à mes collègues dans la Denizot team pour la bonne ambiance quotidienne. Tout d'abord, un ancien collègue Alexis, le semi-Libanais, « papa, Sénior », merci pour tous ce que tu m'avais appris dès mon arrivée, merci pour ton aide et toutes les discussions. Merci pour ta présence aux moments les plus difficiles (Alexis !!! le word a disparu). Hussein, « Nourr limmiyaaaa » 😊, merci mon ami pour tous les bons moments et les fous rires que nous avons partagés pendant ces 3 dernières années. C'était vraiment amusant les manipes à ta compagnie. Je sais que je t'ai éclairé ta vie :D :P. Mention à Melissa, nouvelle entrante au Team. Bon courage pour la suite.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans remercier mes amis hors labo. Mohamad Baydoun, merci pour ton amitié, tous les bons moments, toutttttttttt, dès le premier jour de mon arrivée. Bon courage pour la suite, c'est ton tour bientôt. Rawanoooo, « CHUPSI » ❤️ my gym partner et la plus agréable, folle compagnie, merci pour ton support quotidien. Ton amitié compte trop pour moi. Merci à tous les membres du gym, Allousha pour tous les bons plats et Ahmad H pour les bons moments. Je tiens également à remercier Hajjar, Ahmad I, Mroue, Jalal, Houssam, Oussama et Joseph. Tous mes amis hors le labo, un grand merci, votre soutien de loin compte trop pour moi.

A Sansounti « ASMARI » ❤️, merci pour ton soutien. Tu es toujours là pour moi, dans les moments les plus durs et les plus beaux. Une sœur et une amie unique. Chanceuse de t'avoir dans ma vie.

Enfin, le plus fort de mes remerciements va à ma famille. Maman et papa un immense merci pour tous ce que vous m'avez donné pour que j'arrive là ou j'en suis maintenant. Je suis pleine de gratitude, d'amour inconditionnel et mon profond respect pour vous. Papa merci pour ta patience avec cette question « quand est-ce-que tu reviendras ? ». Maman, tu es ma ressource de vie avec tes mots réconfortants. Mes sœurs (Farrouh, Naddoush et Rola) gravées à jamais don mon cœur, vous avez su me tendre la main, au moment où je n'allais pas bien. Rola « ya zghirté » ma petite sœur de cœur tu m'apportes tout le bonheur, merci pour nos complicités ;). Je ne m'étalerai pas plus, vous savez à quel point vous comptez pour moi.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	8
Table des matières.....	11
Abréviations.....	14
Table des illustrations.....	17
Introduction.....	19
Synthèse Bibliographique.....	22
Chapitre I La lymphopoïèse B.....	23
1. Organisation des gènes d'Ig.....	23
i. Loci des chaînes légères.....	23
a. Le locus kappa (κ).....	23
b. Le locus lambda (λ).....	23
ii. Le locus des chaînes lourdes.....	24
iii. Ig fonctionnelle.....	25
2. La moelle osseuse : Phase précoce Ag indépendante.....	25
i. Cellule souche hématopoïétique : Spécification lymphoïde.....	25
ii. Le stade pré-pro-B : Engagement dans la lignée B.....	26
iii. Le stade pro-B : Réarrangement $V_H D J_H$ au locus IgH.....	26
iv. Le stade pré-B : Réarrangements $V_L J_L$ aux loci IgL.....	29
v. Le stade B immature : Edition du BCR et sa tolérance.....	30
3. Les organes lymphoïdes périphériques : Phases tardives dépendantes de l'Ag.....	30
i. Le stade B transitionnel et signalisation du BCR.....	30
ii. IgD.....	32
iii. Le stade B mature et la formation du centre germinatif (GC).....	33
a. Les cellules B2 de la zone marginale.....	34
b. Les cellules B2 folliculaires et GC.....	34
iv. Les plasmocytes.....	35
v. Les cellules B mémoires.....	36
vi. Les cellules B1.....	36
vii. Les cellules B régulatrices.....	38
Chapitre II Les éléments <i>cis</i> -régulateurs et les Remaniements des gènes du locus IgH	39
1. Accessibilité du locus.....	39
2. Les promoteurs et la transcription germinale.....	42
i. La transcription germinale des régions variables.....	42
ii. La transcription germinale des régions constantes.....	43
3. Les régions isolatrices.....	44
i. La région 5'.....	44
ii. La région 3' : Hs 5 6 7.....	44
iii. La région intergénique $V_H D$ et IGCR1.....	45
4. Les activateurs transcriptionnels.....	45

i.	L'enhancer 5' E μ	46
a.	cE μ	46
b.	Les MARs	46
c.	Rôle de E μ	47
ii.	La région régulatrice en 3' du locus IgH (3'RR).....	48
a.	Structure et évolution de la 3'RR.....	49
b.	Structure fonction de la 3'RR.....	50
c.	Les super-enhancers.....	51
d.	Régulation de la 3'RR par des facteurs <i>trans</i>	51
Chapitre III Recombinaisons secondaires et Translocation oncogénique au locus IgH ..		54
1.	Recombinaisons secondaires : CSR et SHM.....	54
i.	Les hypermutations somatiques (SHM)	55
ii.	La recombinaison des classes (CSR)	56
2.	Les altérations oncogéniques au cours de la lymphopoïèse	57
i.	Translocations lors des recombinaisons VDJ.....	57
ii.	Translocations lors des réarrangements impliquant l'enzyme AID	57
3.	La modulation de l'expression de l'oncogène transloqué.....	58
4.	Rôle de la conformation spatiale des chromosomes.....	59
i.	Régulation spatiale du locus IgH.....	60
5.	L'oncogène Myc	61
i.	Sa structure	62
a.	Le gène Myc	62
b.	La protéine Myc.....	63
ii.	Régulation de l'expression et de l'activité de Myc	63
iii.	Facteurs de transcription de Myc : Activation et répression transcriptionnelle.....	64
iv.	Sa fonction.....	65
a.	Prolifération, cycle cellulaire, croissance, métabolisme et Myc.....	65
b.	Myc et apoptose.....	66
c.	Myc et différenciation cellulaire	67
v.	Myc et développement B normal.....	67
Chapitre IV Myc et Lymphomes B matures		69
Objectifs et Résultats.....		71
1.	Coopérations transcriptionnelles entre les enhancers E μ et 3'RR du locus IgH.....	72
Article 1.....		72
Article 2.....		72
Article 3.....		73
2.	Activateurs transcriptionnels du locus IgH et lymphomagenèse	75
3.	Le ciblage de la 3'RR a-t-il un effet néfaste sur les réactions inflammatoires normales ?	82
Article 4		82
Discussion.....		84
1.	Coopérations entre les <i>enhancers</i> E μ et 3'RR :	85
2.	Activateurs transcriptionnels et lymphomagenèse :	87
3.	Targeting de la 3'RR et réaction inflammatoire induite :	90
Bibliographie		93
Annexes		127
1.	Article 1	128

2.	Article 2.....	129
3.	Article3.....	130
4.	Article 4.....	131
5.	Article 5.....	132
6.	Article 6.....	133
7.	Article 7.....	134
8.	Article 8.....	135

Abréviations

A

APRIL : A Proliferation-Inducing Ligand

Ag : Antigène

Ac : Anticorps

AEJ : Alternative End-Joining Pathway

AID : Activation-Induced Deaminase

Arf1 : ADP Ribosylation Factor 1

ATM : Ataxia-Telangiectasia Mutated

B

Bcl2 : B-Cell Lymphoma 2

Bcl6 : B-Cell Lymphoma 6

BAFF : B-cell Activating Factor

Bcl2-Mbr : Bcl2 major breakpoint

BCR: B Cell Receptor

BSAP : B Cell Specific Activator Protein

Bright : B-cell Regulator of IgH Transcription

BL : Burkitt Lymphoma

Blimp1 : B lymphocyte-induced maturation protein-1

C

ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine

CDRs : Complementary Determining Region

CSR : Class switch Recombination

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CLP : Common Lymphoid Progenitor

Cernunnos (ou XLF) : Xrcc4-like Factor

CD40 L : CD40 Ligand

Cxcr4 : chemokine C-X-C motif Receptor4

Ctcf : CCCTC-binding factor

Cdk : Cyclin-dependent kinase

C/EBP: CCAAT-Enhancer-Binding Proteins

D

DNase I : DésoxyriboNucléase I

dice : Downstream Immunoglobulin Control Elements.

D : Diversité

DSB : Double Strand Break

DDR : DSB Dependant Response

DNA-PKcs : DNA dependant Protein Kinase catalytic subunit

DZ : Dark Zone

DISC : Death-Inducing Signaling Complex

E

E2A : E box protein binding 2 A

Ebf1 : Early B Cell Factor

F

FR : Framework Regions

FO : Folliculaire

FDC : Follicular Dendritic Cell

FL : Follicular Lymphoma

Foxo : Forkhead box O protein

FDA : Food and Drug Administration

G

GC : Germinal center

H

hs : Site hypersensible à la DNase I

HAT : Histone AcetylTransferase

HDAC : Histone Desacetylase

HDACi : Histone Desacetylase inhibitor

HP1 : Heterochromatin Protein1

I

Irf4 : Interferon Regulatory Factor 4

Ig : Immunoglobuline

IgH : Immunoglobulin Heavy chain

IgL : Immunoglobulin Light chain

IRE : Internal Regulatory Element

IL : Interleukine

J

J : Jonction

K

KI : Knock In

KO : Knock-Out

Kb : Kilobase

KAP1 : KRAB domain Associated Protein 1

L

LT : Lymphocytes T

LB : Lymphocytes B

LZi : Leucine-Zipper

L: leader

LPS : Lipopolysaccharides

LZ : Light Zone

M

MAR : Matrix Association Region

MALT : Mucosae Associated Lymphoid Tissue

MZ : Zone marginale

MMR : Mismatch Repair

MCL : Mantle Cell Lymphoma

Mdm2 : Murine double minute 2

N

NK : Natural Killer

NHEJ: Non Homologous End Joining

N : Non-germline nucleotide

NFκB : Nuclear Factor kappa B pathway

P

PAMPs : Pathogen Associated Molecular Pattern

Pb: Paire de base

PU.1 : Purine box factor-1

Pax5 : Paired-box gene 5

P : Palindromic nucleotide

R

RNA Pol II : ARN Polymérase II

Rag : Recombination-Activating Gene

RSS : Recombination Sequence Signal

S

SI : Système immunitaire

SHM : Somatic HyperMutation

T

T_{FH} : T Follicular Helper

TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transferase

TLR : Toll Like Receptor

Tnf : Tumor necrosis factor

Trail/Trail-Récepteur : Tnf Related Apoptosis-Inducing Ligand

TC-seq : Translocation Capture-sequencing

Tcf3: E2A Ig enhancer binding factors

U

Ung: Uracil DNA-Glycosylase

V

V : Région variable

V_L : Régions variables des chaînes légères

V_H : Régions variables des chaînes lourdes

W

WT: Wild type

X

Xrcc4 : X-ray Repair Cross-Complementing protein 4

Z

Zfp318 : Zinc Finger Protein 318

3'RR: 3' Regulatory Region

κ : kappa

λ : lambda

μ : mu

δ : delta

ε : epsilon

γ : gamma

Table des illustrations

Figure 1 : Structure d'une immunoglobuline. Exemple d'une IgG1.

Figure 2 : Représentation schématique des loci d'immunoglobulines chez la souris.

Figure 3 : Représentation schématique des événements de recombinaison lors du développement B.

Figure 4 : Représentation schématique de la lymphopoïèse B précoce.

Figure 5 : Représentation des recombinaisons V_HDJ_H au locus IgH

Figure 6 : Représentation schématique de l'état des réarrangements V(D)J aux loci d'Ig.

Figure 7 : Règle « 12/23 » et séquences RSS au locus IgH.

Figure 8 : Représentation schématique du processus de clivage de l'ADN par les enzymes RAG.

Figure 9 : Représentation schématique des différents stades de l'ontogénie B tardive.

Figure 10 : Mécanisme d'épissage alternatif : co-expression d'une IgM et d'une IgD.

Figure 11 : Structure schématique d'un centre germinatif.

Figure 12 : Représentation schématique du positionnement nucléaire des allèles IgH au cours du développement B.

Figure 13 : Représentation schématique de la contraction du locus IgH au cours des recombinaisons V_H-DJ_H .

Figure 14 : Représentation schématique des éléments *cis*-régulateur du locus IgH.

Figure 15 : Transcrits germinaux des régions variables au cours des recombinaisons V_HDJ_H au locus IgH.

Figure 16 : Diversité et composition des promoteurs V_H .

Figure 17 : Génération des transcrits germinaux dans les régions constantes.

Figure 18 : Différents types d'isolateurs existent chez les vertébrés.

Figure 19 : Structure de la 3'RR.

Figure 20 : Représentation schématique de la recombinaison LSR (pour *Locus Suicide Recombination*).

Figure 21 : Hypermutation somatique au sein des loci d'Ig.

Figure 22 : Représentation schématique de la recombinaison isotypique au stade tardif de la lymphopoïèse B (CSR vers IgG1).

Figure 23 : Translocations oncogéniques au locus IgH liées aux mécanismes de remaniements géniques au cours du développement B.

Figure 24 : Schéma représentant les différents événements aboutissant à la cancérisation d'une cellule.

Figure 25 : Schéma représentant le gène Myc.

Figure 26 : Organisation protéique de Myc.

Figure 27 : Activité transcriptionnelle de Myc.

Figure 28 : Représentation schématique des diverses fonctions biologiques contrôlées par Myc.

Figure 29 : Translocations récurrentes dans les lymphomes B.

Figure 30 : Représentation schématique des modèles murins.

Introduction

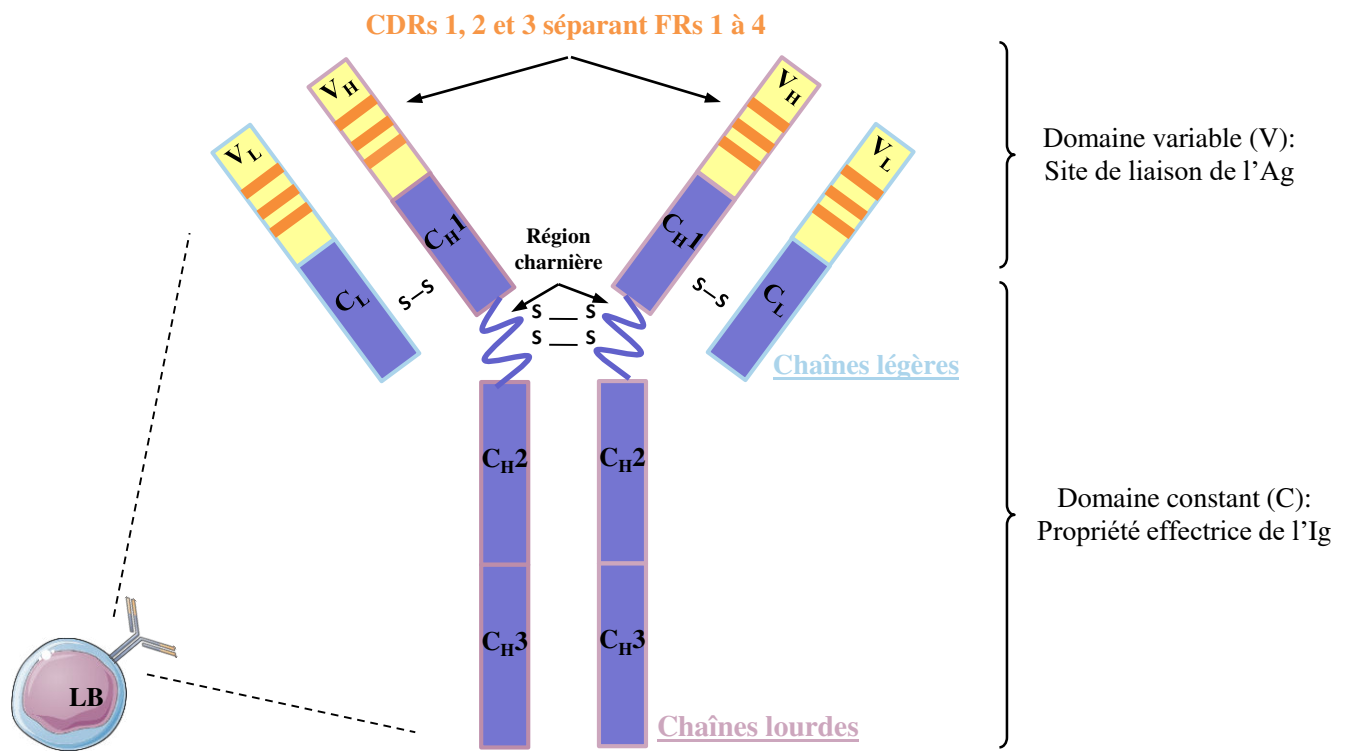


Figure 1 – Structure d’une immunoglobuline. Exemple d’une IgG1.

Une Ig est constituée de deux domaines : Constant (représenté en mauve) et variable (représenté en jaune). Elle est formée par la réunion de deux chaînes légères (encadrées en bleu) et deux chaînes lourdes (encadrées en rose). Des ponts disulfures (symbolisés S-S) les relient entre elles. Le domaine constant est composé des régions constantes des chaînes lourdes (C_H) et légères (C_L). La région charnière est située entre les domaines C_{H1} et C_{H2} . Elle confère sa flexibilité à l’Ig. Le domaine variable (représenté en jaune) est composé des régions variables des chaînes lourdes (V_H) et légères (V_L). Chacun de ces domaines contient trois régions hypervariables, notées CDR 1 à 3 (représentées en oranges), séparant quatre régions moins variables (FR 1 à 4). CDRs (*Complementary Determining Region*); FR (*Framework regions*)

Le système immunitaire (SI) des vertébrés assure la protection de l'organisme contre toutes les agressions extérieures auxquelles il est exposé (virus, bactéries, protozoaires, parasites...), tout en le défendant contre les cellules tumorales. Cette fonction repose principalement sur sa capacité de distinguer entre les composants génétiques du « soi » et du « non soi ». Ce système complexe dispose de divers organes et types cellulaires pour remplir cette mission.

Pour une protection optimale, deux réponses immunitaires capables de coopérer entre elles existent : les réponses innées et adaptatives. L'immunité innée assure une défense naturelle aspécifique, sans mémoire immunitaire, par des barrières physiques (peau, muqueuses...), par des cellules tueuses naturelles (NK pour *Natural Killer*) et par des cellules phagocytaires (macrophages et polynucléaires) qui reconnaissent des motifs communs à tous les pathogènes, les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*). L'immunité adaptative, plus tardive, possède une mémoire immunitaire et est spécifique de l'antigène (Ag). Cette spécificité est due à deux acteurs principaux : les lymphocytes T (LT) lors d'une réponse cellulaire et les lymphocytes B (LB) lors d'une réponse humorale. Lors de cette dernière, les LB, objet de mon travail, reconnaissent l'Ag grâce aux immunoglobulines (Ig) membranaires constituant le BCR (*B Cell Receptor*) associées à deux protéines transmembranaires dites $Ig\alpha$ (ou CD79a) et $Ig\beta$ (ou CD79b). Suite à une activation, le LB se différencie en plasmocyte sécrétant des Ig solubles ou anticorps (Ac) spécifiques de l'Ag afin de le neutraliser. Dans le cas d'une seconde infection par ce même Ag, ce sont aussi ces cellules différenciées en LB mémoires qui assurent une défense continue de l'organisme.

Exprimée à la surface des LB ou excrétée par les plasmocytes, une molécule d'Ig est une glycoprotéine hétérodimérique d'environ 150 kDa avec une composition unique. Elle est constituée de deux chaînes lourdes (IgH pour *Immunoglobulin Heavy chain*) identiques et de deux chaînes légères (IgL pour *Immunoglobulin Light chain*) identiques reliées entre elles par des ponts disulfures (**Figure 1**). Il existe deux types de chaînes légères, kappa (κ) et lambda (λ), pouvant s'associer à cinq classes de chaînes lourdes : mu (μ), delta (δ), gamma (γ), epsilon (ϵ) et alpha (α) correspondant respectivement aux IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Lors d'une réaction immunitaire, les IgM sont produites en première sous forme pentamérique. Ce sont les Ig synthétisées « par défaut » par le LB. Les IgD sont majoritairement co-exprimées avec les IgM. Elles sont principalement membranaires et sont impliquées dans la réponse antibactérienne. L'IgG est l'isotype majeur. Il est subdivisé en sous-classes qui se distinguent par leurs fonctions effectrices : IgG1 pour la réponse antivirale et antiparasitaire, IgG2a et IgG2b pour la réponse

antivirale, et IgG3 pour la défense antibactérienne. Les IgE jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'hypersensibilité, mais sont aussi impliquées dans la défense antiparasitaire. Finalement, les IgA sont principalement sécrétées dans les muqueuses.

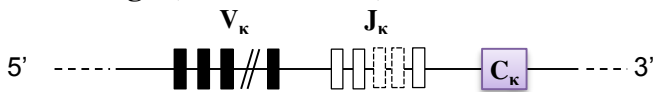
Chaque type de chaîne possède une région variable (V) constituant le site de reconnaissance de l'Ag et un domaine constant (C) qui lui confère ses fonctions effectrices (liaison aux récepteurs Fc, activation du système de complément). L'association d'une région V de la chaîne légère (V_L) et lourde (V_H) constitue le site de fixation spécifique vis-à-vis de l'Ag (**Figure 1**). Les LB sont capables de produire une énorme diversité de récepteurs aux Ag, ce qui leur confère leurs efficacités à défendre notre organisme contre l'ensemble des agents pathogènes aptes à l'infecter. Ceci est dû à l'organisation particulière des complexes génétiques à l'origine des Ig. En fait, 3 différents loci sont distingués : $Ig\lambda$ et $Ig\kappa$ codant les chaînes légères et le locus IgH pour les chaînes lourdes. Ils sont localisés, respectivement, sur les chromosomes 16, 6 et 12 chez la souris. Ces loci sont caractérisés par une structure morcelée des gènes, non fonctionnelle dans leur configuration germinale. Pour devenir fonctionnels, les LB sont soumis à divers remaniements géniques successifs tout au long de leur développement. Ces événements sont régulés par des complexes d'activation génique, impliquant de multiples éléments *cis*-régulateurs qui agissent d'une façon coordonnée en contrôlant l'accessibilité et la transcription des gènes. Ceci confère de l'instabilité génomique, en particulier au sein du locus IgH . La conséquence en est une zone critique de translocations oncogéniques. L'expression de ces oncogènes, juxtaposés aux puissants activateurs transcriptionnels du locus IgH , est dérégulée favorisant le développement de lymphomes.

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé exclusivement sur le locus IgH murin. Il est à noter que ce locus présente une grande similarité avec le locus IgH humain, ce qui fait de la souris un modèle très relevant pour l'extrapolation de nos résultats à l'homme. C'est pourquoi je détaillerai plus particulièrement dans mon introduction le locus IgH murin au cours de la maturation B, l'oncogène Myc et les lymphomes B matures.

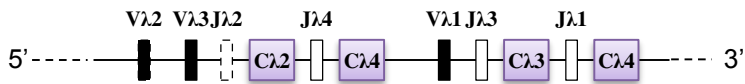
Synthèse Bibliographique

Loci des chaînes légères

A - Locus Ig κ (chromosome 6)



B - Locus Ig λ (chromosome 16)



Locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines IgH

C - Locus IgH (chromosome 12)

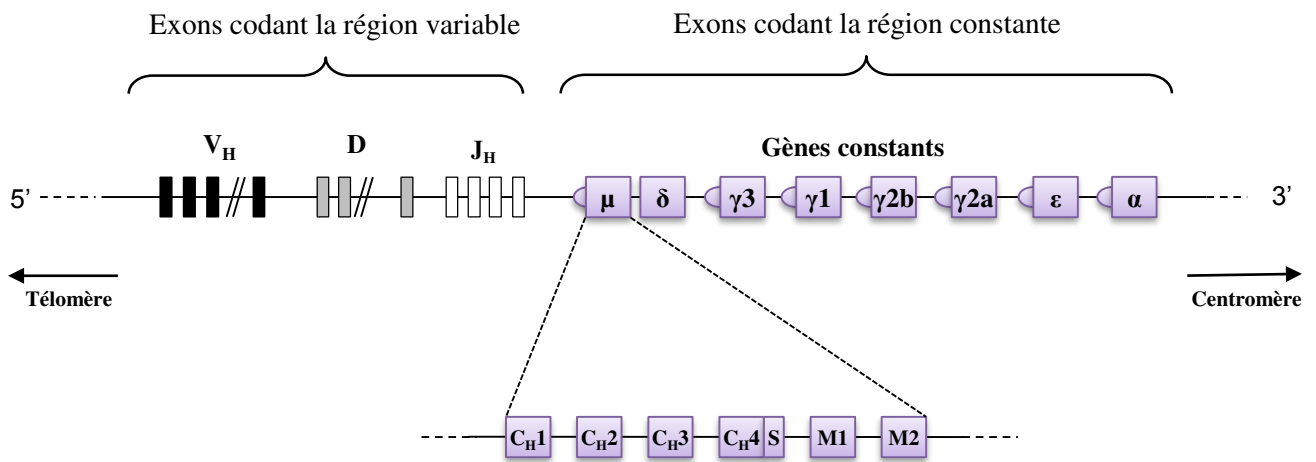


Figure 2 – Représentation schématique des loci d'immunoglobulines chez la souris.

Les segments variables (V), de diversité (D), de jonction (J) et constants (C) sont annotés et représentés par des rectangles, respectivement noirs, gris, blancs et mauves.

A – Représentation schématique du locus Ig κ

B – Représentation schématique du locus Ig λ

C – Représentation schématique du locus IgH avec les détails du segment C μ , avec les différents exons C H 1 à 4, suivis de l'exon de sécrétion S et des deux exons de membrane M1 et M2.

Chapitre I La lymphopoïèse B

1. Organisation des gènes d'Ig

Ayant réalisé mes travaux de thèse sur des modèles murins, je ne développerai que les gènes d'Ig chez la souris. L'organisation similaire des loci humains et murins fait de la souris un modèle d'étude très relevant (malgré quelques différences qui existent entre les espèces de mammifères) (Hirano et al., 2011; Rauta et al., 2012). Les gènes d'Ig sont repartis en trois loci différents localisés sur trois chromosomes distincts (2 légers et 1 lourd). Ces loci sont caractérisés par une structure segmentée dans leur configuration germinale : en allant de 5' vers 3', la région variable est codée par des segments de variabilité « V », des segments de jonction « J » et dans le cas du locus IgH par des segments de diversité « D ». Les segments « C » codent la région constante des gènes d'Ig. Une chaîne légère typique pèse environ 25 kDa contre 55 kDa pour une chaîne lourde.

i. Loci des chaînes légères

a. Le locus kappa (κ)

Le locus κ (**Figure 2A**) est localisé sur le chromosome 6 chez la souris (chromosome 2 chez l'homme). Dans sa configuration germinale, il est composé de plus de 100 segments V_{κ} fonctionnels parmi 161. Par contre le nombre de segments J_{κ} est limité à 5 dont un non fonctionnel. On note un seul gène constant « C » (Aoki-Ota et al., 2012). 95% des LB murins expriment une Ig_{κ} . Ceci est due à l'activation privilégiée de ce locus avant l'activation du locus λ (Engel et al., 1999).

b. Le locus lambda (λ)

Le locus lambda (**Figure 2B**) est situé sur le chromosome 16 chez la souris (chromosome 22 chez l'homme). C'est un petit locus d'environ 200 kb. Il présente une diversité limitée avec une organisation particulière. Il est constitué de 3 segments V_{λ} , 5 segments J_{λ} dont 2 non fonctionnels, et 4 segments C_{λ} dont 2 à 3 segments sont fonctionnels. Il est organisé en deux clusters adjacents $V_{\lambda}J_{\lambda}C_{\lambda}$ qui semblent avoir surgi par duplication (Eisen and Reilly, 1985). Le premier 5'- $V_{\lambda 2}-V_{\lambda 3}-J_{\lambda 2}C_{\lambda 2}$ résultant de l'association entre deux segments variables $V_{\lambda 2}$ et $V_{\lambda 3}$ avec un segment de jonction ($J_{\lambda 2}$), puis un segment constant ($C_{\lambda 2}$) ; et le second : $V_{\lambda 1}-J_{\lambda 3}C_{\lambda 3}-J_{\lambda 1}C_{\lambda 1}$, formé d'un seul segment variable ($V_{\lambda 1}$) suivi de segment de jonction et constant

$J_{\lambda 3}C_{\lambda 3}$, puis des segments $J_{\lambda 1}C_{\lambda 1}$ (Eisen and Reilly, 1985). Le locus ne subit que 4 réarrangements principaux : $V_{\lambda 1}-J_{\lambda 1}$, $V_{\lambda 2}-J_{\lambda 2}$, $V_{\lambda 3}-J_{\lambda 2}$ et $V_{\lambda 1}-J_{\lambda 3}$ dans un ratio de 3 :2 :2 :1. De plus, $V_{\lambda 2}$ peut se recombiner avec $J_{\lambda 1}-C_{\lambda 1}$ ou $J_{\lambda 3}-C_{\lambda 3}$. Ces réarrangements rares suggèrent la présence possible d'éléments régulateurs en 5' de $V_{\lambda 2}-J_{\lambda 2}$ et en 3' de $J_{\lambda 1}-C_{\lambda 1}$ comme la recombinaison entre $V_{\lambda 2}-J_{\lambda 2}$ et $J_{\lambda 1}-C_{\lambda 1}$ élimine toute la partie centrale d'ADN (Haque et al., 2013). Cette organisation de segment conduit à un répertoire restreint. Son intérêt pose question au vu de la très faible utilisation de ce locus (5% des LB normaux) chez la souris. Il ne semble servir que de roue de secours au cas de mauvaises recombinaisons sur le locus $Ig\kappa$. Les loci des chaînes légères n'ayant pas fait l'objet de mes travaux de thèse, je ne détaillerai pas leurs remaniements dans ce manuscrit.

ii. Le locus des chaînes lourdes

Le locus des chaînes lourdes (IgH), situé sur le chromosome 12 chez la souris (chromosome 14 chez l'homme) est un grand locus multigènes s'étendant sur plus de 2300 kilobases. Il est divisé en 4 régions principales : « V_H », « D », « J_H » et « C_H ».

Il comprend, du télomère vers le centromère (côté 5' vers 3') plus de 152 segments (97 sont fonctionnels) variables « V_H » (dont ceux situés près du côté 5' dits distaux et ceux du côté 3' dits proximaux) (Lefranc et al., 2005). Ces segments « V_H » se répartissent en 15 familles. On note 17 à 20 segments de diversité « D », dont 14 fonctionnels regroupés en 4 familles : DFL16, DSP2, DST4 et DQ52. On observe 4 segments de jonctions « J_H » tous fonctionnels (**Figure 2C**). Ces segments subissent une recombinaison V_HDJ_H régulée pour produire la région variable de l'Ig. La région « V_H » est précédée de l'exon « Leader » (L), une petite séquence de 60 à 90 pb qui code la partie du peptide signal de la protéine.

La partie constante des chaînes lourdes d'Ig est codée par 8 gènes représentant les différents isotypes existant (Retter et al., 2007). En allant de l'extrémité 3' des segments V_HDJ_H , ces gènes sont par ordre : μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2b$, $\gamma 2a$, ϵ et α . Chaque gène constant est formé de plusieurs exons codant les domaines structuraux propres à chaque isotype (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} ou C_{H4}). Les régions charnières de certaines Ig, intracytoplasmiques et transmembranaires des Ig de surface, sont codées par des exons indépendants ainsi que ceux des Ig sécrétées (Lefranc, 2009).

Il est important de noter que ce locus est parsemé de plusieurs éléments *cis*-régulateurs contrôlant son expression. Ils seront détaillés dans le chapitre II.

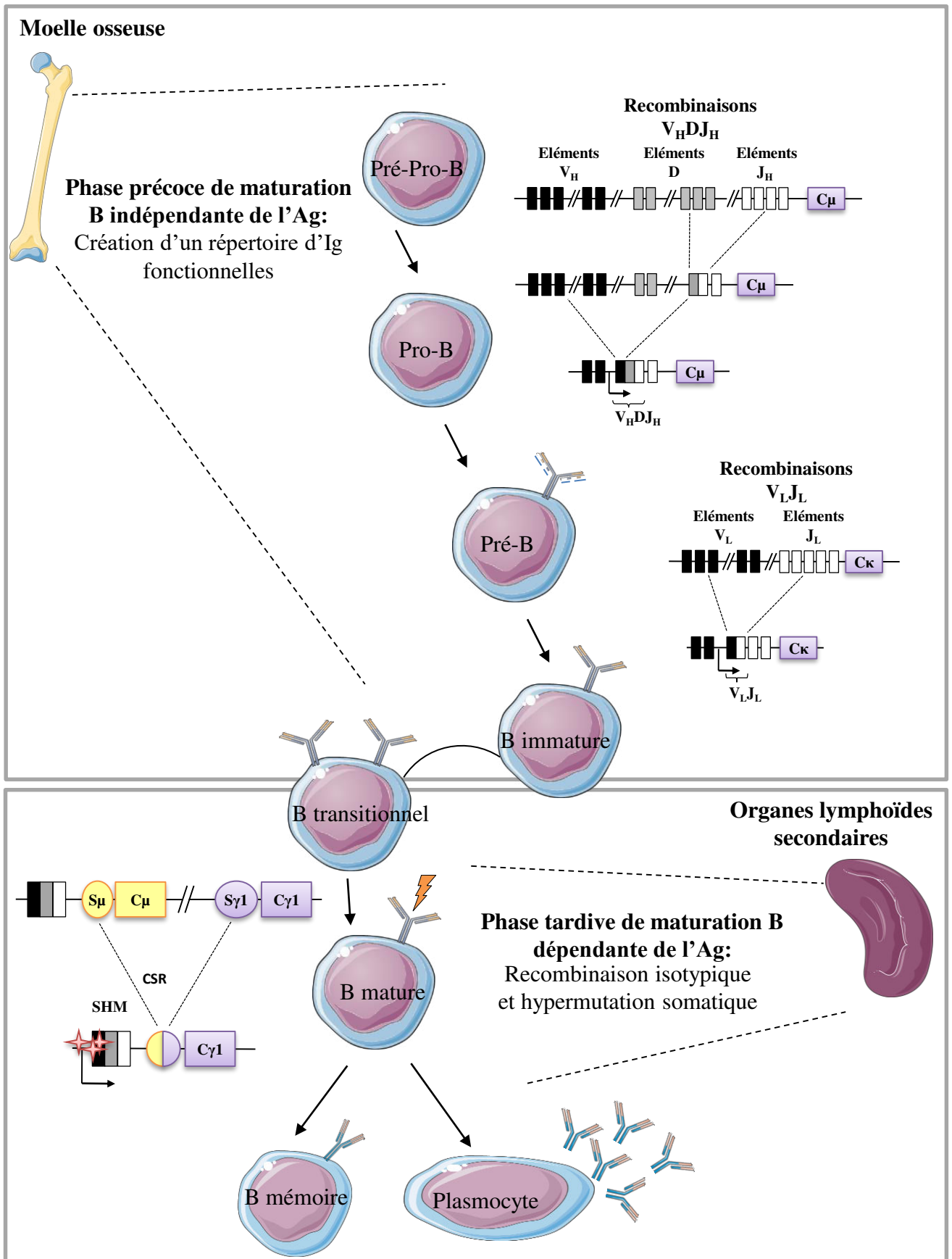


Figure 3 – Représentation schématique des événements de recombinaison lors du développement B. Dans la moelle osseuse, les recombinaisons V(D)J ont lieu avant la rencontre avec l'Ag. Ce sont les réarrangements V_HDJ_H et V_LJ_L (ici $V_\kappa J_\kappa$) permettant l'expression d'une Ig fonctionnelle et donc d'un BCR. Par contre, la phase tardive est Ag-dépendante et prend place dans les organes lymphoïdes secondaires. A ce stade se déroulent les processus de CSR et de SHM afin de modifier respectivement l'isotype de l'Ig exprimée et d'optimiser l'affinité du récepteur pour l'Ag.

iii. Ig fonctionnelle

Les loci d'Ig ne sont pas fonctionnels dans leur conformation germinale. Afin d'exprimer une Ig fonctionnelle, ces loci sont soumis à une succession d'événements géniques qui ponctuent la lymphopoïèse B des stades précoces jusqu'aux stades tardifs.

Tout d'abord ce sont les recombinaisons V(D)J qui débutent aux stades précoces du développement B dans la moelle osseuse. Il s'agit du réarrangement des segments codant pour la partie variable pour former les exons V_LJ_L et V_HDJ_H fonctionnels sur le locus, respectivement, des chaînes légères et lourdes. Ceci permet la formation du répertoire antigénique (Jung et al., 2006; Schlissel, 2004).

Lors des stades de développement tardifs, dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate et plaques de Peyer), deux événements géniques se déroulent : les mécanismes de recombinaison isotypique (CSR pour *Class switch Recombination* ou plus simplement « *switch* ») et d'hypermutations somatiques (SHM pour *Somatic HyperMutation*). Ces dernières introduisent des mutations à une très haute fréquence (de l'ordre de 2 à 3%) dans les exons de la région variable préalablement réarrangés (V_LJ_L et V_HDJ_H) pour augmenter la spécificité de l'Ig. La CSR, qui se déroule uniquement au locus IgH, va permettre de changer l'isotype M/D (M étant l'isotype sécrété par défaut) vers une Ig d'isotype différent avec une fonction effectrice adaptée (Alt et al., 2013; Xu et al., 2012) (**Figure 3**).

2. La moelle osseuse : Phase précoce Ag indépendante

i. Cellule souche hématopoïétique : Spécification lymphoïde

Le développement des LB commence dans la moelle osseuse à partir du jour 13,5 du développement embryonnaire murin (Tsuneto et al., 2014). Elle a lieu dans des niches riches en cellules stromales (environnement nécessaire au développement de la lignée lymphocytaire B) (Nagasawa, 2006). Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) ont la capacité d'auto-renouvellement et de différenciation pour donner toutes les lignées cellulaires sanguines.

Grâce à l'expression de molécules d'adhérence essentielles à l'initiation des voies de signalisation et aux facteurs solubles (cytokines et chimiokines) synthétisés par les cellules stromales, de nombreux facteurs de transcription sont activés. Ils ont pour rôle de réprimer ou d'activer l'expression de différents gènes cibles modulant la prolifération, la différenciation et la survie des futurs LB. L'engagement dans le lignage B se fait sous l'influence de plusieurs

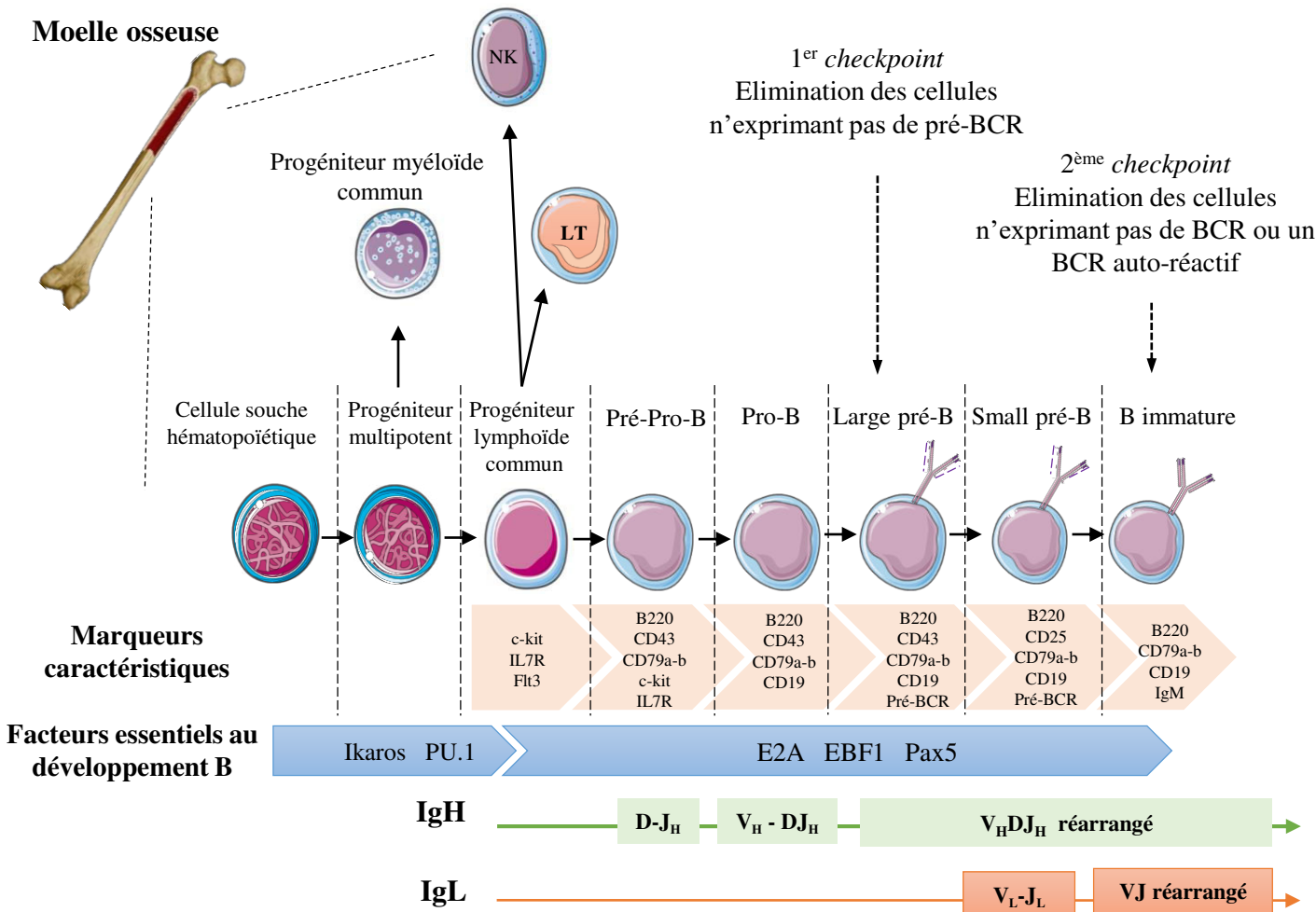


Figure 4 – Représentation schématique de la lymphopoïèse B précoce.
 Les principaux stades de la lymphopoïèse B précoce avec les marqueurs de surface spécifiques et les facteurs de transcription essentiels à la progression d'un stade à l'autre sont décrits. Les flèches horizontales (verte et orange) représentent l'évolution de la configuration des loci d'Ig. Les deux « checkpoints » du développement B précoce sont représentés par les flèches verticales.

Recombinaisons V_HDJ_H

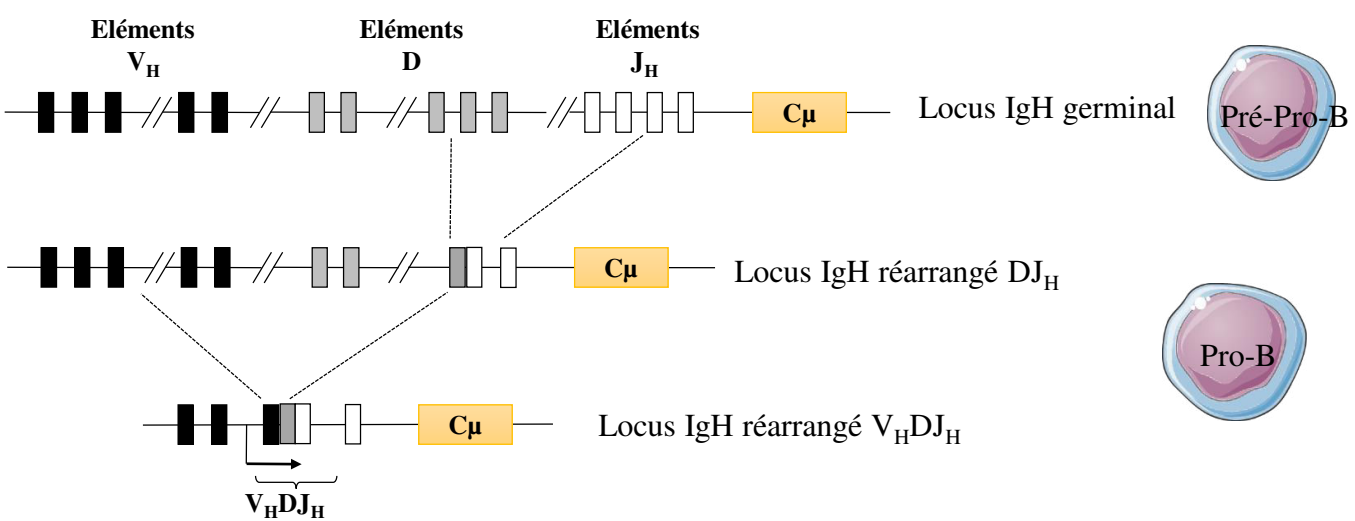


Figure 5 – Représentation des recombinaisons V_HDJ_H au locus IgH.
 Les différents lignes représentent le locus IgH germlinal et réarrangé.

facteurs de transcription tels que E2A (*E box protein binding 2 A*), BSAP (*B Cell Specific Activator Protein*) et Foxo1 (*Forkhead box O protein 1*), qui vont favoriser la différenciation lymphocytaire B tout en réprimant les lignées T et NK (Ramírez et al., 2010). Le régulateur principal qui va définitivement provoquer l'engagement et le maintien des progéniteurs dans la lignée B, en permettant l'expression du récepteur CD45 (B220), est le facteur Pax5 (pour *Paired-box gene 5*) (Reth and Nielsen, 2014; Zhang et al., 2013). Cobaleda et coll ont montré que le développement B est arrêté, entre le stade pré-proB et pro-B, dans les souris déficientes en Pax5 (Cobaleda et al., 2007). L'identité des LB est maintenue tout au long de leur maturation grâce à son expression qui s'éteint ensuite lors de la différenciation terminale en plasmocytes (Mikkola et al., 2002). Par contre, il a été montré que les cellules B1, une population particulière de LB originaire du foie fœtal et acteur de l'immunité innée, sont incapables de s'engager dans le lignage B en absence de PU.1 (*Purine box factor-1*) mais pas de l'IL7 (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012).

Chaque stade de la lymphopoïèse B précoce est caractérisé par : [1] l'état du réarrangement des gènes des loci des chaînes lourdes et légères ; [2] l'activation d'un programme génétique spécifique et la répression de celui d'avant ; et [3] l'expression de divers facteurs de transcription intracellulaires et molécules de surface (Hardy et al., 2007) permettant la fixation de molécules fondamentales au développement B et sécrétées par le microenvironnement (**Figure 4**).

ii. Le stade pré-pro-B : Engagement dans la lignée B

Les pré-pro-B sont les premiers précurseurs B. Ils se distinguent par la présence des marqueurs CD43, IL7R, CD117 (c-kit), CD79a, CD79b et B220 caractéristiques des LB (Hardy et al., 2007) et par l'expression de certains facteurs de transcription. A ce stade, les loci d'Ig sont en configuration germinale et ne permettent donc pas l'expression d'une Ig. Les facteurs Ebf1 (*Early B Cell Factor*) et E2A induisent l'expression du gène Pax5, qui va à son tour inhiber l'expression de certains gènes inappropriés au lignage B et en activer des spécifiques comme CD21 et CD19 (Cobaleda et al., 2007). L'expression du CD19 marque le passage au stade pro-B, où prendront place les réarrangements $V_H D J_H$ sur le locus IgH (**Figure 4**).

iii. Le stade pro-B : Réarrangement $V_H D J_H$ au locus IgH

L'initiation des réarrangements $V_H D J_H$ au locus IgH marque le passage du stade pré-pro-B au stade pro-B précoce. C'est un mécanisme très particulier, ordonné (réarrangement du

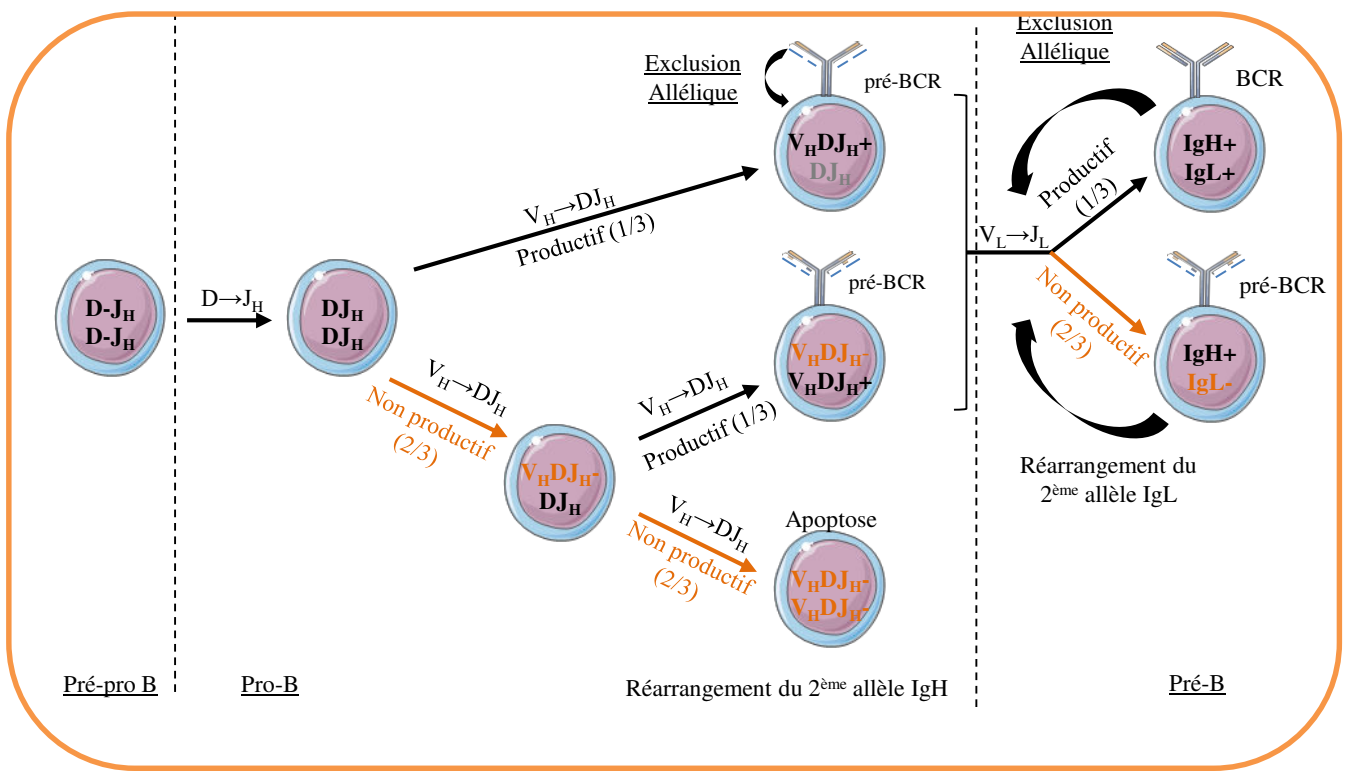


Figure 6 – Représentation schématique de l'état des réarrangements V(D)J aux loci d'Ig.

Statut des réarrangements de chacun des allèles des loci d'Ig et les fractions de réarrangements V(D)J productifs. Le symbole + représente une recombinaison fonctionnelle. Le symbole – représente une recombinaison non fonctionnelle. Extrait de Jung et al 2006

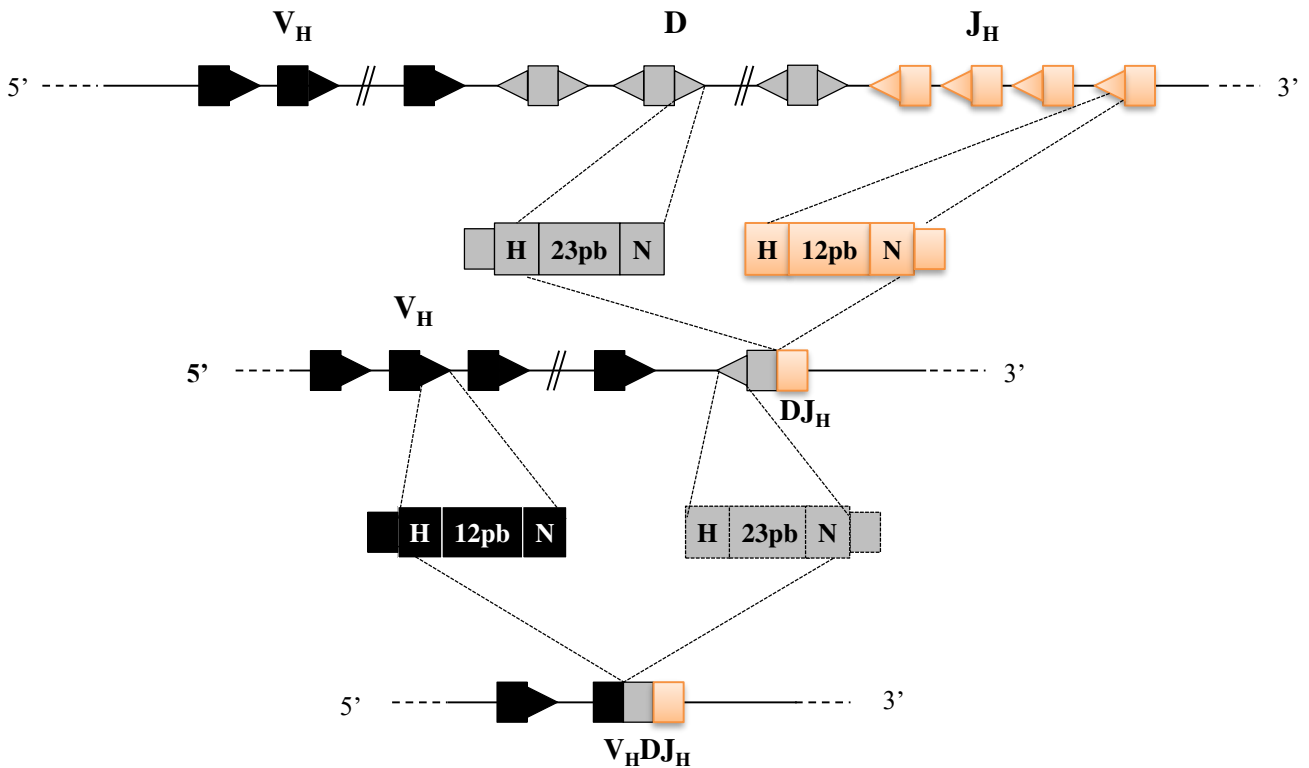


Figure 7 – Règle « 12/23 » et séquences RSS au locus IgH.

Les triangles représentent les séquences RSS reconnues par les enzymes RAG lors des réarrangements VDJ. Les rectangles représentent les exons V_H , D , J_H et C_H . La règle 12/23 définit l'ordre des réarrangements. La recombinaison se fait entre une séquence RSS ayant un espaceur de 23 nucléotides avec une autre possédant un espaceur de 12. H pour représenter la séquence heptamérique (5' CACAGTG 3') et N la séquence nanomérique (5' ACAAAAACC 3').

locus IgH avant les loci IgL), séquentiel (recombinaisons D-J_H avant V_H-DJ_H), spécifique aux LB et aboutissant à la formation de l'exon fonctionnel de la partie variable de la chaîne lourde (création du répertoire antigénique).

Tout d'abord, un segment D s'associe aléatoirement à un segment J_H, et ceci simultanément sur les deux allèles. Cette association D-J_H entraîne la délétion de l'ADN se trouvant entre ces deux segments. Dans un deuxième temps, un segment V_H s'associe au D-J_H déjà recombinaison mais que sur l'un des deux allèles (**Figure 5**). C'est l'exclusion allélique (Alt et al., 1984; Jung et al., 2006). Si les segments V_H distaux sont moins souvent réarrangés que les proximaux (Yancopoulos et al., 1984), cette différence est masquée par la sélection antigénique périphérique. Si le réarrangement est en phase (productif), il aboutit à la formation d'un exon V_HDJ_H transcrit puis épissé sur le premier exon C_μ marquant l'engagement définitif dans la lignée B (Rumfelt et al., 2006). S'il est non fonctionnel (non productif), avec apparition d'un codon stop prématuré ou un décalage du cadre de lecture, un réarrangement se produit sur le deuxième allèle. Cette seconde recombinaison V_H-DJ_H peut soit aboutir à un exon fonctionnel et la cellule poursuit son développement, soit il est non productif et la cellule meurt par apoptose. En effet, le pourcentage des réarrangements non productifs est beaucoup plus élevé que celui des productifs vu, non seulement le décalage dans les cadres de lecture mais aussi la possibilité d'utilisation de segments V_H ou D non fonctionnels. Mostoslavsky et coll ont montré que deux réarrangements sur trois sont non fonctionnels (**Figure 6**) (Mostoslavsky et al., 2004). Par contre, les deux allèles sont transcrits (Daly et al., 2007). Les transcrits non productifs seront pris en charge par des mécanismes de surveillance des ARN afin d'inhiber la formation d'une chaîne lourde tronquée (Tinguely et al., 2012).

Quand un réarrangement productif se produit il permet l'expression d'une chaîne lourde et d'un pré-BCR marquant le passage vers le stade pré-B. L'association de cette chaîne lourde avec une pseudo chaîne légère (SLC pour « *Surrogate Light Chain* »), constituée des protéines V_{préB} (CD179a) et λ5 (CD179b) (Karasuyama et al., 1990; Tsubata and Reth, 1990), en association aux molécules co-stimulatrices CD79a et CD79b (l'hétérodimère Iga/Igβ, sous unités de transduction de signal) constitue le pré-BCR (**Figure 4**).

Du côté mécanistique, ces réarrangements peuvent être divisés en deux phases : [1] l'induction de cassures doubles brins (DSB, pour *Double Strand Break*) et [2] leur réparation. Les cassures doubles brins sont induites par l'endonucléase Rag (*Recombination-Activating Gene*), formée des sous unités Rag1 et Rag2 (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992). Des séquences spécifiques appelées RSS (*Recombination Sequence Signal*) flanquent les segments

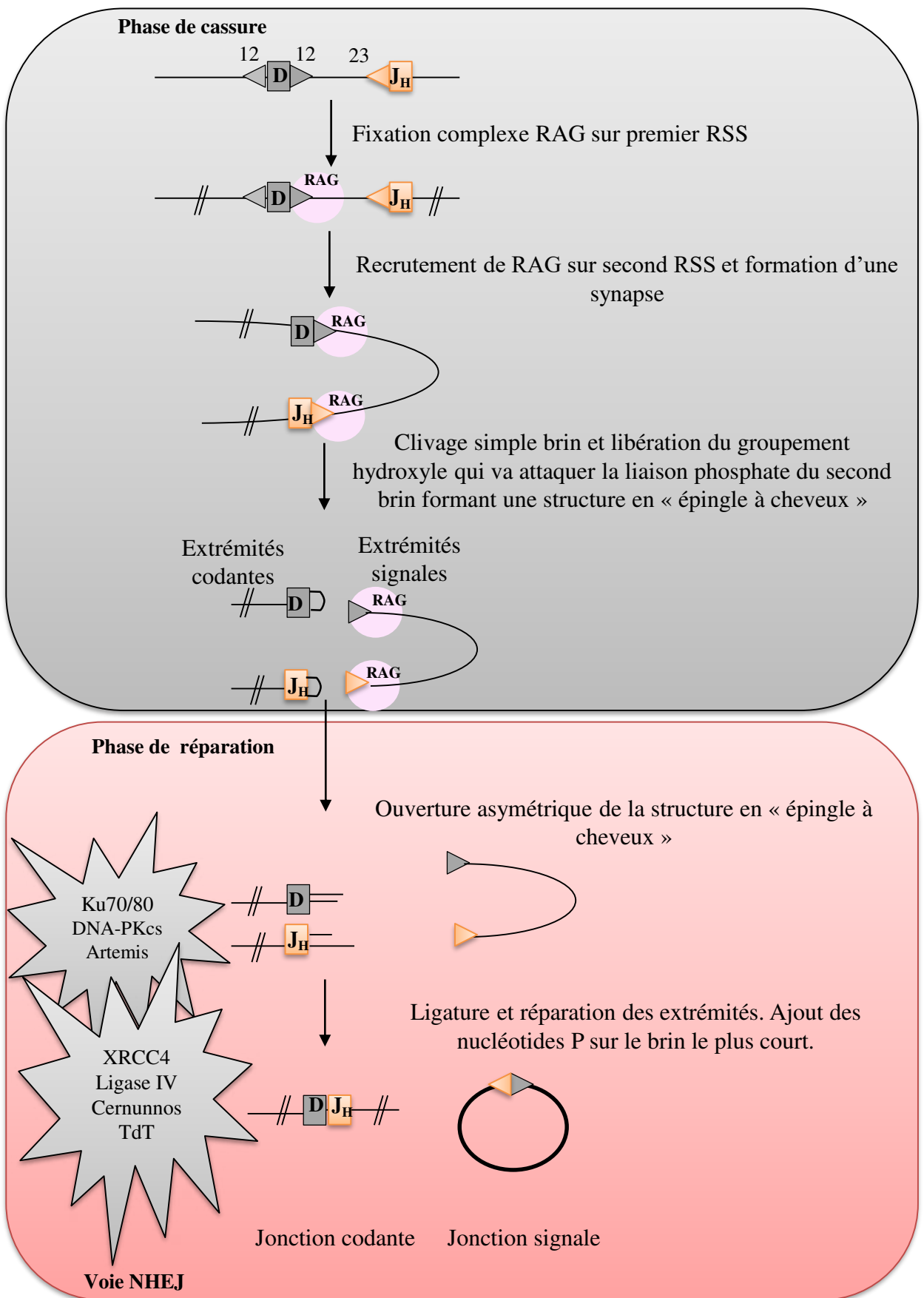


Figure 8 – Représentation schématique du processus de clivage de l'ADN par les enzymes RAG.

Des interactions RAG-RSS prennent place pour créer des DSB. Ceci établit des extrémités codantes en « épingle à cheveux » et d'autres signales à bout franc. Elles sont ouvertes et ligaturées par les protéines de la voie NHEJ. Extrait de Schatz et Ji, 2001

V, D et J. Elles sont la cible des endonucléases. Ces RSS sont formées d'une séquence heptamérique (5' CACAGTG 3') et d'une nonamérique (5' ACAAAAACC 3') hautement conservées au cours de l'évolution et séparées par des régions non conservées de 12 ou 23 pb dites espaceurs ou « *spacers* ». Les recombinaisons suivent une règle dite « 12/23 ». Elle dicte l'ordre des réarrangements au locus IgH pour prévenir la formation d'exons V_H - J_H non productifs. Les segments V_H et J_H sont systématiquement flanqués de RSS contenant des « *spacers* » de 23 pb. Les D sont encadrés par deux RSS présentant des « *spacers* » de 12 pb (**Figure 7**) (Early et al., 1980). Le processus est séquentiel. Dans un premier temps, il y aura : [1] Reconnaissance et fixation des complexes Rag sur une séquence RSS ; [2] Capture d'une RSS partenaire et formation d'une synapse stable en « épingle à cheveux » entre un segment D et un segment V_H (Jones and Gellert, 2002; Lovely et al., 2015; Mundy et al., 2002) ; [3] Induction d'une cassure simple brin et libération d'un groupement 3' hydroxyle ; [4] Attaque du second brin par ce groupement résultant en une cassure double brin et la formation des extrémités franches sur des séquences RSS et d'une structure en « épingle à cheveux » aux extrémités des segments codant à rabouter (Schatz and Spanopoulou, 2005) (**Figure 8**).

La recombinaison V_HDJ_H est un événement très dangereux au vue du grand risque de translocations oncogéniques qui peuvent avoir lieu (Brandt and Roth, 2009) au cas où ces cassures doubles brins n'auraient pas été détectées, prises en charge et réparées. Ce sont les protéines Rag qui assurent la première protection en se fixant aux extrémités générées (McBlane et al., 1995) jusqu'à ce que les senseurs de la voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante de la protéine ATM (DDR pour *DSB Dependant Response*) détectent les DSB et permettent leur stabilisation et le recrutement de facteurs de réparation (Helmink and Sleckman, 2012). De multiples voies de réparation et complexes protéiques interviennent dans la résolution de ces cassures doubles brins. Citons brièvement les protéines associées à Ku70/Ku80, les DNA-PKCs (*DNA dependant Protein Kinase catalytic subunit*), la ligase-IV, Xrcc4 (*X-ray Repair Cross-Complementing protein 4*), Cernunnos (ou XLF pour *Xrcc4-like Factor*) et Artemis (Calsou et al., 2003; Hentges et al., 2006; Ma et al., 2002; Nussenzweig et al., 1996; Taccioli et al., 1994).

Les recombinaisons V_HDJ_H sont des sources de diversité pour le répertoire antigénique. En effet, on peut parler de 3 types de diversité : [1] la diversité « germinale » due aux différences de séquences codant les segments V_H ; [2] la diversité « somatique » due aux différences induites par les jonctions entre les segments V_HDJ_H ; [3] la diversité « combinatoire » qui amplifie celle des séquences des segments D et J_H en introduisant des mutations au cours des réarrangements (Jung et al., 2006). Il est à noter que l'introduction des

nucléotides P (*Palindromic nucleotide*) et N (*Non-germline nucleotide*) diversifie encore la jonction aux extrémités des régions codantes. Ainsi, la coupure dissymétrique de la séquence codante permet d'obtenir deux brins d'ADN de différentes tailles. Le plus court sera donc allongé par ajout de nucléotides complémentaires à l'autre brin, conduisant à l'insertion de nucléotides P au niveau de la jonction des trois segments. En outre, l'intervention de l'enzyme TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*) diversifie encore la jonction en ajoutant des nucléotides N (**Figure 8**) (Desiderio et al., 1984).

iv. Le stade pré-B : Réarrangements V_LJ_L aux loci IgL

L'expression du pré-BCR, signe de passage au stade pré-B, est le premier point de contrôle incontournable pour la lymphopoïèse B. En fait, son expression inhibe les réarrangements sur le deuxième allèle au locus IgH, assurant ainsi qu'une cellule B n'exprime qu'une chaîne lourde unique, avant d'initier les recombinaisons sur les chaînes légères. C'est le phénomène d'exclusion allélique (**Figure 4**) (Corcoran, 2005). Suite à la liaison d'un ligand, la signalisation induite par le pré-BCR engendre les effets physiologiques indispensables à la maturation B (Gauthier et al., 2002). Son expression permet également une sélection négative (**Figure 6**). Dans le cas d'un pré-BCR auto-réactif, la cellule B sera éliminée par apoptose. (Almqvist and Mårtensson, 2012; Mårtensson et al., 2010). Le passage du stade pro-B tardif au stade large pré-B est induit grâce à la prolifération cellulaire suite à l'expression du pré-BCR. Notons que l'IL7 est essentielle pour ce développement (pour revue : (Corfe and Paige, 2012).

C'est à ce stade que le pré-BCR joue un autre rôle important en bloquant la transcription des gènes codant la pseudo-chaîne légère aboutissant à l'inhibition de l'expression de son propre pré-BCR. Ceci est essentiel pour permettre la réexpression des gènes Rag et l'initiation des réarrangements des segments V_L et J_L , sans aucun effet sur le deuxième allèle IgH non réarrangé (Constantinescu and Schlissel, 1997). Cette recombinaison aux loci des chaînes légères permet aux small pré-B (les cellules large pré-B ayant proliférées, perdent l'expression du CD43 au profit du CD25) de remplacer leur pseudo chaîne légère par une chaîne légère conventionnelle, permettant aux cellules B d'exprimer un BCR fonctionnel (Herzog et al., 2009), signe de passage au stade B immature (**Figure 4**).

Du point de vue mécanique, les réarrangements V_LJ_L aux loci des chaînes légères ne diffèrent pas fondamentalement des recombinaisons V_HDJ_H sur les chaînes lourdes. On note seulement l'absence de la N diversité liée avec la non expression du gène codant pour la TdT.

Marqueurs caractéristiques

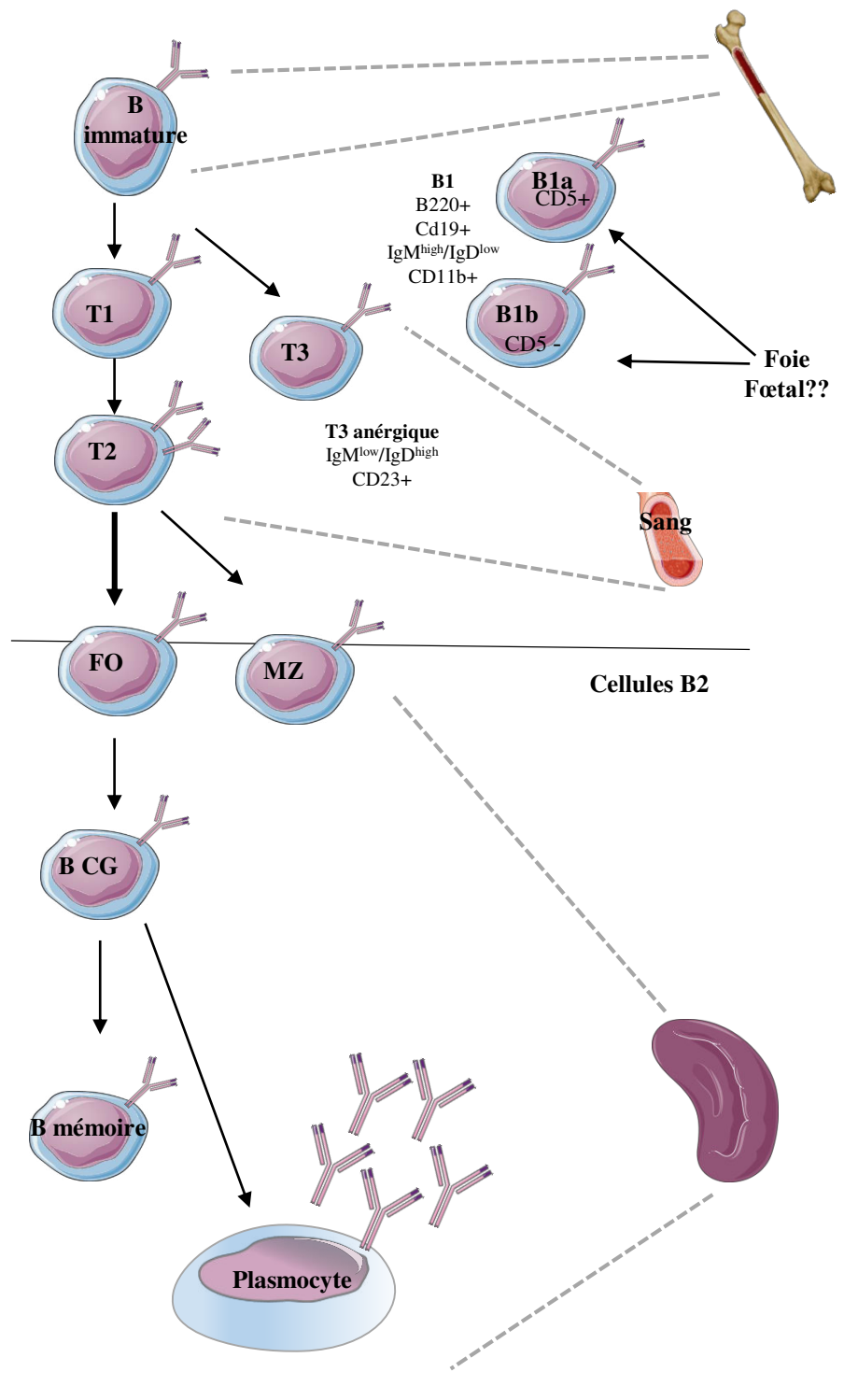


Figure 9 – Représentation schématique des différents stades de l'ontogénie B tardive.

Les principaux stades du développement B tardif sont représentés par ce schéma, ainsi que les marqueurs de surface spécifiques à chacun de ces stades.

Ces réarrangements sont séquentiels : S'ils ne sont pas fonctionnels sur les allèles du locus κ , ils seront effectués au locus λ . Ceci explique pourquoi 95% des LB murins expriment une Ig κ (Engel et al., 1999).

v. Le stade B immature : Edition du BCR et sa tolérance

L'expression du BCR fonctionnel ainsi que la perte du CD25 caractérisent les cellules B immatures. A ce stade, les cellules vont subir un deuxième point de contrôle, avant leur migration en périphérie : c'est le mécanisme de tolérance immunitaire (la capacité de supporter l'existence d'un Ag sans provoquer une réaction immunitaire) (**Figure 4**). Il s'agit soit de l'élimination par apoptose des cellules exprimant un BCR autoréactif (qui reconnaît les cellules de soi), soit de leur mise en anergie en diminuant leur prolifération et en sous exprimant leur BCR (Pike et al., 1982; Russell et al., 1991). Ces cellules B autoréactives peuvent surmonter cette sélection et échapper à l'apoptose en modifiant leur BCR par la réexpression des gènes Rag et en opérant des réarrangements secondaires en particulier au locus des chaînes légères : il s'agit de l'édition du BCR ou « *Receptor Editing* » (Casellas et al., 2001; Sandel and Monroe, 1999). Seules les cellules B qui ont réussi à passer ce point de contrôle quitteront la moelle osseuse pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires où elles subiront une deuxième vague de remaniements géniques pour continuer leur maturation.

3. Les organes lymphoïdes périphériques : Phases tardives dépendantes de l'Ag

Une fois sortie de la moelle osseuse, les cellules B immatures gagnent la circulation sanguine pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les ganglions lymphatiques et les MALT (*Mucosae Associated Lymphoid Tissue*) où elles rencontreront l'Ag. Avant d'arriver au stade terminal de développement et d'avoir la capacité de sécréter des Ac (plasmocytes), ces cellules passent par différents stades de développement dépendant de l'Ag (**Figure 9**). Grâce aux processus géniques de SHM et de CSR, les Ig deviennent plus affines avec une fonction plus adaptée à l'Ag.

i. Le stade B transitionnel et signalisation du BCR

La maturité et la capacité à répondre à une stimulation par un Ag sont acquises à ce stade (Chung et al., 2003). Seul 10% des cellules B quittent la moelle osseuse et arrivent au stade B transitionnel. Elles y resteront de 1 à 5 jours (Allman et al., 1993, 1992; Loder et al., 1999). Elles se caractérisent par leur grande sensibilité à l'apoptose en réponse à une

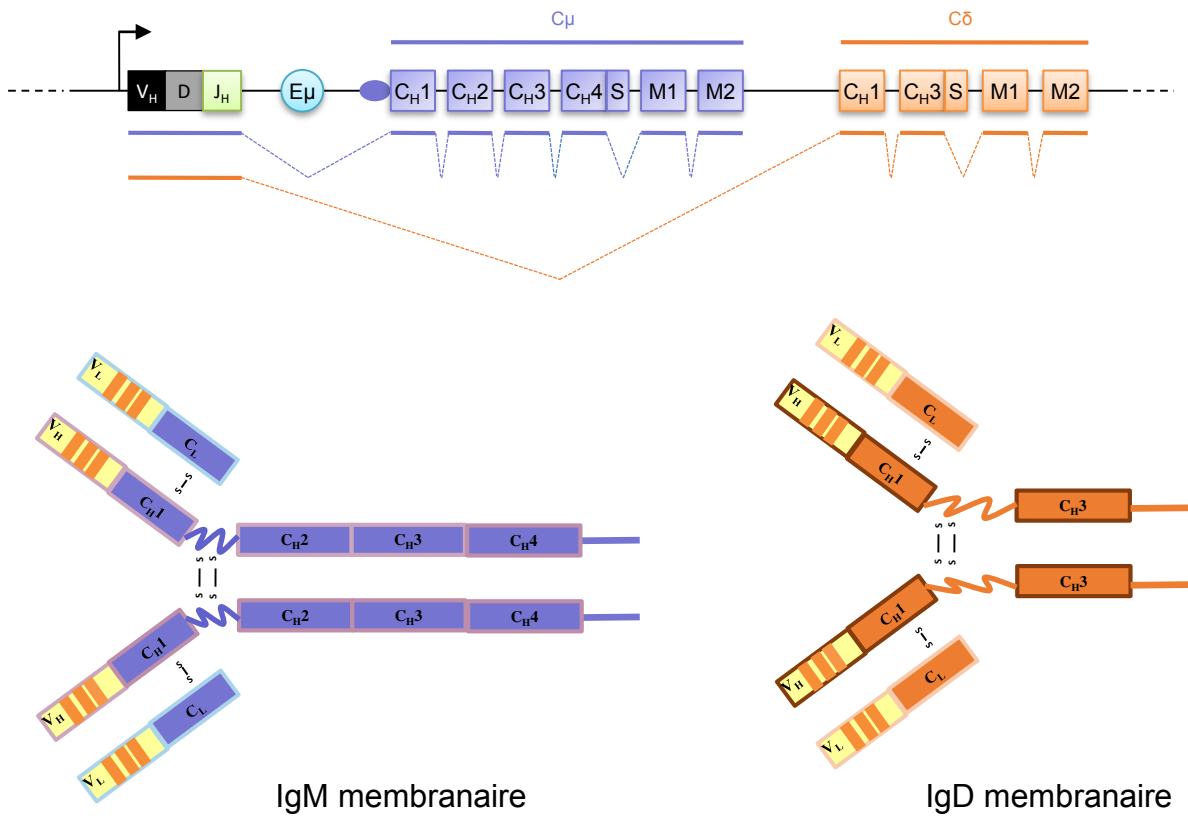


Figure 10 – Mécanisme d'épissage alternatif : co-expression d'une IgM et d'une IgD.

Les transcrits permettant la synthèse d'une IgM et d'une IgD sont représentés respectivement, par les lignes mauves et oranges. Les exons conservés après épissage sont représentés par les traits pleins. L'IgM contient 4 domaines C_H. L'IgD n'en possède que deux (le second étant noté C_{H3}) et contient une région charnière plus longue.

signalisation induite par le BCR ainsi que par l'expression de marqueurs de surface tels que AA4.1 (CD93) (Allman et al., 2001, 1992; Norvell and Monroe, 1996). Les cellules B de cette phase sont hétérogènes. Selon leurs phénotypes et leurs fonctions spécifiques elles peuvent être divisées en trois sous-populations distinctes : cellules T1 (précoces), T2 (tardives) et T3 (anergiques, autoréactives) (**Figure 9**) (Liubchenko et al., 2012; Teague et al., 2007).

Les cellules T1 sont phénotypiquement proches des cellules B immatures. Elles diffèrent des cellules T2 par leur réponse à l'Ag. Une cellule T1 rentre en apoptose ou en anergie suite à la fixation d'un Ag à son récepteur. Il s'agit de la suite du « *checkpoint* » démarré au stade immature (Sandel and Monroe, 1999). Teague et coll ont montré que les dérégulations à ce stade sont associées à des maladies auto-immunes (Lupus erythemateux, syndrome de Sjodren) (Teague et al., 2007).

Les cellules T2 sont retrouvées dans les follicules de la rate et sont caractérisées par l'expression du CD21 et CD23 (Loder et al., 1999). Ces cellules sont résistantes à l'apoptose et sont capables de proliférer suite à la fixation d'un Ag (Su and Rawlings, 2002). À ce stade, une Ig de type δ (IgD) commence à être coexprimée avec l'IgM de surface par un mécanisme d'épissage alternatif (**Figure 10**) (Enders et al., 2014; Maki et al., 1981). Le grand transcrite primaire contenant l'exon VDJ réarrangé et les exons constants $C\mu$ et $C\delta$ sera différemment épissé permettant d'avoir le transcrite mature codant pour chaque isotypes M et D (Moore et al., 1981). Phénotypiquement les cellules T1 sont $IgM^{high}IgD^{low} CD23^{-}$; les cellules T2 sont $IgM^{high}IgD^{high} CD23^{+} CD21^{+}$; et les cellules T3 sont $IgM^{low}IgD^{high} CD23^{+}$.

Le devenir des cellules B dépend de la nature du signal induit par le BCR et sa puissance. Un effet important sur la répartition des différentes populations B matures ou sur le blocage au stade transitionnel est montré suite à l'altération de voies de signalisation (Allman et al., 2004; Chung et al., 2003). Trois phases décrivent la signalisation du BCR : Une d'initiation, induite par la fixation de l'Ag sur le récepteur ; une de propagation du signal et d'activation des cascades de phosphorylation ; une d'intégration pour activer et transloquer au noyau divers facteurs de transcription nécessaires à la survie et la prolifération des cellules B (Packard and Cambier, 2013). D'autres voies de signalisation favorisant la différenciation et la survie des LB existent : les récepteurs des ligands de la famille du Tnf (*Tumor Necrosis Factor*) (BAFF-R et TACI pour le BAFF (*B-cell Activating Factor*), BCMA et TACI pour APRIL (*A Proliferation-Inducing Ligand*)) (Pieper et al., 2013) ainsi que les TLR (*Toll Like Receptor*) exprimés par le LB depuis les stades précoces du développement (ce sont les sites de fixation des PAMPs). Ainsi, il a été montré que les cellules B peuvent se différencier en plasmocytes (Capolunghi et

al., 2008) ou en LB mémoires (Aranburu et al., 2010) suite à l'activation du TLR lors du stade transitionnel. Une signalisation forte induirait la différenciation en cellule B dite folliculaire (FO) alors qu'une signalisation faible favoriserait la différenciation en cellule B de la zone marginale (MZ) (**Figure 9**). Cette hypothèse reste toujours controversée suite à l'absence d'études suffisamment fiables pour la prouver.

ii. IgD

La coexpression de l'IgD avec une IgM reste toujours énigmatique. Ces deux isotypes coexprimés ont la même spécificité antigénique (Fu et al., 1975). L'IgD est considérée comme une classe mystérieuse d'Ac dont le rôle et la régulation n'ont pas été trop étudiés par comparaison aux autres classes d'Ig (Blattner and Tucker, 1984; Chen and Cerutti, 2010).

L'IgD est un ancien isotype conservé durant l'évolution et apparu avec le développement du SI adaptatif (Ohta and Flajnik, 2006). Chez la plupart des vertébrés, et depuis les plus anciens à mâchoires, une double expression IgM/IgD existe et ceci est due au mécanisme d'épissage alternatif d'un pré-ARNm englobant l'exon $V_{H}D_{J_{H}}$ recombiné et les exons C_{μ} et C_{δ} (**Figure 10**) (Maki et al., 1981; Moore et al., 1981). Récemment, la protéine nucléaire Zfp318 (*Zinc Finger Protein 318*) a été décrite comme indispensable à l'épissage alternatif du transcrite IgM/IgD (Enders et al., 2014). Ainsi, chez les souris déficientes en Zfp318, il y a une disparition totale de l'IgD, une surexpression de l'IgM, mais aucun effet sur l'expression d'autres molécules transcriptionnellement régulées en parallèle à l'IgD lors du développement B (CD21, CD23, CD62L). La cinétique d'expression de la Zfp318 est similaire à celle des IgD. Les cellules pro-B et pré-B l'expriment peu ou pas, contrairement aux cellules B immatures, transitoires et matures (Enders et al., 2014; Pioli et al., 2014). Cette cinétique d'expression renforce l'importance de la double expression contrôlée d'un BCR IgM et IgD.

Toutefois, une sous population de LB décrite dans le tissu lymphoïde du nasopharynx exprime une IgD mais pas une IgM. Ces cellules subissent un « *switch* » non conventionnel et se différencient exclusivement en plasmocytes sécréteurs d'IgD. Plusieurs études ont suggéré l'existence d'un « *switch* » vers IgD (Arpin et al., 1998; Chen et al., 2009; Choi et al., 2017; Issaoui et al., 2018; Koelsch et al., 2007; Rouaud et al., 2014; Zheng et al., 2004). La mécanistique de cette recombinaison isotypique ainsi que sa fonction reste toujours à élucider. Il a été suggéré que le « *switch* » à IgD dépendrait de la flore bactérienne intestinale et de la signalisation TLR contribuant ainsi à l'homéostasie des communautés microbiennes (Choi et al., 2017). De même que l'IgA, l'IgD semble établir une relation complexe et probablement

mutualiste avec les bactéries commensales. Durant mes années de thèse, je me suis intéressée à la mécanistique de ce « *switch* » à IgD. Deux publications et une brève revue issus de ce travail ont été mises en annexe.

Le BCR IgD joue un rôle de modulateur de la réaction immunitaire, en régulant la sélection des cellules. L'expression conjointe de l'IgD membranaire et de son Ag bloque le développement B au stade immature suggérant la transmission de signaux de répression ou d'apoptose (Duong et al., 2010). Sa surexpression augmente le signal du BCR IgM, aidant la sélection des clones positifs pour passer au stade B mature (Geisberger et al., 2006). Ainsi l'IgD joue un rôle très important dans la tolérance immunitaire. On note une augmentation des BCR autoréactifs chez des souris déficientes pour l'IgD (L. Guo et al., 2011).

Les récepteurs IgM et IgD sont localisés dans des structures distinctes d'îlots protéiques qui subissent une réorganisation après la stimulation par un Ag (Kläsener et al., 2014; Maity et al., 2015). Ainsi celui de l'IgD est composé du co-récepteur du BCR, le CD19, et du récepteur *Cxcr4* (*chemokine C-X-C motif Receptor4*, récepteur de la chimiokine *Cxcl12*). Ces protéines ont des fonctions connectées entre elles. Ainsi la signalisation par *Cxcr4* et la migration des cellules B dépendantes de la *Cxcl12* sont altérées chez les souris IgD déficientes, mais pas IgM déficientes. La spécificité liée à l'isotype du BCR exprimé par les cellules B au repos peut-être aussi déduite de l'observation que les IgM et les IgD membranaires suivent des modèles d'expression différent durant le développement. Dans la rate, les cellules B transitionnelles exprimant des IgM se différencient en cellules B matures FO ou MZ par différentes voies caractérisées par une sur-expression des récepteurs IgD (Avrameas et al., 1979; Kerr et al., 1991). L'expression du BCR membranaire de l'IgD varie aussi en fonction des différentes population B. Il est élevé dans les LB FO avec un taux d'expression 10 fois plus grand que celui de l'IgM (Havran et al., 1984). Il est faiblement exprimé sur les cellules B1 de la cavité péritonéale, la lamina propria et les tissus pleuraux (Hayakawa et al., 1984) ainsi que sur les cellules B MZ (Martin and Kearney, 2002).

iii. Le stade B mature et la formation du centre germinatif (GC)

Selon leurs origines, leurs spécificités et diversités antigéniques, leurs marqueurs de surface et leurs distributions tissulaires, les LB matures naïfs (avant la rencontre avec l'Ag) peuvent être subdivisés en deux grandes catégories. Les cellules dites B1 sont caractérisées par une capacité à s'autorenouveler et par un répertoire BCR spécifique conduisant à la production d'Ig de type IgM naturelles (NIgM) souvent polyréactives ou autoréactives, avec une faible

affinité (Aziz et al., 2015; Baumgarth, 2011; Ehrenstein and Notley, 2010; Holodick and Rothstein, 2015; Tung and Herzenberg, 2007). Les cellules dites B2 (ou B conventionnels) sont souvent associées à l'immunité adaptative. Cette dernière population est constituée des cellules B MZ et FO (Pillai and Cariappa, 2009).

a. Les cellules B2 de la zone marginale

Les cellules B2 MZ sont situées dans la rate à l'interface de la pulpe blanche et la pulpe rouge. C'est la région marginale d'où elles tirent leur nom (Weill et al., 2009). Elles sont à l'interface du SI et sanguin, dans une zone irriguée par des sinus marginaux permettant de la rendre résistante à l'écoulement du flux sanguin (par comparaison aux artères qui irriguent la rate). Ceci permet aux pathogènes transportés dans le sang d'y résider plus facilement (Cerutti et al., 2013; Mebius and Kraal, 2005). La fonction principale des MZ explique leur localisation. Elle consiste à éliminer les Ag transportés par le sang d'une manière T-indépendante grâce à la sécrétion de fortes quantités d'Ig de faible affinité. Ces cellules ne représentent que 5 à 10% des cellules B de la rate. Elles sont caractérisées par un phénotype $IgM^{High}IgD^{Low}CD21^{High}CD1d^{+}CD23^{Low}$ (Cariappa et al., 2001). Elles possèdent des fonctions identiques à celles de la population B1 malgré leurs différences d'origines. En général, elles présentent comme les B1 des BCR non mutés, polyréactifs et/ou faiblement autoréactifs. Les cellules B MZ produisent essentiellement des Ac d'isotype M (Martin and Kearney, 2001) et reconnaissent les PAMPs ainsi que les débris cellulaires apoptotiques (Ehrenstein and Notley, 2010; Martin and Kearney, 2002; Pillai and Cariappa, 2009). Les stimulants TLRs comme les lipopolysaccharides (LPS) et certaines séquences d'ADN (CpG) activent ces cellules. Elles participent à la réponse immunitaire précoce. Elles peuvent se différencier en plasmocytes extrafolliculaires de courte durée de vie suite à une activation T-indépendante. Cerutti et coll ont montré que ces cellules sont toutefois capables de « *switcher* » pour produire des IgA en réponse à certaines protéines membranaires ou lipides bactériens (Cerutti et al., 2013; Genestier et al., 2007; Rubtsov et al., 2008). Ces cellules peuvent également se différencier en plasmocytes de longue durée de vie en synthétisant des Acs de fortes affinités, en réponse à une stimulation T-dépendante (Song and Cerny, 2003).

b. Les cellules B2 folliculaires et GC

Comme leur nom l'indique, ces cellules sont localisées dans la pulpe blanche des follicules des organes lymphoïdes secondaires (Pillai and Cariappa, 2009). Ces follicules sont

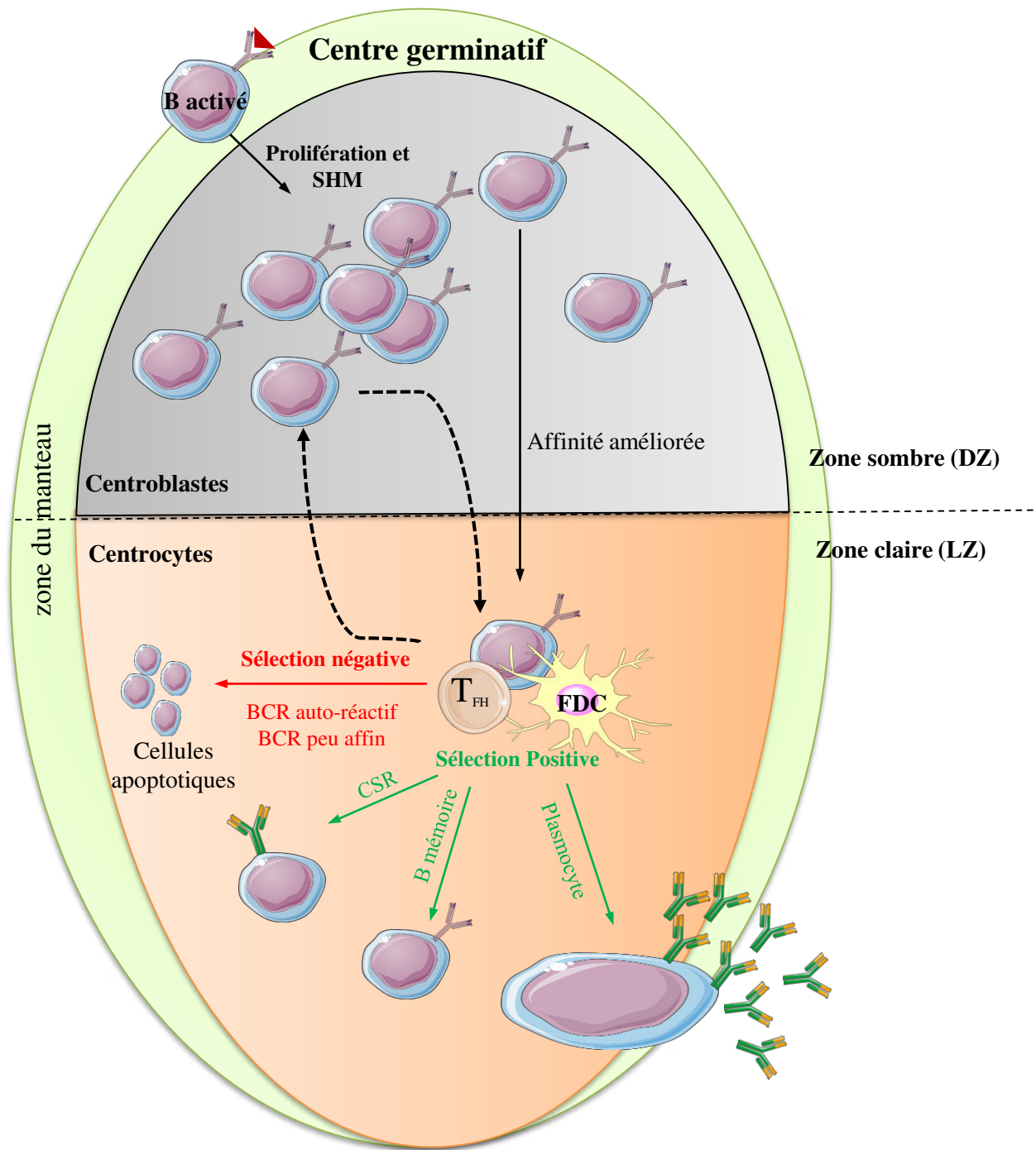


Figure 11 – Structure schématique d'un centre germinatif.

Schéma représentant les réactions des cellules B activées par la rencontre de l'Ag dans les différentes zones du GC. Dans la zone sombre (gris) ces cellules prennent le nom de centroblastes. Elles prolifèrent et subissent les SHM. Elles migrent ensuite dans la zone claire (orange) pour former la population des centrocytes. Une sélection selon leur affinité à l'Ag prend place, avec l'aide des T_{FH} et des FDC. Celles qui seront sélectionnées positivement peuvent ensuite se différencier en B mémoire ou en plasmocytes (et subissent la CSR). Les cellules sélectionnées négativement seront éliminées par apoptose.

remplis de cellules dendritiques présentatrices d'Ag (FDC pour *Follicular Dendritic Cell*) et sont situés à proximité des zones riches en cellules T. Les LB FO représentent la majeure partie des cellules B de la rate. Elles ont relativement une longue demi-vie de 5 mois chez la souris (Förster and Rajewsky, 1990). A l'inverse des MZ, elles expriment fortement le CD23 et faiblement le CD21 (**Figure 9**). Leur maturation a besoin d'un fort signal du BCR (Cariappa et al., 2001). L'activation des LB FO nécessite une collaboration avec les cellules T_{FH} (*T Follicular Helper*, CD4+) et les FDC. Suite à la fixation d'un Ag, les LB FO seront piégés dans la zone interfolliculaire où ils s'activeront suite à leurs interactions avec les cellules T auxiliaires générant des GC. C'est là où débute la formation des cellules B mémoires et des plasmocytes sécréteurs d'Ig de hautes affinités (Good-Jacobson and Tarlinton, 2012).

C'est également là où auront lieu les réarrangements géniques secondaires (SHM et CSR qui seront décrits dans le chapitre III) et la sélection basée sur l'affinité, aboutissant à la formation des Ac de très haute affinité (Victoria and Nussenzweig, 2012). Ces phénomènes se déroulent dans des zones différentes du GC : la prolifération a lieu dans la zone dite sombre (DZ pour « *Dark Zone* ») située à proximité de la zone T. La sélection, exigeant la présence des cellules T ainsi que des FDC, se produit dans une zone dite claire (LZ pour « *Light Zone* »), proche de la zone marginale (**Figure 11**).

Les LB FO vont migrer entre la DZ et la LZ pour sélectionner les clones montrant une grande affinité à l'Ag. Dans la DZ prennent place la prolifération et les modifications géniques aux loci des chaînes lourdes et légères d'Ig pour augmenter l'affinité vis-à-vis de l'Ag (SHM) (Di Noia and Neuberger, 2007). Les cellules B dans cette zone sont dites centroblastes. Elles sont caractérisées par l'expression de peu d'Ig de surface. Dans la LZ, les cellules B sont appelées centrocytes. La recombinaison isotypique va y avoir lieu uniquement pour les clones B sélectionnés (LB ayant un BCR capable de reconnaître son Ag) permettant ainsi l'acquisition de nouvelles fonctions effectrices sans affecter l'affinité pour l'Ag (Chaudhuri et al., 2007).

iv. Les plasmocytes

Les plasmocytes, caractérisés par l'expression du CD138 (*syndecan 1*), constituent les LB au dernier stade de leur maturation (**Figure 9**). Ce sont des cellules totalement différenciées, incapables de se diviser et dont la fonction ultime est de produire des Ig solubles. Avant d'arriver à ce stade, certaines cellules du GC se différencient en plasmoblastes, toujours

capables de se diviser, mais qui ont commencé à se spécialiser pour sécréter des grandes quantités d'Ac.

Les plasmocytes forment un groupe hétérogène, distingué selon la sous-population de cellules B dont ils proviennent, ainsi que de leur durée de vie (Oracki et al., 2010). Il y a ceux qui sont issus des B1 ou des B MZ (Gunn and Brewer, 2006) suite à une activation T-indépendante. Ils sont caractérisés par une courte durée de vie et expriment surtout des Ig d'isotype M. Ils n'ont pas une très grande affinité pour l'Ag. Ils expriment un BCR peu ou pas hypermuté et s'activent lors des phases précoces de la réponse immunitaire (Coutinho et al., 1995; Holodick and Rothstein, 2015). Par contre, les plasmocytes issus des LB FO ont une longue durée de vie. Ils produisent des Ac de différents isotypes après une activation T-dépendante. Ils vont migrer dans la moelle osseuse, dans un microenvironnement spécialisé, où une sous-population de ces cellules survivra très longtemps, grâce aux signaux provenant de cellules stromales. Ces plasmocytes fourniront pendant longtemps une source d'Ac de haute affinité.

v. Les cellules B mémoires

Les cellules B mémoires sont des cellules quiescentes, ayant une longue durée de vie. Ces cellules ont déjà rencontré l'Ag et fournissent une protection spécifique lors de la réponse immunitaire secondaire. Elles sont produites en réponse à des Ag T-dépendants (McHeyzer-Williams et al., 1993), mais également T-indépendants (Pape et al., 2011). On distingue les cellules B mémoires qui peuvent, suite à la rencontre de l'Ag, retourner aux GC pour augmenter leur affinité et celles de la moelle osseuse qui seront les premières à être recrutées lors d'une nouvelle rencontre de l'Ag. La vaccination repose en fait sur cette mémoire immunitaire.

Les mécanismes contrôlant la différenciation en B mémoires ne sont toujours pas connus. Il semble qu'ils soient de deux types : ceux permettant de sortir du GC et ceux induisant la différenciation plasmocytaire. Enfin, contrairement aux cellules B2 mémoires, les cellules B1 mémoires n'ont pas la capacité de provoquer une réponse immunitaire secondaire plus forte et plus rapide. Cette mémoire ne se traduit en fait que par un plus grand nombre de clones B1 spécifiques de l'Ag rencontré (Kurosaki et al., 2015).

vi. Les cellules B1

La deuxième population des cellules B, les B1, fait partie du SI inné. Ces cellules représentent approximativement 5% des cellules B totales chez la souris. Elles diffèrent des cellules B2 par leur origine, fonctions, spécificité antigénique, diversité de répertoire,

marqueurs de surface et distribution tissulaire. Les cellules B1 se développent très tôt, dans le foie foetal, et gardent une capacité d'autorenouveauement tout au long de leur vie. Elles sont surtout présentes dans l'intestin et la cavité intrapéritonéale où elles représentent à peu près 50% des cellules B totales. Par contre, leur pourcentage est très faible dans les ganglions lymphatiques et la rate (1% des cellules B). Elles sont quasiment inexistantes dans la moelle osseuse (0,1% des cellules B totales) (Kantor and Herzenberg, 1993; Kroese et al., 1992). Leur BCR présente un répertoire antigénique restreint, présentant une utilisation préférentielle de certains segments V_H et un faible taux d'insertion aléatoire de nucléotides lors des recombinaisons VDJ (Hardy et al., 1989; Kantor, 1996; Kantor et al., 1997). Elles sont caractérisées par la production d'Ig polyréactives ou autoréactives naturelles d'isotype M (Baumgarth, 2011). Ce BCR est doué d'une faible affinité et reconnaît des Ag T-indépendants (Aziz et al., 2015; Baumgarth, 2011; Ehrenstein and Notley, 2010; Holodick and Rothstein, 2015; Tung and Herzenberg, 2007). Deux rôles principaux ont été attribués à ces Ig polyréactives. Malgré leur faible affinité, elles ralentissent la réplication de pathogènes suite à leur fixation, jouant ainsi un rôle dans l'immunité innée (Martin et al., 2001). Dans un deuxième temps, leur fixation sur les débris des cellules apoptotiques, grâce à leur faible autoréactivité, nettoie l'organisme et limite le risque d'inflammation et de réaction auto-immune dirigée contre ces Ac du soi. Boes et coll ont montré une aggravation des pathologies auto-immunes chez la souris suite à l'élimination des cellules B1 (Boes et al., 2000). D'autres études ont montré que ces Ig dites naturelles jouent un rôle dans la limitation du développement de l'athérosclérose (Shaw et al., 2000). Enfin, les Ig naturelles d'isotype A sécrétées surtout dans le tube digestif semblent avoir un rôle dans la régulation de la flore commensale (Kroese et al., 1996; Macpherson and Slack, 2007).

Phénotypiquement ces cellules sont CD19⁺B220⁺IgM^{high}IgD^{low}CD11b⁺ et peuvent être subdivisées, selon l'expression du marqueur CD5 en deux sous-populations distinctes : les B1a (CD5⁺) et les B1b (CD5⁻) (**Figure 9**). Il a été démontré qu'elles réagissent différemment lors d'une réponse immunitaire. Les B1a sécrètent spontanément des IgM et assurent une première ligne de défense contre des bactéries encapsulées telles que le *Streptococcus pneumoniae*. La production des Ac par les B1b est induite et permet l'élimination fiable des pathogènes ainsi qu'une protection à long terme (Haas et al., 2005). Différentes études de transferts de cellules B plus ou moins matures dans des souris irradiées, ont montré que les cellules B1 sont issues de précurseurs différents des B2. La divergence entre les deux lignées apparaissant dès le stade précurseurs lymphoïdes précoces (Herzenberg and Herzenberg, 1989). Enfin, il est à noter que

les cellules B1 sont prédisposées à « *switcher* » vers l'isotype IgA et leurs répertoires antigéniques ne subit pas de fortes SHM.

Les cellules B1 ont un double rôle crucial : Aider l'organisme contre les risques de pathologies auto-immunes et assurer la lutte contre les pathogènes. Ces lymphocytes sont à l'interface de l'immunité innée et adaptative (Baumgarth, 2011). Au cours de ma thèse, j'ai participé à des études sur le rôle des activateurs transcriptionnels en 3' du locus IgH sur la maturation des LB. Ces travaux ont fait l'objet de 3 publications mises en annexe.

vii. Les cellules B régulatrices

Les cellules B peuvent également affecter les réponses inflammatoires par la libération de cytokines. Ces cellules immunosuppressives agissent à différents stades de développement (T2 jusqu'à plasmocytaire) (Rincón-Arévalo et al., 2016) principalement en sécrétant des cytokines immunosuppressives (e.g. Il-10, Il-35, TGF β) mais aussi par interaction direct avec les LT auxiliaires par l'intermédiaire de protéines de membrane pour induire leur apoptose ou arrêter leur prolifération (Mauri and Menon, 2015; Ray et al., 2015; Rosser and Mauri, 2015). L'altération de cette population lymphocytaire suppressive est très fréquemment associée à des pathologies inflammatoires ou auto-immunes. Ces cellules semblent jouer un rôle dans l'atténuation des réactions immunitaires anti-cancéreuses (Miyagaki et al., 2015; Zhang et al., 2015).

Chapitre II Les éléments *cis*-régulateurs et les Remaniements des gènes du locus IgH

Des éléments au locus IgH, dans des régions dites régulatrices, assurent un contrôle des événements géniques survenant au cours du développement B permettant d'assurer une expression ordonnée des gènes de ce locus. Ces événements sont communs chez l'homme et la souris. Ils sont situés en 5' et en 3' de celui-ci. Son accessibilité joue un rôle très important dans le maintien des remaniements géniques lignages et stades spécifiques (Perlot and Alt, 2008).

1. Accessibilité du locus

Si les enzymes Rag sont exprimées dans les CLP (*Common Lymphoid Progenitor*), les LT et les LB, les recombinaisons V(D)J ne s'observent que dans les LB. Ceci est la conséquence, au stade pro-B, de transcrits non codants dans les segments V_H non réarrangés des LB. Ces transcrits constituent, à un moment donné, une fenêtre d'accessibilité aux régions devant être réarrangées. Plusieurs mécanismes épigénétiques dirigent cette accessibilité. Ces mécanismes sont : la relocalisation nucléaire, le remodelage chromatinien, le changement de configuration tridimensionnelle du locus ainsi que la transcription non-codante (Jaeger et al., 2013).

Le positionnement d'un gène dans des régions nucléaires transcriptionnellement actives ou « euchromatines », au centre du noyau, favorise sa forte expression. Par contre, sa présence dans des régions dites « hétérochromatines » ou transcriptionnellement inactives (en périphérie ou au niveau péricentromérique) contribue à son « silencing » (Kosak, 2004). Pour devenir accessible aux facteurs de recombinaison, le locus IgH se déplace de sa position initiale, à la périphérie nucléaire, vers une position plus centrale. Au stade pro-B, les deux allèles sont dans cette position pour permettre les recombinaisons D- J_H puis V_H - DJ_H avec les segments V_H les plus accessibles aux recombinaisons : les proximaux sont dirigés vers le centre du noyau contrairement aux distaux qui restent liés à la périphérie. Lors de cette recombinaison V_H - DJ_H l'allèle recombiné se trouve dans une position centrale; par contre l'autre allèle se situe en périphérie. Cette localisation asymétrique, maintenue lors des réarrangements des chaînes légères, explique le phénomène d'exclusion allélique. Au stade B immature, les deux allèles reprennent une position centrale (Skok et al., 2001). Au stade B mature, ils doivent être accessibles aux réarrangements secondaires. Ainsi, il a été démontré que les deux allèles sont

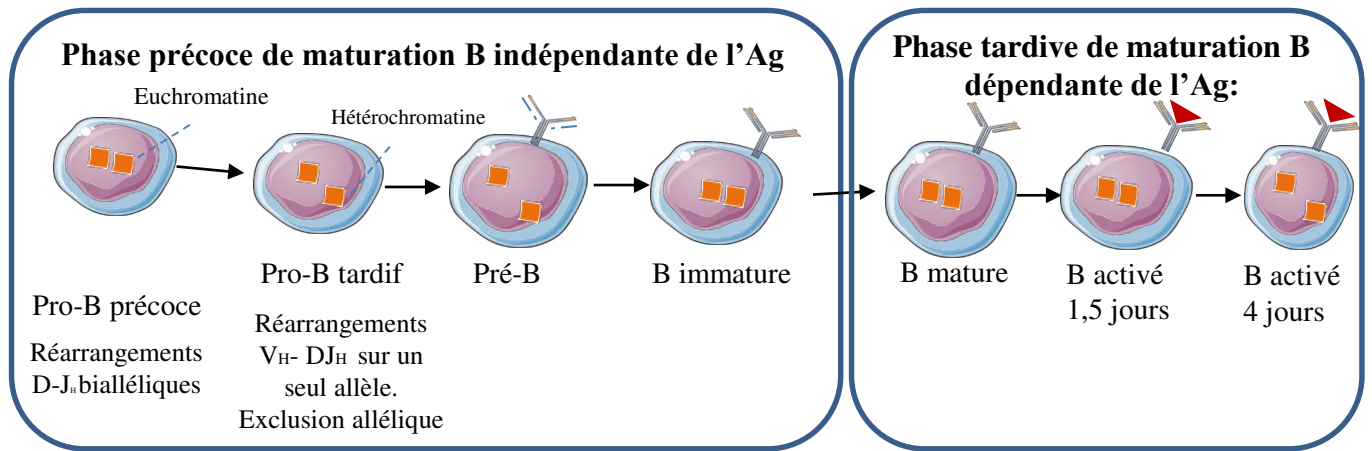


Figure 12 – Représentation schématique du positionnement nucléaire des allèles IgH au cours du développement B.

Les carrés oranges représentent les deux allèles IgH. Ce schéma représente la corrélation entre la localisation au centre du noyau des allèles du locus IgH et l'état de réarrangement des gènes. Lors d'une exclusion allélique, un allèle sera recruté dans l'hétérochromatine à la périphérie du noyau ayant un effet répressif sur la transcription.

maintenus dans l'euchromatine au moins 1,5 jours après l'activation des LB, mais pas après 4 jours, où l'un des deux sera renvoyé dans l'hétérochromatine (**Figure 12**) (Skok et al., 2001).

De la même façon, en fonction du stade de développement B la position des allèles Ig κ est modifiée. Au stade pro-B, les allèles κ semblent se relocaliser de l'hétérochromatine, de la périphérie de noyau, vers le centre (Goldmit et al., 2005; Kosak et al., 2002). Par contre, au stade pré-B, pour rendre un des deux allèles accessibles aux réarrangements, un allèle Ig κ se localise dans l'hétérochromatine (Fitzsimmons et al., 2007; Goldmit et al., 2005). A l'opposé, une étude plus récente indique que les allèles Ig κ sont relocalisés au centre du noyau uniquement à partir du stade pré-B (Rother et al., 2016) et non pas pro-B (Kosak et al., 2002). Au stade plasmocytaire, les gènes des Ig sont préférentiellement localisés en périphérie du noyau. A ce stade, les loci des chaînes lourdes et légères κ sont associés en « cluster » et partagent la même usine de transcription (Park et al., 2014). Aucune étude n'est disponible au sujet du locus Ig λ . Ceci est très certainement à relier à l'utilisation très marginale du locus Ig λ par rapport au locus Ig κ chez la souris. Cette différence d'utilisation, très marquée chez la souris, l'est beaucoup moins chez l'homme. En effet, il existe une plus grande variabilité potentielle en segment V λ chez l'homme (par rapport à la souris) conduisant à une utilisation plus fréquente du locus λ . Cependant, comme chez la souris, c'est le locus κ qui est utilisé en premier lors de la lymphopoïèse B chez l'homme.

En plus du positionnement nucléaire du locus, le changement de sa configuration tridimensionnelle contrôle cette accessibilité au cours de l'ontogénie B. Des études de noyaux en interphase par FISH et des interactions entre régions par 3C (*Chromosome Conformation Capture*) ont montré que la contraction du locus favorise les interactions longues distances et donc les réarrangements géniques entre des segments très éloignés. Les régions d'ADN à recombiner sont dans une même boucle. Celles qui ne doivent pas être recombinées sont physiquement éloignées. Ainsi, lors des réarrangements D-J_H, le locus passe de sa conformation basale décontractée à un état contracté pour générer des boucles proches des segments proximaux. Ce locus se recontracte à nouveau lors des recombinaisons V_H-DJ_H pour juxtaposer les segments V_H au DJ_H déjà recombiné (**Figure 13**) (Medvedovic et al., 2013). La signalisation par le pré-BCR empêche tout futur réarrangement génique, en permettant au locus de revenir dans un état décontracté, et ainsi participe à l'exclusion allélique (Roldán et al., 2005). Pour permettre le rapprochement entre la région S μ et la région S acceptrice concernée lors de la recombinaison isotypique, le locus se contractera suite à une stimulation cytokinique (Wuerffel et al., 2007).

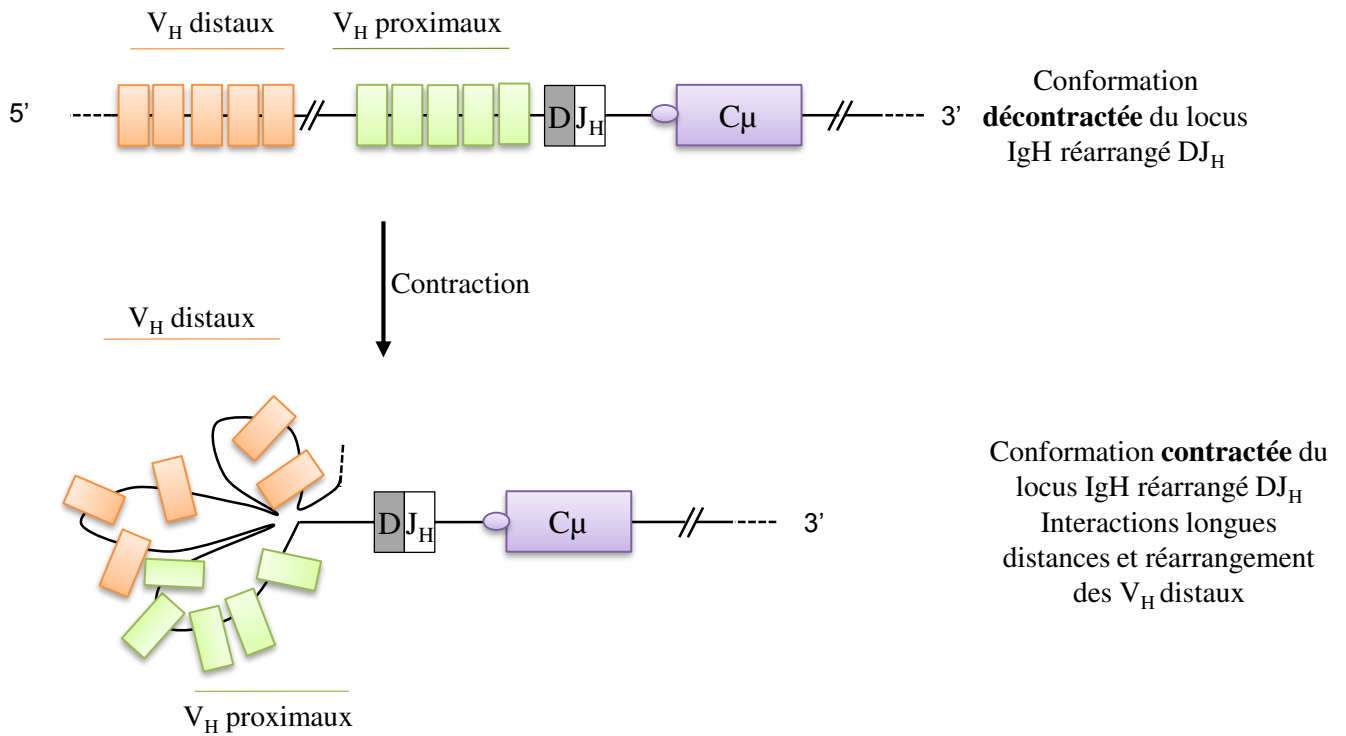


Figure 13 – Représentation schématique de la contraction du locus IgH au cours des recombinaisons V_H-DJ_H.

Le locus est en conformation décontractée suite à la recombinaison DJ_H. Le locus se contracte modifiant ainsi sa structure tridimensionnelle, pour permettre les recombinaisons longues distances avec les segments V_H distaux lors des réarrangements V_H-DJ_H.

Les modifications de la chromatine et le recrutement des recombinaisons s'ajoutent aux mécanismes gouvernant l'accessibilité. Ceci est en relation avec le « code des histones ». Les extrémités amino-terminales des histones libérées des nucléosomes, unités fondamentales de la chromatine, sont accessibles à des modifications post-traductionnelles comme la méthylation, l'acétylation, l'ubiquitinylation ou la phosphorylation. Ces modifications sont à l'origine d'un remodelage chromatinien. Ainsi l'euchromatine (riche en gènes transcriptionnellement actifs) est caractérisée par l'acétylation des histones H3 et H4 (H3ac et H4ac) et par la di- ou triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me2 et H3K4me3). A l'inverse, l'hétérochromatine, l'état le plus condensé de la chromatine, est caractérisée par une hypoacétylation, ainsi que par la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me) et la triméthylation de la lysine 27 de cette même histone (H3K27me3) (Dunleavy et al., 2005; Jenuwein and Allis, 2001). Ces marques sont présentes dans un locus IgH inaccessible comme celui de cellules non B. Elles sont levées progressivement au cours de la lymphopoïèse B pour permettre les différents événements géniques. Elles sont corrélées à des changements dynamiques et ordonnés de la chromatine. Deux enzymes Rag sont impliquées dans le développement B : Rag1 qui agit spécifiquement sur des séquences RSS à recombinaison (Ji et al., 2010), ce qui restreint son activité aux régions V(D)J des lymphocytes B ; et Rag2 qui est plus ubiquitaire du fait qu'elle ne reconnaît pas un site spécifique mais les signes d'accessibilité de la chromatine comme les motifs H3K4me2/3 (Liu et al., 2007). Ainsi Rag2 agit également lors de la formation du T cell Receptor. Jeevan-Raj et collaborateurs ont montré que la marque H3K9me3, décrite comme répressive, permet le recrutement d'AID (*Activation-Induced Deaminase*) sur la région S μ via une interaction avec les protéines KAP1 (*KRAB domain Associated Protein 1*) et HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) (Jeevan-Raj et al., 2011). En partant des précurseurs B non réarrangés jusqu'au stade B mature, les différentes régions du locus présentent des marques épigénétiques répressives ou actives stade-spécifiques, permettant ainsi les différents remaniements géniques d'une manière ordonnée et spécifique.

Enfin pour l'accessibilité du locus, il a été montré que la cinétique d'apparition des ARN non codants, issus de la transcription germinale des segments à réarranger, est corrélée à l'accessibilité aux recombinaisons des segments correspondants (Yancopoulos and Alt, 1985). Les promoteurs à l'origine de cette transcription (germinal ou non) seront décrits dans ce chapitre.

Diverses séquences nucléotidiques *cis*-régulatrices et des protéines ayant ces séquences comme cible (les éléments *trans* : facteurs de transcription) interviennent pour le contrôle de

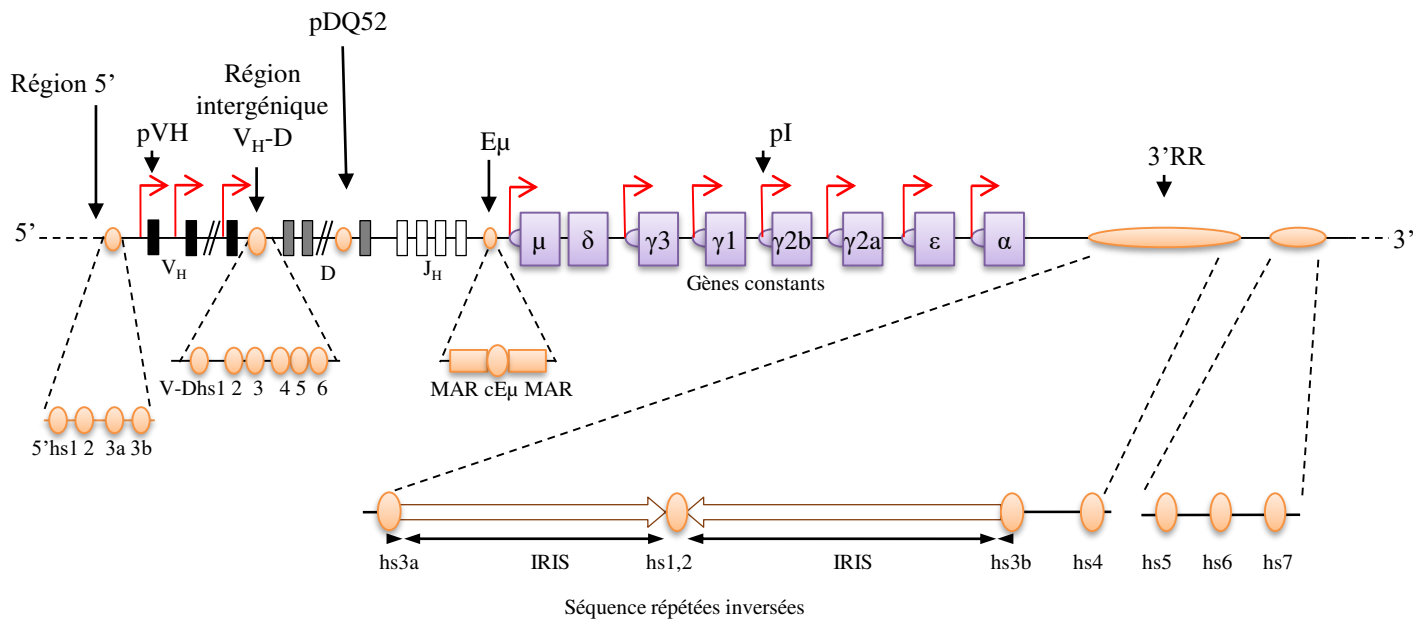


Figure 14 – Représentation schématique des éléments *cis*-régulateur du locus IgH.

Le locus IgH est représenté en configuration germinale. Les éléments *cis*-régulateurs sont représentés en orange sur la ligne du haut et détaillés sur la ligne du bas. Les flèches représentent les promoteurs. Les sites hs sont représentés par des cercles, les MARs par des rectangles et les séquences répétées inversées (IRIS) par des flèches blanches. Le schéma n'est pas à l'échelle.

l'accessibilité du locus et la régulation de l'expression des gènes d'Ig. Plusieurs éléments *cis*-régulateurs ont été identifiés au locus IgH : [1] Les promoteurs localisés en 5' des segments V_H, D et certains segments C_H ; [2] les régions isolatrices situées aux extrémités du locus et entre les segments V_H et D ; [3] les activateurs transcriptionnels, dont un situé dans l'intron entre J_{H4} et C_μ, associé à des régions d'attachements à la matrice dites MAR (*Matrix Association Region*) et l'autre en 3' des gènes constants C_H (Perlot and Alt, 2008).

Lors de mes travaux de thèse, j'ai surtout travaillé sur la région régulatrice en 3' du locus. C'est pour cela que je détaillerai surtout les connaissances actuelles sur la 3'RR

2. Les promoteurs et la transcription germinale

Différents promoteurs existent au locus IgH : Ceux des régions V_H (pV_H), le DQ52 (pDQ52) et ceux des régions constantes (pI) (**Figure 14**). Notons que la synthèse d'une Ig réarrangée ne nécessite qu'un seul promoteur localisé en amont du segment V_H. Ces derniers sont activés séquentiellement lors de l'ontogénie B, donnant naissance à des produits ne codant aucune protéine (transcrits germinaux stériles), mais étant associés au déclenchement des différents événements de recombinaisons géniques.

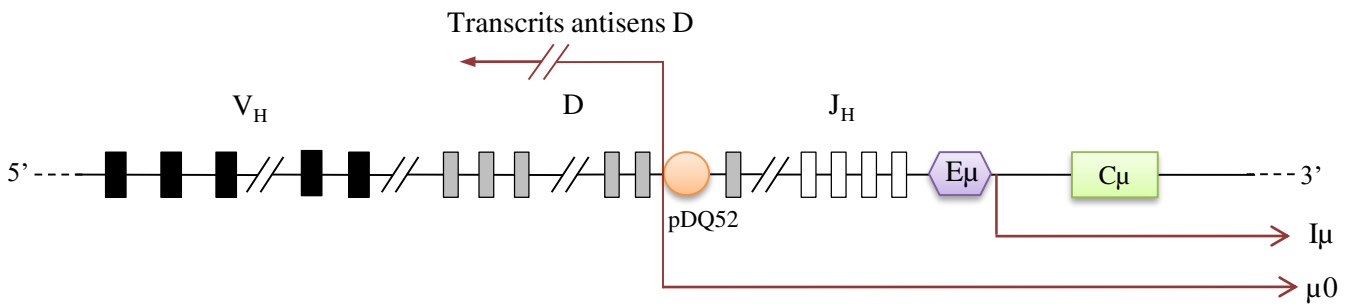
i. La transcription germinale des régions variables

Ce sont les transcrits des segments V_H, D et J_H avant leurs réarrangements. Comme déjà décrit, cette transcription est corrélée au déroulement des différents réarrangements géniques, sans avoir aucun rôle identifié jusqu'aujourd'hui autre que de faciliter l'accessibilité des recombinases à la chromatine. (Sen and Oltz, 2006; Sun and Storb, 2001).

Un promoteur bidirectionnel inactif en conformation germinale précède tous les segments D. PDQ52 est actif dès le premier stade d'engagement en lignage B, contrairement aux autres qui ne s'activent qu'après les réarrangements D-J_H. Un transcrit dit μ_0 est synthétisé à partir du promoteur PDQ52, allant du segment DQ52 au gène C_μ (**Figure15**). Un transcrit DJ_H est synthétisé après les recombinaisons D-J_H à partir du promoteur activé du segment D réarrangé. Son activation permet l'initiation de la transcription dans les deux sens (Alessandrini and Desiderio, 1991; Bolland et al., 2007; Chakraborty et al., 2007; Reth and Alt, 1984).

En parallèle, les segments V_H sont transcrits suite à ce réarrangement D-J_H. Notons que chaque segment V contient un promoteur requis pour la transcription germinale ainsi que pour la transcription après les réarrangements VDJ permettant ainsi l'expression de la chaîne mature

Locus IgH en conformation germinale



Locus IgH réarrangé DJ_H

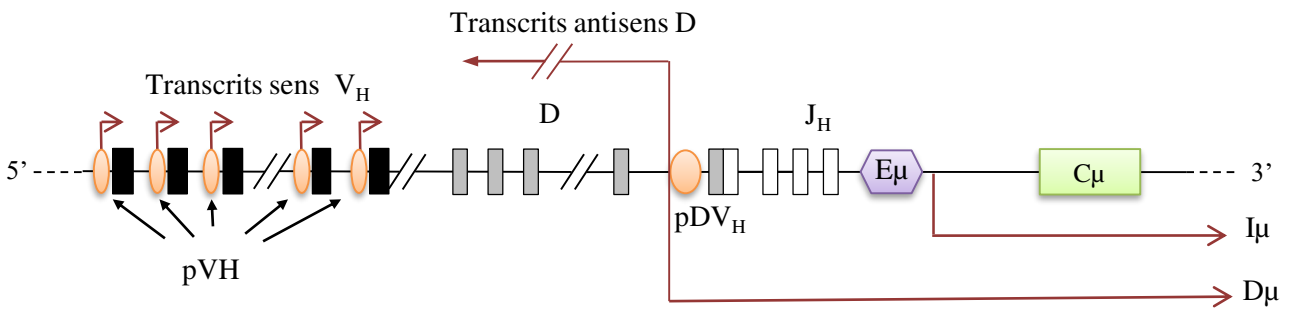


Figure 15 – Transcrits germinaux des régions variables au cours des recombinaisons V_HDJ_H au locus IgH.

Les promoteurs sont représentés par des cercles en orange. Les flèches représentent les transcrits. Ils partent du promoteur pDQ52 dans les deux sens pour permettre l'accessibilité des segments D et J_H dans la conformation germinale du locus. Des transcrits partent dans les deux sens à partir du promoteur du segment D réarrangé après les réarrangements DJ_H. Chacun des segments V_H possède un promoteur et sont également transcrits.

d'Ig (Yancopoulos and Alt, 1986). Un promoteur V_H contient : une TATA box, un élément initiateur (Inr), un élément octamère très conservé ATGCAAAT (situé à moins de 100pb du site d'initiation) et certains contiennent une séquence riche en pyrimidine dont la fonction est toujours inconnue, ainsi qu'une séquence heptamérique CTCATGA qui aboutit à une activation optimale et spécifique de la transcription en association à l'octamère. Notons que ce dernier constitue le site de fixation de divers facteurs de transcription tels que Oct-1 exprimé de façon ubiquitaire et Oct-2 spécifique de la lignée B. Ces facteurs sont nécessaires à la transcription des segments V_H . Les promoteurs des segments V_H de la famille J558 contiennent des séquences dites dice (*Downstream Immunoglobulin Control Elements*) flanquées de deux éléments Inr (**Figure 16**) (Buchanan et al., 1995; Roy et al., 2011; Tantin et al., 2004). Récemment, des éléments appelées PAIR (pour *Pax-5 Activated Intergenic Repeat*) pouvant fixer plusieurs facteurs dont Pax-5, E2A, et Ctf (*CCCTC-binding factor*) ont été identifiés. Ils semblent avoir une fonction de régulation des recombinaisons V_H -DJ $_H$ (Ebert et al., 2011).

ii. La transcription germinale des régions constantes

Cette transcription est indispensable à la CSR, même si elle ne code aucune protéine. Chaque gène constant du locus IgH (excepté C δ) est associé à un promoteur pI (pour *Intervening*), inductible par une stimulation cytokinique adaptée, à partir d'où cette transcription est initiée avant la formation des GC (Xu and Stavnezer, 1992). Les gènes constants sont organisés dans des « unités transcriptionnelles » constituées d'un pI, d'un exon I, d'une région « *switch* » intronique ainsi que des exons C $_H$. Les transcrits initiés aux pI contiennent l'exon I en aval, épissé sur le premier exon constant qui lui est associé (**Figure 17**) (Matthews et al., 2014). Cette machinerie de biosynthèse de l'ARN joue un rôle dans le maintien d'un état chromatinien activé permettant l'induction des cassures (Daniel et al., 2010), ainsi qu'un rôle dans le recrutement d'AID (Nambu et al., 2003). Le promoteur pI n'est pas indispensable à la CSR vu que son remplacement par un promoteur hétérologue ne la perturbe pas s'il induit la génération de transcrits germinaux épissés.

Après la CSR, la transcription à partir du promoteur I μ permet la synthèse d'un transcrit hybride I μ -C $_x$. La détection de ces derniers ainsi que des transcrits I $_x$ -C $_x$ constitue une preuve que la CSR est correctement initiée et effectuée par le LB (Kracker and Radbruch, 2004; Stavnezer, 2000).

La stimulation par divers cocktails cytokiniques est un moyen fréquemment utilisé pour l'étude de la CSR. Ainsi la stimulation par du LPS l'induit vers les isotypes G2b et G3

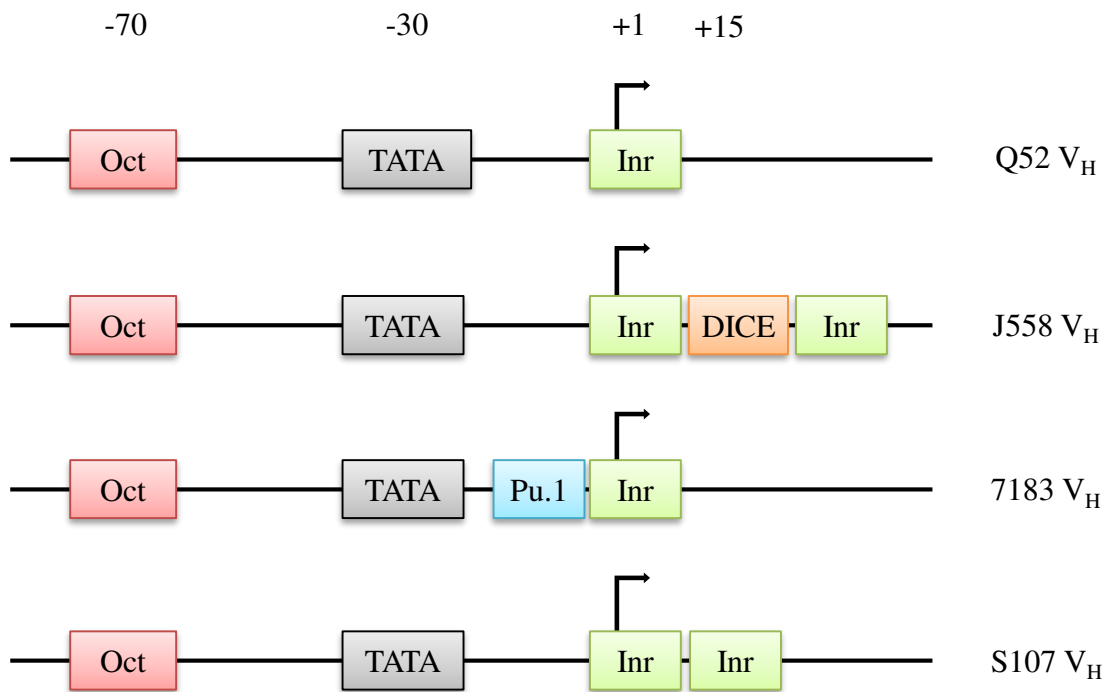


Figure 16 – Diversité et composition des promoteurs V_H.

Un promoteur caractérisé par la présence d'une séquence Oct en aval de la TATA box, ainsi qu'un élément initiateur Inr, précède chacun des segments V_H. Mais des variations existent selon les familles de V_H (existence d'un site de fixation de Pu.1, répétition de l'élément Inr). D'après Roy et al., 2011.

conséquence de la transcription germinale par les promoteurs $I\mu$, $I\gamma 2b$ et $I\gamma 3$. L'induction de la CSR vers les isotypes G1 et E nécessite de l'interleukine 4 (IL4) en plus du LPS, quand celle vers les isotypes G2a ou A nécessite l'interféron γ (INF γ) ou du TGF β (pour *Transforming Growth Factor β*) (Stavnezer, 2000).

3. Les régions isolatrices

Les isolateurs ou régions isolatrices sont des séquences d'ADN fixant des frontières dans la chromatine. Ils présentent généralement un motif CCCTC ou CBE (pour *Ctcf Binding-Element*) sur lequel se fixent des protéines nucléaires en doigt de zinc ubiquitaires dites Ctcf. Ces protéines interagissent entre elles ou avec la cohésine et aident à la contraction du locus pour former des boucles chromatinienne (Gaszner and Felsenfeld, 2006). Deux types d'isolateurs existent : ceux qui séparent les « *enhancers* » des promoteurs pour empêcher toutes interactions indésirables et ceux qui créent une barrière pour éviter la propagation de l'hétérochromatine (séparation euchromatine/ hétérochromatine) (**Figure 18**). Divers isolateurs ont été identifiés sur le locus IgH participant à la régulation du développement B et au déroulement successif des réarrangements géniques (Degner et al., 2009; Gerasimova et al., 2015; Chunguang Guo et al., 2011). Trois régions principales ont été identifiées contenant des CBE contrôlant l'accessibilité ou l'isolation de la chromatine (Featherstone et al., 2010; Garrett et al., 2005; Pawlitzky et al., 2006) : la région 5', la région intergénique et IGCR1 et la région Hs 5 6 7 (Site hypersensible à la DNase I).

i. La région 5'

Cette région contient 4 sites hs (pour hypersensibles à la DNase I (DésoxyriboNucléase I) : 5'hs1, hs2, hs3a et hs3b) situés environ 30kb en amont du segment $V_H J558.55$ le plus distal (**Figure 14**). Ces sites sont détectables tout au long du développement B sauf le 5'hs1 qui ne l'est qu'au stade pro-B. Il peut fixer divers facteurs de transcription tel que le PU.1, Pax5 et E2A (Pawlitzky et al., 2006). Cette région définirait la limite chromatinienne en 5' du locus IgH. Sa délétion n'a aucun effet sur le développement B, les recombinaisons VDJ et la CSR (Perlot et al., 2010).

ii. La région 3' : Hs 5 6 7

Localisée à l'extrémité du locus IgH, cette région est constituée de 3 sites d'hypersensibilité à la DNase I, 3'hs5, hs6 et hs7 (**Figure 14**) (Garrett et al., 2005). Plusieurs

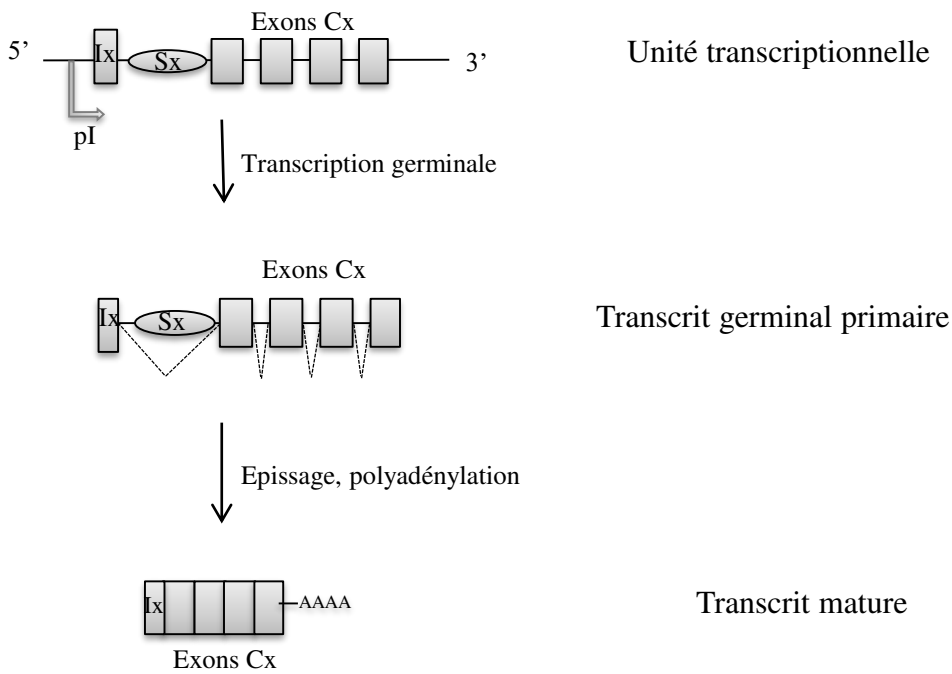


Figure 17 – Génération des transcrits germinaux dans les régions constantes.

L'unité transcriptionnelle de chacun des gènes constants est constitué d'un promoteur pI, d'une séquence (Ix), d'une région switch (Sx) et des exons C_x. Le transcrit mature non codant est obtenu après épissage et polyadénylation du transcrit primaire. D'après Matthews et al., 2014

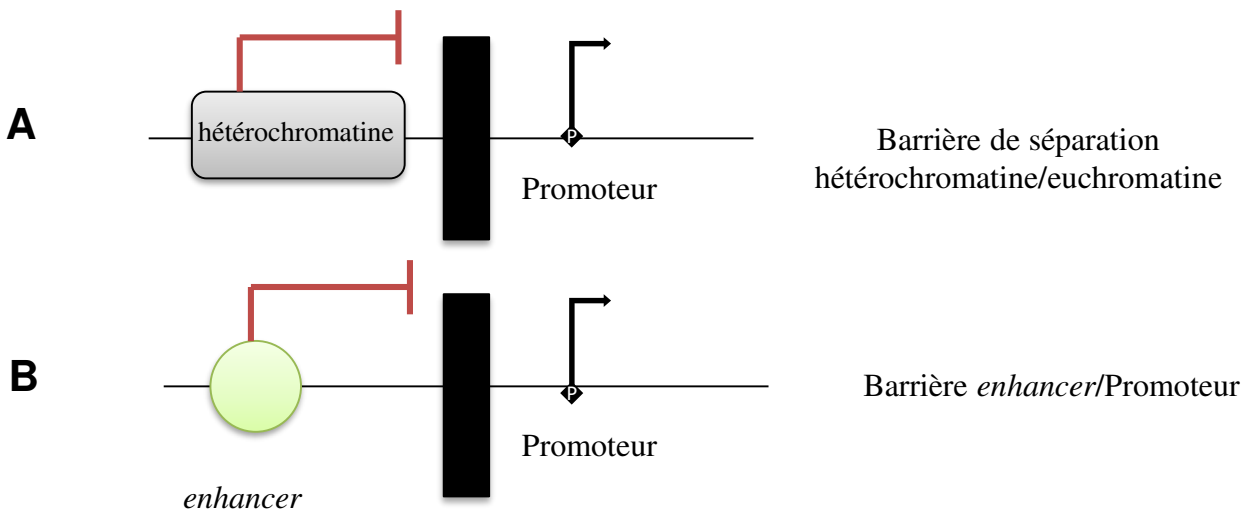


Figure 18 – Différents types d'isolateurs existent chez les vertébrés.

A- Isolateur empêchant la propagation de l'hétérochromatine.
 B- Isolateur empêchant l'activité d'un *enhancer*.

sites CBE y ont été mis en évidence lui conférant ainsi un rôle d'isolateur. Plutôt qu'un rôle *cis*-régulateur, elle interviendrait dans la régulation des interactions longues distances lors des mécanismes de recombinaison. Sa délétion aboutit, en plus d'un biais dans les réarrangements VDJ (avec un usage accru des segments V_H proximaux, de DQ52 et de JH3) à l'augmentation de la transcription des gènes situés en 3' du locus IgH (Volpi et al., 2012). Cette région est l'isolateur transcriptionnel de l'extrémité 3' du locus IgH avec les gènes situés en aval (Birshtein, 2012).

iii. La région intergénique $V_H D$ et IGCR1

La région intergénique $V_H D$ participe à la régulation séquentielle des recombinaisons $V_H D J_H$ (Featherstone et al., 2010). L'accessibilité et l'activation des gènes V_H sont limitées avant que la recombinaison $D J_H$ n'ai lieu grâce à la séparation des segments V_H et D en domaines chromatiniens distincts. Cette séparation est due à cette région qui s'étend sur 90kb entre le segment V_H fonctionnel le plus proximal et le segment D le plus distal appelé DFL6.1. Elle est constituée de 6 sites hypersensibles à la DNase I (hs1 à hs6) dont deux éléments (hs4 et hs5) contiennent un CBE et des sites de fixation à plusieurs facteurs de transcription essentiels au développement lymphocytaire B tels que le Pax5, Stat3 et PU.1 (Featherstone et al., 2010). Les deux CBE jouent un rôle d'isolateur en inhibant l'extension de la transcription anti-sens des segments D vers la région V_H proximale (**Figure 14**). Les deux CBE avec les potentiels éléments *cis* adjacents forment la région IGCR1 (pour *Intergenic Control Region 1*) qui s'étend sur une région de plus de 4kb. Les délétions ou mutations ciblées ont montré qu'elle est indispensable au contrôle de la transcription germinale, assurant la spécificité tissulaire et temporelle des réarrangements V(D)J (Giallourakis et al., 2010). Guo et collaborateurs ont suggéré que le réarrangement des segments V_H distaux est favorisé par la formation de boucles à partir des CBE de l'IGCR1 (Guo et al., 2011).

4. Les activateurs transcriptionnels

Comme son nom l'indique, un activateur transcriptionnel ou « *enhancer* » est une séquence d'ADN ayant la capacité de réguler, à distance, la transcription d'un gène et possédant des sites de fixation pour des facteurs de transcription. Il peut être transcrit en eRNA (pour *enhancer* RNA) dont la régulation et la fonction sont toujours inconnues (ces transcrits ne codent aucune protéine). Notons que certaines équipes proposent que ces transcrits puissent jouer un rôle dans l'accessibilité de la chromatine et/ou dans les interactions à longue distance

(Lai and Shiekhatar, 2014). Au sein du locus IgH, deux activateurs transcriptionnels sont identifiés. Le premier est du côté 5' : C'est l'activateur intronique $E\mu$. Le second est du côté 3' : C'est la région régulatrice en 3' (3'RR) localisée en aval de $C\alpha$ (**Figure 14**).

i. L'enhancer 5' $E\mu$

$E\mu$ fut le premier activateur transcriptionnel découvert au locus IgH (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983). Il est situé entre le dernier segment J_H (J_{H4}) et le gène $C\mu$. Cette localisation permet son maintien durant tous les événements de recombinaison génique prenant place au locus IgH. $E\mu$ est formé d'un core central de 220pb (core $E\mu$ ou $cE\mu$) flanqué des deux régions d'attachement à la matrice nucléaire dites MARs (pour *Matrix Attachment Region*) (Perlot and Alt, 2008).

a. $cE\mu$

Plusieurs sites de fixation de protéines activatrices ou inhibitrices de transcription sont identifiés dans le $cE\mu$. On distingue le site C/EBP (pour *CCAAT-Enhancer-Binding Proteins*), $\mu E1$, $\mu E5$, $\mu E2$, μA , $\mu E3$, $\mu E4$ et une séquence octamérique, successivement, en partant de 5' en 3'. L'octamère constitue le site de liaison des facteurs de transcription tels que Oct-1 et Oct-2 (Ernst and Smale, 1995). Les éléments $\mu E4$ et $\mu E5$ donnent la spécificité cellulaire vis-à-vis des protéines activatrices ou inhibitrices se fixant dessus. En effet, dans les lignées non B, $E\mu$ est inactivé grâce à la fixation de la protéine inhibitrice ZEB. Par contre, ce sont les protéines activatrices de la famille E2A qui viennent se fixer lors de l'activation d' $E\mu$ au cours des réarrangements VDJ (Genetta et al., 1994). L'action d' $E\mu$ s'avère être spécifique du stade pro-B. En effet, des réarrangements $V\kappa J\kappa$ prématurés au stade pro-B (normalement prenant place au stade pré-B) sont trouvés suite à une insertion d' $E\mu$ au locus κ (Inlay et al., 2006). En régulant l'accessibilité aux recombinases, $E\mu$ serait donc impliqué dans le maintien des recombinaisons V(D)J séquentielles (locus IgH avant IgL).

b. Les MARs

Les MARs sont des séquences courtes d'ADN riches en base A/T ou G/C de 200 à 1000 pb. Leur rôle exact demeure mal défini. Deux types de MARs existent : Celles qui sont en permanence attachées à la matrice nucléaire dites « MARs constitutives » et celles qui sont liées de manière réversible en réponse à des facteurs nucléaires tissus spécifiques, dites « MARs facultatives » rendant les régions associées transcriptionnellement actives. Des MARs

facultatifs entourent cE μ . Elles sont associées à des facteurs répresseurs dans les tissus non B. Dans les LB elles s'activent après fixation du facteur de transcription Bright (*B-cell Regulator of IgH Transcription*) (Lin et al., 2007). Elles sont dispensables au déroulement des recombinaisons VDJ mais semblent être impliquées dans la régulation du processus d'hypermutation somatique au locus IgH (Marquet et al., 2014).

c. Rôle de E μ

Plusieurs études ont été réalisées pour déterminer le rôle d'E μ par délétion (ou *Knock-Out*) dans des lignées cellulaires (Chen et al., 1993; Serwe and Sablitzky, 1993) ou dans des modèles murins (Afshar et al., 2006; Marquet et al., 2014; Perlot et al., 2005). Celle-ci affecte fortement les recombinaisons V_H-DJ_H, vu le manque de substrats résultants de la diminution des réarrangements précoces D-J_H.

La délétion du cE μ aboutit à la réduction des transcrits germinaux $\mu 0$ affectant la transcription anti-sens des régions D et J_H avant la recombinaison (Bolland et al., 2007) sans affecter celle des transcrits sens et anti-sens des segments V_H (Afshar et al., 2006; Perlot et al., 2005). Une réduction dans la densité de la RNA Pol II (ARN Polymérase II) accompagne cette diminution de transcription (Chakraborty et al., 2007). Cependant, d'autres éléments semblent être impliqués dans le contrôle de ces réarrangements vu l'activité résiduelle persistante dans les modèles déficients. Afshar et ses collègues ont exclu PDQ52 des candidats potentiels car le phénotype induit par la déficience d'E μ n'est pas intensifié par leur délétion conjointe sur le même allèle (Afshar et al., 2006).

E μ est essentiel à la localisation des allèles dans l'euchromatine au stade pro-B (Guo et al., 2011). L'étude des marques chromatiniennes dans des précurseurs B déficients pour le cE μ montre une apparition des marques H3K9ac et H3K4me3 (marques de chromatine active) suivie de la transcription germinale associée (Chakraborty et al., 2009). Grâce à la formation de boucles d'ADN, le cE μ par son interaction avec le PDQ52 puis IGCR1 régule le réarrangement VDJ séquentiel au stade pro-B. Pour éviter un réarrangement précoce, la première boucle enferme les segments J_H, ce qui permet le recrutement des Rag et l'initiation de ces réarrangements. Ensuite, la deuxième boucle emprisonnant la majorité des segments D grâce à son interaction avec IGCR1 favorise l'initiation des réarrangements par les Rag recrutées dans la boucle précédente. L'interaction de E μ à distance avec un site dans les segments V_H distaux et l'autre dans les segments V_H proximaux est en partie responsable du

rapprochement physique entre les segments V_H et la région DJ_H déjà réarrangée (Guo et al., 2011).

On note une diminution de 50% des cellules B matures en périphérie suite à la délétion d' $E\mu$ ainsi qu'une altération de la répartition des sous populations lymphocytaires B où le nombre des LB FO est fortement réduit. En effet, il a été rapporté qu'une diminution de la « force » du signal du BCR des cellules B transitionnelles les oriente vers le compartiment MZ (Pillai and Cariappa, 2009). Cette faible signalisation s'expliquerait par la diminution de l'expression de la chaîne lourde au stade pré-B suite à la suppression de la région $E\mu$. Malgré l'impact de sa délétion sur les recombinaisons V_HDJ_H , la fréquence d'usage des segments n'est pas altérée (Marquet et al., 2014). Une fois au stade B mature $E\mu$ n'a aucun impact sur l'expression du BCR. Un léger défaut de « *switch* » est suggéré puisque sa délétion entraîne la diminution des transcrits germinaux $I\mu$ (Afshar et al., 2006; Chakraborty et al., 2009; Li et al., 2010; Perlot et al., 2005). Les résultats sur les SHM chez les souris déficientes pour $E\mu$ sont contradictoires. Stabilité pour certains (Perlot et al., 2005), baisse pour d'autres (Ronai et al., 2005).

En conclusion, l'intégralité de ces études suggère qu' $E\mu$ régule le développement des LB, par son action sur les réarrangements V_HDJ_H ainsi que par l'expression des chaînes lourdes d'Ig, du stade pro-B jusqu'au stade B immature (Marquet et al., 2014; Peng and Eckhardt, 2013).

ii. La région régulatrice en 3' du locus IgH (3'RR)

Au cours de ma thèse j'ai participé à diverses études sur le rôle de la 3'RR sur la maturation des LB. Certaines de ces études ont fait l'objet de publications mises en annexe. Une revue, dont je suis un auteur, décrivant les dernières avancées scientifiques portant sur la structure/fonction de la 3'RR a été publié durant ma thèse (Saintamand et al., 2017). Elle est incluse ci-dessous. Je me contenterai donc de résumer brièvement les caractéristiques essentielles de cette région.

La capacité des lignées cellulaires déficientes pour $E\mu$ à produire des Ig a suggéré l'existence d'autres activateurs transcriptionnels au sein du locus IgH (Eckhardt and Birshstein, 1985; Zaller and Eckhardt, 1985). De multiples études ont abouti à la description d'une région de 30kb en 3' du locus IgH constituée de 4 activateurs transcriptionnels (hs3a, 1.2, 3b, 4).

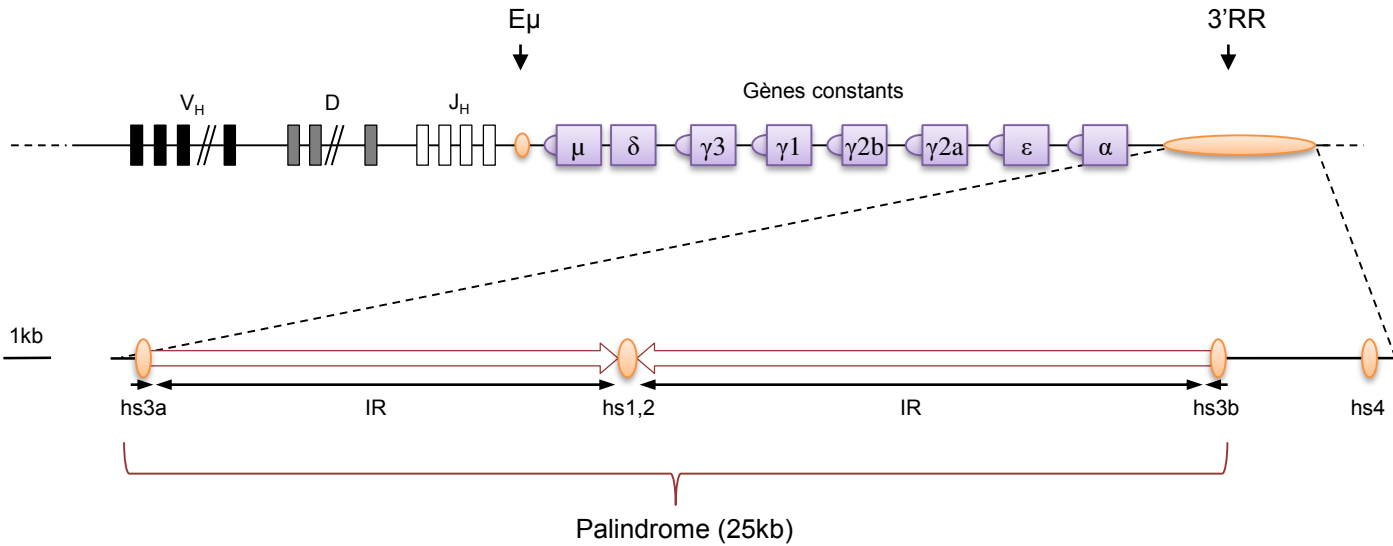


Figure 19 – Structure de la 3'RR.

Représentation schématique à l'échelle de la 3'RR du locus IgH. Les 3 premiers activateurs transcriptionnels hs3a, hs1,2 et hs3b avec les séquences répétées inversées (IR) constituent le palindrome. hs3a et hs3b ont 97% d'homologie avec une orientation inverse. hs1,2 constitue le centre de symétrie du palindrome. hs4 est en dehors du palindrome.

a. Structure et évolution de la 3'RR

Son séquençage a permis de mettre en évidence une structure unique. La 3'RR est divisée en deux sous-unités différentes : palindrome d'une part et hs4 d'autre part (Birshtein, 2014; Pinaud et al., 2011). L'architecture palindromique s'étend sur les premiers 25kb englobant les 3 premiers activateurs transcriptionnels (hs3a, hs1.2 et hs3b). hs1.2 constitue le centre de ce palindrome avec, de part et d'autre, des séquences répétées inversées IR (pour *Inverted repeat*) de 10 à 12kb (IR1, IR2 et IR 3) dont certaines sont en tandem. Ces séquences sont limitées par hs3a et hs3b. Ces deux sites d'hypersensibilité à la DNase I sont disposés en sens inverse avec 97% d'homologie de séquences prolongeant ainsi le palindrome. L'élément hs4, se situant en dehors du palindrome, constitue le dernier élément avec une activité *enhancer* de la région 3'RR (**Figure 19**) (Chauveau et al., 1998; Saleque, S., Singh, M., Little, R.D., Giannini, S.L., Michaelson, J.S., and Birshtein, B.K., 1997).

Une recombinaison $S\mu$ -3'RR similaire à la CSR dite LSR (pour *Locus Suicide Recombination*) a été identifiée suite à la découverte de séquences répétitives similaires aux régions « *switch* » nommées LS (pour *Like-switch*) dans la 3'RR. Ces séquences sont ciblées par AID ce qui aboutit à la délétion de l'ensemble des gènes constants, et par la suite, à l'apoptose des cellules B matures incapables de survivre sans l'expression du BCR (**Figure 20**) (Péron et al., 2012).

Une 3'RR se trouve, chez l'homme, dans chacun des deux blocs de gènes constants. Chaque bloc possède sa propre 3'RR qui contient trois *enhancers* (hs1.2, hs3 et hs4) présentant, comme chez la souris, une structure palindromique, avec hs1.2 flanqué des séquences IR (Saleque, S., Singh, M., Little, R.D., Giannini, S.L., Michaelson, J.S., and Birshtein, B.K., 1997; Sepulveda et al., 2005). La structure palindromique de cette région est conservée chez tous les mammifères (D'Addabbo et al., 2011). Contrairement aux séquences hs3a, hs1.2, hs3b et hs4, les séquences IR sont peu conservées entre les espèces. Ceci suggère une fonction très importante de cette architecture palindromique au-delà de la simple séquence nucléotidique.

Un même profil d'activation, au cours du développement B, est observé entre la 3'RR humaine et murine faisant de la souris un modèle d'étude pertinent pour l'analyse de ses fonctions régulatrices (Chen and Birshtein, 1997; Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997).

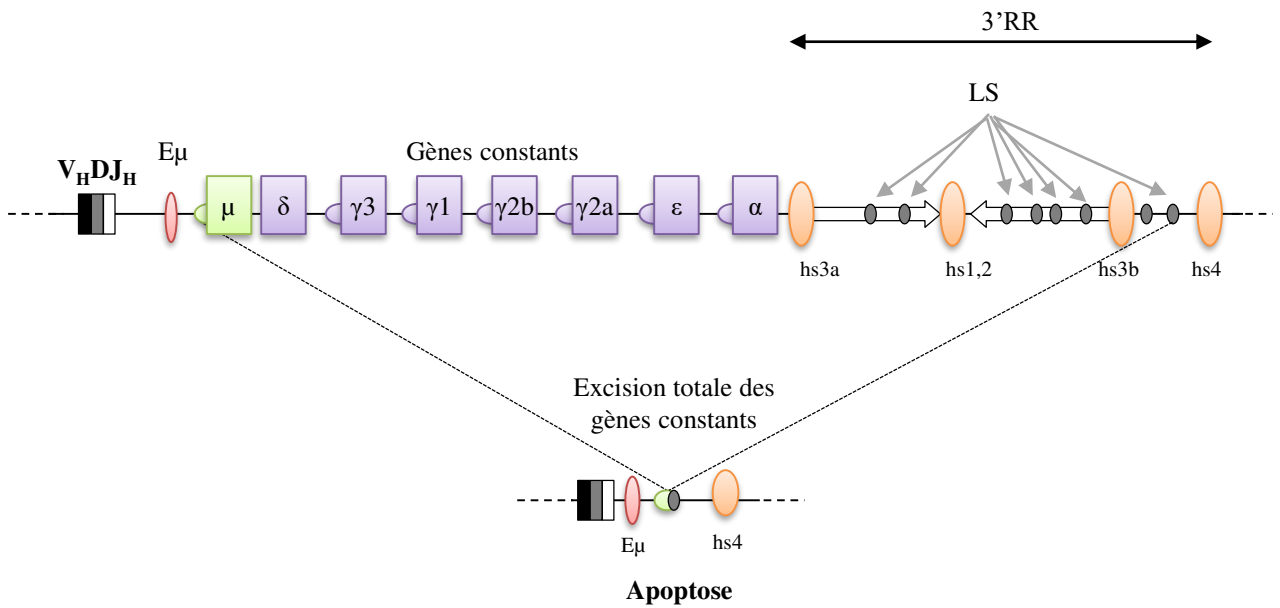


Figure 20 – Représentation schématique de la recombinaison LSR (pour *Locus Suicide Recombination*).

Les régions LS possédant une structure proche des régions « *switchs* » peuvent être ciblées par AID induisant une recombinaison similaire à la CSR dite LSR. L'intégralité des gènes constants est déléetée par cette réaction entraînant ainsi l'apoptose des cellules B matures dont le BCR est indispensable pour leur survie.

b. Structure fonction de la 3'RR

Pour résumer la revue ci-dessous décrivant les dernières avancées sur la 3'RR, une série de modèles KO a décrité la cinétique d'action de la 3'RR ainsi que sa fonction. Elle s'active du stade B immature au stade B mature. Au stade B immature, elle joue un rôle dans la synthèse de l'Ig et donc l'expression du BCR. Au stade B mature, elle est essentielle pour la transcription du locus IgH, CSR et les SHM. Pour ces fonctions, un rôle important de la structure palindromique a été mis en évidence.

► Les quatre activateurs transcriptionnels localisés dans la région régulatrice 3' (3'RR) du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) contrôlent les phases tardives de la maturation lymphocytaire B et, en particulier, la transcription du locus IgH. Docteur Jekyll lors de la maturation B, la région 3'RR se transforme en Mister Hyde en cas de translocation oncogénique au locus IgH, en prenant sous son contrôle transcriptionnel l'élément transloqué. Cette revue a pour but de montrer cette dualité à partir des dernières avancées scientifiques portant sur la structure/fonction de la région 3'RR et de souligner le possible ciblage de cette région comme approche thérapeutique potentielle pour les lymphomes B matures. ◀

Les différents événements géniques qui s'effectuent lors de la lymphopoïèse B (établissement du répertoire antigénique *via* les recombinaisons V(D)J¹, maturation d'affinité par le processus d'hypermutations somatiques, et modification des fonctions effectrices de l'immunoglobuline (Ig) par la recombinaison de classe) requièrent une régulation extrêmement fine, à la fois dans le temps et l'espace (*Figure 1*) [1]. Leur déroulement séquentiel, qui nécessite la génération de cassures doubles brins de l'ADN, est assuré par différents mécanismes permettant de modifier l'accessibilité des différentes régions cibles des recombinaisons : régulation de la transcription, condensation de la chromatine, localisation des locus au sein du noyau, etc. La coordination de ces mécanismes est assurée principalement par des éléments *cis*-régulateurs² répartis tout au long des locus d'Ig, particulièrement au locus des chaînes lourdes (IgH) (*Figure 2*) [1]. Un activateur transcriptionnel (ou

Vignette (Photo © Bertrand Nadel).

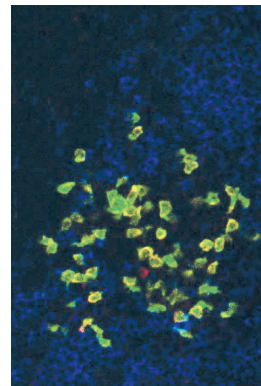
¹ Quatre régions géniques interviennent pour la formation des immunoglobulines (Ig) : la région V pour variable, la région D pour diversité (uniquement pour IgH), la région J pour jonction et la région constante C qui varie selon la classe d'Ig (Cμ, Cγ, Cε, etc.).

² Séquences régulatrices situées (sur le même chromosome) en amont ou en aval du site d'initiation.

3'RR

Docteur Jekyll et Mister Hyde de la lymphopoïèse/lymphomagenèse B

Alexis Saintamand*, Nour Ghazzoui, Hussein Issaoui, Yves Denizot



UMR CNRS 7276, Université de Limoges, rue Pr Descottes, 87025 Limoges, France.

*Adresse actuelle : Inserm U1236, université Rennes 1, 35000 Rennes, France.

alexis.saintamand@live.fr

yves.denizot@unilim.fr

enhancer, selon la terminologie anglo-saxonne) est défini comme une séquence d'ADN capable de stimuler à distance la transcription d'un gène, notamment en servant de site de fixation à des facteurs de transcription. Le locus IgH murin en comprend deux principaux : l'activateur intronique $\xi\mu$, localisé entre les segments J_H et le gène $C\mu$, et la région régulatrice située en 3' du locus (3'RR) en aval du gène $C\alpha$. C'est cette dernière qui coordonne toutes les phases tardives de la maturation B que sont la transcription du locus IgH, l'hypermutation somatique et la recombinaison de classe, assurant ainsi le fonctionnement optimal du lymphocyte B. La région 3'RR peut également contrôler la transcription d'oncogènes transloqués au locus IgH à la faveur des cassures chromosomiques, ce qui aboutit au processus de lymphomagenèse. Voilà donc le double visage de la région 3'RR...

La région 3'RR

$\xi\mu$ fut le premier activateur découvert au sein du locus IgH. Il est organisé sous forme d'un élément central (core $\xi\mu$ ou $c\xi\mu$) flanqué de deux régions d'attachement à la matrice nucléaire (MAR, pour *matrix attachment region*). La délétion d' $\xi\mu$ perturbe fortement les réarrangements V(D)J au locus IgH mais n'a guère d'impact sur la transcription du locus, l'hypermutation somatique et la recombinaison de classe [2, 3]. D'autres éléments régulateurs pour le contrôle de ces processus ont donc été recherchés au sein du locus. Quatre nouveaux activateurs transcriptionnels, répartis dans une région régulatrice d'environ 30 kb, ont ainsi été identifiés en 3' du gène constant $C\alpha$ et nommés, de 5' vers 3', $hs3a$, $hs1,2$, $hs3b$ et $hs4$ [1]. Le séquençage de cette région correspondant à la région 3'RR, a permis de mettre en évidence des caractéristiques structurales étonnantes. Une première particularité

Phases précoces du développement B :
Création d'un répertoire d'Ig fonctionnelles

Phases tardives du développement B

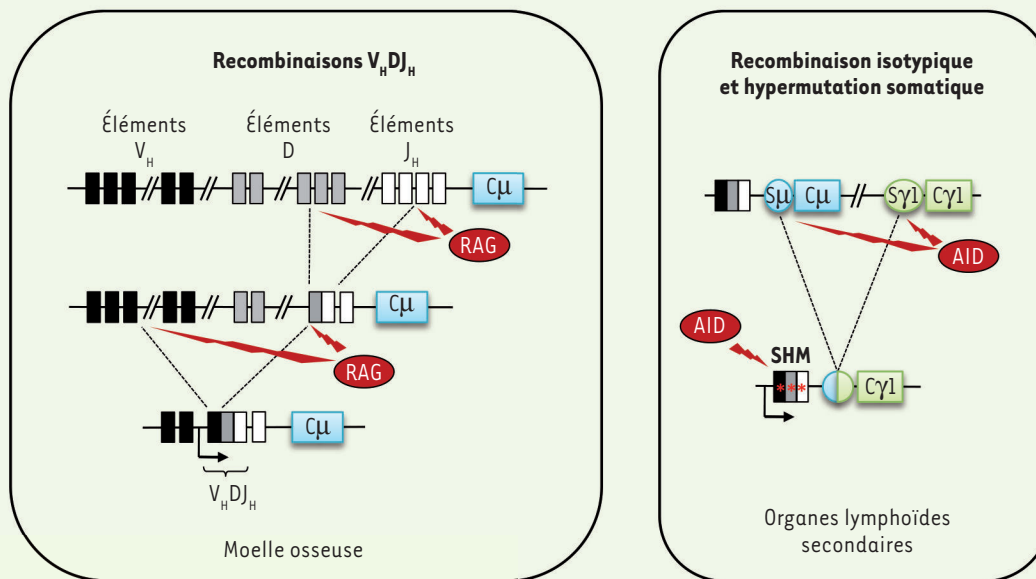


Figure 1. Représentation schématique des événements de recombinaison au locus IgH lors de la lymphopoïèse B. Lors des phases précoces qui précèdent la rencontre avec l'antigène, les réarrangements $V_H D J_H$ permettent, avec les réarrangements des chaînes légères, l'expression d'une immunoglobuline (Ig) fonctionnelle. Les cassures chromosomiques créées pour ces réarrangements reposent sur l'activité de l'enzyme RAG (*recombination-activating gene*). Au cours des phases tardives du développement B, qui s'effectuent en présence de l'antigène, les phénomènes d'hypermutations somatiques et de recombinaison isotypique visent à optimiser l'affinité du récepteur pour l'antigène et à modifier l'isotype d'Ig exprimée. Ces processus nécessitent l'intervention de l'enzyme AID (*activation-induced cytidine deaminase*). SHM : *somatic hypermutation*.

provient de son architecture palindromique qui couvre les trois premiers activateurs transcriptionnels, soit environ 25 kb (Figure 3) [4]. En effet, hs1,2 est flanqué de deux séquences répétées inversées (IR, pour *inverted repeat*), dont certaines sont en tandem (TR, pour *tandem repeat*) ; hs3a et hs3b forment les limites de ces séquences répétées inversées. Leurs séquences présentent 97 % d'homologie et ils sont disposés en orientation inverse, prolongeant ainsi le palindrome. L'élément hs4, quant à lui, se situe en dehors du palindrome et constitue la limite 3' de la région 3'RR. La 3'RR serait divisée en deux unités distinctes : le palindrome et ses trois activateurs, hs1,2, hs3a et hs3b, d'une part, et hs4, d'autre part [5, 6]. Une étude plus fine, réalisée au laboratoire, a récemment révélé que les éléments transcriptionnels de la 3'RR étaient, d'autre part, flanqués de séquences répétitives similaires aux régions S (switch) qui sont essentielles à la recombinaison de classe [7, 8] (→).

(→) Voir la Dernière heure de S. Péron et al., m/s n° 5, mai 2012, page 551

De façon surprenante, ces séquences, baptisées séquences LS (pour *like-switch*) sont la cible de l'enzyme AID (*activation-induced cytidine deaminase*), ce qui permet une recombinaison similaire à la recombinaison de classe entre la séquence S μ et la région 3'RR. Cette recombinaison, nommée LSR (pour *locus suicide recombination*), aboutit à la délétion de l'ensemble des gènes constants (C), ce qui conduit à

l'apoptose des lymphocytes B matures qui ne peuvent survivre sans exprimer de BCR (*B cell receptor*) [7, 8]. Ce processus permettrait l'élimination des clones auto-réactifs.

Chez l'homme, on retrouve également une région régulatrice en 3' qui possède certaines particularités propres à la structure du locus IgH humain. En effet, les gènes constants y sont dupliqués et forment deux blocs distincts séparés d'environ 30 kb. Chaque bloc possède sa propre région 3'RR, localisée en aval des gènes C α 1 et C α 2. Chaque 3'RR ne contient que trois activateurs (hs1,2, hs3 et hs4) mais, comme chez la souris, présente une structure palindromique, hs1,2 étant flanqué de séquences répétées inversées [1, 9]. De manière intéressante, les homologies de séquences sont limitées entre espèces, tant pour les activateurs que pour les séquences IR, mais la structure palindromique de la région 3'RR est conservée chez tous les mammifères [10]. La conservation d'une telle structure malgré le polymorphisme dans les séquences, suggère donc une pression de sélection importante et un rôle fonctionnel de cette architecture palindromique.

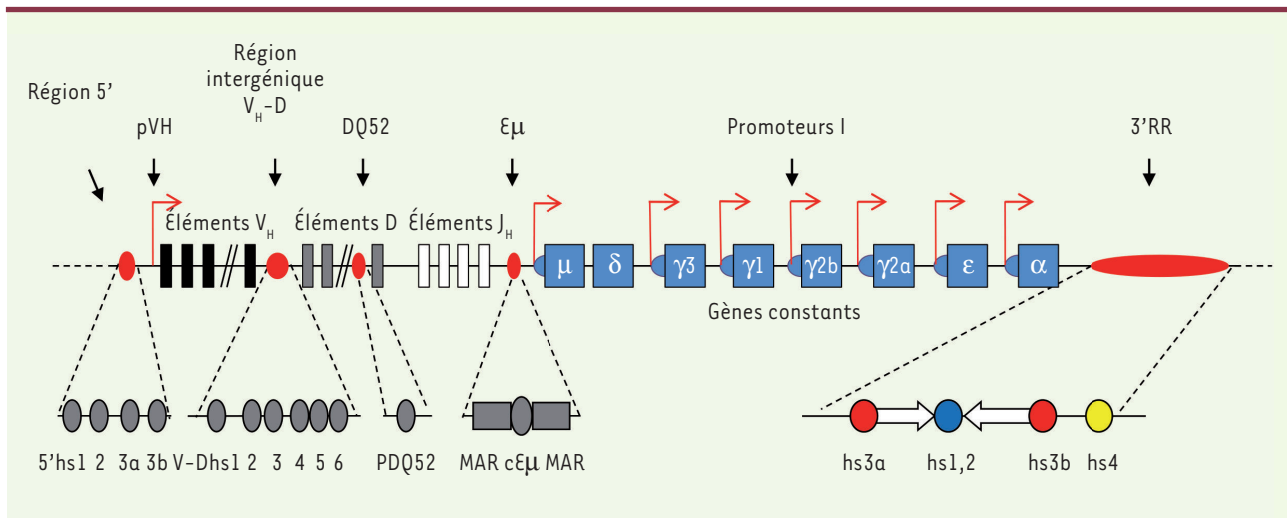


Figure 2. Représentation schématique du locus IgH et de ses éléments cis-régulateurs chez la souris. La ligne supérieure représente le locus IgH murin en conformation germinale. Les éléments régulateurs sont représentés en rouge et sont détaillés sur la ligne inférieure. Les sites hs (pour hypersensibilité à la DNaseI) sont représentés par des cercles et des ovals, les MAR (*matrix attachment regions*) par des rectangles, et les séquences répétées inversées par des flèches blanches. hs3a et hs3b (cercles rouges de la ligne inférieure) possèdent 97 % d'homologies mais sont en orientation inversée. hs1,2 (cercle bleu) est l'élément central du palindrome constituant la région 3'RR. hs4 (cercle jaune) est situé en dehors du palindrome. Seuls $\epsilon\mu$ et la 3'RR présentent une activité pro-transcriptionnelle importante. pVH : promoteur des régions variables.

La région 3'RR semble être l'élément régulateur apparu le plus récemment lors de l'évolution du locus IgH. Elle serait issue de la duplication de la région contenant les exons $C\mu$ qui, ensuite, se serait elle-même dupliquée, formant ainsi la structure palindromique. Son apparition semble corrélée à celle de la recombinaison de classe chez les tétrapodes. Il est donc possible que son évolution, et les duplications successives, aient été facilitées par une pression de sélection imposant la mise en place d'une région régulatrice assurant le contrôle de ce mécanisme complexe [11].

Diverses publications ont rapporté le rôle de la région 3'RR dans son ensemble, mais aussi celui de chaque élément transcriptionnel, ainsi qu'une éventuelle synergie ou redondance entre ces éléments [1]. Schématiquement (Figure 3), la 3'RR n'est pas impliquée dans les phases précoces de la lymphopoïèse B (contraction du locus IgH, recombinaison DJ_H et V_HDJ_H) [12, 13]. Sa structure palindromique est, par contre, essentielle au processus d'hypermutation somatique [14-16]. Ce sont ses activateurs transcriptionnels qui contrôlent son effet sur la recombinaison de classe [16-18] et la transcription des gènes constants du locus IgH [19]. La synergie entre les quatre éléments transcriptionnels est notable pour ces deux activités non seulement *in vitro* mais aussi *in vivo*. Enfin, au stade de B mature, la 3'RR prend l'activateur transcriptionnel $\epsilon\mu$ sous sa domination transcriptionnelle, faisant de cette région, l'élément clef unique contrôlant tous les processus de transcription (sens, anti-sens, codant et non codant) au locus IgH [20].

L'origine des lymphoproliférations B

Le développement et la prolifération des lymphocytes B sont des phénomènes étroitement contrôlés. Un déséquilibre de la balance entre

apoptose et prolifération de ces cellules sera à l'origine de l'apparition de leucémies ou de lymphomes. Une cellule B ayant subi une transformation maligne conserve certains traits phénotypiques de sa cellule d'origine, ce qui permet d'identifier le précurseur à l'origine du lymphome et ainsi de le classer. Les lymphomes B représentent ainsi un groupe hétérogène comprenant plus de 40 sous-types, dont la majorité dérivent de cellules B matures [21]. La transformation d'une cellule fait intervenir plusieurs événements oncogéniques qui modifient des fonctions en lien avec la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore l'interaction avec l'environnement. Dans le cas des lymphomes, il s'agit, d'une part, de lésions génétiques majoritairement aléatoires et, d'autre part, de translocations pouvant apparaître au gré des recombinaisons qui ponctuent l'ontogénie B [22, 23] (→).

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

Le développement des techniques de séquençage et de biologie moléculaire a permis de caractériser des translocations contribuant au développement de différentes tumeurs et s'avérant récurrentes. Plus récemment, les techniques de séquençage haut débit et de TC-seq (*translocation capture-sequencing*) ont permis une étude plus exhaustive des translocations et des mutations à l'origine de nombreux cancers, dont les lymphomes [22]. Ainsi, différents types de translocations sont retrouvés lors des lymphoproliférations B (Figure 4) et les plus fréquents conduisent à l'insertion

	Recombinaisons VDJ	Hypermutations somatiques	Recombinaison de classe	Synthèse d'immunoglobulines	Réf	
Souris sauvage						
Souris Δ hs3a		?	?	Non touchée	[1]	
Souris Δ hs1,2		?	?	Non touchée	[1]	
Souris Δ hs3b		?	?	Non touchée	[1]	
Souris Δ hs4		?	?	Non touchée	[1]	
Souris Δ hs3b/hs4		?	Non touchées	↓↓↓ (sauf IgG1)	[1]	
Souris Δ left-PAL		?	↓↓↓	↓↓ (sauf IgA)	[15]	
Souris Δ RIS		?	↓↓	↓ (sauf IgA et IgG2b)	[15]	
Souris 3'RR-minilocus		?	↓↓↓↓	↓	↓↓	[16]
Souris Δ PAL		?	↓↓↓↓	↓↓↓ (sauf IgA et IgG2b)	↓↓↓	[6]
Souris Δ 3'RR		Non touchée	↓↓↓↓	↓↓↓↓	↓↓↓↓	[12-14, 17-19]

Figure 3. Modèles murins de délétion de la région 3'RR. Différents modèles murins de délétions de la région 3'RR ont été générés et analysés. La délétion d'un seul activateur transcriptionnel n'a que peu ou pas d'effet, confirmant la redondance et la synergie d'activité entre les différents éléments de la 3'RR. La délétion de plusieurs activateurs perturbe fortement la recombinaison de classe, l'hypermutation somatique et la synthèse d'Ig. La suppression du palindrome a un effet notable sur l'hypermutation somatique. Cercles rouges : hs3a et hs3b ; cercles bleus : hs1,2 ; cercle jaune hs4 ; flèches blanches : régions répétées inversées du palindrome de la 3'RR. Le point d'interrogation (?) indique un paramètre non étudié. Le nombre de flèches vers le bas indique l'intensité de la baisse sur le paramètre étudié.

au locus IgH de séquences codantes intactes de proto-oncogènes. Les exemples les plus connus sont la translocation du gène codant c-myc, associée au lymphome de Burkitt, de celui codant la cycline D1, dans le lymphome du manteau³, et celui codant Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), dans le lymphome folliculaire. Ces translocations sont généralement l'un des événements les plus précoces de la transformation maligne. Elles ne sont toutefois pas suffisantes pour conduire à un cancer. Plusieurs événements géniques (ou « hit ») seront nécessaires pour aboutir à une cancérisation complète de la cellule. Ces mutations qui

permettent de contourner différents points de contrôle en affectant le cycle cellulaire, la résistance à l'apoptose, la signalisation intracellulaire, la reconnaissance par le système immunitaire, etc. [24], ne sont pas spécifiques des lymphoproliférations et sont retrouvées dans de nombreux types de cancers. C'est le cas, par exemple, de celles touchant le gène *TP53*, qui code la protéine suppresseur de tumeur p53, qui sont retrouvées dans près de la moitié des tumeurs chez l'homme. Ce facteur de transcription, parfois appelé « gardien du génome », contrôle l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose en réponse à un stress (lésion de l'ADN, défaut de

³ Le lymphome à cellules du manteau est une forme rare de lymphome malin non-hodgkinien qui affecte les lymphocytes B situés dans la zone du manteau, une région située sur le bord externe du ganglion lymphatique.

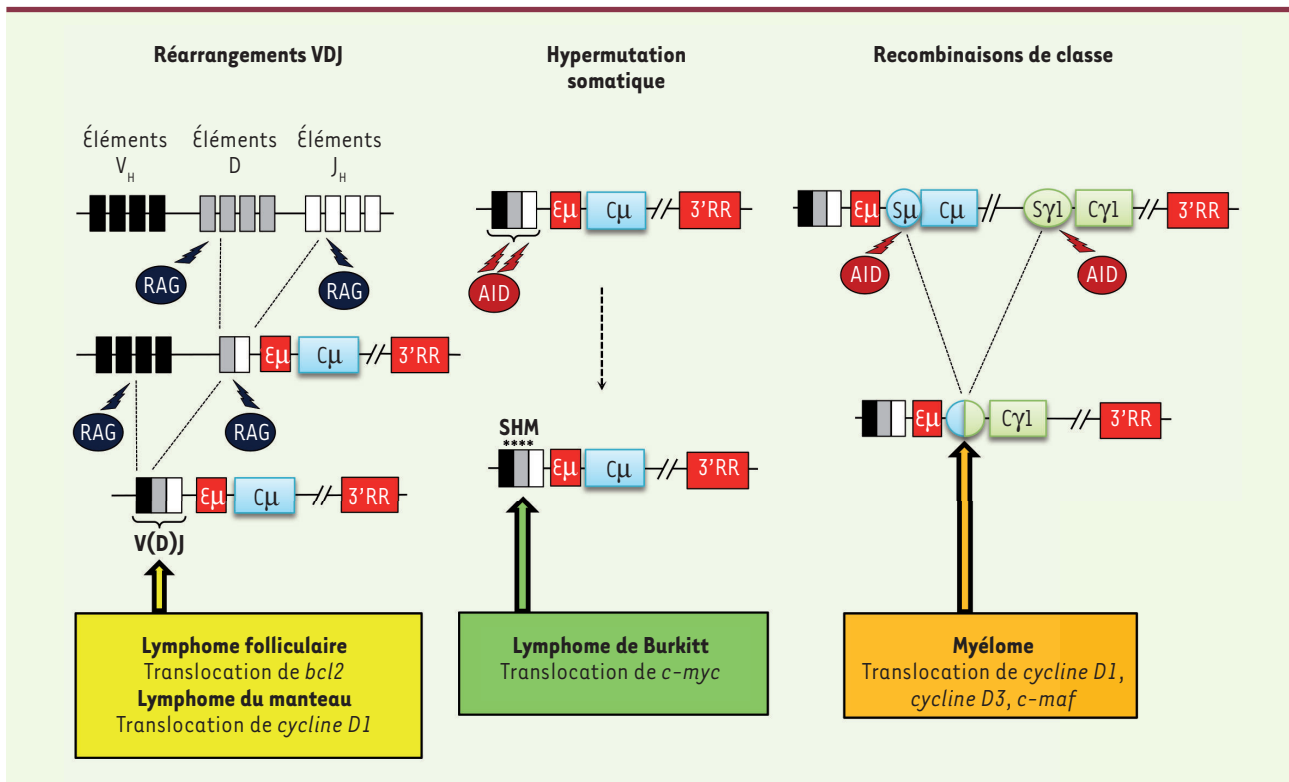


Figure 4. Translocations récurrentes au sein du locus IgH liées aux mécanismes de diversification des immunoglobulines. Les différents remaniements géniques qui ont lieu sur le locus IgH au cours du développement B en font un « point chaud » de translocation. Selon le mécanisme et les enzymes impliqués (RAG ou AID), la translocation peut avoir lieu dans les régions variables (flèche jaune et flèche verte) ou constantes (flèche orange) et impliquer différents proto-oncogènes. RAG : *recombination-activating gene* ; AID : *activation-induced cytidine deaminase* ; SHM : *somatic hypermutation*.

réplication, etc.). Sa mutation est susceptible de créer un environnement permissif au développement de tumeurs.

La majorité des lymphomes humains semblent issus de la transformation de cellules du centre germinatif (CG)⁴ ou post-CG. Cette observation peut sembler surprenante puisque les lymphocytes B ne résident que peu de temps dans cette zone du ganglion lymphatique, et que les lymphocytes B naïfs représentent plus de la moitié de l'ensemble des cellules B. Cela s'explique cependant par la prolifération intense des cellules du CG et par le déroulement de l'hypermutation somatique et de la recombinaison de classe, qui majorent considérablement le risque de mutations oncogéniques. La notion de cellule d'origine du lymphome doit cependant être nuancée. La cancérisation d'une cellule s'effectue en plusieurs étapes, pouvant affecter différents stades de développement de la cellule. Il est ainsi difficile de déterminer les stades de maturation auxquels les différentes altérations ont été acquises et l'impact qu'elles ont pu avoir sur le développement du lymphocyte B avant sa transformation maligne. Par exemple, dans les lymphomes folliculaires,

le premier événement oncogénique consiste en une translocation plaçant le proto-oncogène *BCL2* au sein du locus IgH. Cette translocation a généralement lieu lors du stade pro-B, mais elle n'entraînera le développement d'un lymphome que lors des stades tardifs du développement, durant lesquels l'expression de *BCL2* est normalement réprimée [25]. C'est pour ces raisons que le terme « contrepartie normale » d'une cellule cancéreuse est souvent préféré à « cellule d'origine ».

Les altérations oncogéniques au cours des lymphomes

La plupart des lymphomes B se caractérisent par l'existence d'une translocation déplaçant un proto-oncogène au sein des locus d'immunoglobulines (Ig). Il sera alors transcrit de façon constitutive, sous le contrôle des éléments régulateurs propres à ces locus. La fréquence élevée de ces altérations géniques s'explique par l'induction de cassures doubles brins intervenant au cours des réarrangements qui ponctuent la

⁴ Le centre germinatif est une structure se formant dans le ganglion et conduisant à la maturation, la prolifération et la sélection des lymphocytes B. Ils sont organisés en deux zones : claire, où a lieu le processus de sélection, et sombre où les lymphocytes B prolifèrent.

lymphopoïèse et qui font des locus d'Ig des points chauds de translocations. Lors de certaines translocations, le point de cassure au sein du locus IgH peut être adjacent aux segments D ou J. La translocation résulte dans ce cas d'une erreur qui survient lors des réarrangements V(D)J. C'est le cas notamment des translocations *BCL2*-IgH ou *CCND1* (le gène codant la cycline D1)-IgH [24]. Ces translocations nécessitent l'induction de deux cassures doubles brins (l'une dans le locus d'Ig, l'autre, à proximité du proto-oncogène). La cassure au locus IgH fait intervenir, dans la quasi-totalité des cas, l'enzyme RAG (*recombination-activating gene*) chargée d'induire les cassures doubles brins lors des recombinaisons V(D)J. La cassure à proximité du proto-oncogène peut, elle aussi, être induite par RAG (action hors cible), la translocation est alors due à un réarrangement VDJ illégitime. Cette cassure peut également être indépendante de RAG, l'extrémité du proto-oncogène allant alors envahir le complexe synaptique⁵ formé lors d'une recombinaison V(D)J légitime.

Pour certaines translocations, les points de cassures se situent au sein, ou à proximité, de l'exon VDJ réarrangé. C'est, par exemple, le cas de la translocation *c-MYC*-IgH associée au lymphome de Burkitt endémique. Ce type de translocation implique l'enzyme AID et est caractéristique d'une erreur de réparation lors de l'hypermutation somatique. En effet, bien qu'elles ne soient pas nécessaires, des cassures doubles brins sont souvent induites au cours de l'hypermutation somatique, ce qui favorise l'apparition de translocations. Certaines translocations ciblent les régions S qui précèdent les exons codant les domaines constants. Elles proviennent de réparations illégitimes lors de la recombinaison de classe. C'est le cas par exemple des translocations *c-MYC*-IgH ou *c-MAF*-IgH, cette dernière étant associée aux myélomes multiples [22, 23, 25]. Une translocation requiert l'induction simultanée de deux cassures double brins. Si celles au locus IgH sont dues à l'action physiologique d'AID, celles à proximité du proto-oncogène peuvent provenir d'une activité hors cible de l'enzyme. En effet, malgré une régulation très stricte, AID peut agir sur certaines régions du génome de façon non spécifique. L'organisation spatiale nucléaire semble également jouer un rôle important, les translocations étant plus fréquentes entre des gènes localisés en *cis* ou des gènes situés à proximité, au sein du noyau [26, 27]. Dans le cas des lymphomes B, une proximité chromosomique importante a été décrite entre le gène *CCND1* ou *c-Myc* et le locus IgH. Ce rapprochement des gènes varie au cours des différentes étapes de la maturation lymphocytaire B. Ainsi, dans les lymphocytes B naïfs, *CCND1* est proche du locus IgH. Lors des étapes de maturation que sont l'hypermutation somatique et la recombinaison isotypique, c'est *c-Myc* qui est proche du locus IgH [28, 29]. La localisation nucléaire du chromosome transloqué est également modifiée. En effet, dans les cellules de lymphomes de Burkitt et du manteau, le locus *c-Myc*-IgH et *CCND1*-IgH sont relocalisés de la périphérie nucléaire (zone de faible transcription) vers la région centrale péri-nucléaire (zone de forte transcription) [30] où plusieurs protéines (dont LRI [*LPS-res-*

ponsive factor] composant de la nucléoline) peuvent influencer l'activation des proto-oncogènes qui ont été transloqués [30, 31].

La 3'RR et la lymphomagénèse

La translocation d'un proto-oncogène au locus IgH entraîne sa surexpression. Son contrôle transcriptionnel apparaît donc sous la dépendance des éléments régulateurs du locus IgH qui l'accueille. L'activateur intronique $\epsilon\mu$ a été initialement soupçonné d'être l'acteur critique de cette induction d'expression des proto-oncogènes. Cependant, des souris transgéniques exprimant un transgène $\epsilon\mu$ -*c-Myc* ne développent que des tumeurs de phénotypes immatures, différentes des lymphomes de Burkitt matures, retrouvés chez l'homme, ayant pour origine une translocation de *c-Myc* dans le locus IgH [32]. Ces résultats et le fait qu' $\epsilon\mu$ puisse être éliminé lors des translocations *c-Myc*-IgH associées à des lymphomes de Burkitt sporadiques, ont conduit à suggérer que la région 3'RR puisse être responsable de la modulation d'expression du proto-oncogène transloqué.

Cette implication de la 3'RR a en effet été validée dans des modèles murins : la transfection d'un transgène constitué d'une cassette *c-Myc*-3'RR [33], l'insertion d'une cassette 3'RR en 5' du *c-Myc* endogène [34], ou l'insertion de *c-Myc* en divers points du locus IgH (en amont de $\epsilon\mu$ ou de $C\mu$, ou dans $C\alpha$) [35-37], induisent l'apparition de lymphomes B similaires aux lymphomes de Burkitt humains et aux plasmocytomes. Le modèle de souris transfectées avec la cassette *c-Myc*-3'RR a révélé l'influence sur la lymphomagénèse, de mutations additionnelles (touchant *TP53* ou *CDK4* [*cyclin-dependent kinase-4*]) [38] et de l'isotype du BCR que les cellules expriment [39]. La confirmation définitive du rôle de la région 3'RR dans l'apparition des lymphomes a été apportée, chez la souris, par des expériences de délétions touchant les activateurs *hs3b* et *hs4* qui favorisent leur développement : la 3'RR est en effet indispensable au développement de lymphomes matures mais pas de lymphomes pro-B [40]. Des études *in vitro* ont également prouvé que la 3'RR était responsable de la dérégulation de l'expression de *BCL2* dans des lymphomes associés à une translocation *BCL2*-IgH [41]. Des expériences de capture de la conformation des chromosomes (3C)⁶ [46] (→) ont de plus permis de montrer la proximité

(→) Voir la Synthèse de David Umlauf, *m/s* n° 3, mars 2015, page 304

⁵ Complexe synaptique (ou complexe de jonction) : par analogie très lointaine aux neurones, ce terme (assez impropre) représente la zone de contact comprenant toute la machinerie cellulaire (protéines, enzymes, co-facteurs, ARN régulateurs, ADN cis-régulateurs, etc.) nécessaire à la réparation des deux parties du chromosome devant se rebotter.

⁶ La technique 3C (*chromosome conformation capture*) permet de détecter la proximité spatiale de deux fragments de chromatine. Ces deux fragments peuvent être à des distances plus ou moins grandes sur le même chromosome, ou appartenir à des chromosomes différents.

spatiale (*via* des boucles d'activation de plusieurs méga-bases) entre les éléments activateurs de la 3'RR et le promoteur du *BCL2* transloqué. L'ensemble de ces études a donc confirmé l'importance de la région 3'RR dans la lymphomagenèse B. Il montre également la pertinence des modèles murins pour l'étude de leur développement.

Faisant suite à une translocation oncogénique au locus IgH, le « super-enhancer » 3'RR peut donc prendre sous sa dépendance transcriptionnelle, l'oncogène transloqué. Afin de remédier à la dérégulation de son expression ainsi générée, seul le ciblage pharmacologique de l'oncogène avait, jusqu'à présent, été envisagé [42, 43] (→).

Cibler spécifiquement dans la cellule B, l'activité transcriptionnelle de la 3'RR (qui repose sur ses activateurs), pourrait se révéler une stratégie thérapeutique prometteuse dans le cas des lymphomes B matures. L'activation de la 3'RR est sous le contrôle d'une histone déacétylase (HDAC) qui se lie spécifiquement sur l'activateur *hs1,2*. Les inhibiteurs d'HDAC (HDACi) régulent négativement l'activité de la 3'RR [32]. Ils apparaissent ainsi être une piste potentiellement intéressante en thérapeutique. Certaines de ces molécules capables, en théorie, de réprimer l'expression du locus IgH en agissant sur la 3'RR, sont actuellement en phase d'essai clinique pour le traitement de différents types de tumeurs (myélome, lymphomes du manteau, folliculaires ou diffus à grandes cellules). Elles présentent une cytotoxicité importante pour les cellules cancéreuses [44, 45].

Ces inhibiteurs sont-ils spécifiques de la région 3'RR ? Vraisemblablement pas ! Le seront-ils dans l'avenir ? Possiblement, mais pas dans un futur proche : les études sur l'inhibition des fonctions transcriptionnelles de la 3'RR n'en sont qu'à leurs balbutiements ! La réduction drastique du niveau d'expression des Ig en réponse aux HDACi *via* leur action sur la 3'RR laisse penser que ces molécules induiraient une baisse importante de la transcription du proto-oncogène transloqué au locus IgH.

Conclusion

Les progrès à venir dans le traitement des lymphomes B reposeront, en grande partie, sur une meilleure connaissance de leur mode de développement. Ils pourront notamment résulter des études permettant d'élucider les mécanismes qui participent à la régulation du locus IgH, celui-ci paraissant être directement impliqué dans l'amplification de l'expression des proto-oncogènes transloqués. Les études récentes d'épigénétique et de transcriptomique ont révélé l'étendue du rôle de la région 3'RR dans les étapes clés de la maturation lymphocytaire B. Elle contrôle non seulement la transcription du locus IgH, mais aussi le remodelage chromatinien avec cassures multiples de l'ADN et l'élimination programmée de centaines de kilobases de matériel génétique. Si l'importance de cette fonction de la 3'RR dans la génération des lymphocytes B matures a été progressivement comprise au cours de ces dernières années, sa contrepartie délétère, lors de la lymphomagenèse B, apparaît de plus en plus évidente. Le rôle central de la 3'RR sur la transcription du locus IgH ne peut en effet qu'avoir des conséquences sur la transcription du proto-oncogène transloqué. Le rationnel de l'utilisation

de drogues épigénétiques pour le traitement de certains lymphomes B matures n'était jusqu'ici que peu documenté. Leur effet négatif sur l'activation transcriptionnelle de la 3'RR dans le lymphocyte B pathologique avec, pour corolaire, la diminution de l'hypertranscription oncogénique, pourrait permettre d'expliquer les activités de ces drogues dans le traitement des lymphomes. ♦

SUMMARY

The IgH 3'RR: Doctor Jekyll and Mister Hyde of B-cell maturation and lymphomagenesis

The four transcriptional enhancers located in the 3' regulatory region (3'RR) of the IgH locus control the late phases of B-cell maturation, namely IgH locus transcription, somatic hypermutation and class switch recombination. Doctor Jekyll by nature, the 3'RR acts as Mister Hyde in case of oncogenic translocation at the IgH locus taking under its transcriptional control the translocated oncogene. The aim of this review is to show this duality on the basis of the latest scientific advances in the structure and function of the 3'RR and to highlight the targeting of the 3'RR as a potential therapeutic approach in mature B-cell lymphomas. ♦

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par l'ANR (projet EpiSwitch-3'RR 2016) et le Comité d'Organisation de la Recherche en Cancérologie du Limousin (CORC) (FJA/NP-2015-109). Nour Ghazoui est financée par l'Association de spécialisation et d'orientation scientifique et la municipalité de Khiam (Liban).

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

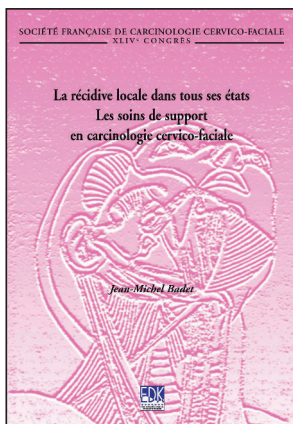
1. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, et al. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol* 2011 ; 110 : 27-70.
2. Perlot, T, Alt, FW, Bassing, CH, et al. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 42 : 14362-7.
3. Marquet M, Garot A, Bender S, 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* 2014 ; 193 : 1171-83.
4. Chauveau C, Cogné M. Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat Genet* 1996 ; 14 : 15-6.
5. Birshstein BK. Epigenetic regulation of individual modules of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region. *Front Immunol* 2014 ; 5 : 163.
6. Garot A, Marquet M, Saintamand A, et al. Sequential activation and distinct functions for distal and proximal modules within the IgH 3'RR region. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016 ; 113 : 1618-23.
7. Péron S, Laffleur B, Denis-Lagache N, et al. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 2012 ; 336 : 931-4.
8. Péron S, Laffleur B, Denis-Lagache N, et al. Recombinations suicides du locus IgH : quand le lymphocyte B dépose les armes ! *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 551-4.
9. Chen C, Birshstein BK. Virtually identical enhancers containing a segment of homology to murine 3'IgH-E(hs1,2) lie downstream of human Ig C alpha 1 and C alpha 2 genes. *J Immunol* 1997 ; 159 : 1310-8.

RÉFÉRENCES

10. D'addabbo P, Scascitelli M, Giambra V, *et al.* Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1,2 within the palindrome of IgH 3' regulatory region. *BMC Evol Biol* 2011 ; 11 : 71.
11. Magor BG, Ross DA, Pilstrom L, *et al.* Transcriptional enhancers and the evolution of the IgH locus. *Immunol Today* 1999 ; 20 : 13-7.
12. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Fiancette R, *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* 2012 ; 287 : 8356-60.
13. Medvedovic J, Ebert A, Tagoh H, *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 : 229-44.
14. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, *et al.* The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J Exp Med* 2013 ; 210 : 1501-7.
15. Saintamand A, Vincent-Fabert C, Garot A, *et al.* Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 10730.
16. Le Noir S, Boyer F, Lecardeur S, *et al.* Functional anatomy of the immunoglobulin heavy chain 3' super-enhancer needs not only core enhancer elements but also their unique DNA context. *Nucleic Acids Res* 2017 ; 45 : 5829-37.
17. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, *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* 2010 ; 116 : 1895-9.
18. Saintamand A, Rouaud P, Saad F, *et al.* Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 7084.
19. Saintamand A, Rouaud P, Garot A, *et al.* The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget* 2015 ; 6 : 4845-52.
20. Saintamand A, Vincent-Fabert C, Marquet M, *et al.* μ and 3'RR IgH enhancers show hierarchic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 442.
21. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. The genetic landscape of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Hematol* 2015 ; 52 : 67-76.
22. Robbiani DF, Nussenzweig MC. Chromosome translocation, B cell lymphoma, and activation-induced cytidine deaminase. *Ann Rev Pathol* 2013 ; 8 : 79-103.
23. Gisselbrecht S. Oncogènes et leucémies : historique et perspectives. *Med Sci (Paris)* 2003 ; 19 : 201-10.
24. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 ; 144 : 646-74.
25. Seifert M, Scholtysik R, Küppers R. Origin and pathogenesis of B cell lymphomas. *Methods Mol Biol* 2013 ; 971 : 1-25.
26. Zhang Y, McCord RP, Ho YJ, *et al.* Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations. *Cell* 2012 ; 148 : 908-21.
27. Nikiforova MN, Stringer JR, Blough R, *et al.* Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science* 2000 ; 290 : 138-41.
28. Roix JJ, McQueen PG, Munson PJ, *et al.* Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet* 2003 ; 34 : 287-91.
29. Sklyar I, Iarovaia OV, Gavrilov AA, *et al.* Distinct patterns of colocalization of the CCND1 and CMYC genes with their potential translocation partner IGH at successive stages of B-cell differentiation. *J Cell Biochem* 2016 ; 117 : 1506-10.
30. Allinne J, Pichugin A, Iarovaia O, *et al.* Perinucleolar relocalization and nucleolin as crucial events in the transcriptional activation of key genes in mantle cell lymphoma. *Blood* 2014 ; 123 : 2044-53.
31. Brys A, Maizels N. LR1 regulates c-myc transcription in B cell lymphomas. *Pro Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 4915-9.
32. Ghazoui N, Saintamand A, Issaoui A, *et al.* The IgH 3' regulatory region and c-myc induced B-cell lymphomagenesis. *Oncotarget* 2017 ; 8 : 7059-67.
33. Truffinet V, Pinaud E, Cogné N, *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* 2007 ; 179 : 6033-42.
34. 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 : 12766-73.
35. Park SS, Kim JS, Tessarollo L, *et al.* Insertion of c-Myc into IgH induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 1306-15.
36. Rosean TR, Holman CJ, Tompkins VS, *et al.* KSHV-encoded vIL6 collaborates with deregulated c-MYC to drive plasmablastic neoplasm in mice. *Blood Cancer J* 2016 ; 6 : e398.
37. Cheung WC, Kim JS, Linden M, *et al.* Novel targeted deregulation of c-myc cooperates with Bcl-XL to cause plasma cell neoplasms in mice. *J Clin Invest* 2004 ; 113 : 1763-73.
38. Rouaud P, Fiancette R, Vincent-Fabert C, *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* 2012 ; 3 : 586-93.
39. Amin R, Marfak A, Pangault C, *et al.* The class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a c-myc deregulation transgenic model. *Oncotarget* 2014 ; 15 : 8995-9006.
40. Gostissa M, Yan CT, Bianco JM, *et al.* Long-range oncogenic activation of IgH-c-myc translocations by the IgH 3' regulatory region. *Nature* 2009 ; 462 : 803-7.
41. Duan H, Heckman CA, Boxer LM. The immunoglobulin heavy-chain gene γ' enhancers deregulate bcl-2 promoter usage in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene* 2007 ; 26 : 2635-41.
42. Pyndiah S, Sakamuro D. Un trio de choc pour pallier la chimiorésistance des cancers : c-MYC, PARP1, BIN1. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 133-5.
43. Montagne R, Furlan A, Kherrouche Z, *et al.* Le récepteur Met fête ses 30 ans. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 864-73.
44. Richardson PG, Mitsiades CS, Laubach JP, *et al.* Preclinical data and early clinical experience supporting the use of histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma. *Leuk Res* 2013 ; 37 : 829-37.
45. Morschhauser F, Terriou L, Coiffier B, *et al.* Phase 1 study of the oral histone deacetylase inhibitor abexinostat in patients with Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma, or chronic lymphocytic leukaemia. *Invest New Drugs* 2015 ; 33 : 423-31.
46. Umlauf D. Le génome intime... et en trois dimensions. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 304-11.

TIRÉS À PART
Y. Denizot

Bon de commande



ISBN : 978-2-8425-4174-3 274 pages

À retourner à EDP Sciences, 109, avenue Aristide Briand - 92541 Montrouge Cedex
Tél. : 01 49 85 60 69 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **La récurrence locale dans tous ses états - Les soins de support en carcinologie cervico-faciale** : 35 € + 3 € de port = **38 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDP Sciences

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |

c. Les super-enhancers

Ces régions sont supposées contrôler l'expression d'un important nombre de gènes et sont essentielles à l'engagement des cellules souches pluripotentes dans des lignées spécifiques. Alors que plus de 10000 *enhancers* potentiels ont été détectés par type cellulaire (Pott and Lieb, 2015), les auteurs ont suggéré que les *super-enhancers* sont beaucoup moins nombreux. Cinq caractères définissent un *enhancer* : [1] Une hypersensibilité à la DNase I ; [2] la capacité de réguler à distance la transcription d'un gène ; [3] l'existence de sites de fixation pour des facteurs de transcription; [4] la présence de marques épigénétiques ; [5] la capacité à former des boucles facilitant son contact avec les gènes qu'il régule. Un *super-enhancer* est défini non seulement comme étant enrichi en histone acétyl-transférases (p300), en facteurs de transcription, en protéine participant à la formation des boucles de chromatines dites Med1 (faisant partie de complexe du médiateur) et en certaines marques épigénétiques (H3K27ac, H3K4me2, H3K4me1), mais aussi par une longueur de plusieurs kb (contre 700 pb en moyenne pour les *enhancers* « classiques ») (Pott and Lieb, 2015; Whyte et al., 2013). La 3'RR, répondant à tous ces critères, peut être définie comme un « *super-enhancer* ».

d. Régulation de la 3'RR par des facteurs *trans*

Plusieurs facteurs de transcription (activateurs ou répresseurs) agissent en *trans* pour réguler l'action séquentielle des divers *enhancers* de la 3'RR. Comme déjà décrit, ce *super-enhancer* contient énormément de sites de fixation pour des facteurs spécifiques ou non au lignage B (Pinaud et al., 2011).

Trois sites de fixation octamères ont été trouvés dans les séquences de hs3a et hs3b liant ainsi Oct 1 et Oct2 (Matthias and Baltimore, 1993). Elles présentent aussi des sites de fixation pour les protéines de la famille E2A, comme μ E2 et μ E5 (Chauveau and Cogné, 1996; Greenbaum and Zhuang, 2002). Egalement, des sites de fixation des protéines inhibitrices Maf, SMRT, et Bach2, dites MARE (pour MAF Recognition Element) ont été identifiés. Ces protéines sont essentielles aux stades précoces de la lymphopoïèse B pour inhiber toute transcription avant terme de la chaîne lourde d'Ig (Muto et al., 1998).

Pour hs1.2, l'élément le plus étudié, un site octamère est décrit permettant son activation suite à la fixation des protéines Oct-2 et OCA-B au stade plasmocytaire (Tang and Sharp, 1999). Plusieurs sites de fixation de protéines essentielles pour l'engagement en LB, tel que E12 et

E47, ont été identifiés dont les sites μ E2 et μ E5. Cette fixation est régulée, aux stades précoces du développement B ou dans les LB matures au repos, par les protéines inhibitrices Id1, Id2 et Id3. Ceci permet de freiner l'activation de la 3'RR (Kadesch, 1992; Meyer et al., 1995; O'Riordan and Grosschedl, 1999; Sun, 1994). Egalement un site de fixation pour NF κ B a été identifié jouant un rôle de répression (stades précoces) et d'activation (stades tardifs) (Michaelson et al., 1996). Deux sites de fixation pour la protéine Pax5 sont identifiés. Cette dernière interagit avec les facteurs Oct et NF κ B pour la répression d'hs1.2. Au stade plasmocytaire, l'expression de Pax5 est inhibée, ce qui permet l'activation d'hs1.2 et la synthèse de la chaîne lourde du locus IgH (Neurath et al., 1995, 1994; Singh and Birshstein, 1996). La fixation de PU.1 et d'autres facteurs de la famille ETS à ce stade, accentue cette activation (Neurath et al., 1995).

L'*enhancer* hs4 possède des sites de fixation similaires aux autres *enhancers*, bien qu'il soit activé dès les stades précoces de l'ontogenèse B suggérant une régulation différente. Le site NF κ B est actif tout au long de l'ontogenèse B. C'est Oct1 qui active hs4 du stade pré-B jusqu'au stade B mature. Cependant c'est Oct2 en interaction avec OCA-B qui l'active au stade B mature. Pax5 est inhibiteur aux stades précoces et activateur aux stades matures (Michaelson et al., 1996; Tang and Sharp, 1999; Wakatsuki, 1994).

Une étude, réalisée par Henseler et coll, a démontré que la 3'RR peut être activée *in vitro* par divers agents chimiques tels que le ligand du récepteur d'hydrocarbure aryle (Henseler et al., 2009). Les HDACs (*Histone Desacetylase*) ont été étroitement liés à l'inhibition de la transcription des gènes (Fischle et al., 2003). Cependant, Lu et coll ont suggéré que HDAC1 stimule l'activité des activateurs du locus IgH et donc sa transcription. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont montré que HDAC1 est recruté sur l'*enhancer* hs1.2 de la 3'RR. Les inhibiteurs d'HDAC (HDACi) régulent ainsi négativement l'action de la 3'RR. Certains de ces inhibiteurs chimiques sont déjà utilisés en thérapeutique (Lu et al., 2005; Waibel et al., 2015). Des analyses de gènes rapporteurs ont montré une diminution significative de l'activité des *enhancers* du locus suite au traitement par des HDACi. Ainsi une expression transitoire de l'HDAC1 augmente surtout l'activité de la 3'RR.

Plusieurs types d'HDACi sont entrés en clinique pour le traitement de certains hémopathies malignes en association avec des chimiothérapies. Cependant, la base rationnelle de cette utilisation n'est pas claire. Les mécanismes d'action des HDACi ne le sont pas également. Une des raisons qui fait de cette thérapie une stratégie favorable est que les cellules saines sont relativement résistantes au traitement, alors que les cellules cancéreuses sont plus

réactives. Ces dernières subissent une inhibition de leur croissance et de leur différenciation et entrent en apoptose.

Plusieurs HDACi ont été testés dans des tumeurs lymphoïdes tel que le SAHA. Ce dernier a été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 2006 pour l'usage clinique chez les patients atteints de lymphome cutané à cellules T (Bolden et al., 2006; Grant et al., 2007). Le SAHA est également testé dans le lymphome de Hodgkin, folliculaire de la zone marginale et du manteau. Il y a montré des résultats prometteurs (Kirschbaum et al., 2011; Ogura et al., 2014). L'acide valproïque, un autre HDACi, est un inhibiteur très puissant et sélectif de STAT3 (Chateauvieux et al., 2010). Une étude préclinique sur les leucémies lymphoïdes chroniques a montré que l'acide valproïque induit la mort cellulaire en déclenchant des voies apoptotiques (Bokelmann and Mahlknecht, 2008). Le traitement des souris atteintes de leucémie PML-RAR induite, avec cette molécule, augmente leur survie tout en induisant l'apoptose des cellules leucémiques (Insinga et al., 2005). Les effets les plus documentés des HDACi sont liés à l'apoptose (expression de gènes pro-apoptotiques et diminution de l'expression de gènes anti-apoptotiques). De nombreuses autres études seront nécessaires pour comprendre l'action de ces molécules afin de profiter de ces puissants médicaments anticancéreux. L'effet épigénétique des HDACi sur l'organisation de la chromatine dans des régions de translocations (comme dans la majorité des lymphomes B) dans les LB est insuffisamment étudié. Ceci est nécessaire pour mieux comprendre leurs mécanismes d'actions.

Chapitre III Recombinaisons secondaires et Translocation oncogénique au locus IgH

1. Recombinaisons secondaires : CSR et SHM

Pour générer des Ac adaptés et de hautes affinités vis-à-vis de l'Ag, deux mécanismes prennent place lors de la maturation tardive des LB du GC : les SHM et le « *switch* ».

La CSR modifie l'isotype M de l'Ig par l'un des autres (G, E ou A). Cette recombinaison consiste à remplacer le gène C μ exprimé par défaut à la surface de l'Ig par un autre situé en aval pour changer sa fonction effectrice, tout en gardant la même spécificité. La SHM consiste en l'induction de mutations dans un segment V(D)J préalablement réarrangé codant pour la partie variable des chaînes légères et lourdes d'Ig afin d'augmenter son affinité à l'Ag. Bien que ces deux événements soient différents, ils nécessitent tous les deux l'implication de l'enzyme **AID** (pour *Activated Induced Deaminase*). Elle est surtout exprimée dans les GC (Muramatsu et al., 1999). Son absence n'a aucun effet sur le développement B, mais empêche la SHM et la CSR (Muramatsu et al., 2000).

AID appartient à la famille des APOBEC (*APOLipoprotein B RNA-Editing catalytic Component*). Elle a été découverte en 1999 par Honjo et coll (Muramatsu et al., 1999). C'est une petite protéine de 26kDa (198 acides aminés) codée par le gène *Aicda*. Cette protéine agit principalement dans le noyau des cellules B activées bien qu'elle soit maintenue dans le cytoplasme, d'où son nom de protéine « navette » (Ito et al., 2004; Patenaude and Di Noia, 2010). La protéine kinase-A (*c-AMP-dependent Protein Kinase A*) régule sa fonction par phosphorylation (Basu et al., 2005). L'activité d'AID doit être régulée d'une façon particulière et limitée aux loci d'Ig des LB activées. AID est exprimée là où la SHM et la CSR ont lieu, c.à.d. dans les LB du GC et dans les régions extrafolliculaires des organes lymphoïdes secondaires (Cattoretti et al., 2006; Muto et al., 2000). Pour limiter son activité, le protéasome la dégrade très rapidement (Aoufouchi et al., 2008).

Bien qu'elle appartient à la famille des APOBEC, AID agit en désaminant l'ADN et non pas l'ARN. La désamination d'une cytosine (C) en uracil (U) sur l'ADN simple brin (Di Noia and Neuberger, 2007), va engendrer un mésappariement dU:dG (Chaudhuri et al., 2003; Chaudhuri and Alt, 2004; Dickerson et al., 2003; Pham et al., 2003). AID possède des *hotspots* ou points chauds précis. Ce sont les motifs WRCY (W =weak=dA/dT, R =purine=dA/dG et Y=pyrimidine=dT/dC) (Hwang et al., 2015). Plusieurs systèmes de réparation prennent en

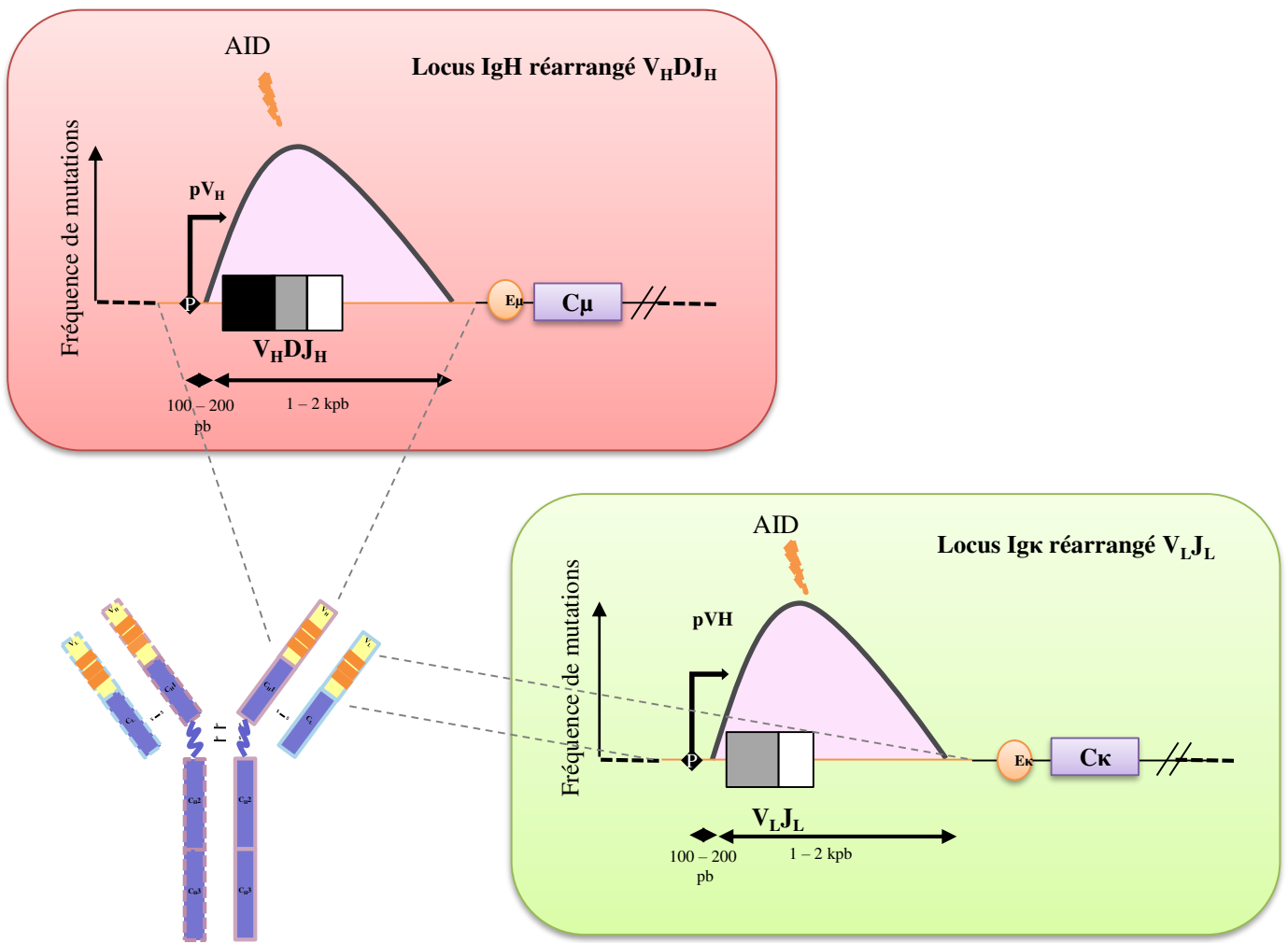


Figure 21– Hypermutation somatique au sein des loci d’Ig.

En rose sont indiqués le profil et la fréquence de mutations au loci IgH et Igκ sur des segments V(D)J déjà recombinés. Les mutations s’accumulent surtout de 100 à 200 pb en aval du site d’initiation et peuvent s’étendre jusqu’à 2kb en aval de ce dernier. Les zones de ciblage d’AID sur l’exon VDJ et VJ au locus IgH et Igk, respectivement, sont représentées par les traits oranges. Les *enhancers* E_μ et E_κ ainsi que les parties constantes C_μ et C_κ sont hors de portée de la région ciblée. L pour Leader; SR pour Switch Region. D’après Peled et al., 2008.

charge le mésappariement ainsi créé. Ceci produit des mutations ponctuelles dans la région variable de l'Ig lors de la SHM ou génère des cassures dans les régions « *switch* » lors de la CSR (Alt et al., 2013; Di Noia and Neuberger, 2007). La différence principale entre ces deux mécanismes est donc la région ciblée par AID et le traitement des mésappariements.

i. Les hypermutations somatiques (SHM)

Après la génération du répertoire antigénique primaire suite aux recombinaisons V(D)J, les Ig subissent des mutations (fréquence de l'ordre de 10 mutations pour 1000 pb) dans des gènes V, pour augmenter leur affinité vis à vis de l'Ag. Ce mécanisme définit les SHM (**Figure 21**) (pour revue : Seki et al., 2005). Ces mutations se trouvent surtout dans les régions hypervariables CDRs (*Complementary Determining Region*). Une interaction CD40:CD40L avec les LT est indispensable. Les mutations proviennent de la réplication après la réparation des résidus U (Rada et al., 1998, p. 199)

Trois différentes voies de réparation peuvent prendre en charge le mésappariement créé (Peled et al., 2008). Soit l'U est ignorée par l'ADN polymérase, soit excisée par la protéine Ung (*Uracil DNA-Glycosylase*), soit elle est reconnue par la machinerie de réparation dite MMR (Mismatch Repair). Ces voies lors de la SHM doivent être infidèles pour générer des mutations à haute fréquence, contrairement aux voies conventionnelles fidèles et nécessaires au maintien de l'intégrité du génome.

Dans le premier cas, une mutation de type transition prend place. L'U est considérée comme une Thymine et l'ADN contenant le mésappariement est simplement répliqué. Dans le deuxième cas c'est une mutation de type transition ou transversion qui peut apparaître au site abasique créé suite à l'excision du U. Ce site est pris en charge par la voie dite BER (pour *Base Excision Repair*), faisant intervenir des polymérases non fidèles qui insèrent une base au hasard pour remplacer le dU (Pérez-Durán et al., 2012; Rada et al., 2002). Enfin, dans le troisième cas, c'est la voie MMR qui intervient générant plusieurs mutations de types transversions ou transitions. L'hétérodimère Msh2/Msh6 (pour *Mus Homologue 2* et 6) détecte le mésappariement et recrute le complexe protéique Mlh1/Pms2 (pour *Mut Homologue 1* et *Post Meiotic Segregation 2*) et élimine le fragment d'ADN encadrant le *mismatch* grâce au recrutement de l'exonucléase I (Exo1). Un nouveau brin est ensuite synthétisé par des polymérases infidèles (Hwang et al., 2015; Rada et al., 1998).

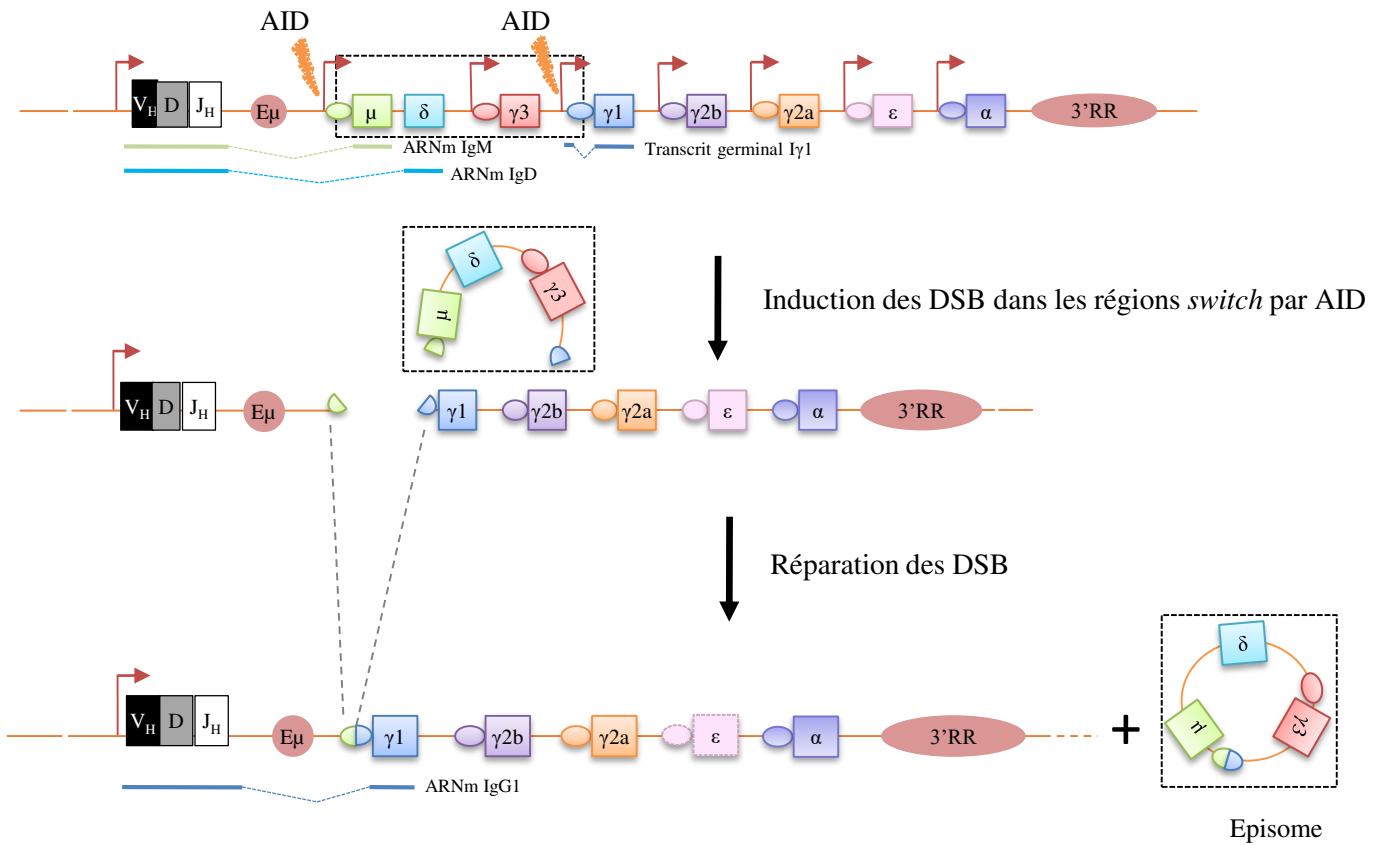


Figure 22 – Représentation schématique de la recombinaison isotypique au stade tardif de la lymphopoïèse B (CSR vers IgG1).

La recombinaison a lieu entre deux régions *switch* (ovale) qui précèdent les gènes constants (carré) dont une donneuse (S_μ) et une acceptrice (ici S_{γ1}) qui sont ciblées par AID. Cette dernière induit des DSB (cassures double brin) dans ces régions, qui seront dans un second temps réparées et ligaturées. La séquence d'ADN intermédiaire sera circularisée et éliminée sous forme d'épisome.

Seules les cellules B avec une affinité plus forte à l'Ag suite aux SHM seront sélectionnées positivement et survivront dans les GC. Par contre, celles dont l'affinité diminuera seront éliminées par apoptose (MacLennan, 1994).

ii. La recombinaison des classes (CSR)

La CSR consiste à changer l'isotype de l'Ig sans toucher sa spécificité à l'Ag. C'est l'environnement cytokinique des LB qui le stimule vers un isotype précis. Deux étapes caractérisent la CSR. La première est l'induction de DSB suite aux mutations introduites par AID dans les régions « *switch* » localisées devant les gènes constants. La deuxième est la réparation de ces cassures en raboutant les deux régions en question entre elles. L'ADN compris entre elles sera circularisé en « épisode » et éliminé (**Figure 22**) (Xu et al., 2012).

Les régions « *switch* » sont caractérisées par des séquences répétées riches en G/C, variantes en longueur de 1kb à 12kb. La transcription germinale de ces régions (une donneuse S_{μ} et une acceptrice dite S_x) est indispensable pour les exposer à l'enzyme AID (Chaudhuri and Alt, 2004). AID induit ainsi des mésappariements dU:dG qui aboutiront à des DSB du fait de la grande densité des cibles d'AID présentes dans les régions « *switch* ». Ces DSB sont ensuite pris en charge par les machineries de surveillance de l'ADN, créant ainsi une synapse entre les deux régions « *switch* », suivie de la réparation des cassures majoritairement par la voie NHEJ (*Non-Homologous End Joining pathway*). Une autre voie de réparation nommée AEJ (pour *Alternative End-Joining Pathway*) existe, utilisant des protéines indépendantes de celles du NHEJ (Boboila et al., 2012; Matthews et al., 2014; Vaidyanathan et al., 2014). Les jonctions générées par cette voie présentent surtout des micro-homologies, alors que celles induites par la voie NHEJ sont principalement directes (Stavnezer and Schrader, 2014; Yan et al., 2007). Cette micro-homologie dépend également de la similarité entre les régions « *switch* » donneuses et acceptrices impliquées (Pan-Hammarström et al., 2005).

La voie de réparation NHEJ est préférentiellement utilisée par rapport à la voie AEJ lors de la CSR. Plusieurs facteurs favorisent ce choix : la position du locus dans le noyau, l'intensité de la transcription, la fréquence de déamination par AID (Aymard et al., 2014; Cortizas et al., 2013; Lemaître et al., 2014) et la plus grande efficacité de NHEJ lors des réarrangements à distance. Pour sa part, la voie AEJ, en raison de la résection des extrémités qu'elle prend en charge favoriserait ainsi le risque de translocations oncogéniques (Boboila et al., 2010, 2012).

L'induction des lésions de l'ADN (cassures et mutations) est donc inhérente aux remaniements géniques que subit le LB tout au long de son développement que ce soit lors des

recombinaisons V(D)J, des SHM et du « switch ». Ces lésions sont ainsi réparées par des voies non conventionnelles plus ou moins fidèles, ce qui rend le locus IgH particulièrement sensible aux translocations virtuellement oncogéniques; l'oncogène pouvant passer sous le contrôle transcriptionnel des éléments *cis*-régulateurs du locus IgH, aboutissant ainsi au déclenchement des lymphomes B.

2. Les altérations oncogéniques au cours de la lymphopoïèse

Malgré le fort contrôle des événements de recombinaisons qui touchent le locus IgH lors de la lymphopoïèse B, l'induction de mutations et de DSB le rend très sensible à des événements de translocations chromosomiques non souhaités.

i. Translocations lors des recombinaisons VDJ

Les translocations observées lors des réarrangements VDJ peuvent être classées en deux catégories selon l'induction des DSB par le complexe Rag ou non. Dans la première catégorie, les DSB induites dans le locus d'Ig et celles à proximité de l'oncogène sont dépendantes de l'enzyme Rag. C'est une activité dite « *off-target* » de Rag. Elle touche deux types de cible. Soit des sites très similaires aux séquences RSS dits « cryptiques » soit des sites dans des segments d'ADN capables de recruter le complexe Rag comme lors des translocations de Bcl2 (*B-Cell Lymphoma 2*) dont la partie dite Bcl2-Mbr (*Bcl2 major breakpoint*) est souvent exposée sous forme de simple brin. Dans l'autre catégorie, Rag n'induit des DSB que dans le locus d'Ig. Ceux dans l'oncogène sont dépendants d'autres mécanismes (Mani and Chinnaiyan, 2010). Dans ce cas, le complexe synaptique résultant de la recombinaison VDJ est envahi par l'extrémité de l'oncogène (**Figure 23**).

ii. Translocations lors des réarrangements impliquant l'enzyme AID

Ces translocations sont caractéristiques d'une erreur de réparation lors de la SHM dans ou à proximité de l'exon VDJ réarrangé (comme lors du lymphome de Burkitt (BL pour *Burkitt Lymphoma*) endémique où Myc est transloqué au locus IgH). Elles peuvent aussi survenir dans des régions « *switch* » en amont des exons constants lors de la réparation illégitime des cassures au cours des recombinaisons isotypiques. C'est le cas des translocations Myc-IgH dans les lymphomes de Burkitt sporadiques ou c-maf-IgH lors des myélomes multiples (**Figure 23**) (pour revue : Robbiani and Nussenzweig, 2013; Seifert et al., 2013).

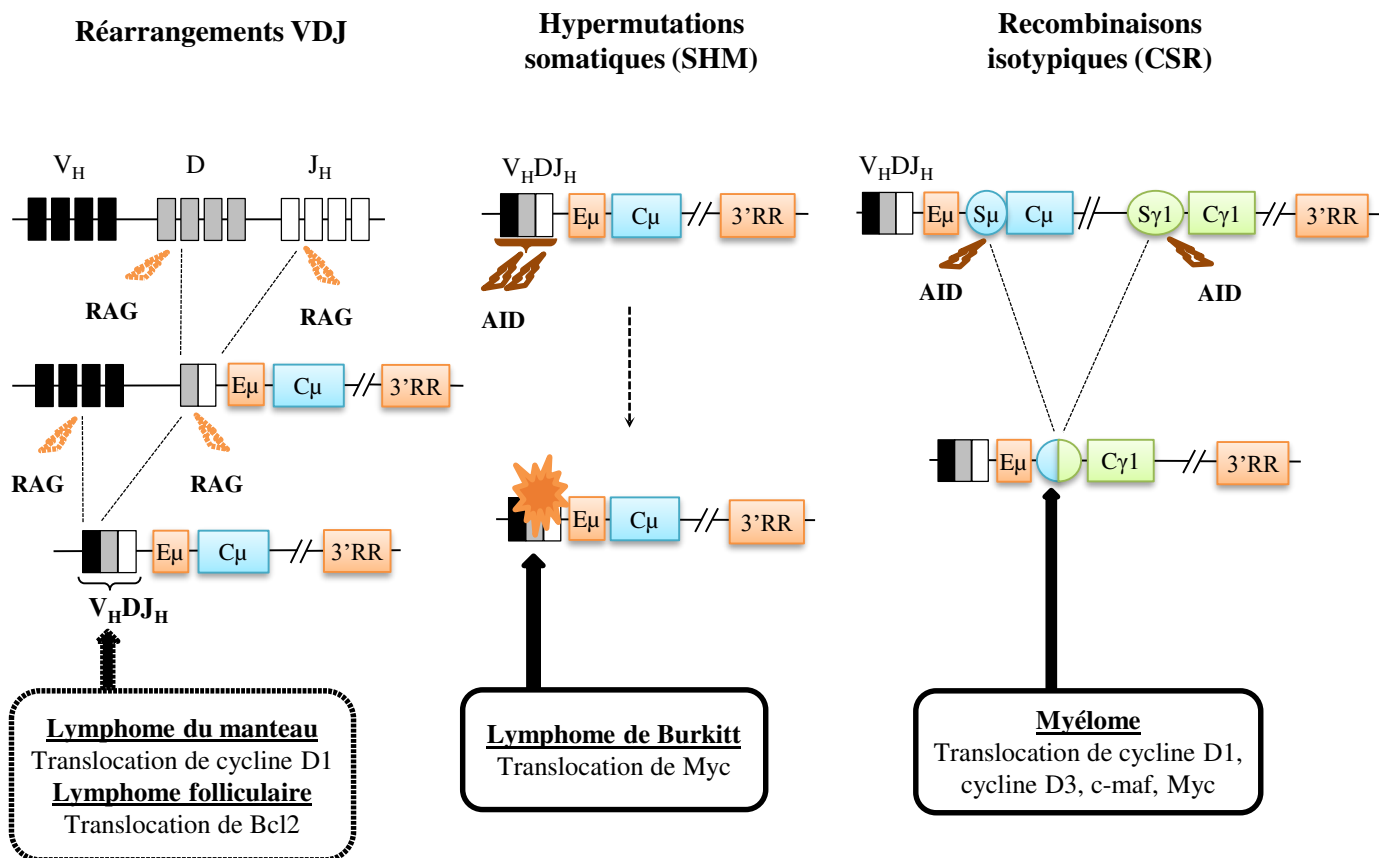


Figure 23 – Translocations oncogéniques au locus IgH liées aux mécanismes de remaniements géniques au cours du développement B.

Lors de son développement, un LB subit divers mécanismes de remaniements géniques qui induisent des lésions d'ADN (cassures et mutations) rendant le locus IgH sensible à des translocations oncogéniques. Ces translocations peuvent impliquer divers oncogènes et avoir lieu dans les régions variables ainsi que dans les régions constantes, tout dépend du mécanisme en question.

3. La modulation de l'expression de l'oncogène transloqué

La plupart des lymphomes B matures sont caractérisés par des translocations oncogéniques au locus IgH. Ceci fut mis en évidence grâce au développement des techniques de cytogénétiques dans les années 1970 (Rowley et al., 1973a;1973b). Dans les années 1980, les nouvelles procédures de biologie moléculaire ont permis de caractériser ces translocations. Ainsi différentes études ont pu cloner l'oncogène Myc transloqué au locus IgH (Adams et al., 1983; Cory et al., 1983; Crews et al., 1982; Dalla-Favera et al., 1982; Hamlyn and Rabbitts, 1983; Taub et al., 1982). Le séquençage haut débit et la TC-seq (*translocation capture-sequencing*) ont permis de mieux étudier les mutations et les translocations à l'origine de divers cancers dont les lymphomes (Campbell et al., 2008; Cancer Genome Atlas Research Network et al., 2013; Greenman et al., 2007; pour revue : Wartman et al., 2011).

Fréquemment, cette translocation conduit à mettre l'oncogène sous le contrôle des *enhancers* du locus IgH (Küppers, 2005). C'est le cas lors du BL où l'oncogène Myc est inséré au locus IgH sous le contrôle d' $\text{E}\mu$ et/ou de la 3'RR. Ainsi le lymphome résulterait d'une augmentation constitutive de l'expression de Myc par les activateurs transcriptionnels du locus (Adams et al., 1985). Plusieurs lymphomes B matures humains sont marqués par des translocations récurrentes d'oncogènes au locus IgH (Sewastianik et al., 2014). Les translocations de Bcl-2 et de cycline D1, trouvées respectivement dans le lymphome folliculaire (FL pour *Follicular Lymphoma*) et le lymphome du manteau (MCL pour *Mantle Cell Lymphoma*), se produisent pendant les recombinaisons V(D)J. La translocation Myc, caractéristique du BL, est liée à la CSR ou à la SHM. L'insertion des cyclines D1 / D3, Myc ou c-maf dans le myélome sont clairement liées à la CSR (**Figure 23**) (Saintamand et al., 2015c). Il est à noter que la transcription du locus IgH est sous le contrôle de ses éléments *cis*-régulateurs (Henderson and Calame, 1998; Pinaud et al., 2011). Ces activateurs de transcription interviennent évidemment dans la dérégulation de l'oncogène au cours de la lymphomagenèse B. Durant la dernière décennie, les rôles et les mécanismes d'action de divers éléments *cis*-régulateurs du locus IgH ont été clarifiés. Parallèlement, différents modèles de souris transgéniques ont été développés pour mimer la lymphomagenèse B mature humaine. Un certain nombre d'entre eux utilisent Myc comme oncogène avec $\text{E}\mu$ ou la 3'RR comme dérégulateurs.

Ces translocations ne suffisent pas pour la cancérisation complète mais en constituent le premier « *hit* ». Plusieurs autres événements seront nécessaires pour aboutir à un lymphome

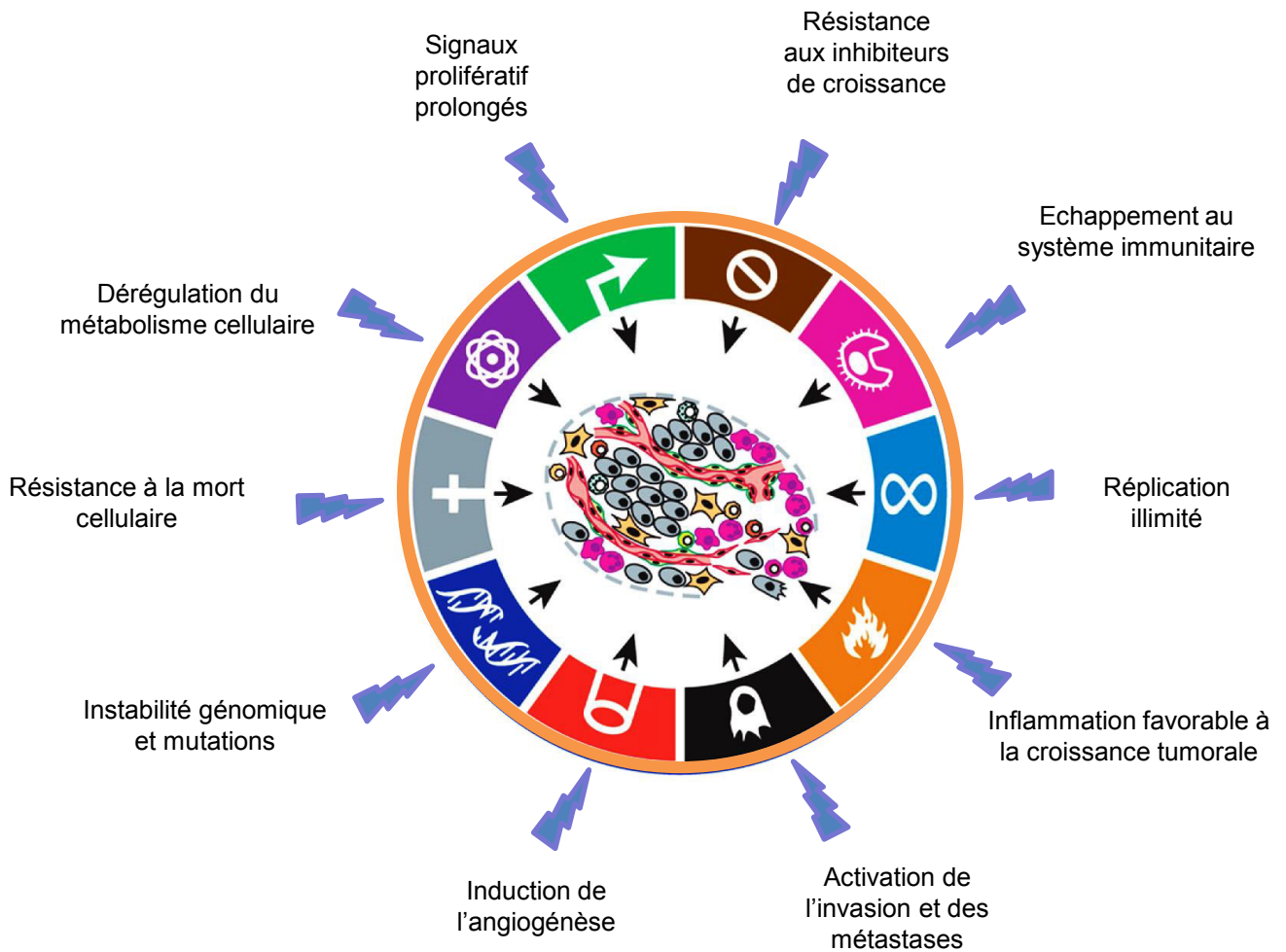


Figure 24 – Schéma représentant les différents événements aboutissant à la cancérisation d'une cellule.

Les translocations oncogéniques ne suffisent pas pour la cancérisation complète. Plusieurs altérations géniques affectant l'homéostasie de la cellule seront accumulées par la cellule pour aboutir à sa dérégulation. D'après Hanahan et Weinberg, 2011.

comme échapper aux mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose (**Figure 24**) (Hanahan and Weinberg, 2011; Vogelstein and Kinzler, 1993). Ces dérégulations génétiques ne sont pas spécifiques aux lymphomes, mais communes à plusieurs types de cancers. Par exemple le gène suppresseur de tumeur p53 est retrouvé muté dans la moitié des tumeurs chez l'homme. Sa mutation permet d'avoir un environnement intracellulaire favorable au développement tumoral (Goh et al., 2011).

Ainsi, des cellules B porteuses de translocations chromosomiques impliquant les loci d'Ig peuvent être trouvées à une basse fréquence chez des individus sains (hommes et souris). Par exemple, des LB portant une translocation *bcl-2*/IgH sont détectés à une fréquence d'environ 1 sur 10^4 à 10^6 chez des individus sains (Limpens et al., 1991; Summers et al., 2001). Les translocations *myc* /IgH se produisent à une fréquence de l'ordre de 1 sur 10^6 cellules chez des souris saines et chez 2% des hommes en bonne santé (Müller et al., 1995; Roschke et al., 1997). Ces résultats sont cohérents avec un processus de transformation en plusieurs étapes au cours de la lymphomagenèse des LB. Les translocations chromosomiques impliquant les loci d'Ig jouent un rôle nécessaire mais pas suffisant dans la lymphomagenèse B. Ainsi, les souris transgéniques surexprimant *bcl-2* ou *c-myc* dans leur LB développent des lymphomes monoclonaux, impliquant que seules de rares cellules exprimant le transgène, donneront naissance à un lymphome, fort probablement, après l'acquisition d'événements transformants supplémentaires (Adams et al., 1985; McDonnell and Korsmeyer, 1991).

4. Rôle de la conformation spatiale des chromosomes

La plupart des translocations sont formées par la jonction de deux DSB (Stephens et al., 2011). Plusieurs facteurs mécaniques peuvent influencer ces translocations parmi lesquels la fréquence des DSB aux loci de translocation, les protéines qui favorisent la juxtaposition physique des DSB et la formation des synapses ainsi que les processus qui inhibent les voies de réparation des DSB favorisant des jonctions normales (pour revue : Zhang et al., 2010). Les DSB sont les principaux moteurs de translocations (Klein et al., 2011; Tsai and Lieber, 2010; pour revue : Zhang et al., 2010).

Les translocations récurrentes aux loci d'Ig dans les lymphomes reflètent, à la fois la haute fréquence des DSB programmés dans ces loci, ainsi que la capacité de leurs *enhancers* à activer les oncogènes transloqués (Gostissa et al., 2009). Les sources de DSB chez les partenaires de translocation non-Ig sont moins bien caractérisées (Tsai and Lieber, 2010). Des études chez la souris (Robbiani et al., 2008) ainsi que chez l'homme suggèrent que des

collaborations entre les enzymes AID et Rag sont à l'origine des DSB conduisant à des translocations oncogéniques (Tsai et al., 2008). D'autres études de séquençage ont montré que des points chauds de translocations endogènes sont générés par des DSB induits par AID dans des gènes dits hors cible ou « *off-target* ». Un ensemble plus large de translocations à l'échelle du génome était associé aux sites de départ de la transcription (TSS pour *Transcription Start Sites*) (Chiarle et al., 2011; Klein et al., 2011). Au-delà de la transcription, des facteurs cellulaires intrinsèques, tels que le métabolisme oxydatif et le stress de réplication, ou facteurs extrinsèques, tels que les rayonnements ionisants (IR) ou les agents chimiothérapeutiques, peuvent générer des DSB (Tsai and Lieber, 2010).

La fusion de deux DSB pour générer des translocations nécessite leur rapprochement. Les chromosomes occupent des territoires nucléaires distincts (Cremer and Cremer, 2010) et sont souvent organisés en domaines de chromatines ouverts et fermés dans différents compartiments nucléaires (Gilbert et al., 2004; Lieberman-Aiden et al., 2009). La position nucléaire non aléatoire des gènes et des chromosomes a conduit à penser que la proximité spatiale de deux séquences génomiques favoriserait leur translocation préférentielle (Meaburn et al., 2007). Les études cytogénétiques ont montré que plusieurs gènes contribuant aux translocations étaient, en moyenne, relativement proches les uns des autres (Neves et al., 1999; Osborne et al., 2007; Roix et al., 2003; Wang et al., 2009). Des études d'imagerie sur cellules vivantes ont montré que les DSB étaient relativement immobiles (Soutoglou et al., 2007). Zhang et coll ont montré que l'organisation 3D du génome ainsi que la proximité spatiale entre les loci influencent fortement les modèles de réarrangements chromosomiques et les translocations à l'échelle du génome (Zhang et al., 2012a).

i. Régulation spatiale du locus IgH

Tout au long du développement B, le locus IgH modifie sa conformation spatiale pour permettre une régulation efficace des événements séquentiels qui le touchent ainsi que celle des recombinaisons longues distances qui y prennent place; ceci grâce à une coordination de l'expression des gènes et promoteurs qui le constituent. Cette conformation spatiale se traduit par la formation de boucles de chromatines afin d'approcher les gènes distants et par le changement de la position du locus dans le noyau.

Des études ont aussi montré qu'une relation existe dans l'autre sens. La transcription de certaines séquences régulerait la conformation 3D du génome. Les lncRNA (pour *long non coding RNA*) ne codant pour aucune protéine (Hung and Chang, 2010; Yang et al., 2014) ainsi

que les eRNA, issus de la transcription des régions régulatrices, semblent être impliqués. Ces deux types de transcrits présentent une taille comparable d'au moins 200 nucléotides et sont maintenus dans le noyau. Seule différence, les eRNA sont les moins stables et n'ont pas de queue poly-A (Kim et al., 2015; Li et al., 2014). De tels transcrits ont été décrits pour la 3'RR (Péron et al., 2012). Outre leur rôle dans l'activation ou la répression de la transcription par le recrutement de facteur nucléaires au locus, ces transcrits, grâce à leurs interactions avec la cohésine ou le complexe du médiateur, contribuent à la mise en place de la conformation 3D du locus. Un rôle des eRNA est suggéré dans les interactions promoteurs/*enhancers* très importantes lors de la CSR (Li et al., 2014; Quinodoz and Guttman, 2014). Le rôle exact de ces divers transcrits lors du développement B reste toujours à déterminer.

5. L'oncogène Myc

L'oncogène Myc, situé sur le bras court « q » du chromosome 8 (8q24) chez l'homme et sur le chromosome 15 chez la souris, est l'un des gènes les plus fréquemment impliqués dans la carcinogenèse humaine. Le gène *Myc* a été initialement identifié comme étant l'analogue cellulaire de l'oncogène *v-myc* dans le virus de la leucémie aiguë aviaire (MC29) en 1978 (Sheiness et al., 1978; Vennstrom et al., 1982). La découverte directe de l'implication du Myc dans le cancer chez l'homme est venue de son identification en 8q24 et de sa translocation sur le locus IgH (chromosome 14) dans BL (Dalla-Favera et al., 1982; Neel et al., 1982; Taub et al., 1982). Des études ultérieures ont démontré que le gène *Myc*, associé aux *enhancers* μ ou κ chez des souris transgéniques, était hautement leucémogène et entraînait le développement de lymphomes B (Adams et al., 1985). Au cours des trois dernières décennies, il a été démontré que le Myc est un facteur de transcription global essentiel, régulant 10 à 15% des gènes humains (Knoepfler, 2007). Il contrôle diverses fonctions cellulaires, y compris la progression du cycle cellulaire, la croissance cellulaire, la survie, le métabolisme et la biosynthèse cellulaire, l'adhérence et la fonction mitochondriale (Dang et al., 2006). Les taux de protéines Myc sont faibles et insuffisants pour favoriser la prolifération cellulaire sans signaux régulateurs positifs appropriés. L'activité transformante de celui-ci est neutralisée par sa capacité à induire l'apoptose dans les conditions normales (Pelengaris et al., 2002). Dans les tumeurs induites par Myc, ce délicat équilibre de régulation est perdu. Cependant, contrairement aux autres proto-oncogènes, le Myc n'est pas activé par des mutations oncogéniques dans sa séquence codante. Le Myc transforme les cellules *via* une surexpression non régulée de la protéine Myc intacte et ceci à travers trois mécanismes principaux : la mutagenèse par insertion,

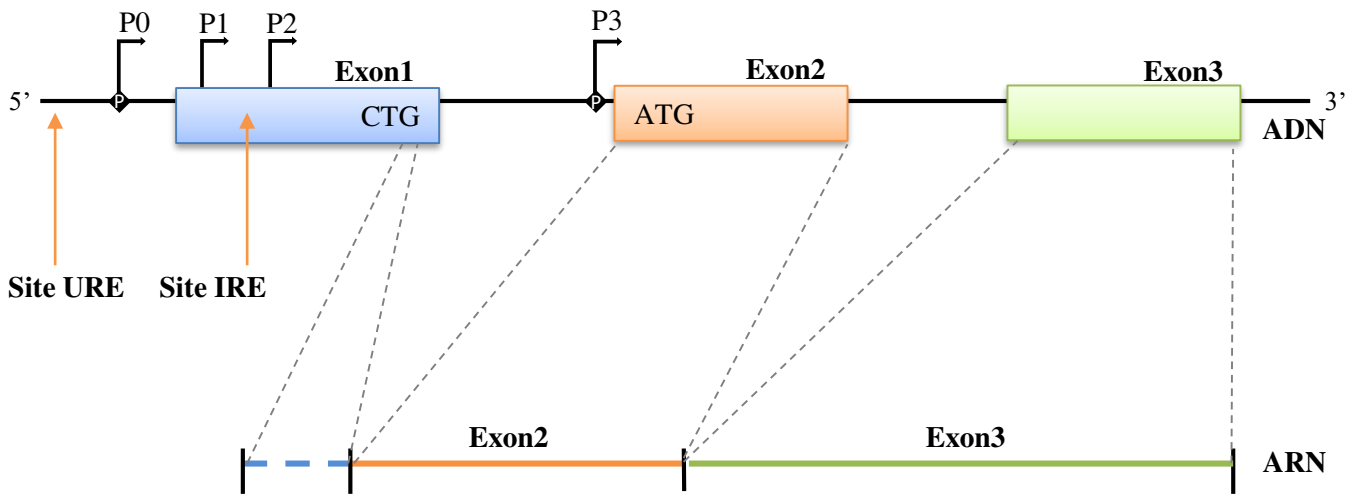


Figure 25 – Schéma représentant le gène Myc.

La première ligne représente l'ADN. Les exons 1, 2 et 3 symbolisés, respectivement, par des rectangles bleu, orange et vert. Les promoteurs (P0 n'existant que chez l'homme) sont représentés par des flèches noires, les sites de fixation de NFκB (URE et IRE) par des flèches oranges et les introns par des traits fins. La deuxième ligne représente l'ARN. D'après Ryan et Birnie, 1996.

l'amplification génique et la translocation chromosomique. La mutagenèse par insertion est observée dans les tumeurs induites par les rétrovirus, telles que les tumeurs hématopoïétiques induites par le virus ALV pour (*Avian Leucosis Virus*), dans lesquelles le stimulateur proviral est intégré en amont du gène Myc et conduit à sa surexpression (Dudley et al., 2002). Une amplification de Myc est également détectée partenaire dans des tumeurs hématopoïétiques ou non, y compris les cancers du poumon, du sein et du colon (Alitalo et al., 1983; Augenlicht et al., 1997; Collins and Groudine, 1982; Little et al., 1983; Mariani-Costantini et al., 1988; Münzel et al., 1991). Les translocations chromosomiques juxtaposant le gène Myc au chromosome 8q24 avec les gènes d'Ig aux chromosomes 14q32, 2p11 et 22q11 ou d'autres gènes partenaires, sont de loin les plus courantes et les mieux étudiées. Ces translocations entraînent une expression dérégulée de Myc (Erikson et al., 1983). Myc fonctionne en tant qu'amplificateur universel des gènes déjà exprimés dans la cellule plutôt que comme activateur de gènes silencieux (Lin et al., 2012; Nie et al., 2012). Dans les tumeurs malignes hématopoïétiques, les anomalies génomiques impliquant le gène Myc sont presque toujours observées dans les lymphomes B. Les altérations génétiques de Myc sont rarement rapportées dans les lymphomes T.

i. Sa structure

a. Le gène Myc

Le gène Myc est formé de trois exons (le premier non fonctionnel) et régulé par quatre promoteurs P0 (uniquement chez l'homme), P1, P2 et P3 (**Figure 25**). P0 se trouve dans la région 5' UTR non traduite du gène, P1 et P2 dans l'exon 1 et P3 dans l'intron I. P1 et P2 possède chacun une boîte TATA et constitue les points d'initiation majeurs des transcrits du gène Myc. 75 à 90% des transcrits sont initiés à partir de P2, 10 à 25% à partir de P1 et moins de 5% à partir de P0 et P3 dans les cellules normales. Deux sites d'initiation de la traduction, l'un à l'extrémité 3' de l'exon 1 (CTG) et l'autre à l'extrémité 5' de l'exon 2 (ATG), existent. Ils codent soit la protéine Myc1 (67kDa) soit la protéine Myc2 (64kDa), transcrits initiés respectivement à partir de P1 ou P2 (pour revue : Facchini and Penn, 1998; Ryan and Birnie, 1996; Wierstra and Alves, 2008). Myc code pour un facteur de transcription de type « hélice-boucle-hélice » (HLH) ayant un domaine « Leucine-Zipper » (LZi). Ce gène est régulé par des mécanismes complexes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Spencer and Groudine, 1991). Le mRNA et la protéine Myc ont des demi-vies très courtes dans les cellules normales (de l'ordre de 10 et 25 min respectivement). Ceci permet une adaptation rapide aux

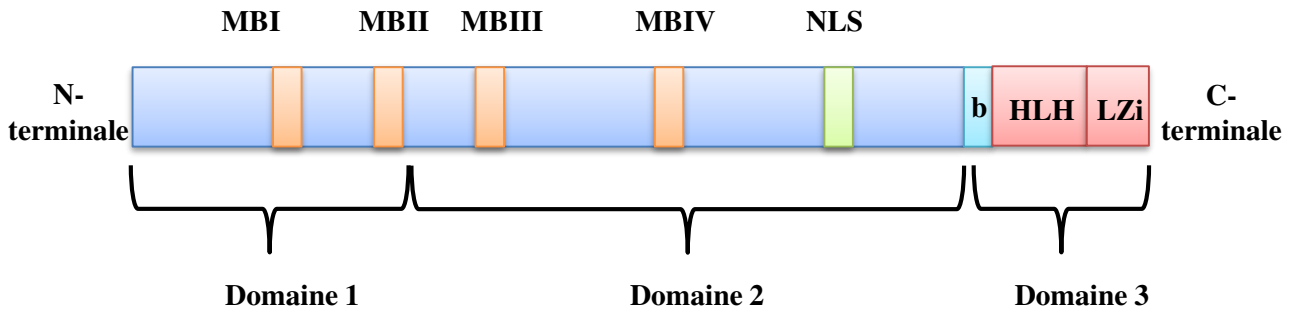


Figure 26 – Organisation protéique de Myc.

Trois domaines essentiels constituent la protéine Myc. Le premier, dans la partie N-terminale, contient les deux régions MBI et MBII (*MYC Box*). Le deuxième, central, contient MBIII et MBIV ainsi que le signal de localisation nucléaire (NLS). Le troisième, dans la partie C-terminale, contient une région basique et les deux séquences HLH « hélice-boucle-hélice » et LZi « leucine-zipper ».

stimulations développementales et environnementales (Ciechanover et al., 1991; Hann and Eisenman, 1984; Herrick and Ross, 1994). Les cellules en progression du cycle cellulaire expriment Myc alors que son taux diminue dans celles au repos ou différenciées.

Myc possède deux sites de fixation à NF κ B (*Nuclear Factor kappa B*) dits URE en amont du promoteur P1 et IRE (*Upstream Regulatory Element* et *Internal Regulatory Element*) dans l'exon 1. Il est régulé par ce dernier suite aux stimulations par différentes voies de signalisation telles que le CD40 (Schauer et al., 1996), l'IL-1 (Duyao et al., 1992) et le Tnf (Kirillova et al., 1999). Plusieurs autres facteurs de transcription se lient aux promoteurs de Myc le réprimant tels que Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) et Ctf. Suite à sa fixation aux promoteurs, Blimp1 agit en recrutant des HDACs qui désacétylent les histones H3 associées au promoteur de Myc (Lin et al., 1997; Yu et al., 2000). Cette répression provoque l'apoptose des cellules. Ctf se fixe sur différents sites présents sur les promoteurs, réprimant Myc et diminuant la croissance cellulaire (Filippova et al., 1996).

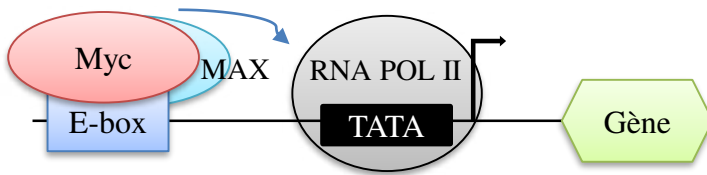
b. La protéine Myc

La protéine Myc dispose de trois grands domaines caractéristiques des facteurs de transcription (**Figure 26**). Le premier, dans sa partie N-terminale, est un domaine d'activation de la transcription. Il contient deux régions hautement conservées dites MBI et MBII (pour *MYC Box I* et II). Ces deux boîtes sont indispensables pour la transactivation et la transrépression des gènes cibles. Le deuxième, plus central, est un domaine de localisation nucléaire qui permet le passage de la protéine Myc nouvellement synthétisée du cytoplasme au noyau. Le troisième, dans la partie C-terminale, est constitué d'une région basique assurant la reconnaissance et la liaison à des séquences spécifiques de l'ADN : une région HLH et une LZi impliquée dans l'association de Myc avec son partenaire Max (pour *Myc Associated factor X*). Deux autres boîtes ont été plus récemment décrites dans la partie centrale dont MBIII impliquée dans la tumorigenèse (Herbst et al., 2005) et MBIV régulant la liaison à l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Cowling et al., 2006). Ces deux boîtes régulent aussi l'apoptose et la transformation cellulaire.

ii. Régulation de l'expression et de l'activité de Myc

L'expression et l'activité de Myc sont finement régulées. Elles sont en corrélation avec le potentiel prolifératif de la cellule. En effet, une expression rapide et adaptée est indispensable en réponse aux signaux internes et externes (pour revue : Facchini and Penn, 1998; Hann, 2006;

A Complexe Myc/MAX: Activation transcriptionnelle



B Complexe Myc/Mad: Répression transcriptionnelle

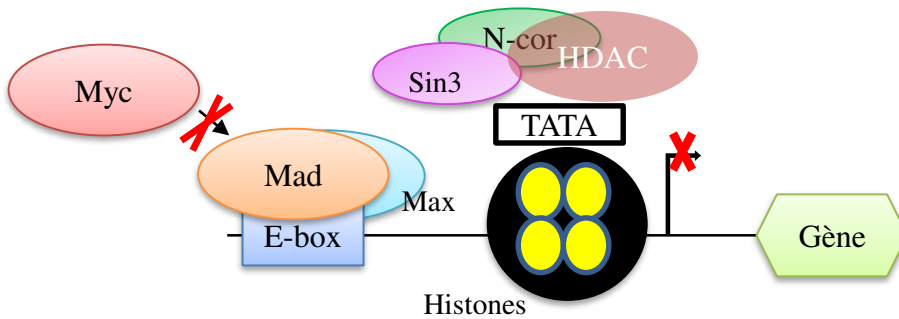


Figure 27 – Activité transcriptionnelle de Myc.

A- La fixation de l'hétérodimère Myc/Max sur l'E-box (CACGTG) active la transcription du gène cible par la RNA polymérase II.

B- La fixation du complexe Mad/MAX sur l'E-box réprime la transcription du gène cible par le recrutement de répresseurs transcriptionnels (Sin3, N-Cor et HDAC).

Wierstra and Alves, 2008). Deux niveaux de régulation existent. La régulation transcriptionnelle se traduit par une multitude de voies de signalisation qui ciblent Myc soit positivement soit négativement (notant que Myc peut également réprimer son propre promoteur). La régulation post-traductionnelle est assurée par des mécanismes directs ou indirects. Les phosphorylations, glycosylations et ubiquitinations constituent les directs, alors que les indirects se font par l'interaction avec des partenaires qui vont moduler son activité.

Plusieurs sites hypersensibles à la DNase I ont été identifiés en 5' et dans le gène *c-myc* (Bentley and Groudine, 1986; Dyson et al., 1985; Dyson and Rabbitts, 1985). Arcinas et coll ont montré que plusieurs facteurs de transcription se lient *in vivo* à un certains nombres de ces sites dans les promoteurs Myc (Arcinas and Boxer, 1994). En plus de l'initiation de la transcription, l'élongation joue un rôle important dans la régulation de l'expression de *c-myc*. Ainsi, la diminution de l'ARNm de *c-myc*, au cours de la différenciation de différents types de cellules, est le résultat d'un blocage de l'élongation de la transcription (Bentley and Groudine, 1986; Eick and Bornkamm, 1986; Nepveu and Marcu, 1986).

iii. Facteurs de transcription de Myc : Activation et répression transcriptionnelle

Divers groupes de gènes sont activés par l'hétérodimère Myc/MAX formé par l'association du domaine centrale (hélice-boucle-hélice Zipper ou bHLHZ) de Myc avec un domaine bHLHZ que possède également MAX (Blackwood and Eisenman, 1991). Cet hétérodimère reconnaît et se fixe sur une E-box; une séquence d'ADN spécifique possédant la séquence CACGTG (**Figure 27A**) (Blackwell et al., 1990). Mais il peut aussi se fixer à des séquences variantes (Blackwell et al., 1993).

Myc est globalement considéré comme un activateur de la transcription en modulant la structure de la chromatine (Grandori et al., 2000). En effet, l'activité transcriptionnelle des gènes cibles de Myc est augmentée suite au recrutement des HAT (*Histone AcetylTransferase*) qui induisent un remodelage chromatinien. Cependant des répressions géniques médiées par Myc existent. L'exemple le mieux étudié est celui de MIZ-1 (pour *Myc Interacting Zinc finger protein 1*). L'hétérodimère Myc/MAX empêchent l'interaction de MIZ-1 avec p300, permettant le recrutement de l'ADN-méthyltransférase Dnmt3a qui induit le silence des promoteurs cibles de MIZ-1 (Brenner et al., 2005). La répression de la transcription par Myc résulte de son

interaction avec des éléments initiateurs de la région promotrice des gènes cibles (Li et al., 1994).

Deux sites de phosphorylation dans la région N-terminale sont impliqués dans la stabilité de la protéine. La phosphorylation de la Serine 62 (S62) par ERK (pour *Extracellular-regulated kinase*) augmente la stabilité de Myc. La phosphorylation de la Threonine 58 (T58) par GSK-3 β cible Myc pour sa dégradation. La T58 est localisée dans une région « hotspot » trouvée fréquemment mutée dans plusieurs tumeurs incluant le BL. Ces mutations inhibent la phosphorylation de la T58, améliorant ainsi la stabilité de la protéine (Bahram et al., 2000). De plus, des points de mutation affectant cette région sont connectés à des altérations dans le potentiel apoptotique de Myc (Hemann et al., 2005).

Il est à noter que MAX peut conduire à la formation d'homodimères qui se fixent sur les E-Box entrant ainsi en compétition avec Myc. MAX peut également former des dimères avec des protéines tel que Mad1, Mix1, Mad3, Mad4 et Mnt. Ces derniers sont capables de se fixer sur les mêmes E-boxes et réprimer la transcription en recrutant des HDACs. Ainsi, dans les cellules en prolifération les hétérodimères Myc/MAX sont dominants (**Figure 27B**). Par contre, dans les cellules en quiescence ou au repos, ce sont les hétérodimères Mad/MAX et Mnt/MAX qui se trouvent majoritaires (Adhikary and Eilers, 2005).

iv. Sa fonction

La protéine Myc est un facteur de transcription qui régule divers processus cellulaires jouant ainsi un rôle majeur dans le développement. Notamment, il régule la croissance et la prolifération cellulaires, la progression du cycle cellulaire et le métabolisme, la transcription, la différenciation, l'apoptose et la motilité cellulaire (**Figure 28**) (Dang, 1999; Vita and Henriksson, 2006). Les modèles murins KO pour Myc montrent qu'il est létal au stade embryonnaire (Davis et al., 1993).

a. Prolifération, cycle cellulaire, croissance, métabolisme et Myc

Myc est impliqué dans la transition des cellules de la phase de repos Go vers G1 et la traversée des cellules dans G1, dans laquelle les cellules augmentent leur métabolisme pour la synthèse d'ADN (Roussel, 1998). Des régulateurs du cycle cellulaire tels que des cyclines, des Cdk (*Cyclin-dependent kinase*), des inhibiteurs de Cdk, des protéines de réplication et autres constituent les cibles de Myc. Myc stimule la progression du cycle cellulaire en induisant directement ou indirectement l'activation de certains gènes (tels que les cyclines D1, D2, E, et

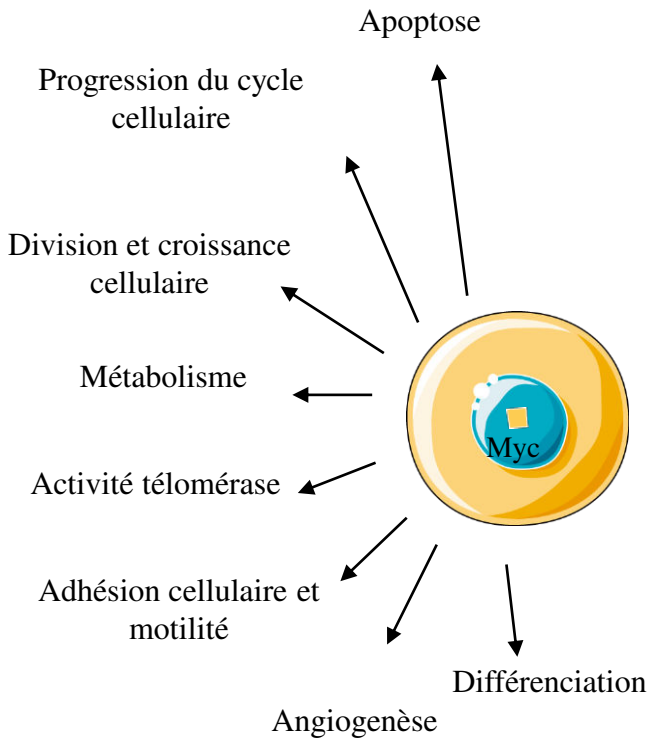
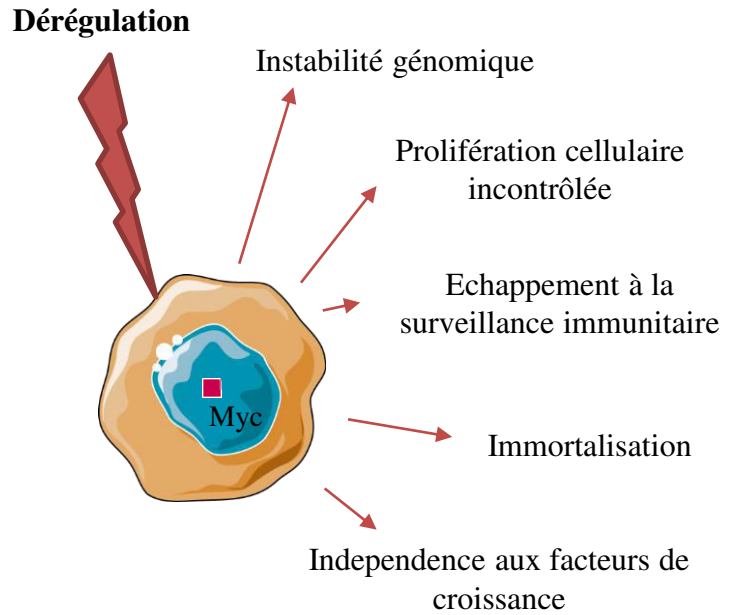
A**B**

Figure 28 – Représentation schématique des divers fonctions biologiques contrôlées par Myc.

A- Fonctions biologiques contrôlées par Myc dans des conditions normales.

B- Fonctions biologiques contrôlées par Myc au cours des lymphoproliférations.

D'après Vita et Henriksson, 2006.

A ; Cdk4 et Cdc25a) et en inhibant des facteurs impliqués dans les points de contrôle du cycle cellulaire (tels que gadd45 et gadd153) et des inhibiteurs de Cdk (tels que p15, p21 et p27) (Dang et al., 2006; Grandori et al., 2000; Oster et al., 2002). Ainsi le gène Cdc25a, cible de Myc (Galaktionov et al., 1996), code pour une protéine qui élimine les groupements phosphates inhibiteurs que portent Cdk2 et Cdk4 (Steiner et al., 1995). L'activité de p27 est diminuée par Myc, empêchant son effet inhibiteur sur l'activité kinase du complexe Cdk2-cycline E (Vlach et al., 1996; Yang et al., 2001). En prévenant l'action de l'inhibiteur du complexe cycline D/Cdk4 (p16INK4a), Myc dérégule l'expression de la cycline E. Il est à noter que Myc est directement impliqué dans la réplication de l'ADN (Dominguez-Sola et al., 2007). Des études, sur l'hypofonctionnement de Myc se traduisent chez la drosophile par une petite taille corporelle (Gallant et al., 1996; Schreiber-Agus et al., 1997). Ceci ne résulte pas de moins de cellules, mais de cellules plus petites (Johnston et al., 1999). Ceci suggère un rôle de Myc dans l'accroissement de la masse cellulaire et le métabolisme. En favorisant la croissance cellulaire, Myc augmente également le potentiel prolifératif de la cellule en fournissant des réserves et en augmentant la synthèse protéique (Arabi et al., 2005; pour revue : Dang et al., 2006; Gomez-Roman et al., 2003; Grandori et al., 2005; Grewal et al., 2005; Schmidt, 2004, 1999). Des expériences sur une lignée cellulaire fibroblastique, portant une inactivation de Myc sur les deux allèles, ont montré une prolongation des phases G1 et G2 du cycle cellulaire, mais une phase S normale, montrant ainsi l'importance de Myc dans la prolifération cellulaire (Mateyak et al., 1997).

b. Myc et apoptose

Outre son rôle d'inducteur de prolifération, la protéine Myc a également un rôle pro-apoptotique (Askew et al., 1991; Evan et al., 1992; Shi et al., 1992). En effet, Askew et coll ont montré que les cellules hématopoétiques qui surexpriment Myc rentrent en apoptose. C'est aussi le cas des fibroblastes privés de serum et exprimant d'une manière constitutive Myc. Les cellules B primaires déficientes pour Myc résistent à l'apoptose induite par le CD95 ou la staurosporine (de Alborán et al., 2004). L'apoptose induite par Myc peut passer par diverses voies : la voie mitochondriale, la voie dépendante ou non de la p53 ou les récepteurs de mort tels que le CD95 (Hoffman and Liebermann, 2008; Pelengaris et al., 2002).

Brièvement le Myc augmente de façon indirecte ARF1 (*ADP Ribosylation Factor 1*) un supresseur de tumeur, par l'intermédiaire de FOXO (Bouchard et al., 2007). Cette surexpression inhibe Mdm2 (*Murine double minute 2*) qui est un régulateur négatif de la p53. P53 s'active et

induit l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Zindy et al., 1998). De plus, la surexpression de Myc *in vivo* active la voie ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*), de réponse aux cassures double brin de l'ADN qui active la p53 et ainsi promeut l'apoptose (Pusapati et al., 2006). L'apoptose induite par Myc peut passer par la voie mitochondriale en activant des protéines pro-apoptotiques (Bak, Bax, Bim) ou en réprimant des protéines anti-apoptotiques (Bcl 2, Bcl-XL) (Eischen et al., 2001; Soucie et al., 2001). Les récepteurs de mort tels que DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) (Kleefstrom et al., 1997), CD95/CD95L, Trail/Trail-Récepteur (*Tnf Related Apoptosis-Inducing Ligand*) constituent également une voie d'induction d'apoptose par Myc (Hoffman and Liebermann, 2008).

c. Myc et différenciation cellulaire

Dans la plupart des cas Myc est associé à une inhibition de la différenciation. La répression de Myc résulte en une expression constitutive de MAX ou de mutants dominants négatifs de Myc, induisant une différenciation cellulaire (Griep and Westphal, 1988; Holt et al., 1988; Prochownik et al., 1988). Par contre, son expression ectopique inhibe la différenciation cellulaire (Prochownik and Kukowska, 1986).

v. Myc et développement B normal

Myc est essentiel au développement précoce des LB dans la moelle osseuse par l'activation d'un facteur de transcription vital au maintien de l'identité des cellules B, Ebf1 (Vallespinós et al., 2011). Le rôle de Myc dans le développement des GC est resté obscur pour longtemps car il n'était pas détecté dans les cellules B en forte prolifération (Klein et al., 2003). En fait, Myc n'est pas exprimé par les centroblastes de la DZ, mais par un petit groupe de B dans la LZ (Calado et al., 2012; Dominguez-Sola et al., 2012) grâce à des interactions avec des Ag et des cellules T_{FH}. L'activation transitoire de récepteurs de surface tels que le BCR, le CD40 et celui de l'IL2 supprime l'activité de BCL6 (*B-Cell Lymphoma 6*) allégeant sa régulation négative de Myc. Cela va permettre aux cellules B du GC de subir les premiers cycles de division cellulaire (pour revue : De Silva and Klein, 2015; Oestreich et al., 2012). Dans les cellules Myc⁺, la voie du NFκB s'active. Ceci conduit à l'augmentation transcriptionnelle de Myc et Irf4 (*Interferon Regulatory Factor 4*), fournissant ainsi un rétrocontrôle positive pour l'expression de Myc. A ce stade, BCL6 et Myc semblent être co-exprimés dans les LB de la LZ. Dans ces cellules, Myc entraîne une prolifération dépendante de la cycline D2. Les cellules T_{FH} induisent les cellules B Myc⁺ à entrer dans la DZ pour des cycles supplémentaires de

sélection positive en proliférant et pour subir les SHM. L'expression de Myc est indispensable à cette re-entrée pour soutenir la formation de GC. BCL6 est ensuite régulée positivement supprimant la transcription de *c-myc* en se liant directement à ses promoteurs (Basso et al., 2010; Ci et al., 2009; Nahar et al., 2011).

Myc est complètement inhibé dans les centroblastes en prolifération de la DZ. La prolifération dépendante de la cycline D3 et E2F2 remplace celle dépendante de la cycline D2 dans les cellules B Myc+ du GC, grâce à l'expression de facteur de transcription Tcf3 (*E2A Ig enhancer binding factors*) (pour revue : De Silva and Klein, 2015). BCL6 induit également une progression du cycle cellulaire indépendante de Myc en se liant au facteur MIZ-1. C'est un partenaire de Myc en tant qu'inhibiteur des Cdk (Phan et al., 2005; Shaffer et al., 2000). Le Myc doit être activement réprimé dans la DZ du GC pour limiter le nombre de divisions cellulaires avant chaque cycle de sélection basé sur l'affinité antigénique (Oprea and Perelson, 1997) et pour permettre une maturation d'affinité normale. Les cellules Myc dans la LZ quittent le GC et deviennent des cellules B mémoires ou des plasmablastes. L'activation de la protéine Blimp1 dans les plasmablastes précoces post-GC, inhibe l'expression de Myc et induit la différenciation en cellules plasmatiques.

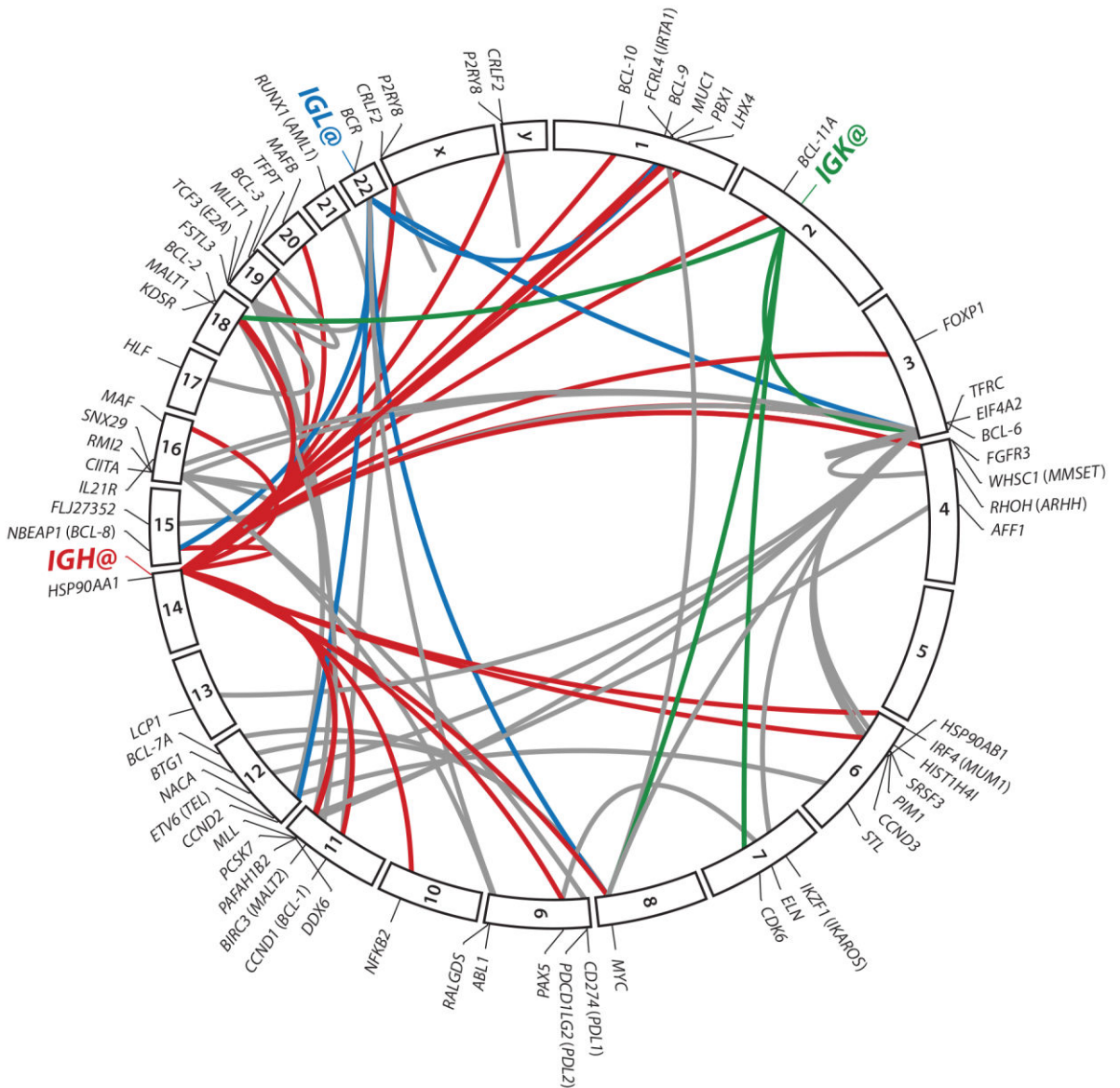


Figure 29 – Translocations récurrentes dans les lymphomes B.

L'ensemble du génome humain est représenté par le diagramme circulaire. Les partenaires impliqués dans des réarrangements chromosomiques récurrents lors des lymphoproliférations B malignes sont rejoints par des arcs. Les arcs colorés en rouge, en bleu et en vert indiquent respectivement, les translocations concernant les locus IgH, Ig λ et Igk. D'après Robbiani et Nussenzweig, 2013.

Chapitre IV Myc et Lymphomes B matures

Un déséquilibre de la balance entre prolifération et apoptose des cellules B aboutit à l'apparition de lymphomes. La lymphomagenèse B constitue ainsi un détournement de la physiologie de la maturation 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 Myc, cycline D1, cycline D3 et bcl-2 ; et 2) la dérégulation de facteurs transcriptionnels impliqués dans l'apoptose ou le contrôle de la prolifération. Une majorité des lymphomes B 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 aux SHM mais impliquant d'autres gènes que ceux des récepteurs à l'Ag. Plus de 40 sous-types de lymphomes ont été détectés, dont la majorité dérive de cellules B matures. Malgré le fait que les LB ne passent que peu de temps dans le GC, la plupart de ces lymphomes provient des cellules GC ou post GC. Ceci s'explique par la prolifération intense de ces cellules, ainsi qu'aux mécanismes de diversification secondaire (SHM et CSR) qu'elles y subissent. Plusieurs translocations récurrentes ont été découvertes et étudiées exhaustivement dans les LB cancéreux grâce au développement des techniques de séquençage (**Figure 29**) (Robbiani and Nussenzweig, 2013).

Ainsi au cours du BL, la translocation chromosomique t(8;14) associe l'oncogène Myc (porté par le chromosome 8 chez l'homme) et la région de jonction (J) du locus IgH (porté par le chromosome 14 chez l'homme). Au cours du lymphome folliculaire on retrouve la translocation t(14;18) de l'oncogène bcl-2 dans les régions DJ_H. Les translocations t(11;14) de la cycline D1, t(6;14) de la cycline D3, t(14;16) de c-maf ou t(4;14) du FGFR3 sont retrouvées dans les régions « switch » lors des myélomes. Dans tous les cas de figure, on note une surexpression des oncogènes transloqués. Ceci serait due à leur passage sous le contrôle des « *super-enhancers* » présents dans le locus IgH. L'étude de ces derniers en 5' et en 3' du locus IgH pourrait se révéler importante dans la compréhension de nombreuses hémopathies malignes.

La dérégulation et les mutations de Myc ont été rapportées dans de multiples lymphomes B matures tels que le BL, le myélome et le lymphome plasmocytaire. Après translocation dans le locus IgH, Myc serait exprimé de manière constitutive sous le contrôle de ses éléments *cis-*

activateurs parmi les activateurs transcriptionnels actifs à ce moment. Notons que la 3'RR est l'élément chef de contrôle de la transcription IgH. La structure de la 3'RR murine et humaine présente une forte homologie (D'Addabbo et al., 2011). Les modèles murins explorant le rôle de la 3'RR dans les lymphomes B devraient fournir des données intéressantes et pertinentes concernant le développement des lymphomes B humains. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses démonstrations convaincantes de la contribution de cette région à la lymphomagenèse mature induite par le Myc ont été rapportées. Ceci non seulement avec l'aide de modèles transgéniques murins porteurs d'un Myc dérégulé mais également par des KI de Myc directement en divers points du locus IgH.

La revue ci-dessous décrit : [1] Les différents modèles transgéniques et de KI publiés jusqu'à maintenant ; [2] leur phénotype ; [3] l'hypothèse du rôle de la 3'RR dans la dérégulation d'un oncogène transloqué au locus IgH.

C'est l'ensemble de cette bibliographie qui nous a conduit à tenter de mieux comprendre les interactions de Myc avec les deux « *super-enhancer* » les plus puissants du locus IgH : E μ et 3'RR.

The IgH 3' regulatory region and c-myc-induced B-cell lymphomagenesis

Nour Ghazzoui^{1,*}, Alexis Saintamand^{1,*}, Hussein Issaoui¹, Christelle Vincent-Fabert¹ and Yves Denizot¹

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

* These authors have contributed equally to this work

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

Keywords: c-myc, 3' regulatory region, lymphomagenesis, transgenic mice, HDAC

Received: August 15, 2016

Accepted: October 05, 2016

Published: October 08, 2016

ABSTRACT

Deregulation and mutations of c-myc have been reported in multiple mature B-cell malignancies such as Burkitt lymphoma, myeloma and plasma cell lymphoma. After translocation into the immunoglobulin heavy chain (IgH) locus, c-myc is constitutively expressed under the control of active IgH cis-regulatory enhancers. Those located in the IgH 3' regulatory region (3'RR) are master control elements of transcription. Over the past decade numerous convincing demonstrations of 3'RR's contribution to mature c-myc-induced lymphomagenesis have been made using transgenic models with various types of IgH-c-myc translocations and transgenes. This review highlights how IgH 3'RR physiological functions play a critical role in c-myc deregulation during lymphomagenesis.

INTRODUCTION

The immunoglobulin heavy chain (IgH) locus undergoes numerous changes during B-cell differentiation, affecting transcription, V(D)J accessibility to recombination, class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM) [1, 2]. Ongoing recombination and mutation throughout B-cell development, *via* Rag1/Rag2 and AID targeting [1, 2], make the IgH locus a hotspot for translocations. Several human mature B-cell lymphomas are marked by oncogene translocations into the IgH locus [3]. Bcl-2 and cyclin D1 translocations found respectively in follicular lymphomas (FL) and mantle cell lymphomas (MCL), occur during V(D)J recombination. c-myc translocation, the typical hallmark of Burkitt lymphoma (BL), is linked to either CSR or SHM. Cyclin D1/D3, c-myc or c-maf translocations found in myeloma are clearly related to CSR [4]. Transcription of the IgH locus is under control of *cis*-regulatory elements [1, 2]. These transcriptional enhancers obviously intervene in oncogene deregulation during B-cell lymphomagenesis. During the past decade the roles and mechanism of actions of various IgH *cis*-regulatory enhancers have been clarified. At the same time various transgenic mice models have been developed in order to mimic human mature B-cell lymphomagenesis. A number of them use c-myc as a deregulated oncogene

and the IgH 3' regulatory region (3'RR) as an oncogene deregulator. Indeed, c-myc is well known to be both an important regulator of cell growth and apoptosis through its action on cell cycle progression, cell metabolism, cell differentiation, cell death receptor signaling and DNA damage recovery [3]. This review describes how IgH 3'RR physiological functions might play a critical role in c-myc oncogene deregulation during mature B-cell lymphomas and why 3'RR targeting would be an interesting promising strategy in human lymphomagenesis.

IGH CIS-REGULATORY ELEMENTS

IgH *cis*-regulatory elements are major locus regulators (Figure 1). Two important regions have been identified. The intronic 5' E μ enhancer is mandatory for VDJ recombination and thus plays a key role during early steps of B-cell development [2, 5]. VDJ recombination is initiated by Rag1/Rag2 nucleases. The resulting Rag-induced DNA double-strand breaks are ideal sites for oncogene translocation. The IgH 3'RR promotes SHM [6, 7], CSR [8-10], μ transcription [11] but not VDJ recombination [12]. In germinal centers, SHM and CSR are AID-mediated modifications. SHM mainly occurs in VDJ exons for high affinity antibody generation. CSR is required for synthesis of non IgM Ig. Although these events imply different mechanisms, they both require the

initiation of simple- or double-strand breaks by AID, which dramatically increase the risk of oncogene translocation. The 3'RR, as the principal AID-dependent recombination regulator, is the major player during late B-cell maturation stages. The mouse 3'RR is downstream from the IgH C α gene and shares a strong structural homology with 3'RR located downstream from each human IgH C α gene (C α 1 and C α 2) [13] (Figure 2). 3'RR structural homology has been conserved during vertebrate evolution highlighting its importance during B-cell lymphopoiesis. The mouse 3'RR contains four transcriptional enhancers (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4). hs1,2 is flanked by inverted repeat sequences and is the center of a 25-kb palindrome bound by two inverted copies of hs3 enhancers (hs3a and hs3b) [14]. hs4 is downstream from the palindrome. Each 3'RR enhancer has weak *in vitro* activity, but a synergistic and potent global effect in transgenes, especially when the palindromic 3'RR architecture is maintained [15]. Recently, sequential activation and distinct functions were reported for distal (hs4) and proximal (hs3a-hs1,2- hs3b) modules within the 3'RR [16]. Transgenic mice have shown that the 3'RR palindrome is of key importance for efficient SHM [17]. Together, the four enhancer elements are sufficient for efficient germline transcription, CSR and Ig transcription [7]. These transcriptional enhancers might

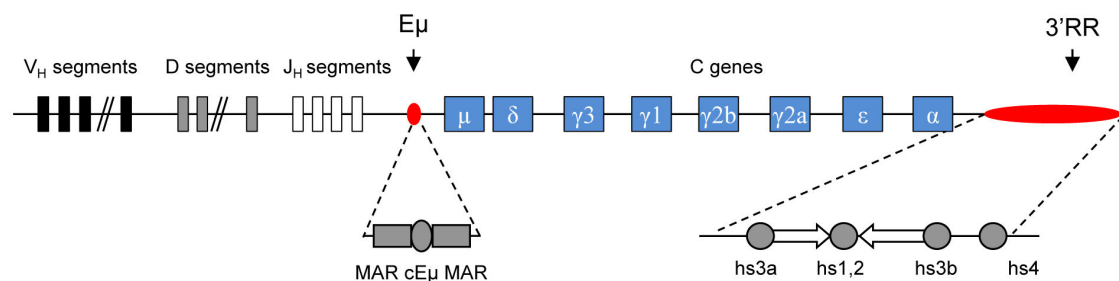
thus play a role during the oncogene deregulation found in several types of mature B-cell lymphomas.

Transgenic and knock-in models of c-myc lymphomagenesis

The *cis*-regulatory E μ element was first suspected to be the c-myc deregulator in BL. However, E μ -c-myc transgenic mice developed immature B-cell lymphomas [18] clearly different from a human BL which has a mature B-cell signature [19]. In human BL, c-myc translocation breakpoints are found in the VDJ (*i.e.*, endemic BL with E μ and 3'RR at the IgH locus) or in the switch μ region (*i.e.*, sporadic BL with E μ deletion and 3'RR at the IgH locus). Thus, a 3'RR was progressively suspected to be a good candidate for oncogene deregulation. Mouse and human 3'RRs share a strong structural homology [13]. Mouse models exploring the 3'RR role in B-cell malignancies should provide interesting data concerning human B-cell lymphoma development.

The first model investigating the role of IgH 3'RR in c-myc deregulation was in knock-in mouse in which 3'RR was inserted 5' to the endogenous c-myc locus (3'RR-myc-knock-in mice) [20]. After ten months, mice developed clonal BL-like B-cell lymphomas with a B220⁺IgM⁺IgD^{low}/

Mouse IgH locus



Human IgH locus

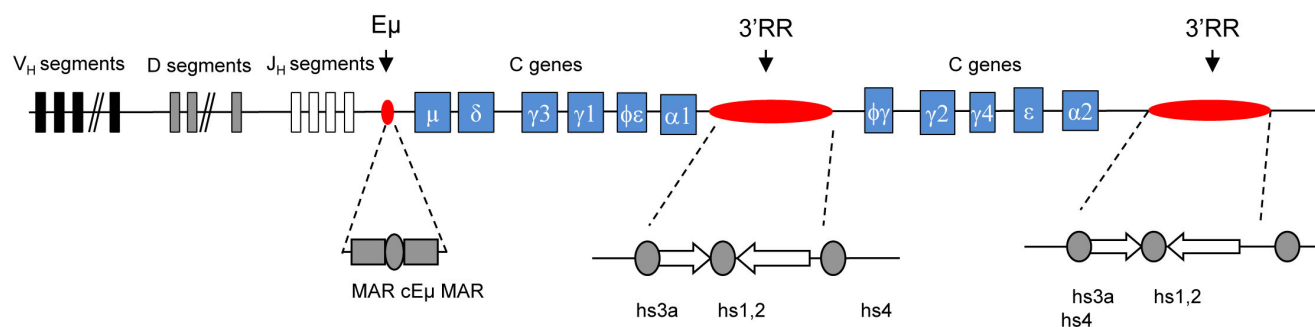


Figure 1: Murine and human IgH locus. Upper panel: Schematic diagrams of the murine IgH locus. Locations of E μ (with its flanking matrix attachment regions, MARs) and 3'RR (encompassing four transcriptional enhancers with flanking inverted repeats) are highlighted. Lower panel: Schematic diagrams of the human IgH locus. Locations of E μ MARs and the two 3'RR (encompassing three transcriptional enhancers with flanking inverted repeats) are highlighted.

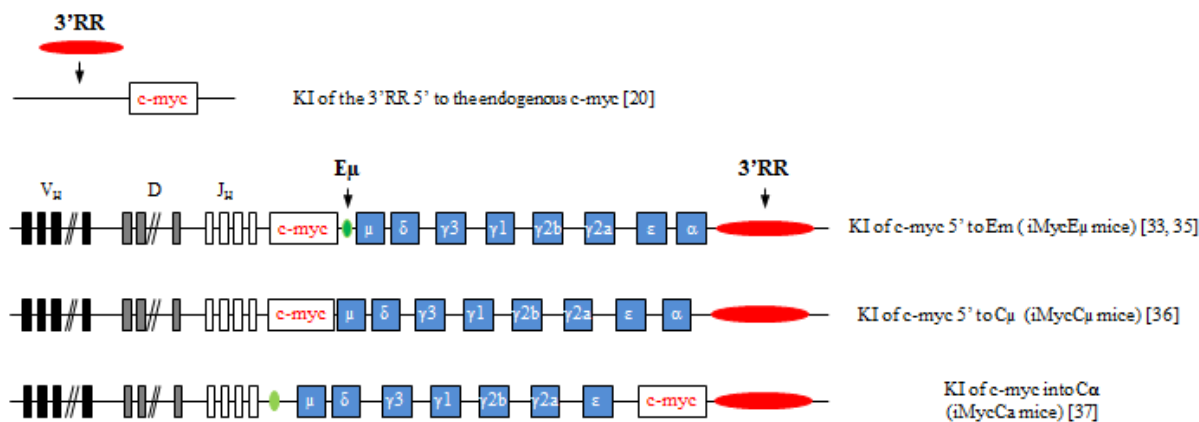
^{neg} phenotype. In these mice, 3'RR stimulated endogenous c-myc transcription triggering both cell proliferation and apoptosis in pre-malignant spleen B-cells. Lymphoma development required multiple "hits" in addition to c-myc deregulation. Mutations in the p53-ARF-Mdm2 apoptotic pathways occurred during lymphoma development. Thus, only recently, has 3'RR been shown to be sufficient for c-myc deregulation leading to BL-like lymphomas.

Results with 3'RR-myc-knock-in mice were confirmed using mice having a c-myc-3'RR transgene [21]. Pre-malignant spleen B-cells from c-myc-3'RR mice proliferated more rapidly in response to mitogen signals and showed a higher apoptosis rate. At twelve weeks, c-myc-3'RR mice developed BL-like lymphomas or diffuse anaplastic plasmacytomas. BL-like lymphomas were B220⁺IgM⁺IgD⁺ with a "starry sky" appearance. Transcriptome analysis indicated alterations in the growth program and Ras-p21 pathway. Compared to 3'RR-

myc-knock-in mice, the c-myc-3'RR mice developed two different phenotypes of B-cell lymphomas with two different kinetics of appearance and lacked mutations for the p53-ARF-Mdm2 apoptotic pathways [21]. In the 3'RR-myc-knock-in model, these differences imply 3'RR targeting the endogenous c-myc locus directly. The 3'RR would affect c-myc locus by destroying with its insertion some positive/negative endogenous *cis*-regulatory elements or by influencing their activation through the 3'RR long range transcriptional activity.

Interestingly, the occurrence of lymphoproliferations in c-myc-3'RR mice was sensitive to genetic background. C57Bl/6 mice developed BL-like lymphomas, while none occurred in a Balb/c background [22] known to have an allelic variant in the coding region of the p16^{INK4a} tumor suppressor gene that produces a protein with impaired activity. The regulation of cell cycle progression is managed by cyclins and cyclin dependent kinases

KI models



Transgenic models

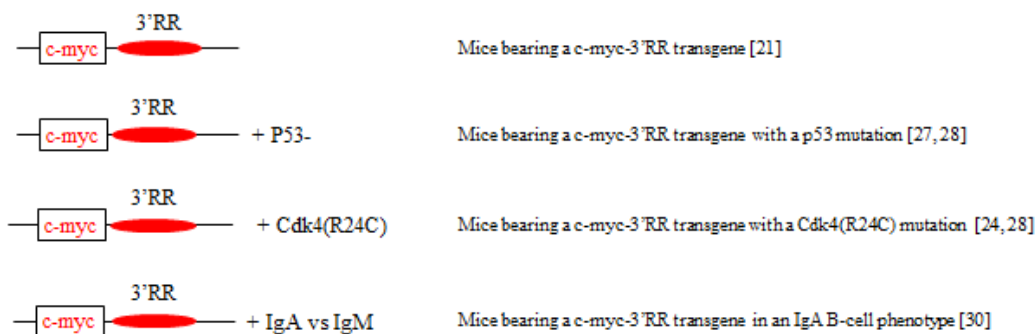


Figure 2: Knock-in and transgenic models of 3'RR induced c-myc lymphomogenesis. A schematic representation of the various knock-in (upper panel) and transgenic models (lower panel) reporting that the 3'RR deregulates c-myc leading to B-cell lymphomogenesis. Bibliographic references are in brackets.

(Cdk). Cdk4 and Cdk6 are chief catalytic subunits of the cyclin D family of proteins that govern G₁/S phase progression. The tumor suppressor protein p16^{INK4a} and all members of the INK4 family bind specifically to Cdk4 or Cdk6 and inhibit the cyclin D-Cdk4 and cyclin D-Cdk6 complexes formation. Breeding Cdk4^{R24C} mice (a knock-in strain expressing a Cdk4 resistant to p16^{INK4a} inhibition and other Ink4 family members [23]) with c-myc-3'RR mice (that developed aggressive BL) led to the development of clonal indolent blastoid MCL-like lymphoma (CD19⁺IgM⁺CD5⁺CD43⁺CD23⁻ cells) in c-myc-3'RR/Cdk4^{R24C} mice [24]. Large amounts of Cdk4/cyclin D1 complexes were the main hallmark of these lymphomas. Although silent in non-malignant B-cells, a defect in the Ink4-Cdk4 checkpoint could contribute to lymphomagenesis in conjunction with additional alterations of cell cycle control, a situation which is reminiscent of the development of human blastoid MCL.

p53 is a transcription factor that triggers growth inhibition and apoptosis [25]. p53 inactivation is the most common feature of human tumors. The frequent loss of p53 function in human lymphomas underscores its critical role in suppressing the emergence of incipient tumors [26]. A genetic anomaly initially restricted to c-myc deregulation clearly selects tumors with a homogeneous high proliferating signature and has no need for additional alteration of apoptotic pathways. Breeding of c-myc-3'RR mice with p53-deficient mice confirmed the hypothesis that early alteration of apoptosis in a model of deregulated proliferation (*i.e.*, 3'RR-driven c-myc overexpression in B-cells) induced tumor onset in a higher number of animals. Furthermore, these double mutant mice developed not only highly proliferative BL but also less proliferative types of lymphomas as observed in human patients where c-myc deregulation frequently occurs in pathologies such as MCL and plasmablastic cell lymphomas (PCL). While c-myc-3'RR mice developed non-activated CD43⁻ BL, a wider pattern of lymphomas occurred in c-myc-3'RR/p53⁻ mice including CD43⁻ BL, CD43⁺ BL, MCL-like lymphoma (IgM⁺CD5⁺CD43⁺CD23⁻ cells) and PCL (IgM^{-low}IgD^{-low}CD138⁺ cells) [27, 28]. This spectrum of tumors provided strong evidence that in the natural progression of lymphomagenesis, an initial defect in apoptosis can endow a 3'RR-mediated deregulation of c-myc to induce the occurrence of various types of mature B-cell lymphomas. This model thus accurately mimics the effect of c-myc translocation as seen in multiple human lymphomas.

Some B-cell lymphomas are associated with IgM or non IgM expression. B-cell receptor (BCR) signaling is essential for B-cell survival and response to antigens. BCR signaling varies not only among B-cell compartments but also among BCR classes. This suggests that different BCR signaling would affect lymphomagenesis. Breeding c-myc-3'RR mice in a genetic background (α 1-knock-in mice) [29] where IgA replaced IgM (IgA inducing stronger

tonic BCR signaling than IgM) led to the generation of more differentiated CD138⁺ and less proliferative B-cell lymphomas [30]. BCR class-specific signals thus affect experimental c-myc-induced lymphomagenesis. The class of the BCR often correlates with the maturity of human B-cell tumors. IgM is thus associated with less differentiated malignancies [31, 32]. IgA tumors in α 1-knock-in-c-myc-3'RR double mutant animals indicated that a class-switched BCR signal resulted in cell transformation with a more differentiated phenotype (and the occurrence of plasma cell lymphoma), then reminiscent of human plasma cell proliferations that overwhelmingly produce class-switched Ig. This could also be pertinent to observations made in patients, where IgM⁺ malignancies are frequently more aggressive than related class-switched proliferations. Finally these results confirm the expression of the 3'RR at the plasma cell stage.

The most convincing data for the essential 3'RR role in c-myc lymphomagenesis were brought by transgenic mice with IgH-c-myc translocations [33-37]. c-myc knock-in in the mouse IgH locus just 5' E μ (iMycE μ mice), modeling human endemic BL, induced B-cell lymphoma development after six months. Lymphomas in iMycE μ mice had alterations in the p19^{Arf}-Mdm2-p53 tumor suppressor axis, a key pathway during c-myc-induced apoptosis [33]. Authors reported complex alterations with overexpressed p19^{Arf} or lost p19^{Arf} due to biallelic deletion of the Ink4a locus associated with overexpression of Mdm2 in some tumors and sometimes elevation of a presumably dysfunctional p53. NF κ B/STAT3/PI3K signaling crosstalk was later demonstrated to maintain c-myc-driven lymphomagenesis in iMycE μ mice [34]. The mouse plasmacytoma T(12;15) translocation is a well-known cancer-associated chromosomal translocation in mice that join c-myc (in chromosome 15) with the IgH locus (in chromosome 12) [38]. iMycE μ mice also mimic the T(12;15) translocation resulting in c-myc activation in murine plasmacytomas and thus also developed plasmacytomas [35]. In iMycE μ mice, c-myc is under transcriptional control of both the 3'RR and E μ . E μ and 3'RR have activation kinetics clearly different with E μ acting in early B-cell development and the 3'RR in mature B-cell stages [2]. The definitive proof of an involvement of the 3'RR in B-cell lymphomagenesis was brought by iMycC μ mice carrying a c-myc knock-in in the IgH locus just 5' of C μ with deletion of E μ . The 3'RR alone (without E μ and/or putative E μ -3'RR transcriptional crosstalk) is sufficient to deregulate c-myc expression in the B-cell lineage [36]. Plasmablastic neoplasms were rare in iMycC μ but markedly increased after breeding with transgenic Kaposi Sarcoma-associated herpes-virus IL6 (vIL6) mice [36]. In this study authors validated their hypothesis that vIL6 mice may be a driver of transformation of B-cells to malignant cells. Finally knock-in insertion of c-myc directly into C α just 5' to the 3'RR (iMycC α mice) produced infrequent plasma cell

neoplasms (about 10%) [37]. In contrast, after breeding with transgenic mice bearing the *bcl-X_L* gene under the transcriptional Ig κ light chain 3' enhancer, these double transgenic mice quickly developed plasma cell tumors. *Bcl-X_L* is a well-known anti-apoptotic molecule and the Ig κ light chain 3' enhancer is of importance to drive *Bcl-X_L* expression specifically in the B-cell compartment from pre-B to mature B-cell stages. Taken altogether these knock-in models carrying *c-myc* at the IgH locus are prone to B-cell neoplasias of various penetrance, kinetics, and fate of knock-in bearing lymphocytes, highlighting the key role of IgH *cis*-regulatory enhancers (especially the 3'RR) for lymphoma progression. They also highlight the need for additional mutations in addition to *c-myc* deregulation to accelerate B-cell lymphoma development and that these "hits" target both proliferative, apoptotic and cytokine pathways.

3'RR knock-out models of *c-myc* lymphomagenesis

To elucidate 3'RR function, mice with genomic mutations were generated. Individual deletion (knock-out mice) of *hs3a* [39], *hs1,2* [39], *hs3b* [40] or *hs4* [41] has no effect on B-cell lymphopoiesis. In contrast deconstruction of the 3'RR palindrome structure [17] or deletion of two [17, 42], three [16] or four [8] of the 3'RR enhancers severely impaired B-cell lymphopoiesis. Mutant 3'RR mice were used in a few number of studies together with *c-myc*. 3'RR deleted mice showed that 3'RR was dispensable for the development of immature pro-B-cell lymphomas related to VDJ recombination-initiated *c-myc* translocations in double *p53/Lig4* deficient mice [43]. 3'RR was not essential for the generation of IgH-*c-myc* translocations in double *p53/Xrcc4* deficient mice. However it had an important role in *c-myc* transcription after IgH-*c-myc* translocation thus leading to mature B-cell tumors [43]. These results are in agreement with the long distance effect of 3'RR on IgH transcription at mature B-cell stages. Transcriptional enhancers of κ and λ light chain loci efficiently deregulate *c-myc*. Mice carrying the *c-myc* gene under the transcriptional control of Ig λ enhancers (Ig λ -*myc* mice) developed BL [44]. Breeding Ig λ -*myc* mice in a 3'RR-deficient background deviated B-cell lymphomagenesis toward less mature B-cell lymphomas most probably through a 3'RR action during B-cell development [45]. Indeed during B-cell development the 3'RR is crucial for μ chain transcription and density of BCR expression at the B-cell membrane [11]. Together results from these 3'RR knock-out models indicate that deletion of 3'RR markedly reduces the development of mature B-cell lymphomas highlighting the key role of this IgH *cis*-regulatory region for lymphoma progression.

Targeting the 3'RR: a promising therapeutic approach for *c-myc* induced B-cell lymphomas

The 3'RR is essential for high-rate Ig transcription [8, 11]. Therefore, it may be a key stimulator of IgH-translocated oncogene transcription. Breakpoints for oncogene translocations are sometimes several hundred kb away from the 3'RR. Data have reported that long-range interactions, through a loop structure, are implicated in both normal and abnormal regulation of 3'RR-induced gene transcription [46-48]. Of interest, physical interactions are also documented in resting and activated B-cells between E μ and 3'RR [46]. This structure facilitates switch-switch synapsis by approaching the switch μ region (proximal to E μ) and a downstream switch region (targeted by the 3'RR). Such loop structure is reported of importance for gene requiring a rapid transcriptional activation [46]. This suggests cooperative transcriptional effects between IgH *cis*-regulatory transcriptional enhancers that may explain why E μ deletion between iMycE μ mice and iMycC μ mice has such an important effect on B-cell lymphoma development [33, 36]. Therefore, as previously reported by us and others [4, 43], 3'RR targeting would in theory provide a potential strategy for the treatment of some mature B-cell lymphomas. Reinforcing this hypothesis, transgenic mice carrying IgH transgenes with the 3'RR (and independently of transgene chromosomal location, length, number and orientation) have been shown to undergo *myc* translocation into the transgene; these translocations generating plasmacytomas [49]. Thus the IgH constant region includes all elements necessary for both *myc* translocation and deregulation. Data also indicate that translocation/knock-in of *c-myc* to another chromosome changes its nuclear localization. In human BL cells the *c-myc* locus is relocalized from the nuclear periphery to the central, perinucleolar position [50]. In this setting, nucleolar proteins such as nucleolin (a polypeptide of 106 KDa constituting a part of the LR1 DNA binding protein which regulates transcription and switch recombination in mammalian B-cells) [51] may play a role in *c-myc* activation along with IgH *cis*-regulatory elements.

Translocations in B-cell lymphomas induce epigenetic changes [52]. This observation provides the opportunity to use new classes of anti-cancer agents, epigenetic drugs (EDs), that target histone acetylation (inhibitors of histone deacetylases, HDACi) and histone methylation (EZH2 inhibitors) to treat several B-cell lymphoid malignancies, such as MCL, FL, BL and others [53]. These drugs gave promising initial results in various clinical trials [54]. For example, preclinical data support the use of HDACi in combination with other antimyeloma agents [55, 56]. Surprisingly, the scientific basis to treat B-cell lymphomas with EZH2i and HDACi is not clear. How EDs act on B-cell lymphoma remain largely speculative. Is it *via* the role of the 3'RR on oncogene

transcription? Data have documented that 3'RR activation and transcription can be down-regulated by several chemicals, including isothiocyanates (known to have anti-carcinogenic properties) [57] and HDACi [58]. Studies have reported, in a model of BL translocations, that the 3'RR vastly remodelled large (up to 450 kb) domains of translocated chromatin through epigenetic mark reprogramming [59]. We recently reported that 3'RR-induced effects are largely mediated through activation of specific epigenetic marks in a 3'RR targeted DNA [10] reinforcing that targeting the IgH 3'RR would be of interest in the down-regulation of oncogene transcription. Moreover, 3'RR absence only weakly impacts chronic inflammatory ascites formation (penetrance, kinetic of development, cellular and pro-/ anti-inflammatory cytokine compositions) onto BALB/c mice in response to pristine [60]. 3'RR-deficient B-cells remain efficient to develop oil granulomas in response to pristine with no differences for granuloma numbers, cellular composition and ability to express mRNA transcripts for several pro- and anti-inflammatory cytokines [61]. Altogether these results suggest a normal role for 3'RR-deficient B-cells in the development of an acute and chronic B-cell-mediated inflammatory response to pristine. These data reinforce the hypothesis which considers 3'RR as an interesting target for anti-lymphoma drug therapy with only low adverse effects on normal inflammatory and immune responses.

CONCLUSIONS

The 3'RR is of key importance for SHM, CSR and μ chain transcription. It follows that it is potentially of key importance as a deregulator for IgH-translocated oncogenes, even when breakpoints are hundreds of thousands bp away from the 3'RR. Long-range interactions through loop chromatin structures are common mechanisms of both normal and abnormal 3'RR-mediated gene transcription. Data have documented interactions between the 3'RR, E μ and the IgH locus in both normal B-cells and lymphomas. Mice transgenic for IgH-c-myc translocations have highlighted the important contribution of 3'RR in the development of mature B-cell lymphomas. Data obtained with these mice are transferable to human lymphomagenesis with respect to the high structural homology between mouse and human 3'RR. Thus, 3'RR targeted inhibition may be a potential therapeutic strategy for mature B-cell lymphoma treatments. Mouse models described herein may be useful tools for both *in vitro* and *in vivo* studies of 3'RR down-regulation treatments. Future studies will be necessary to clarify the rationale for treatment of B-cell lymphomas with HDACi and EZH2i: 1) by studying the biological functions and mechanisms of action of E μ and 3'RR and their cross-talk in the c-myc deregulation during experimental lymphomagenesis; 2) by identifying changes in the epigenome network occurring in lymphoma cells throughout the IgH locus; 3) by *in*

vivo and *in vitro* testing of the role of various HDACi and EZH2i in the development of B-cell lymphomas; 4) by identifying genetic and epigenetic changes occurring in lymphoma cells upon acquisition of drug resistance during ED treatments; and 4) by identifying molecular mechanisms of these changes. Over the past decade convincing demonstrations of the 3'RR contribution to mature c-myc-induced lymphomagenesis have been made using transgenic models. They may become now useful models for the study of treatment of B-cell lymphomas.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Comité d'Orientation de la Recherche Cancérologie du Limousin (CORC:FJA/NP-2015-109), Association pour la Recherche sur le Cancer (PJA 20141201649), Ligue Contre le Cancer (Comité de la Corrèze et Haute Vienne), Agence Nationale de la Recherche (ANR : projet EpiSwitch-3'RR 2016) and "Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud". A. Saintamand was supported by a grant from fondation ARC (DOC20150602943). N. Ghazzaui was supported by a grant from Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique (Lebanon) and the municipality of Kham (Lebanon).

CONFLICTS OF INTEREST

There are no conflicts of interest.

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. Sewastianik T, Prochorec-Sobieszek M, Chapuy B, Juszczynski P. MYC deregulation in lymphoid tumors: molecular mechanisms, clinical consequences and therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1846: 457-467.
4. Saintamand A, Saad F, Denizot Y. 3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy? *Cell Cycle.* 2015; 14: 789-790.
5. 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.
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. Saintamand A, Vincent-Fabert C, Garot A, Rouaud P, Oruc Z, Magnone V, Cogné M, Denizot Y. Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region. *Nature Commun*. 2016; 7: 10730.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Saintamand A, Rouaud P, Saad F, Rios G, Cogné M, Denizot Y. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nature Commun*. 2015; 6: 7084.
 11. 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*. 2015; 6: 4845-4852. doi: 10.18632/oncotarget.3010.
 12. 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.
 13. D'addabbo P, Scascitelli M, Giambra V, Rocchi M, Frezza D. Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1,2 within the palindrome of IgH 3' regulatory region. *BMC Evol Biol*. 2011; 11: 71.
 14. Chauveau C, Cogné M. Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nature Genet*. 1996; 14: 15-16.
 15. Chauveau C, Decourt C, Cogné M. Insertion of the IgH locus 3' regulatory palindrome in expression vectors warrants sure and efficient expression in stable B cell transfectants. *Gene*. 1998; 222: 279-285.
 16. Garot A, Marquet M, Saintamand A, Bender S, Le Noir S, Rouaud P, Carrion C, Oruc Z, Bébin AG, Moreau J, Lebrigand K, Denizot Y, Alt FW et al. Sequential activation and distinct functions for distal and proximal modules within the IgH 3'RR region. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113: 1618-1623.
 17. Saintamand A, Vincent-Fabert C, Garot A, Rouaud P, Oruc Z, Magnone V, Cogné M, Denizot Y. Deciphering the functional importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region. *Nature Commun*. 2016; 7: 10730.
 18. Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander WS, Cory S, Palmiter RD, Brinster RL. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*. 1985; 318: 533-538.
 19. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. 2004; 104: 3009-3020.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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. *Leuk Res*. 2009; 33: e203-e206.
 23. Rane SG, Dubus P, Mettus RV, Galbreath EJ, Boden G, Reddy EP, Barbacid M. Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia. *Nature Genet*. 1999; 22: 44-52.
 24. 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.
 25. Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 331: 851-858.
 26. Martins CP, Brown-Swigart L, Evan GI. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell*. 2006; 127: 1323-1334.
 27. 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.
 28. 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. doi: 10.18632/oncotarget.474.
 29. Duchez S, Amin R, Cogné N, Delpy L, Sirac C, Pascal V, Corthésy B, Cogné M. Premature replacement of mu with alpha immunoglobulin chains impairs lymphopoiesis and mucosal homing but promotes plasma cell maturation. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2010; 107: 3064-3069.
 30. Amin R, Marfak A, Pangault C, Oblet 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; 15: 8995-9006. doi: 10.18632/oncotarget.2297.
31. Ruminy P, Etancelin P, Couronné L, Parmentier F, Rainville V, Mareschal S, Bohers E, Burgot C, Cornic M, Bertrand P, Lenormand B, Picquenot JM, Jardin F et al. The isotype of the BCR as a surrogate for the GCB and ABC molecular subtypes in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2011; 25: 681-688.
 32. Avet-Loiseau H, Garand R, Lode L, Harousseau JL, Bataille R. Translocation t(11;14)(q13;q32) is the hallmark of IgM, IgE, and nonsecretory multiple myeloma variants. *Blood*. 2003; 101: 1570-1571.
 33. 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.
 34. Han SS, Yun H, Son DJ, Tompkins VS, Peng L, Chung ST, Kim JS, Park ES, Janz S. NF-kappaB/STAT3/PI3K signaling crosstalk in iMyc E mu B lymphoma. *Mol Cancer*. 2010; 9: 97.
 35. 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.
 36. Rosean TR, Holman CJ, Tompkins VS, Jing X, Krasowski MD, Rose-John S, Janz S. KSHV-encoded vIL6 collaborates with deregulated c-MYC to drive plasmablastic neoplasm in mice. *Blood Cancer J*. 2016; 6: e398.
 37. Cheung WC, Kim JS, Linden M, Peng L, Van Ness B, Polakiewicz RD, Janz S. Novel targeted deregulation of c-myc cooperates with Bcl-XL to cause plasma cell neoplasms in mice. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1763-1773.
 38. Janz S. Myc translocations in B cell and plasma cell neoplasms. *DNA Repair*. 2006; 5: 1213-1224.
 39. Manis JP, van der Stoep N, Tian M, Ferrini R, Davidson L, Bottaro A, Alt FW. Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J Exp Med*. 1998; 188: 1421-1431.
 40. Bébin AG, Carrion C, Marquet M, Cogné N, Lecardeur S, Cogné M, Pinaud E. In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J Immunol*. 2010; 184: 3710-3717.
 41. 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.
 42. Pinaud E, Khamlichi AA, Le Morvan C, Drouet M, Nalesso V, Le Bert M, Cogné M. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity*. 2001; 15: 187-199.
 43. Gostissa M, Yan CT, Bianco JM, Cogné M, Pinaud E, Alt FW. Long-range oncogenic activation of IgH-c-myc translocations by the IgH 3' regulatory region. *Nature*. 2009; 462: 803-807.
 44. 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 HC 3rd. Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med*. 2000; 192: 1183-1190.
 45. Saad F, Saintamand A, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Igλ-Myc mice. *Oncotarget*. 2015; 6: 20302-20311. doi: 10.18632/oncotarget.3963.
 46. Wuerffel R, Wang L, Grigera F, Manis J, Selsing E, Perlot T, Alt FW, Cogne 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.
 47. Ju Z, Volpi SA, Hassan R, Martinez N, Giannini SL, Gold T, Birshstein BK. Evidence for physical interaction between the immunoglobulin heavy chain variable region and the 3' regulatory region. *J Biol Chem*. 2007; 282: 35169-35178.
 48. Xiang H, Noonan EJ, Wang J, Duan H, Ma L, Michie S, Boxer LM. The immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancers induce Bcl2 deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. *Leukemia*. 2011; 25: 1484-1493.
 49. Spehalski E, Kovalchuk AL, Collins JT, Liang G, Dubois W, Morse HC 3rd, Ferguson DO, Casellas R, Dunnick WA. Oncogenic Myc translocations are independent of chromosomal location and orientation of the immunoglobulin heavy chain locus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: 13728-13732.
 50. Allinne J, Pichugin A, Iarovaia O, Klibi M, Barat A, Zlotek-Zlotkiewicz E, Markozashvili D, Petrova N, Camara-Clayette V, Ioudinkova E, Wiels J, Razin SV, Ribrag V et al. Perinucleolar relocalization and nucleolin as crucial events in the transcriptional activation of key genes in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2014; 123: 2044-2053.
 51. Brys A, Maizels N. LR1 regulates c-myc transcription in B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 4915-4949.
 52. Lindström MS, Wiman KG. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12: 381-387.
 53. Berg T, Thoene S, Yap D, Wee T, Schoeler N, Rosten P, Lim E, Bilenky M, Mungall AJ, Oellerich T, Lee S, Lai CK, Umlandt P, et al. A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb-group gene EZH2 in lymphomagenesis. *Blood*. 2014; 123: 3914-3924.
 54. Morschhauser F, Terriou L, Coiffier B, Bachy E, Varga A, Kloos I, Lelièvre H, Sarry AL, Depil S, Ribrag V. Phase 1 study of the oral histone deacetylase inhibitor abexinostat in patients with Hodgkin lymphoma, non-Hodgkin lymphoma, or chronic lymphocytic leukaemia. *Invest. New drugs*. 2015; 33: 423-431.
 55. Kaufman JL, Fabre C, Lonial S, Richardson PG. Histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma: rationale

- and evidence for their use in combination therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2013; 13: 370-376.
56. Richardson PG, Mitsiades CS, Laubach JP, Hajek R, Spicka I, Dimopoulos MA, Moreau P, Siegel DS, Jagannath S, Anderson KC. Preclinical data and early clinical experience supporting the use of histone deacetylase inhibitors in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2013; 37: 829-837.
 57. Henseler RA, Romer EJ, Sulentic CEW. Diverse chemicals including aryl hydrocarbon receptor ligands modulate transcriptional activity of the 3' immunoglobulin heavy chain regulatory region. *Toxicology.* 2009; 261: 9-18.
 58. Lu ZP, Ju ZL, Shi GY, Zhang JW, Sun J. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 330: 204-209.
 59. Kovalchuk AL, Ansarah-Sobrinho C, Hakim O, Resch W, Tolarová H, Dubois W, Yamane A, Takizawa M, Klein I, Hager GL, Morse HC 3rd, Potter M, Nussenzweig MC et al. Mouse model of endemic Burkitt translocations reveals the long-range boundaries of Ig-mediated oncogene deregulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109: 10972-10977.
 60. 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. doi: 10.18632/oncoscience.81.
 61. Ghazzoui N, Saintamand A, Issaoui H, Saad F, Denizot Y. Efficient role of IgH 3' regulatory region deficient B-cells in the development of oil granulomas. *Oncotarget.* 2016; 7: 38741-38749. doi: 10.18632/oncotarget.9588.

Objectifs et Résultats

1. Coopérations transcriptionnelles entre les enhancers E μ et 3'RR du locus IgH.

Pour comprendre le rôle des *enhancers* du locus IgH sur un oncogène transloqué, il nous fallait analyser quel était leur impact sur la transcription de ce locus, leur cinétique d'action et leurs éventuelles coopérations transcriptionnelles.

De vieilles études avaient montré qu'un transgène E μ -GFP s'exprimait aux stades pro-B/pré-B (Guglielmi et al., 2005) alors qu'un transgène GFP-3'RR le faisait des stades B immatures à matures (Guglielmi et al., 2003b). Nous avons revisité ces études avec les technologies de maintenant.

Pour ce faire nous avons utilisé 3 lignées murines: une lignée sauvage ; une lignée déficiente pour l'activateur transcriptionnel E μ et une déficiente pour la 3'RR. Les résultats de ces études ont fait l'objet des 3 publications suivantes (*contribution équivalente)

Article 1

E μ and 3'RR IgH enhancers show hierarchic unilateral dependence in mature B-cells.

SAINTAMAND A, VINCENT-FABERT C, MARQUET M, GHAZZAUI N, MAGNONE V, PINAUD E, COGNE M, DENIZOT Y.

Scientific Report 2017; 7: 442.

Article 2

3'RR and 5'E μ immunoglobulin heavy chain enhancers are independent engines of locus remodelling.

GHAZZAUI N*, ISSAOUI H*, BOYER F, MARTIN OA, SAINTAMAND A, DENIZOT Y.

Cellular and Molecular Immunology (sous presse).

Article 3

Trans-silencing effect of the 3'RR immunoglobulin heavy chain enhancer on Igk transcription at the pro-B cell stage.

GHAZZAUIN*, ISSAOUI H*, MARTIN OA, SAINTAMAND A, COOK-MOREAU J, DENIZOT Y, BOYER F.

Cellular and Molecular Immunology (sous presse).

Les analyses transcriptomiques (par RNAseq) et de remodelage chromatinien (par ChIP) au locus IgH montrent, qu'au stade B mature, seule la 3'RR est impliquée dans la transcription des gènes constants. A ce stade, E μ est sans influence. Sa délétion ne perturbe pas la transcription du locus IgH. Enfin, l'activation de la 3'RR est révélée par la mise en évidence d'eRNA (enhancer RNA) dont la présence ne nécessite pas un E μ fonctionnel.

Les expériences au stade pro-B ont nécessité le développement d'animaux portant les délétions d'E μ ou de la 3'RR dans un fond génétique déficient pour Rag (blocage de la maturation B dès les recombinaisons DJ). Au stade pro-B, la délétion de l'activateur transcriptionnel E μ se traduit par une baisse de la transcription sens autour des segments J_H et C μ (transcrits μ o partant de l'élément DQ52 et I μ partant de E μ) confirmant l'activité et le rôle de cet élément aux stades immatures de la lymphopoïèse B. Au stade pro-B, aucun eRNA de la 3'RR n'est détectable montrant son absence d'effet transcriptionnel. Très curieusement, sa délétion se traduit par l'apparition d'une très forte transcription anti-sens de segments D et J révélant un mystérieux effet « silencer » de la 3'RR au stade pro-B (déjà décrit par Braika et al., 2015).

L'analyse des données RNAseq, sur des souris déficientes pour la 3'RR, a révélé un autre résultat surprenant : un effet *silencer* en *trans* de celle-ci sur le locus Ig κ (mais pas Ig λ). Des interactions physiques entre les chromosomes portant les locus IgH et Ig κ avaient déjà été mises en évidence. Au stade pré-B, le locus Ig κ se rapproche du locus IgH. Les activateurs transcriptionnels κ jouent alors un rôle *silencer* pour l'exclusion allélique d'un des deux chromosomes IgH. Nos résultats sont, à notre connaissance, la première mise en évidence d'un effet *silencer* en *trans* de la 3'RR. Il est intéressant de noter que cet effet n'est pas observable

dans les LB matures (activées ou non) ni au locus $Ig\lambda$. Il existe des différences notables entre $Ig\kappa$ et $Ig\lambda$. Ainsi $Ig\kappa$ s'active en premier lieu. $Ig\lambda$ ne sera utilisé que si les recombinaisons sur $Ig\kappa$ sont infructueuses. On peut émettre l'hypothèse que le *silencing* de la 3'RR sur le locus κ au stade pro-B est nécessaire pour bloquer temporairement son activation jusqu'au stade pré-B et ainsi éviter l'expression d'une chaîne légère avant la création d'une chaîne lourde fonctionnelle.

L'ensemble de nos résultats confirme l'hypothèse d'un rôle séquentiel des éléments $E\mu$ et 3'RR sur la transcription oncogénique au locus IgH : $E\mu$ lors des stades précoces et 3'RR lors des stades tardifs. Nos résultats RNAseq sont en concordance avec une ancienne publication rapportant l'expression d'un transgène $E\mu$ -GFP-3'RR du stade pro-B au stade B mature (Guglielmi et al., 2003a).

Perspectives

Le mode d'action de l'effet « *silencer* » de la 3'RR sur la transcription DJ et le locus $Ig\kappa$, au stade pro-B, est encore totalement énigmatique. On peut émettre l'hypothèse de la séquestration, par la 3'RR, de divers facteurs nucléaires impliqués dans la transcription des segments V, D et J. Celle-ci doit être précisément régulée pour éviter qu'elle ne se déroule de façon anarchique dans les cellules non B. Elle doit l'être également pour permettre la séquence : synthèse de la chaîne lourde puis synthèse de la chaîne légère, nécessaire à la maturation du LB. Il est évident que la résolution de ce mécanisme est un challenge excitant pour parfaire notre compréhension des recombinaisons V(D)J et des étapes initiales de la lymphopoïèse B.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

E_{μ} and 3'RR IgH enhancers show hierarchic unilateral dependence in mature B-cells

A. Saintamand^{1,3}, C. Vincent-Fabert¹, M. Marquet¹, N. Ghazzaoui¹, V. Magnone², E. Pinaud¹, M. Cogné¹ & Y. Denizot¹

Enhancer and super-enhancers are master regulators of cell fate. While they act at long-distances on adjacent genes, it is unclear whether they also act on one another. The immunoglobulin heavy chain (IgH) locus is unique in carrying two super-enhancers at both ends of the constant gene cluster: the 5' E_{μ} super-enhancer promotes VDJ recombination during the earliest steps of B-cell ontogeny while the 3' regulatory region (3'RR) is essential for late differentiation. Since they carry functional synergies in mature B-cells and physically interact during IgH locus DNA looping, we investigated if they were independent engines of locus remodelling or if their function was more intimately intermingled, their optimal activation then requiring physical contact with each other. Analysis of chromatin marks, enhancer RNA transcription and accessibility in E_{μ} - and 3'RR-deficient mice show, in mature activated B-cells, an unilateral dependence of this pair of enhancers: while the 3'RR acts in autonomy, E_{μ} in contrast likely falls under control of the 3'RR.

Super-enhancers (SEs) are master regulators of cell fate which differ from basic enhancers by their ten-fold higher load of chromatin marks, their binding of mediator, their long length and their impact on nuclear organisation^{1,2}. The immunoglobulin heavy chain (IgH) locus undergoes multiple changes along B-cell differentiation, affecting transcription and accessibility for V(D)J recombination, somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR)³. The IgH locus is somehow unique in carrying two SEs, E_{μ} and the 3' regulatory region (3'RR) at both ends of the constant gene cluster, which control locus remodelling along B-cell differentiation³. In mature B-cells, the IgH locus assumes an enigmatic loop conformation in which these two SEs are brought in close proximity despite their 200 kb distance on the chromosome (Fig. 1a)⁴. Two mechanistic hypotheses may explain the function of this 3D chromatin structure: a bidirectional crosstalk between these two SEs allowing reciprocal activation, or a simple chromatin arch assembly that brings enhancers, promoters and switch (S) regions into close proximity to facilitate transcription, accumulation of RNA pol II, AID targeting and S junction machinery. In a third hypothesis, the E_{μ} -3'RR interaction might lack any mechanistic role by passively witness transitional links, with E_{μ} on one side promoting S_{μ} - S_x synapsis and the 3'RR stimulating the I_x - S_x transcriptional unit. We investigated if these two IgH SEs were independent engines of locus remodelling simply combining their proper actions or if their functions were more strongly intermingled and required physical contact with each other. SEs are potent clusters of transcriptional enhancers and regulate the expression of key cell lineage specific genes. The 5' E_{μ} SE has clearly such a role in early developmental stages of B-cells through its key role on V(D)J recombination. Since 5' E_{μ} may be considered as a SE only in pro-B/pre-B-cells but not in mature ones, we used the qualifier of enhancer to name 5' E_{μ} at the mature B-cell stage during this study.

Results

E_{μ} and CSR. During CSR, a chromatin loop is found with E_{μ} and 3'RR in close proximity^{3,4}. It is generally accepted that E_{μ} is dispensable for CSR, although some studies suggest that its deletion impacts at minor levels CSR efficiency⁵⁻⁷. In this study, flow cytometry analysis shows normal proportion of E_{μ} -deficient $\gamma 3$ - and $\gamma 2b$ -expressing B-cells in response to LPS stimulation (Fig. 1b and c). In contrast, the significant decrease of E_{μ} -deficient $\gamma 1$ -expressing B-cells in response to LPS + IL4 (Fig. 1c and d) could mostly be attributed to the lack of follicular

¹CNRS UMR 7276, CRIBL, Université de Limoges, Limoges, France. ²CNRS et Université de Nice Sophia Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR 6097, Sophia, Antipolis, France. ³Present address: INSERM U1236, Université Rennes 1, Rennes, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.S. (email: alexis.saintamand@live.fr) or Y.D. (email: yves.denizot@unilim.fr)

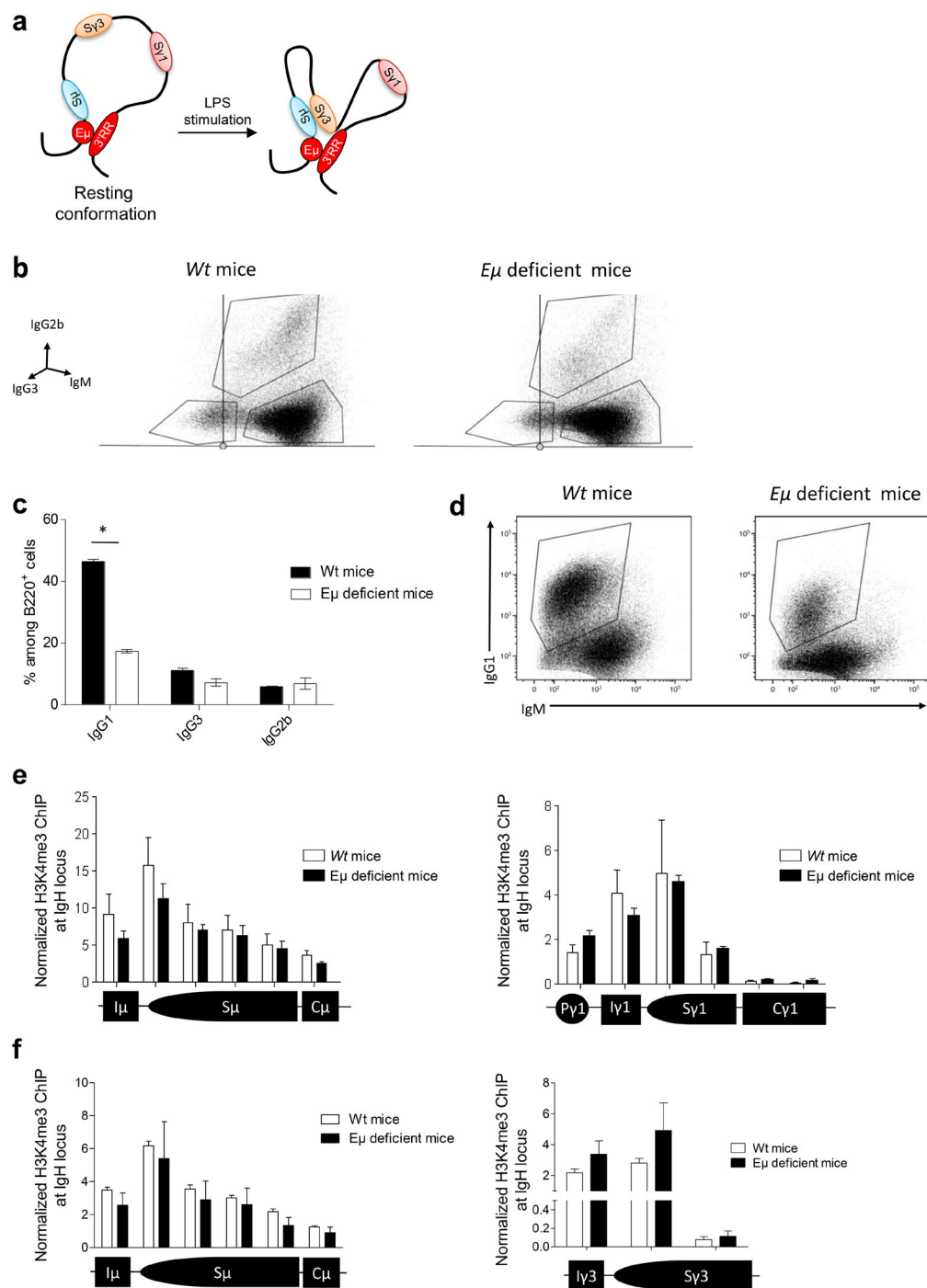


Figure 1. E_{μ} and CSR. (a) Schematic 3D conformation of the IgH locus during LPS-induced CSR. 3C experiments indicated that E_{μ} and the 3'RR are in close proximity in resting B cells. After appropriate stimulation the activated S acceptor region gets closer to the S_{μ} donor region. Adapted from Wuerffel *et al.*⁴ (b) Flow cytometry analysis of IgG₃ and IgG_{2b} CSR in E_{μ} -deficient B-cells. Cells were stimulated 4 days with LPS. Cells were labelled with anti-B220-BV421, anti-IgG₃-FITC, anti-IgG_{2b}-PE and anti-IgM-PC7 antibodies. Cells were gated on B220⁺ B-cells. One representative experiment out of four is shown. (c) Quantitative analysis of IgG₁, IgG₃ and IgG_{2b} CSR. Results are reported as mean \pm SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$, Mann-Whitney *U*-test. (d) Flow cytometry analysis of IgG₁ CSR in E_{μ} -deficient B-cells. Cells were stimulated 4 days with LPS + IL-4. Cells were labelled with anti-B220-BV421, anti-IgG₁-PE and anti-IgM-PC7 antibodies. Cells were gated on B220⁺ B-cells. One representative experiment out of four is shown. (e) H3K4me3 epigenetic mark in S_{μ} and $S_{\gamma 1}$ during IgG₁ CSR ChIP assays were performed with CD43⁻ splenic B-cells from E_{μ} -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 SEM of 3 independent experiments with 2 mice. (f) H3K4me3 epigenetic mark in S_{μ} and $S_{\gamma 3}$ during IgG₃ CSR. Cells were stimulated with LPS for 2 days. Same protocol as in part E.

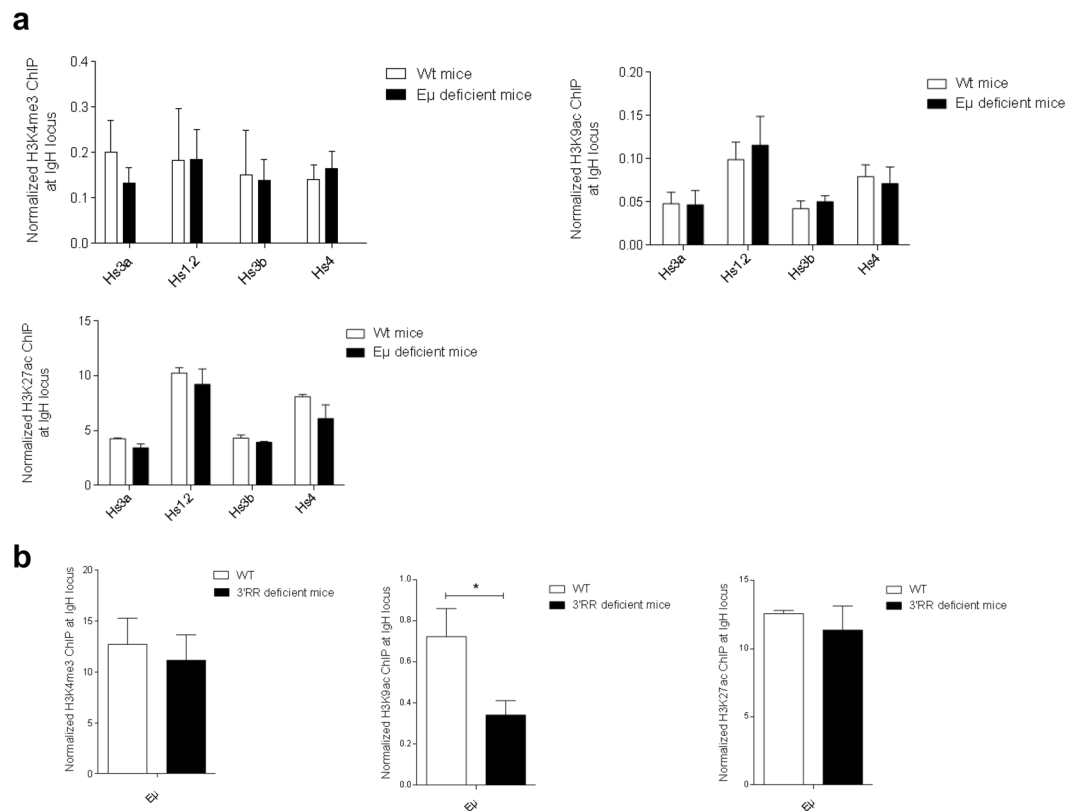


Figure 2. Epigenetic marks in E_{μ} and 3'RR during CSR. **(a)** H3K4me3, H3K9ac and H3K27ac epigenetic marks in the four enhancers (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) of the 3'RR in LPS-stimulated B-cells of E_{μ} -deficient and *wt* mice. Cells were stimulated with 5 μ g/ml LPS for 2 days. Data are the means \pm SEM of 3 independent experiments with 2 mice. **(b)** H3K4me3, H3K9ac and H3K27ac epigenetic marks in E_{μ} in LPS-stimulated B-cells of 3'RR-deficient and *wt* mice. Same experimental protocol as in part **(a)**. Data are the means \pm SEM of 3 independent experiments with 2 mice. * $p < 0.05$ (Mann-Whitney *U*-test).

B-cells previously reported in this model⁷. These results are in accordance with the lowered serum IgG₁ levels but normal IgG₃/IgG_{2b} levels in this model⁷. Specific epigenetic mark enrichment in S regions is a prerequisite for CSR^{8,9}. During CSR, the 3'RR SE fosters H3K4me3 histone modifications in the S acceptor but not S μ donor region¹⁰, suggesting another *cis*-transcriptional enhancer for this role. This role is not devolved to E_{μ} since its deletion did not affect H3K4me3 histone modifications in S μ and S γ_1 in response to LPS + IL-4 stimulation (Fig. 1e) nor in S μ and S γ_3 in response to LPS stimulation (Fig. 1f). Altogether, these data indicate that the E_{μ} enhancer is mostly dispensable for CSR and did not poise S μ for CSR. The *cis*-transcriptional enhancer that poised S μ for CSR is currently unknown. One might suggest the enigmatic transcriptional enhancer located between C γ_1 and C γ_2b found to interact with both E_{μ} and 3'RR in pro-B cells^{2,11,12}.

E_{μ} , 3'RR and respective epigenetic marks. Epigenetic changes in E_{μ} and 3'RR are of importance during CSR¹³. In this study we have focussed on H3K4me3, H3K9ac and H3K27ac epigenetic marks that are associated with active regulatory regions¹⁴. Lack of the E_{μ} enhancer did not affect H3K4me3, H3K9ac and H3K27ac epigenetic marks in the four 3'RR transcriptional enhancers (hs3a; hs1,2; hs3b; hs4) during LPS-induced B-cell CSR (Fig. 2a). In turn, if deletion of the 3'RR SE had no effect on H3K4me3 and H3K27ac marks of E_{μ} (Fig. 2b), a significant decrease was found for H3K9ac. This difference between epigenetic marks may be explained by the proposed model of sequential histone modifications. Indeed, several studies suggest that tri-methylation of H3K4 is the earliest modification, and that H3K4me3 then facilitate H3 acetylation and thus establishment of chromatin openness. All these marks together may then positively regulate transcription and enhancer activation^{15,16}. At the mature B-cell stage, data suggest the lack of E_{μ} -dependence for the 3'RR SE during CSR, and the influence of the 3'RR on the E_{μ} enhancer, a result that fits well with their different kinetics of activation, *i.e.*, at the immature and mature B-cell stages for E_{μ} and 3'RR, respectively³.

Mutual activation of transcription of E_{μ} and 3'RR SEs. The 3'RR SE controls CSR by acting on germline transcription and histone modifications^{8,17}, that are hallmarks of CSR accessibility. We investigated the effect of the lack of the E_{μ} enhancer or of the 3'RR SE on IgH constant gene transcription units (C_H) in response to LPS-induced stimulation *in vitro*. RNAseq experiments showed that, except for C μ , C_H sense and antisense transcripts were dramatically reduced in 3'RR-deficient mice (Fig. 3a and Supplementary Figs 1–3). In contrast, E_{μ} deletion had no effect on C_H transcription at the IgH locus. RNAseq data are presented in a quantitative way

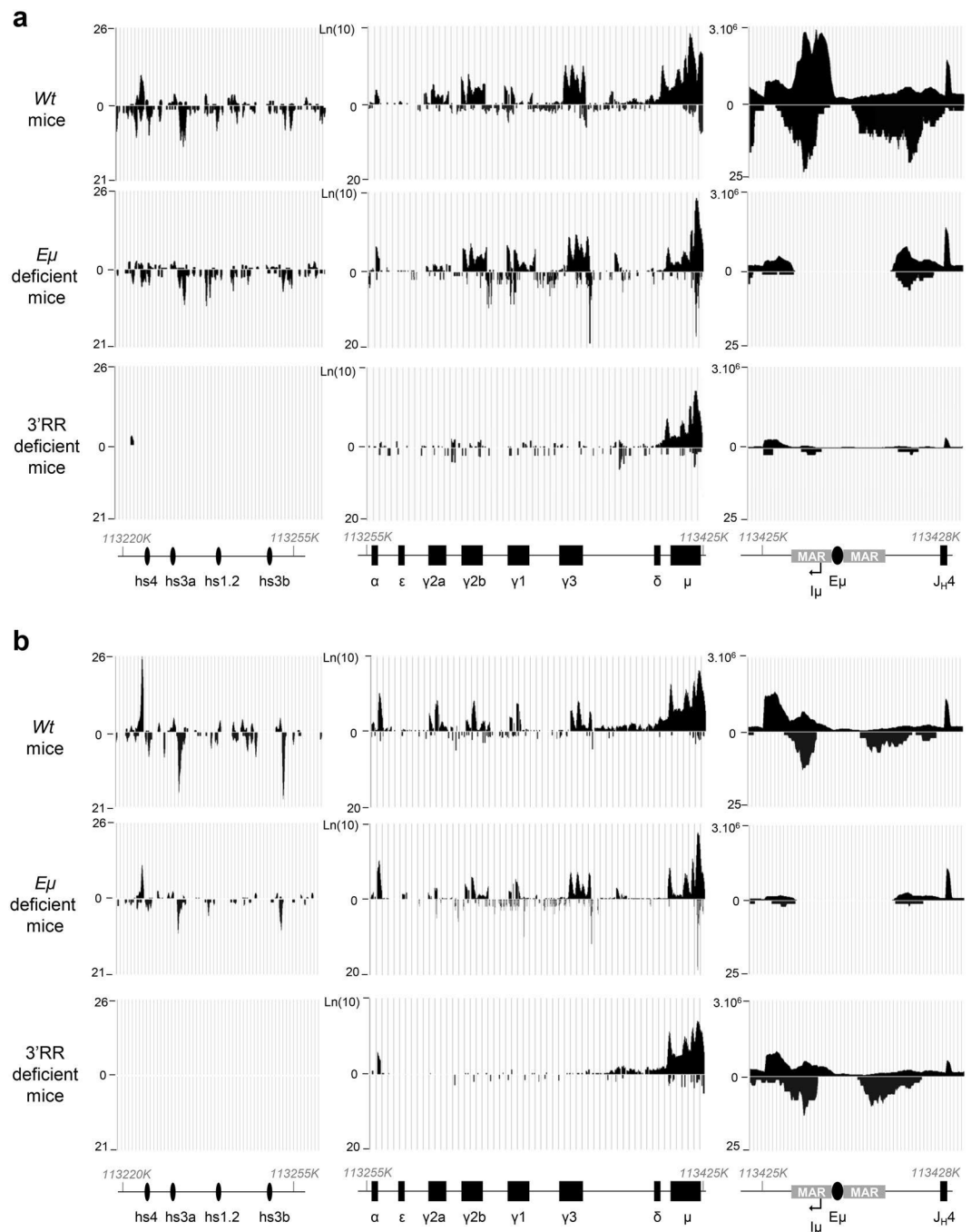


Figure 3. Influence of E_{μ} and 3'RR on IgH transcription during CSR. **(a)** IgH transcription on LPS-stimulated B-cells of *wt*, E_{μ} -deficient and 3'RR-deficient mice. CD43-depleted splenocytes were cultured for 2 days with 5 μ g LPS. RNAseq experiments were done after depletion of rRNA. Data are the mean of two independent experiments with 3 mice per genotype. **(b)** IgH transcription on resting B-cells of *wt*, E_{μ} -deficient and 3'RR-deficient mice. RNAseq experiments were done with CD43-depleted splenocytes after depletion of rRNA. Data are the mean of two independent experiments with 3 mice per genotype. Precise locations of I_{μ} , S_{μ} , C_{μ} , C_{δ} , $I_{\gamma 3}$, $S_{\gamma 3}$, $I_{\gamma 2b}$ and $S_{\gamma 2b}$ are reported in Supplementary Figs 1–3.

with statistics in the Supplementary Fig. 4. Non coding RNAs (ncRNAs) play an important role in the targeting of the CSR machinery and contribute to chromosomal looping^{10,18}. Among these ncRNAs, enhancer RNA (eRNA) are transcribed from DNA sequences of enhancer including the 3'RR and contribute to their enhancer function^{19,20}, and chromosomal looping⁴. RNAseq experiments did not highlight any effect of E_{μ} deletion on both sense and antisense 3'RR eRNA levels (Fig. 2a). In contrast both sense and antisense transcription around the E_{μ} enhancer were consistently lowered in 3'RR-deficient activated B-cells. This decrease is reminiscent of the notable effect of the 3'RR SE deletion on μ transcription evidenced with quantitative PCR in resting mature B-cells²¹. Physical E_{μ} -3'RR interactions were also documented in resting B-cells⁴. RNAseq data comparing splenic

resting B-cells indicate that enhancer activity was, at this stage, already dominated by the 3'RR: while E_{μ} deletion showed no obvious effect on C_H transcription and 3'RR eRNAs, the 3'RR deletion does not modify E_{μ} eRNA but still decreases μ transcripts and abrogates basal transcription of all downstream C_H (Fig. 2b). This confirmed a passive role for E_{μ} at the resting stage while H chain production originated from pV_H mostly rely on 3'RR, and more precisely on hs4²².

Discussion

Studies highlighted different roles and kinetics of activation for IgH SEs during B-cell development. The E_{μ} SE regulates V(D)J recombination in pro-B cells^{6,7}, but is not crucial for SHM and CSR in mature B-cells²³. The 3'RR SE regulates SHM²⁴, and conventional CSR in mature B-cells^{10,25,26}, but is dispensable for V(D)J recombination²⁷. GFP transgenic mice reported that the E_{μ} SE is active at pro-B/pre-B cell stages²⁸, while the 3'RR SE is active at immature/mature B-cell stages²⁹. Despite different roles and kinetics, the IgH locus assumes in resting B-cells and CSR an enigmatic loop conformation with the E_{μ} enhancer and the 3'RR SE in close proximity⁴, suggesting a potential transcriptional cross-talk between these two enhancer entities. Present results strongly suggest that cross-talk is unidirectional. The 3'RR SE stands as a fully autonomous module in mature B-cells. The E_{μ} enhancer by contrast appears mostly dispensable at this stage, its deletion neither abrogating CSR-required sense/antisense germline transcription or 3'RR SE eRNA expression and activation-associated epigenetic mark enrichment. If the E_{μ} enhancer has no role on 3'RR activation during CSR, it itself shows at least partial 3'RR-dependence. Deletion of the 3'RR SE impacts E_{μ} H3K9ac activation-associated epigenetic marks and sense/anti-sense eRNA transcription.

During CSR the IgH locus assumes a loop conformation. While this conformation has obviously a major interest to simultaneously bring enhancer, SE, S regions and promoters into close proximity, our data suggest another unknown functional role, which is to place E_{μ} under the authority of the 3'RR SE. The $E_{\mu}/S_{\mu}/S_x/3'RR$ hub might have several successive purposes to facilitate CSR. This hub brings the S_x acceptor region in close proximity to the 3'RR SE, allowing for its efficient activation by acting notably on transcription and AID targeting¹⁰. It supports physical/functional interactions between 3'RR elements hereby building their synergy³, and finally facilitates S_{μ} - S_x synapsis, increasing the probability of a legitimate junction between donor and acceptor S regions and, in the meantime, reducing the risk of potentially oncogenic translocation^{30–32}. Previously reported phenotypes of E_{μ} - and 3'RR-deficient mice, now completed by the present study, show that both IgH enhancers can behave as completely autonomous elements with regards to chromatin marks, eRNA transcription and accessibility, with E_{μ} solely controlling early rearrangements of immature B-cells, and the 3'RR being both necessary and sufficient for late B-cell remodelling events. However in mature B-cells, this ends with E_{μ} falling under the control of the 3'RR SE and then undergoing 3'RR-dependent transcription and chromatin remodelling as almost all basic promoters of the locus. Finally, three SEs have been reported in pro-B cells: E_{μ} , 3'RR and an enigmatic region between $C_{\mu 1}$ and $C_{\mu 2}$ ^{2,11,12}. Despite that 3'RR has little role on V(D)J recombination except for silencing early transcription in pro-B cells³³, investigation of the cross-talk between these three SEs in pro-B cells would be of interest to reinforce our knowledge of their role at the immature B-cell maturation stage.

Material and Methods

Mouse. 129 *wt* mice (from Charles Rivers Laboratories, France), E_{μ} MAR-deficient mice⁷, and 3'RR-deficient mice²⁵ were used. E_{μ} MAR-deficient mice and 3'RR-deficient mice were in a 129 background. 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 B-cell activation. Single-cell suspensions of CD43⁻ spleen cells of *wt*, E_{μ} MAR-deficient mice and 3'RR-deficient mice (8–12 week old, male and female) were cultured at 1×10^6 cells per ml in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum with 5 μ g per ml LPS with or without 20 ng/ml IL-4. Two days LPS-stimulated cells were used for RNAseq and $S_{\mu}/S_{\gamma 3}$ ChIP experiments. Two days LPS + IL4 stimulated cells were then used for $S_{\mu}/S_{\gamma 1}$ ChIP experiments. Four days LPS- and LPS + IL4 stimulated cells were used for $\gamma 3$, $\gamma 2b$ and $\gamma 1$ CSR flow cytometry analysis, respectively.

Flow cytometry analysis. Cultured splenic B-cells were labelled with anti-B220-BV421, anti-IgG₁-PE, anti-IgG₃-FITC, anti-IgG_{2b}-PE and anti-IgM-PC7 antibodies for 30 min at 4 °C. Labelled cells were analyzed on a Fortessa LSR2 (Beckman Coulter) with Kaluza.

ChIP experiments. ChIP experiments were done on LPS- and LPS + IL4 stimulated CD43⁻ spleen cells as previously described¹⁰. In brief, 20×10^6 B-cells were cross-linked at room temperature for 15 min in 15 ml PBS with 1% formaldehyde. The reaction was quenched with 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 50 ml of 50% protein A/G slurry (0.2 mg per ml sheared salmon sperm DNA, 0.5 mg per ml BSA, and 50% protein A/G; Sigma). 1×10^6 cell equivalents were saved as input, and 10×10^6 cell equivalents were incubated overnight with anti-H3K4me3, anti-H3K9ac, anti-H3K27ac or control antibodies. Immune complexes were precipitated by the addition of protein A/G. Cross-linking was reversed by overnight incubation (70 °C) in TE buffer with 0.02% SDS and chromatin was phenol/chloroform extracted. Anti-H3K4me3 and anti-H3K9ac were obtained from Millipore (ref: 07473 and 06942) and anti-H3K27ac was obtained from Abcam (clone ab5131). PCR probes were the following: E_{μ} -forward: GGGAGTGAGGCTCTCTCATA; E_{μ} -reverse: ACCACAGCTACAAGTTTACCTA; hs3a-forward: GGGTAGGGCAGGGATGCTCACAT; hs3a-reverse: GCTCTGGTTTGGGGC ACCTGTGC; hs1,2-forward: AGCATAGGCCACTGGGACTGG; hs1,2-reverse:

CTCTCA CTTCCCTGGGGTGT; hs3b-forward: TGGTTTGGGGCACCTGTGCTGAG; hs3b-reverse: GGGTAGGGCAGGGATGTTACAT; hs4-forward: CCATGGGACTGAAAC TCAGGGAACAGAAC; hs4-reverse: CTCTGTGACTCGTCCTTAGG. PCR probes for S_{μ} , C_{μ} , $S_{\gamma 1}$, $C_{\gamma 1}$, $S_{\gamma 3}$ and $C_{\gamma 3}$ have been reported in a previous study¹⁰.

RNAseq experiments. CD43⁻ splenocytes were obtained from 4 *wt*, 4 3'RR-deficient mice and 4 E_{μ} MAR-deficient mice before and after 48 h of *in vitro* stimulation (1×10^6 cells per ml in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum) with 5 μ g per ml LPS. RNA was extracted using miRNeasy kit from QIAGEN, according to the manufacturer instructions. Two pooled RNA (with two samples) were obtained for each genotype. RNA libraries were obtained using TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold (Illumina), according to the manufacturer instruction. Libraries were sequenced on a NextSeq500 sequencer, using NextSeq 500/550 High Output Kit (Illumina). Illumina NextSeq500 paired-end 2×150 nt reads were mapped with STAR release v2.4.0a versus mm10 with gene model from Ensembl release 77 with default parameters. The long length of the reads allowed for their precise mapping on switch regions, previously reported as error prone with shorter reads due to the highly repetitive structure of these sequences³⁴. Quantification of genes was then performed using feature Counts release subread-1.4.6-p1-Linux-x86_64 with “-primary -g gene_name -p -s 1 -M” options based on Ensembl GTF release 77 annotations.

Accession number. Data were deposited in Gene Expression Omnibus under the accession number GSE90760.

References

1. Qian, J. *et al.* B cell super-enhancers and regulatory clusters recruit AID tumorigenic activity. *Cell* **159**, 1524–1537 (2014).
2. Whyte, W. A. *et al.* Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* **153**, 307–319 (2013).
3. Pinaud, E. *et al.* The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol.* **110**, 27–70 (2011).
4. 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).
5. Sakai, E., Bottaro, A. & Alt, W. The Ig heavy chain intronic enhancer core region is necessary and sufficient to promote efficient class switch recombination. *Int Immunol.* **11**, 1709–1713 (1999).
6. 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).
7. Marquet, M. *et al.* The E_{μ} 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).
8. Li, G. *et al.* Combinatorial H3K9acS10ph histone modification in IgH locus S regions targets 14-3-3 adaptors and AID to specify antibody class-switch DNA recombination. *Cell Rep.* **5**, 702–714 (2013).
9. Vaidyanathan, B. & Chaudhuri, J. Epigenetic codes programing class switch recombination. *Front Immunol.* **6**, 405 (2015).
10. Saintamand, A., Rouaud, P., Saad, F., Rios, G., Cogné, M. & Denizot, Y. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nature Commun.* **6**, 7084 (2015).
11. Medvedovic, J. *et al.* 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 (2013).
12. Predeus, A. V. *et al.* Targeted chromatin profiling reveals novel enhancers in IgH and IgL chain loci. *J Immunol.* **192**, 1064–1070 (2014).
13. Zan, H. & Casali, P. Epigenetics of peripheral B-cell differentiation and the antibody response. *Front Immunol.* **6**, 631 (2015).
14. Ernst, J. *et al.* Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. *Nature* **473**, 43–49 (2011).
15. Karmodiya, K., Krebs, A. R., Oulad-Abdelghani, M., Kimura, H. & Tora, L. H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomics.* **13**, 424 (2012).
16. Roh, T. Y., Cuddapah, S., Cui, K. & Zhao, K. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 15782–15787 (2006).
17. Saintamand, A. *et al.* Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region. *Nature Commun.* **7**, 10730 (2016).
18. Pefanis, E. *et al.* RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell* **161**, 774–789 (2015).
19. Lam, M. T. Y., Li, W., Rosenfeld, M. G. & Glass, C. K. Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends Biochem Sci.* **39**, 170–182 (2014).
20. Péron, S. *et al.* AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain “locus suicide recombination” in B cells. *Science* **336**, 931–934 (2012).
21. 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).
22. 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.* **182**, 6926–6932 (2009).
23. Li, F., Yan, Y., Pieretti, J., Feldman, D. A. & Eckhardt, L. A. Comparison of identical and functional IgH alleles reveals a nonessential role for E_{μ} in somatic hypermutation and class switch recombination. *J Immunol.* **185**, 6049–6057 (2010).
24. 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).
25. 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).
26. 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).
27. 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.* **287**, 8356–8360 (2012).
28. Guglielmi, L. *et al.* The 5'HS4 insulator element is an efficient tool to analyse the transient expression of an E_{μ} -GFP vector in a transgenic mouse model. *Trans Res.* **14**, 361–364 (2005).
29. 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.* **307**, 466–471 (2003).
30. Klein, I. A. *et al.* Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes. *Cell* **147**, 95–106 (2011).

31. Zhang, Y. *et al.* Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations. *Cell* **148**, 908–921 (2012).
32. Ghazzaoui, N., Saintamand, A., Issaoui, H., Vincent-Fabert, C. & Denizot, Y. The IgH 3' regulatory region and c-myc induced B-cell lymphomagenesis. *Oncotarget*, 2016 Oct 8, doi:10.18632/oncotarget.12535 [Epub ahead of print].
33. Braikia, F. Z. *et al.* A developmental switch in the transcriptional activity of a long-range regulatory element. *Mol. Cell. Biol* **35**, 3370–3380 (2015).
34. Pavri, R. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell* **143**, 122–133 (2010).

Acknowledgements

This work was supported by grants from Comité d'Orientation de la Recherche en Cancérologie du Limousin (CORC:FJA/NP-2015-109 and CORC:FJA/NP-2014-126), Association pour la Recherche sur le Cancer (PJA 20141201649), Ligue Contre le Cancer (Comité de la Corrèze et Haute Vienne), Agence Nationale de la Recherche (ANR: projet EpiSwitch-3'RR 2016). Epigenetic experiments were supported by a specific grant from INCa-Cancéropôle GSO (2014). A. Saintamand was supported by a grant from fondation ARC (DOC20150602943). N. Ghazzaoui was supported by a grant from Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique (Lebanon) and the municipality of Khiam (Lebanon). M. Cogné is supported by Institut Universitaire de France and Fondation pour la Recherche Médicale. 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. Desforges and B. Remerand for help with animal care.

Author Contributions

A.S., C.V.F., M.M., N.G., E.P., M.C. and Y.D. actively participated to the experimental design of the study. V.M. performed RNAseq experiments. E.P., 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. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-00575-0

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Accession codes: GEO GSE90760.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017



CORRESPONDENCE

3'RR and 5'E_μ immunoglobulin heavy chain enhancers are independent engines of locus remodeling

Nour Ghazzaoui¹, Hussein Issaoui¹, François Boyer¹, Ophélie Alyssa Martin¹, Alexis Saintamand^{1,2} and Yves Denizot¹

Keywords: IgH 3' regulatory region; E_μ; Transcriptional enhancer; knockout mice; RAG-deficient mice

Cellular & Molecular Immunology _____; <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0171-3>

By their impact on nuclear organization, enhancers are master regulators of cell fate.¹ The immunoglobulin heavy chain (IgH) locus undergoes numerous changes as B cells differentiate. Among them, transcription and accessibility for V(D)J recombination, class switch recombination (CSR), and somatic hypermutation (SHM) are the most notable.² The IgH locus carries two potent enhancers that are separated by 200 kb of distance. E_μ and the 3' regulatory region (3'RR), at both ends of the constant gene cluster, control locus remodeling as B cells differentiate.² Previous studies reported long-range interactions (of still unclear functional significance) between the E_μ and 3'RR enhancers during B-cell maturation.^{3–5} The question of a mutual transcriptional cross talk between these two enhancer entities remains open. We thus investigated if they were independent engines of locus remodeling or if their functions were more intimately intermingled. In this study, we developed ΔE_μ-RAG-deficient and Δ3'RR-RAG-deficient mice to investigate the potential transcriptional cross talk between E_μ and 3'RR enhancers at the immature B-cell maturation stage.

RAG-deficient mice, double E_μ⁶-RAG-deficient mice, and double 3'RR⁷-RAG-deficient mice were developed in our animal facility (free of specified pathogenic organisms). Our research was approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Éthique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and carried out according to the European guidelines for animal experimentation. Femoral pro-B cells were recovered with the EasySep™ mouse B-cell isolation Kit (STEM-CELL Technologies, France), which was designed to isolate B cells from single-cell suspensions by negative selection. Cells from RAG-deficient, ΔE_μ-RAG-deficient, and Δ3'RR-RAG-deficient mice (8–12 weeks old, males and females) were used. RNA was extracted using Trizol (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Two pooled RNA (with four to six mice) were obtained for each genotype. RNA libraries were obtained using TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold (Illumina), according to the manufacturer instructions. Libraries were sequenced on a NextSeq 500 sequencer, using NextSeq 500/550 High Output Kit (Illumina). Illumina NextSeq 500 paired-end 2 × 150 nt reads were mapped with STAR release v2.4.0a versus mm10 with gene model information from Ensembl release 77 with default parameters. RNAseq experiments were done in the genomics platform of Nice Sophia Antipolis, as previously

reported.^{8–10} Data were deposited in Gene Expression Omnibus under the accession number, GSE117449.

Femoral pro-B cells were isolated from RAG-deficient, ΔE_μ-RAG-deficient, and Δ3'RR-RAG-deficient mice to investigate the potential transcriptional cross talk between E_μ and 3'RR enhancers in immature B cells. A schematic representation of the IgH locus is reported in Fig. 1a. Non-coding RNAs (ncRNAs) contribute to chromosomal looping.¹¹ Among these ncRNAs, enhancer RNAs (eRNAs) are transcribed from enhancer DNA sequences, including the 3'RR, and contribute to their enhancer function.^{12,13} RNAseq experiments did not highlight any 3'RR eRNA in the pro-B cells of RAG mice (Fig. 1b), confirming results from a previous study with specific reverse transcription-quantitative PCR (RT-QPCR).¹⁴ The absence of 3'RR eRNA in pro-B cells is in agreement with studies reporting that 3'RR has no direct role in V(D)J recombination.^{4,15,16} As a positive control, 3'RR eRNA was evident in lipopolysaccharide-stimulated B splenocytes (Fig. 1b). Excepted for C_μ (Fig. 1c), the RNAseq experiments showed no transcription in the C_γ, C_ε, and C_α constant genes of the IgH locus (data not shown). If genomic deletion of the E_μ enhancer reduced sense transcription around its location (including C_μ transcription), genomic deletion of the 3'RR paradoxically enhanced both sense and especially antisense transcription of the D and J segments, as well as E_μ and C_μ transcription (Fig. 1c, d). Peak transcription levels were specifically found to originate from the D_{Q52} promoter (D₄₋₁) and the E_μ enhancer (known as μ₀ and I_μ sense transcripts, respectively). The concept of the 3'RR-mediated transcriptional silencing activity was first reported by Braikia et al.,¹⁴ with RT-QPCR analysis. In contrast, with the present study, the μ₀ and I_μ sense transcripts were not reportedly altered by the 3'RR deletion.

Deletion of the 5'E_μ enhancer markedly lowered B-cell V(D)J recombination without affecting SHM and CSR.⁶ In contrast, deletion of the 3'RR enhancer affects B2 B-cell fate,¹⁷ SHM,¹⁸ and conventional CSR.^{7–9,19} If the 3'RR deletion also affects B1 B-cell fate¹⁶ and SHM,²⁰ then it has no evident effect on B1 B-cell IgA CSR.²¹ If the roles of these two IgH enhancers have been observed during B-cell fate and maturation, then few data were available concerning their synergy, cooperation, and transcriptional cross talk. Analysis of chromatin marks, eRNA, and accessibility in the ΔE_μ and Δ3'RR mice shows in mature activated B cells that the 3'

¹CNRS UMR 7276, Inserm U1262, Université de Limoges, Limoges, France

Correspondence: Yves Denizot (yves.denizot@unilim.fr)

²Present address: Inserm U1236, Université Rennes 1, Rennes, France

These authors contributed equally: Nour Ghazzaoui, Hussein Issaoui.

Received: 13 September 2018 Accepted: 17 September 2018

Published online: 10 October 2018

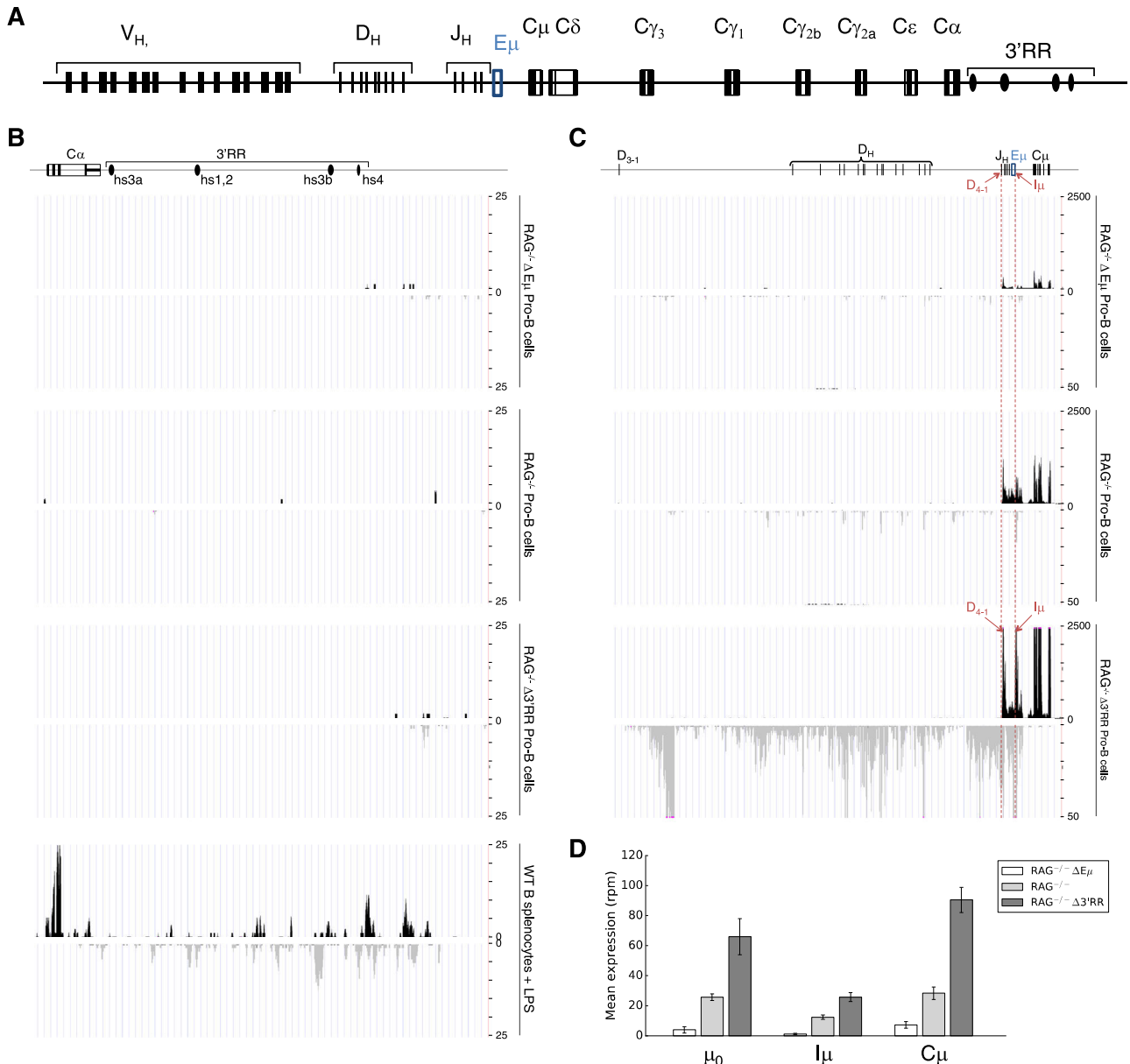


Fig. 1 Influence of the E μ and 3'RR enhancers on IgH transcription in pro-B cells. **a** Schematic representation of the IgH locus (not to scale). V (variable), D (diversity), J (junctional), and C (constant) segments are shown as well as the E μ enhancers and the 3'RR. The 3'RR contains four transcriptional enhancers. Three of them are encompassed in a 25 kb palindromic structure. **b** Detection of 3'RR eRNA in the pro-B cells of RAG-deficient, Δ E μ -RAG-deficient, and Δ 3'RR-RAG-deficient mice (8–12 weeks old, males and females). RNAseq experiments were done after depletion of rRNA. Data represent the mean of two independent experiments with four to six mice per genotype. 3'RR eRNA from LPS-stimulated B splenocytes from wt mice are reported as positive control.⁸ **c** D-J-E μ -C μ sense and antisense transcription in pro-B cells of RAG-deficient, E μ -RAG-deficient, and Δ 3'RR-RAG-deficient mice. Locations of the D₄₋₁ (also known as D_{Q52}) and I μ promoters are indicated. The same mice were utilized as in **a**. **d** Quantitative representation of D₄₋₁, I μ , and C μ transcription (in reads per million). The mean of two independent experiments are shown (error bars show extreme values)

RR acts in autonomy and controls IgH transcription.⁸ The present study shows that despite physical interactions (with a still hypothetical meaning) during IgH locus DNA looping,³⁻⁵ the 5' E μ and 3'RR enhancers are independent engines of locus remodeling, and their function is not intimately intermingled and their optimal activation does not require physical contact with each other. Our results reinforce the concept that E μ -3'RR interactions may affect E μ -mediated recombination control rather than transcription.¹⁴ Finally, they also highlight that if the 3'RR acts as a transcriptional enhancer in mature B cells, it acts as a transcriptional silencer at the immature B-cell stage. Clearly,

determining how the 3'RR mediates its transcriptional silencing within the D and J domains will be an exciting challenge to resolve.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Ligue Contre le Cancer (Equipe labellisée LIGUE 2018) and Agence Nationale de la Recherche (ANR: projet EpiSwitch-3'RR 2016). N.G. was supported by a grant from the Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique (Lebanon), the municipality of Kham (Lebanon), and the Société Française d'Hématologie. H.I. was supported by a fellowship from the

University of Limoges. F.B. was supported by the Fondation Partenariale de l'Université de Limoges and ALURAD. We thank the genomics platform of Nice Sophia Antipolis for conducting the RNAseq experiments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.I., N.G., A.S., F.B., O.A.M., and Y.D. designed and performed the experiments and wrote the manuscript. Y.D. obtained financial grants.

ADDITIONAL INFORMATION

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

1. Qian, J. et al. B cell super-enhancers and regulatory clusters recruit AID tumorigenic activity. *Cell* **159**, 1524–1537 (2014).
2. Pinaud, E. et al. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* **110**, 27–70 (2011).
3. Wuerffel, R. et al. S-Synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* **27**, 711–722 (2007).
4. Medvedovic, J. et al. 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 (2013).
5. Guo, C. et al. CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* **477**, 424–430 (2011).
6. Marquet, M. et al. The E μ 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).
7. 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).
8. Saintamand, A. et al. μ and 3'RR IgH enhancers show hierarchic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci. Rep.* **7**, 442 (2017).
9. Saintamand, A. et al. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat. Commun.* **6**, 7084 (2015).
10. Saintamand, A. et al. Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy-chain 3' regulatory region. *Nat. Commun.* **7**, 10730 (2016).
11. Pefanis, E. et al. RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell* **161**, 774–789 (2015).
12. Péron, S. et al. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* **336**, 931–934 (2012).
13. Lam, M. T., Li, W., Rosenfeld, G. & Glass, C. K. Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 170–182 (2014).
14. Braikia, F. Z. et al. Developmental switch in the transcriptional activity of a long range regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 3370–3380 (2015).
15. 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).
16. Ghazzoui, N. et al. The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer controls mouse B1 B-cell fate and late VDJ repertoire diversity. *Blood Adv.* **2**, 252–262 (2018).
17. 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).
18. 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).
19. Issaoui, H., Ghazzoui, N., Saintamand, A., Denizot, Y. & Boyer, F. IgD class switch recombination is not controlled through the immunoglobulin heavy chain (IgH) 3' regulatory region super-enhancer. *Cell. Mol. Immunol.* **14**, 871–874 (2017).
20. Issaoui, H., Ghazzoui, N., Boyer, F., Denizot, Y., Saintamand, A. Deletion of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer affects B1 B-cell somatic hypermutations. *Cell. Mol. Immunol.* (in press). <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0091-2>.
21. Issaoui, H. et al. The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer does not control IgA class switch recombination in B1 lineage. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 289–291 (2018).



CORRESPONDENCE

Trans-silencing effect of the 3'RR immunoglobulin heavy chain enhancer on Igk transcription at the pro-B cell stage

Nour Ghazzoui¹, Hussein Issaoui¹, Ophélie Alyssa Martin¹, Alexis Saintamand^{1,2}, Jeanne Cook-Moreau¹, Yves Denizot¹ and François Boyer¹

Cellular & Molecular Immunology _____; <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0189-6>

Due to their impact on nuclear organization, enhancers are master regulators of cell fate.^{1,2} The immunoglobulin heavy chain (IgH) locus undergoes numerous changes (such as transcription, accessibility, DNA breaks, and mutations) throughout B-cell differentiation. Several of these events are controlled by the IgH 3' regulatory region (3'RR). The 3'RR is the master control element of mature B-cell IgH transcription,³ somatic hypermutation (SHM),^{4,5} conventional class switch recombination (CSR),^{4,6–10} and locus suicide recombination (LSR).¹¹ In contrast, the 3'RR is expected to be dispensable for V(D)J recombination.^{12,13} During B-cell development, the heavy and light chain loci are poised for their VDJ and VJ rearrangements, respectively. The IgH locus rearranges first, with D–J joining at the pro-B-cell stages, followed by V–DJ joining at the pre-B-cell stage. The Igk locus is poised for VJ rearrangements at the pre-B cell stage. A transient association (*trans*-mediated by Igk enhancer elements) between IgH and Igk loci has been demonstrated at the pre-B cell stage.^{14,15} Recently, unexpected and novel findings have shown that the 3'RR acts as a *cis* transcriptional silencer of sense and antisense germinal V, D, and J transcription at the pro-B cell stage.^{16,17} In light of these intriguing 3'RR features, we undertook the current study to determine if such a *trans* silencing effect could also be found for Igk transcription.

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 out according to the European guidelines for animal experimentation. Pro-B cell experiments were performed with RAG-deficient (RAG^{-/-}) and double 3'RR⁶-RAG-deficient (Δ 3'RR–RAG^{-/-}) mice developed in our animal facility. Femoral pro-B cells were recovered with the EasySepTM Mouse B-cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies, France). RNA was extracted using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. Two pooled RNA samples (from four to six mice) were obtained for each genotype. RNA libraries were obtained using TruSeq stranded total RNA with Ribo-Zero Gold (Illumina) according to the manufacturer's instructions. RNAseq experiments were performed using the Nice Sophia Antipolis genomics platform as previously reported.^{7,8,17} Data were deposited in Gene Expression Omnibus under the accession number GSE117449. Mature B-cells (CD43⁻ splenocytes) were obtained from four 129 *wt* mice (Charles Rivers Laboratories, France) and four Δ 3'RR mice (in a 129 background) before and 48 h after *in vitro* stimulation (1 × 10⁶ cells per ml in

RPMI 1640 with 10% fetal calf serum) with 5 µg/ml LPS. Two pooled RNA samples (from two mice each) were obtained for each genotype. RNAseq experiments were performed as above and RNAseq data were deposited under the accession number GSE90760.

Femoral pro-B cells were isolated from RAG^{-/-} and Δ 3'RR–RAG^{-/-} mice to explore potential transcriptional cross-talk between IgH and Igk loci in immature B-cells. A schematic representation of these two loci is reported in Fig. 1a. RNAseq experiments led to an unexpected novel finding: deletion of the IgH 3'RR enhancer markedly enhanced sense and antisense transcription of the Igk locus in *trans* in pro-B cells (Fig. 1b). This effect was not found in mice deficient for the IgH E μ enhancer (Δ E μ –RAG^{-/-} mice); the E μ enhancer (located in blue in Fig. 1a) being the major control element for IgH VDJ recombination (data not shown).² As a positive control, we found no such *trans* effect on the Ig λ locus. We next examined if this effect could be detected in mature B-cells. Deletion of the 3'RR had no *trans* silencer (nor activator) effect on Igk (and Ig λ) transcription in resting and LPS-stimulated splenocytes (Fig. 1c, d). These results are expected since a close association between the Igk and IgH loci has not been reported in mature B cells.

The concept of pro-B 3'RR *cis*-mediated transcriptional silencing activity was first reported (using RT-QPCR) by Braikia and colleagues¹⁶ and recently confirmed (using RNAseq analysis) by our group.¹⁷ The current study is the first report of a *trans* silencing effect of the 3'RR. This effect is found at the Igk locus known to have a feedback inhibition effect on the establishment of allelic exclusion of the IgH locus in pre-B cells. The present study reinforces the concept of mutual crosstalk through enhancer/silencer effects between the IgH and Igk loci during immature B-cell stages. It is possible that the *trans* silencer effect of the 3'RR on Igk transcription would use the same mechanism as that of its *cis* silencing effect on the transcription of the V, D, and J segments of the IgH locus. The 3'RR *trans* silencing on the Igk locus would be of interest to prevent its usage until the end of IgH D–J recombination. Clearly, the resolution of how the 3'RR mediates *trans* transcriptional silencing on the Igk locus is an exciting challenge to meet.

¹CNRS UMR 7276, Inserm U1262, Université de Limoges, Limoges, France

Correspondence: Yves Denizot (yves.denizot@unilim.fr)

²Present address: Inserm U1236, Université Rennes 1, Rennes, France

These authors contributed equally: Nour Ghazzoui, Hussein Issaoui.

Received: 6 November 2018 Accepted: 7 November 2018

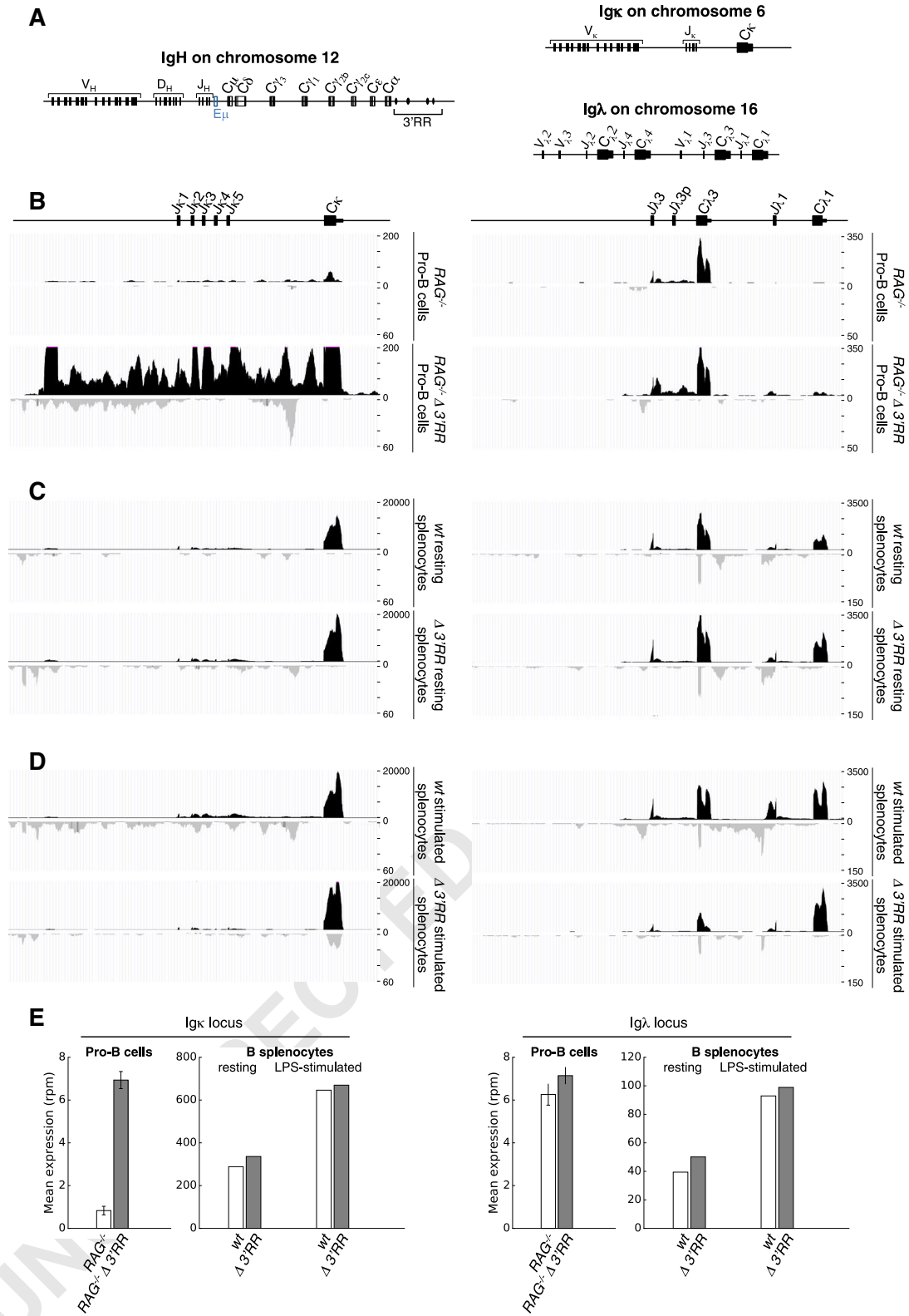


Fig. 1 Influence of the 3'RR enhancer on Igκ transcription in pro-B cells. **a** Schematic representation of the IgH, Igκ, and Igλ loci (not to scale). **b** Igκ and Igλ sense (top) and antisense (bottom) transcription in pro-B cells of $RAG^{-/-}$ and $RAG^{-/-} \Delta 3'RR$ mice. **c** Igκ and Igλ sense and antisense transcription in resting splenocytes of 129 w_t mice and $\Delta 3'RR$ mice. **d** Igκ and Igλ sense and antisense transcription in LPS-stimulated splenocytes of 129 w_t mice and $\Delta 3'RR$ mice. The same mice as in **c**. **e** Quantitative representation for C_{κ} and C_{λ} transcription (in reads per million). The error bars show the extreme values of two independent experiments. The same samples as in **c** and **d**

2. Activateurs transcriptionnels du locus IgH et lymphomagenèse

Cette partie de ma thèse en est encore au stade des expériences. Je décrirai les résultats les plus significatifs que nous avons obtenus sous forme de questions/réponses (publication prévue dans un an).

Notre objectif était de déterminer, en la modélisant chez la souris, l'impact d'une translocation de Myc au locus IgH sur la lymphomagenèse B. Nous nous sommes procurés 3 lignées murines possédant une insertion de Myc au locus IgH. Dans la première, Myc est inséré, comme lors du BL endémique, derrière un segment VDJ recombiné et devant E μ (souris Myc-E μ). Dans la seconde, Myc est inséré, comme lors du BL sporadique, devant C μ et avec délétion de l'élément régulateur E μ (souris Myc-C μ). Dans la troisième, Myc est inséré dans C α mimant les stigmates d'un myélome (Figure 1). L'étude, pendant 2 ans, de ces lignées nous a permis de répondre aux questions suivantes.

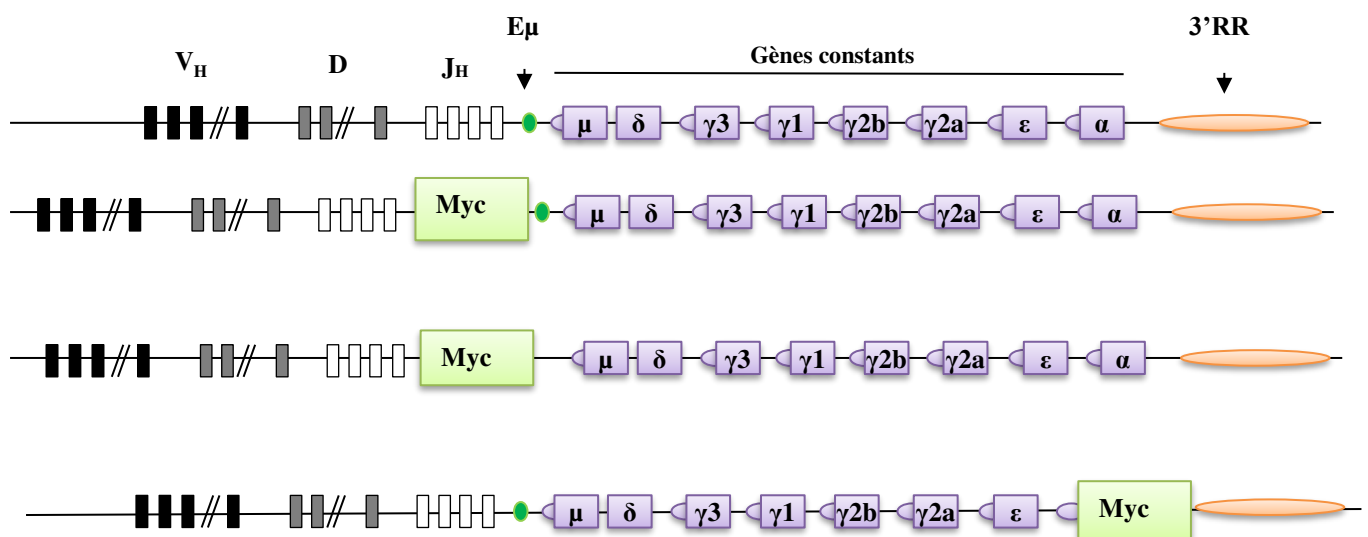


Figure 1 : Représentation schématique (non à l'échelle) des 3 lignées murines étudiées.

Le site d'insertion de Myc au locus IgH est indiqué. Ligne 1 : locus sauvage (*wt*). Ligne 2 : souris Myc-E μ . Ligne 3 : souris Myc-C μ . Ligne 4 : souris Myc-C α .

Question 1 : Existe-il une différence de prolifération lymphocytaire B pour ces 3 lignées (contribution d'E μ et de la 3'RR sur l'expression de Myc) ?

Méthodes : Etude de la prolifération lymphocytaire B (CellTiter 96[®] One Solution Cell Proliferation Assay) en réponse à diverses doses de LPS et anti-CD40, analyse des transcrits Myc par PCR quantitative et de la protéine Myc par Western blot.

Réponse 1: Les 3 lignées murines avec Myc au locus IgH expriment plus de transcrits Myc dans les B de la rate que des souris *wt* (Figure 2, haut gauche). Aucune différence n'est observable entre les souris Myc-E μ , Myc-C μ et Myc-C α . Cette augmentation de transcription se traduit par une élévation de la traduction et plus de protéine Myc par rapport aux *wt* (Figure 2, haut droit). Une capacité accrue de prolifération est observée en réponse à de faibles doses de LPS plus anti-CD40 (Figure 2, bas gauche).

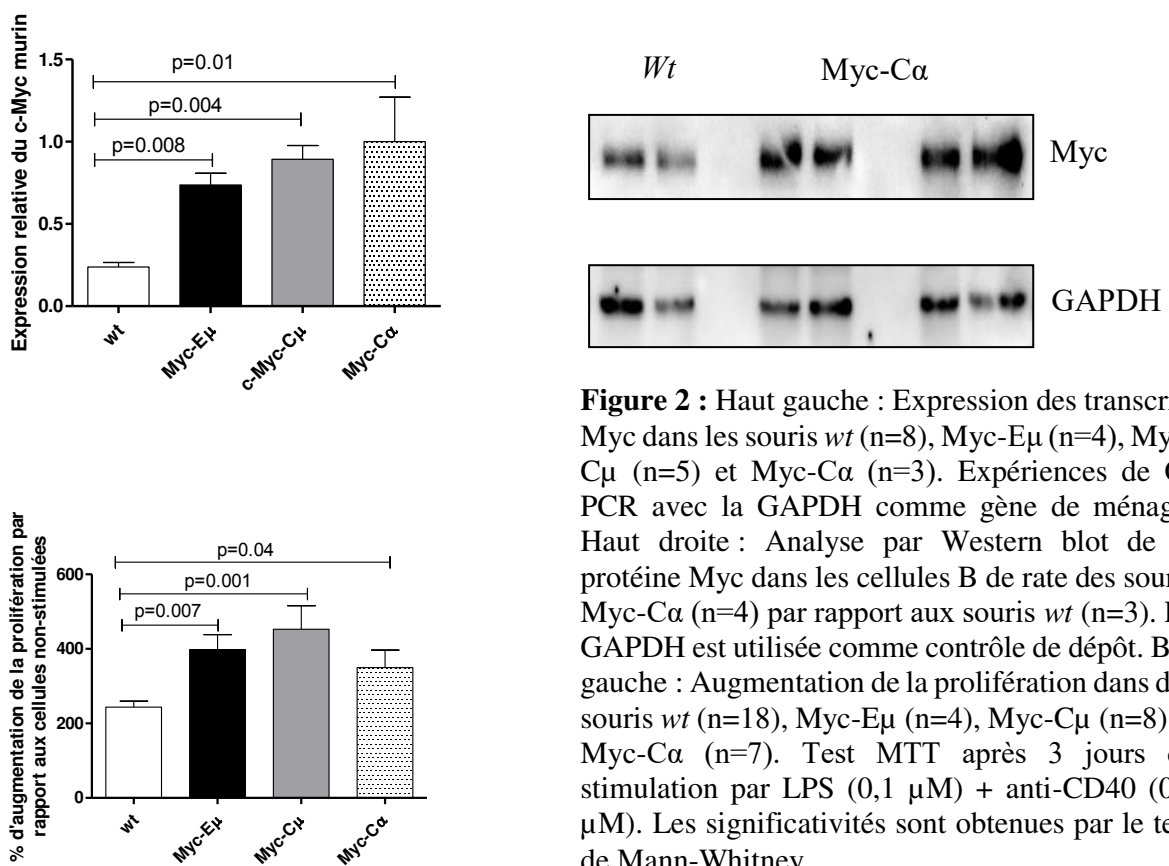


Figure 2 : Haut gauche : Expression des transcrits Myc dans les souris *wt* (n=8), Myc-E μ (n=4), Myc-C μ (n=5) et Myc-C α (n=3). Expériences de Q-PCR avec la GAPDH comme gène de ménage. Haut droite : Analyse par Western blot de la protéine Myc dans les cellules B de rate des souris Myc-C α (n=4) par rapport aux souris *wt* (n=3). La GAPDH est utilisée comme contrôle de dépôt. Bas gauche : Augmentation de la prolifération dans des souris *wt* (n=18), Myc-E μ (n=4), Myc-C μ (n=8) et Myc-C α (n=7). Test MTT après 3 jours de stimulation par LPS (0,1 μ M) + anti-CD40 (0,5 μ M). Les significativités sont obtenues par le test de Mann-Whitney.

Cependant une analyse transcriptomique complète des cellules B de ces souris (cellules non stimulées ou en réponse à un traitement de 2 jours avec 5 μ g/ml de LPS) ne montre aucune différence qualitative et quantitative notable (résultats non montrés). Ces résultats confortent l'hypothèse que la translocation de Myc au locus IgH n'est, à elle seule, pas suffisante pour induire des modifications conduisant à la lymphomagenèse.

Question 2: Existe-il une sensibilité différente à l'apoptose pour ces 3 lignées ?

Méthode : Etude de l'apoptose B par cytométrie en flux (annexine V et 7-AAD).

Réponse 2: Une augmentation notable de l'apoptose est observée dans les lymphocytes B de nos trois lignées. Ceci est en accord avec le lien entre apoptose et expression de Myc. Ces expériences ont été réalisées sur des souris de 2 mois avant développement de tous signes de lymphomes (Figure 3).

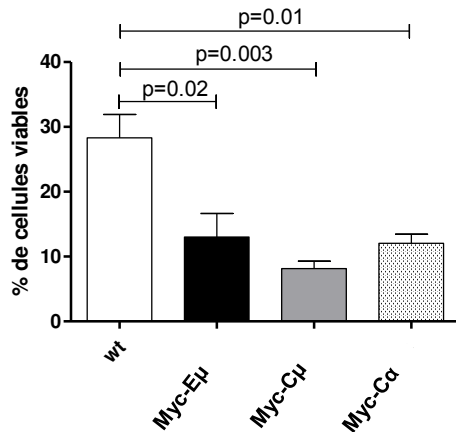


Figure 3 : Le pourcentage de cellules vivantes est analysé par cytométrie en flux (annexine V + 7AAD) après 24 heures de stimulation avec 0,01 μ M de H₂O₂. Souris *wt* (n=13), Myc-E μ (n=4), Myc-C μ (n=6) et Myc-C α (n=6). Significativité par le test de Mann-Whitney.

Question 3: L'absence d'E μ et le site d'insertion de Myc modifient-ils la cinétique d'apparition des lymphomes B ?

Méthode : Evaluation de la survie des souris Myc-E μ , Myc-C μ et Myc-C α sur une période de 18 mois.

Réponse 3: L'absence d'E μ au locus IgH perturbe la cinétique d'émergence des lymphomes (souris Myc-E μ vs Myc-C μ) (Figure 4). Il existerait donc une coopération E μ -3'RR aux stades immatures de la lymphopoïèse augmentant le risque de survenue de mutations oncogéniques dans les lymphocytes B durant les diverses étapes de leur maturation. Le site d'insertion de Myc au locus IgH perturbe également la cinétique d'émergence des lymphomes (souris Myc-E μ vs Myc-C α). Ces résultats renforcent le rôle de la 3'RR, au stade B mature, dans le contrôle de la transcription de Myc et l'importance de mutations additionnelles dans la survenue de mutations oncogéniques pour les lymphocytes B.

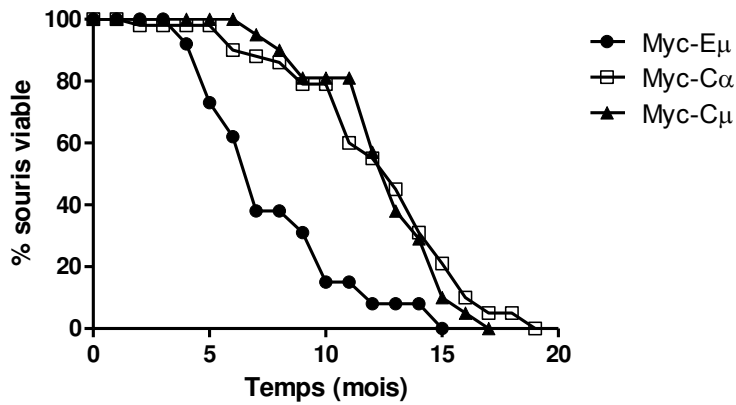


Figure 4 : Cinétique de mortalité et pénétrance des lymphomes. Souris Myc-E μ (n=26), Myc-C μ (n=21) et Myc-C α (n=42).

Significativité par le test Gehan-Breslow-Wilcoxon ; $p < 0.0001$ pour souris Myc-E μ et Myc-C μ ; $p < 0.0001$ pour souris Myc-E μ et Myc-C α ; $p > 0.05$ pour souris Myc-C μ et Myc-C α .

Question 4: L'absence d'E μ et le site d'insertion de Myc modifient-ils le phénotype du lymphome (pro-B/pré-B, B immature, B mature, plasmocytaire) ?

Méthode : Analyse phénotypique par cytométrie en flux (anticorps anti-CD117, anti-CD25, anti-CD5, anti-CD138, anti-B220, anti-IgM et anti-IgD).

Réponse 4: Aucune différence notable dans la localisation tumorale (Figure 5, gauche) ou son caractère immature/mature (Figure 5, droite) ne sont mis en évidence. L'absence d'E μ dans les souris Myc-C μ ne conduit pas à l'émergence de moins de lymphomes B immatures. L'insertion de Myc dans C α (sous la dépendance unique de la 3'RR aux stades tardifs de la maturation B) ne conduit pas à l'émergence de plus de lymphomes B matures. Ces résultats confirment l'hypothèse que seule la 3'RR est utile pour l'hyper-transcription du Myc inséré au locus IgH lors des stades matures de la lymphopoïèse B.

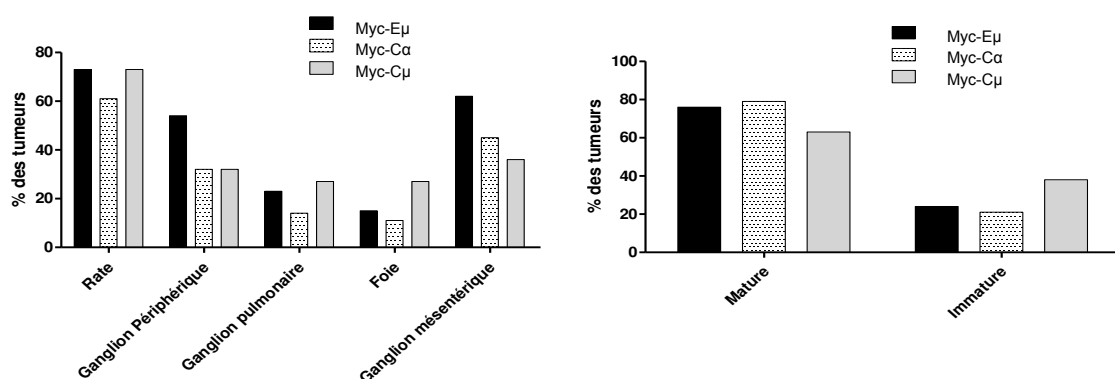


Figure 5 : Gauche : Localisation des tumeurs chez les souris Myc-E μ (n=26), Myc-C μ (n=22) et Myc-C α (n=44) (plusieurs sites possibles par souris). Droite : Caractère immature/mature des tumeurs chez ces mêmes souris.

Question 5: L'absence d'E μ et le site d'insertion de Myc modifient-ils l'index de prolifération du lymphome?

Méthode : Etude de l'antigène Ki67 par cytométrie en flux.

Réponse 5: Non seulement l'absence d'E μ (souris Myc-C μ) mais également la localisation de Myc au locus IgH (souris Myc-C α) induit une diminution de l'index Ki67 des lymphomes B par rapport aux souris Myc-E μ (Figure 6).

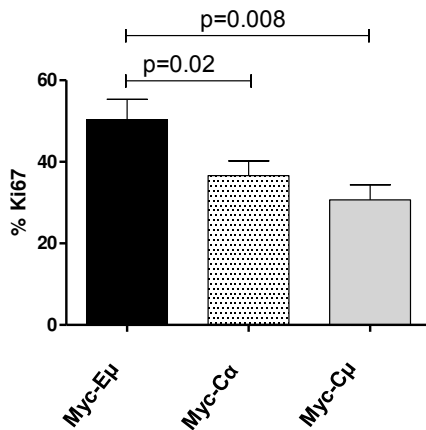


Figure 6 : Index de prolifération KI67 chez les souris Myc-E μ (n=22), Myc-C μ (n=18) et Myc-C α (n=39). Significativité par le test de Mann-Whitney.

Question 6: Existe-t-il une signature transcriptomique particulière des lymphomes en fonction du site d'insertion de Myc?

Méthode : Analyse du transcriptome des lymphomes et comparaisons statistiques.

Réponse 6: Ces expériences sont en cours de réalisation. Des lymphomes pulmonaires phénotypiquement similaires (B220⁺CD19⁺IgM⁺IgD⁺CD5⁻CD43⁻CD138⁻) issus des lignées Myc-E μ , Myc-C μ et Myc-C α sont en cours d'analyse transcriptomique (plate-forme de Nice Sophia-Antipolis) pour déterminer l'existence d'une signature lignée dépendante. Par la même approche, nous étudions la signature transcriptomique de lymphomes phénotypiquement différents au sein d'une même lignée pour mettre en évidence une signature lymphome dépendante.

Question 7: Comment s'active la 3'RR ?

Méthode : ChIP sur la 3'RR dans un locus *wt*.

Réponse 7: Nous avons regardé les fixations d'HDAC1, HDAC2 et HDAC3 sur l'activation de la 3'RR dans les lymphocytes B normaux. Nos études montrent qu'HDAC1 (mais ni HDAC2 ni HDAC3, résultats non montrés) se fixe sur l'activateur hs1,2 de la 3'RR (Figure 7). HDAC1

et hs1,2 pourraient se révéler des cibles thérapeutiques potentielles lors du traitement de certains lymphomes B matures. Actuellement nous analysons le rôle des HDACi sur l'activation de la 3'RR au travers de leurs effets sur la transcription globale du locus IgH, la synthèse d'Ig et la recombinaison isotypique.

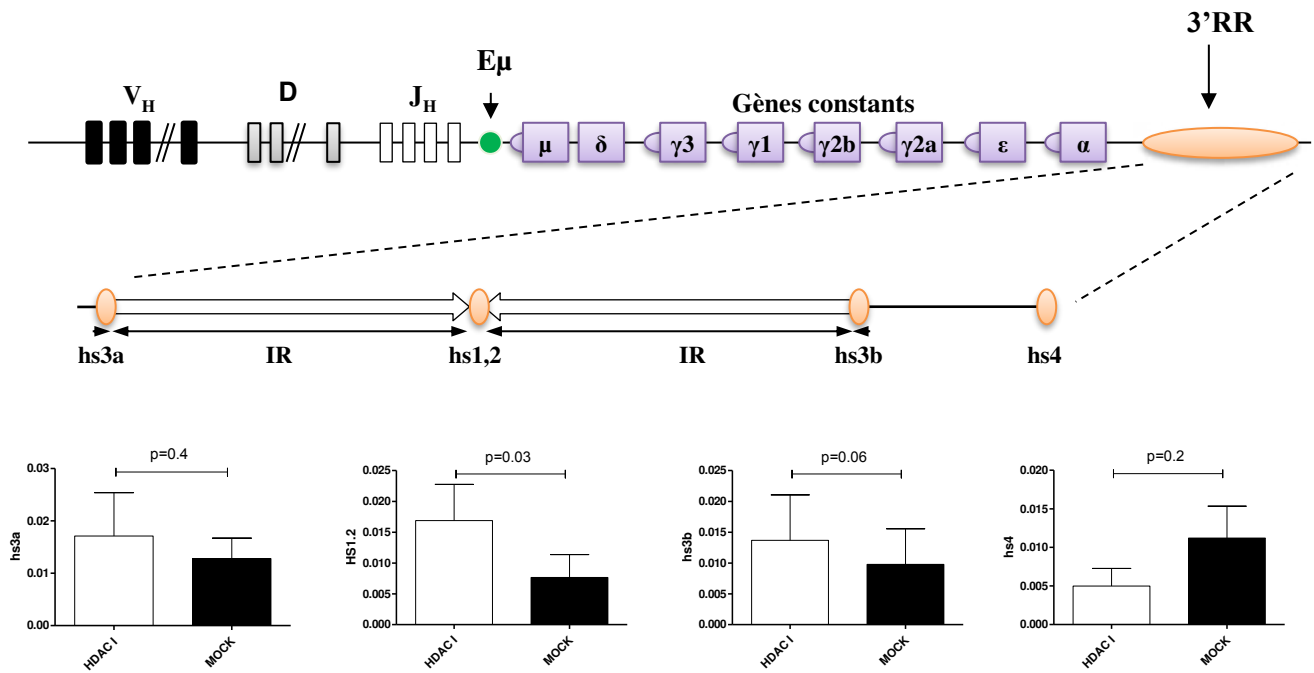


Figure 7 : Fixation d'HDAC1 sur la 3'RR. Cellules B de rate stimulées 48 h au LPS (5µg/ml). Moyenne et écart type de 5 souris.

Le locus IgH est une zone critique pour des évènements de translocations chromosomiques aboutissant à la dérégulation d'oncogènes et à la survenue de lymphomes. Il est clair que les progrès à venir dans leur traitement vont provenir, en grande partie, d'une meilleure connaissance de leur mécanisme de développement. La dérégulation transcriptionnelle de l'oncogène au locus IgH semble assurée par les éléments *cis*-activateurs 5' E μ et 3'RR. La mécanistique qui sous-tend leur action sur la transcription du locus IgH et donc celui de l'oncogène transloqué est méconnue. Grâce à des modèles murins uniques, nous avons pu montrer l'importance du site d'insertion de Myc au locus IgH et la contribution de ses activateurs transcriptionnels (E μ et 3'RR) sur le développement des lymphomes. Le blocage pharmacologique de la 3'RR pourrait se révéler une approche prometteuse pour le traitement de certains d'entre eux. Notre hypothèse est que la 3'RR influence 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 désacétylase HDAC1 est recrutée par la 3'RR et son activité modifie la transcription du locus IgH, confirmant le lien entre la 3'RR et la modification des histones. Le ciblage spécifique de la 3'RR, par des HDACi, pourrait ainsi se révéler une approche potentielle pour réduire l'augmentation transcriptionnelle oncogénique observée dans les lymphomes B matures.

3. Le ciblage de la 3'RR a-t-il un effet néfaste sur les réactions inflammatoires normales ?

Un ciblage potentiellement efficace de la 3'RR lors de la lymphomagenèse B ne peut se concevoir que s'il n'altère pas les processus de réponses immunitaires classiques : coopérations LT-LB- macrophages, activation des sous populations B régulatrices, surveillance immunitaires et cancéreuses, etc ... En effet, ces processus inflammatoires et immunitaires sont nécessaires pour le maintien de l'homéostasie.

Nous avons utilisé, dans une première approche, le modèle murin de génération de granulomes en réponse à une huile minérale, le pristane. Nous avons testé l'influence de la délétion de la 3'RR sur leur développement, nombre, cinétique d'apparition, composition cellulaire et contenu en transcrits pour certaines cytokines pro- et anti-inflammatoires.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet de la publication suivante :

Article 4

Efficient role of IgH 3' regulatory region deficient B-cells in the development of oil granulomas.

GHAZZAUI N, SAINTAMAND A, ISSAOUI H, SAAD F, DENIZOT Y.

Oncotarget 2016, 7, 38741-38749.

Deux lignées murines ont été utilisées : une lignée déficiente pour le super-enhancer 3'RR et une lignée sauvage. Notre étude montre que l'absence de la 3'RR n'est pas préjudiciable au développement d'une réponse inflammatoire normale dans le modèle murin d'induction de granulomes en réponse au pristane. Le nombre de granulomes (mésentériques ou séreux), leur cellularité, leur composition (T/B/monocytes) et leurs contenus en transcrits pour des cytokines inflammatoires (comme Tnf α , IL6 et IL12) et anti-inflammatoires (comme IL4, IL10 et TGF β) ne sont pas modifiés par l'absence de la 3'RR.

Perspectives

Le modèle des granulomes en réponse au pristane n'est pas le plus physiologique qui soit. Cependant il permet de montrer que la réponse inflammatoire, dans le cas extrême d'un ciblage total de la 3'RR, ici modélisée par son absence, n'est pas préjudiciable à son développement. Récemment le concept de lymphocyte B régulateur a été développé. En particulier l'équipe de Fillatreau a montré l'existence d'une sous-population B productrice d'IL10 qui se développe en réponse à une infection par Salmonella (Lino et coll. Immunity 2018). Cette population, de phénotype plasmablastique, joue un rôle comme première ligne de défense en réponse à des signaux TLR. Il serait intéressant de démontrer (ou non) l'existence de cette population de B régulateurs (et à fortiori les divers types de B régulateurs) chez nos souris déficientes pour la 3'RR.

Efficient role of IgH 3' regulatory region deficient B-cells in the development of oil granulomas

Nour Ghazzoui¹, Alexis Saintamand¹, Hussein Issaoui¹, Faten Saad¹, Yves Denizot¹

¹Department of Immunology, 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, granulomas

Received: March 25, 2016

Accepted: April 29, 2016

Published: May 25, 2016

ABSTRACT

Functional B-cells are essential for the formation of oil granulomas. The IgH 3' regulatory region (3'RR) activates important check-points during B-cell maturation. We investigated if 3'RR-deficient B-cells remain efficient to develop oil granulomas in response to pristine. B-cells expressing an IgH 3'RR-deficient allele were similarly recruited to wild type allele expressing B-cells in the granuloma. No differences were observed between 3'RR-deficient mice and control mice for granuloma numbers, cellular composition and ability to express mRNA transcripts for several pro- and anti-inflammatory cytokines. Altogether these results suggest a normal role for 3'RR-deficient B-cells in the development of an acute B-cell-mediated inflammatory response.

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]. IgH *cis*-regulatory regions are major locus regulators. The IgH 3' regulatory region (3'RR) promotes SHM [3, 4], CSR [5–7], μ transcription [8] but not V(D) J recombination [9]. The 3'RR is also a potent lymphoma oncogene deregulator [10]. Transgenic mice models demonstrated the 3'RR implication in the development of several B-cell lymphomas [11–18]. The absence of the 3'RR influences lymphomagenesis in λ -myc mice toward less mature lymphomas [19]. Until now, the functionality of 3'RR-deficient B-cells in inflammatory response is poorly documented. The lack of 3'RR was only reported to marginally impact the development of a chronic inflammatory ascite formation in response to pristine [20].

The *i.p.* injection of pristine induces the formation of mesenteric oil granulomas [21, 22]. Pristine-induced granulomas are characterised by clustered cells adhered to the mesentery and other peritoneal tissues. The granuloma formation constitutes a protective inflammatory cellular response of the host against invading pathogens or indigestible substances. Two types of granulomas are reported. Serosal granulomas (SG) are located at the interface of the mesenteric margins and gut. Mesenteric granulomas (MG) are located around the center of the

mesenteric tissue [23, 24]. Oil granulomas are considered as tertiary lymphoid tissues constituted of monocytes, granulocytes, T-cells and B-cells. Their formation is regulated by several cytokines [25]. The absence of functional B-cells blocks SG formation and diminishes MG development in response to pristine [23]. Mesenteric oil granulomas thus appear as an interesting tool to ensure the functional ability of 3'RR-deficient B-cells in the occurrence and/or development of an acute inflammatory response. In this study we investigated the generation of pristine-induced oil granulomas in IgH 3'RR-deficient mice.

RESULTS

Spleen and peritoneal B-cells expressing a 3'RR-deleted allele

Mouse substrains have dissimilar differentiation programs culminating in different B-cell fate, BCR expression and signalling [8]. Pristine-induced oil granuloma generation is different with respect to mouse substrains [24]. Before assessing the influence of an IgH 3'RR-deleted allele *vs* a *wt* allele in B-cell recruitment in oil granulomas we firstly investigated heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice. The presence of a 3'RR-deficient allele and a *wt* allele was investigated by PCR (Figure 1A). The 3'RR deletion was done in a 129 ES cell line (IgH α allotype) and developed in a 129 background (IgH a^{wt}/a^{wt}). Heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice were generated by

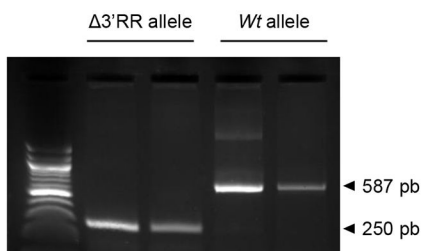
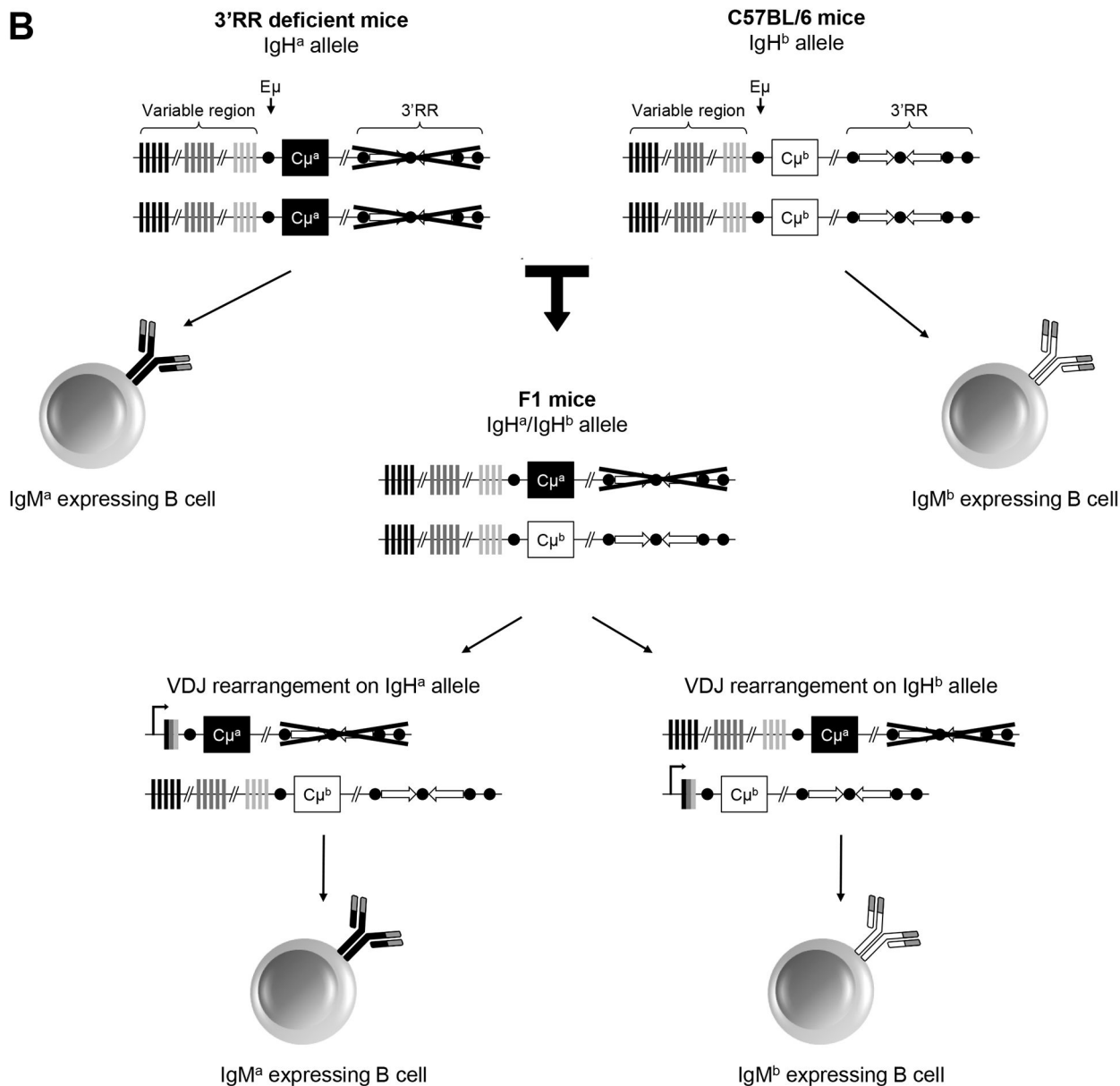
A**B**

Figure 1: Generation of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. **A.** PCR profile for a 3'RR-deficient and a *wt* IgH allele. **B.** Backcross for generation of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice, and expression of either IgM^a or IgM^b allele by B-cells from F1 mice. B-cells are expected to express IgM^a or IgM^b at similar frequency, including when the *a* allele is deleted for the 3'RR, since its deletion does not affect VDJ recombination. If the expression of one of this allele impedes the B-cell development, the equilibrium between IgM^a or IgM^b expressing B-cell will be disrupted. Lowered number of IgM^a expressing B-cells in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice will thus demonstrate that deletion of the 3'RR alters B-cell development or recruitment.

crossing homozygous 3'RR-deficient mice (IgH $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$) with C57BL/6 mice bearing an IgH b allotype (IgH b^{wt}/b^{wt}) mice (Figure 1B). Mixed 129 x C57BL/6 mice (IgH a^{wt}/b^{wt}) were used as control mice. As previously reported [8], analysis of splenic B-cells with IgM-allotype specific antibodies indicated a lowered ($p=0.001$, Mann-Whitney U -test) percentage of B-cells expressing an a allotype (IgM^a/IgM^b ratio: 0.33) in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice (Figure 2A and 2B). A similar decrease ($p=0.0006$) was also found for peritoneal B-cells (IgM^a/IgM^b ratio: 0.59) (Figure 2C and 2D). While similar percentages of B-splenocytes expressed either an a or b allotype (IgM^a/IgM^b ratio: 0.96) in a^{wt}/b^{wt} mice (Figure 2A and 2B), elevated number of peritoneal B-cells expressing an a allotype was found (IgM^a/IgM^b ratio: 1.53) (Figure 2C and 2D). This result might be linked to a differential strength of signalling between IgM^a BCR and IgM^b BCR for proliferation/survival of peritoneal B-cells. Such specific interactions with IgM^a (but not IgM^b) determinants have been already reported with the HIV-1 envelope gp41 membrane proximal external region [26]. Furthermore, the phenotype of mature B-cells differs between the various mouse substrains. Notably, BCR signalling has been suggested to be lower in 129 mice than in C57BL/6 [27]. Altogether these results suggest that the 3'RR deletion is not only detrimental for efficient B-cell maturation in spleen but also for B-cells in the peritoneal cavity.

B-cells expressing a 3'RR-deleted allele in oil granulomas

We next compared B-cell recruitment in granulomas from $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. For granuloma experiments we used mechanical dissociation instead of collagenase dissociation. Collagenase-based intestinal digestion procedure is frequently used to isolate tissue-resident B-cells. However this procedure was recently reported to alter B-cell surface marker expression and thus can impede the correct phenotypic analysis of these B-cells [28]. All granulomas were investigated the same day to ensure similar recovery efficiency. As a positive control, similar percentages of B-cells expressing either a a or b allotype (IgM^a/IgM^b ratio: 1.00) were found in granulomas of a^{wt}/b^{wt} mice (Figure 3A and 3B). Analysis of B-cells in oil granulomas with IgM-allotype specific antibodies indicated a lowered ($p=0.0006$) percentage of B-cells expressing an a allotype (IgM^a/IgM^b ratio: 0.47) in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice (Figure 3A and 3B). The 53% of IgM^a reduction paralleled the 41% and 67% of IgM^a reduction in peritoneal cavity and spleen of IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice, respectively. Finally the mean membrane IgM^a and IgM^b densities were similar in heterozygous $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice (Figure 3C and 3D). Thus, differences in IgM^a and IgM^b allotypes in oil granulomas in heterozygous $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice are linked to differences in the percentage of

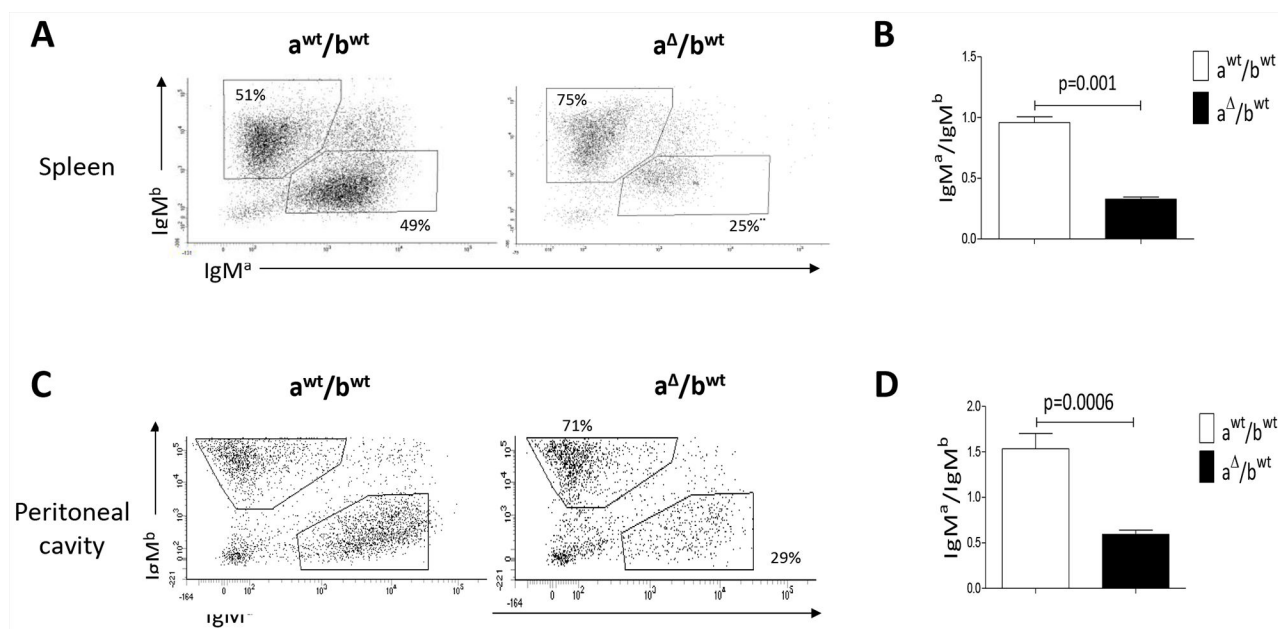


Figure 2: IgM^a and IgM^b in spleen and peritoneal cavity of heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. **A.** Flow cytometry analysis of the percentages of IgM^a and IgM^b in spleen of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Cells were gated on B220⁺ cells. One representative experiment out of six $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice and nine a^{wt}/b^{wt} mice is shown. **B.** IgM^a/IgM^b ratio in splenocytes of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of six $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice and nine a^{wt}/b^{wt} mice. Significance was assessed using the Mann-Whitney U -test. **C.** Flow cytometry analysis of the percentages of IgM^a and IgM^b in the peritoneal cavity of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Cells were gated on B220⁺ cells. One representative experiment out of seven for both genotypes is shown. **D.** IgM^a/IgM^b ratio in the peritoneal cavity of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of seven experiments. Significance was assessed using the Mann-Whitney U -test.

IgM^a and IgM^b B-cells in mice but not to a defect in B-cell recruitment of 3'RR-deficient B-cells.

Oil granulomas in 3'RR-deficient mice and *wt* mice

We next compared granuloma formation in 3'RR-deficient mice (IgH locus $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$) and *wt* mice (IgH locus a^{wt}/a^{wt}). A representative photograph of the gut associated whole mesenteric tissue 3 weeks after *i.p.* injection of 1ml pristine is reported in Figure 4A. To contrast with the background we labelled phagocytes with India ink by injecting it intraperitoneally into mice at week 1 after pristine (Figure 4A). Arrows indicate locations of MG and SG. For all experiments we counted granulomas on the whole mesenteric tissue. Numbers of total granulomas (Figure 4B), MG (Figure 4C) and SG (Figure 4D) were not significantly different between 3'RR-deficient mice and *wt* mice. No significant differences were found for the total cell number in the gut associated whole mesenteric tissue (MG + SG) between 3'RR-deficient mice and *wt* mice (Figure 4E). The percentages of granulocytes, monocytes and lymphocytes (morphological analysis and counts in the CELL-DYN Emerald) were not significantly affected in the gut associated whole mesenteric tissue (MG + SG) of 3'RR-deficient mice (Figure 4F). Finally flow cytometry analysis indicated similar ($p=1$, Mann-Whitney *U*-test) percentages of IgM^{a+} B-cells in granulomas of 3'RR-deficient mice (32.6 ± 5.8 %, mean \pm SEM of 3 animals) and *wt* mice (40.7 ± 13.2 %, mean \pm SEM of 3

animals). Taken altogether these results suggest no impact of the 3'RR deficiency for oil granuloma formation.

Inflammatory cytokine network in oil granuloma in 3'RR-deficient mice and *wt* mice

Cytokines have been reported to regulate the structure and formation of oil granulomas in mice [25, 29]. Several pro- (INF- γ , TNF- α , CXCL2, IL-12, IL-6) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10, TGF- β) cytokine transcripts were investigated, by real-time PCR, in granulomas cells of 3'RR-deficient and *wt* mice. Adherent (monocytes/macrophages) and non-adherent (lymphocytes/granulocytes) cells were investigated to search putative differences between 3'RR-deficient and *wt* mice. As shown in Table 1, no significant differences were found for INF- γ , TNF- α , CXCL2, IL-12, IL-6, IL-4, IL-10, TGF- β mRNA transcripts between 3'RR-deficient mice and *wt* mice. These results reinforce the hypothesis of a similar mechanistic/kinetic of granuloma formation in mice with 3'RR-deficient B-cells and *wt* B-cells.

DISCUSSION

The IgH 3' regulatory region (3'RR) stimulates numerous important B-cell check-points during B-cell maturation [3–8]. We have investigated the impact of the 3'RR deletion on the *in vivo* pristine-induced granuloma formation. By using heterozygous $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice we demonstrated that B-cells expressing a 3'RR-deficient

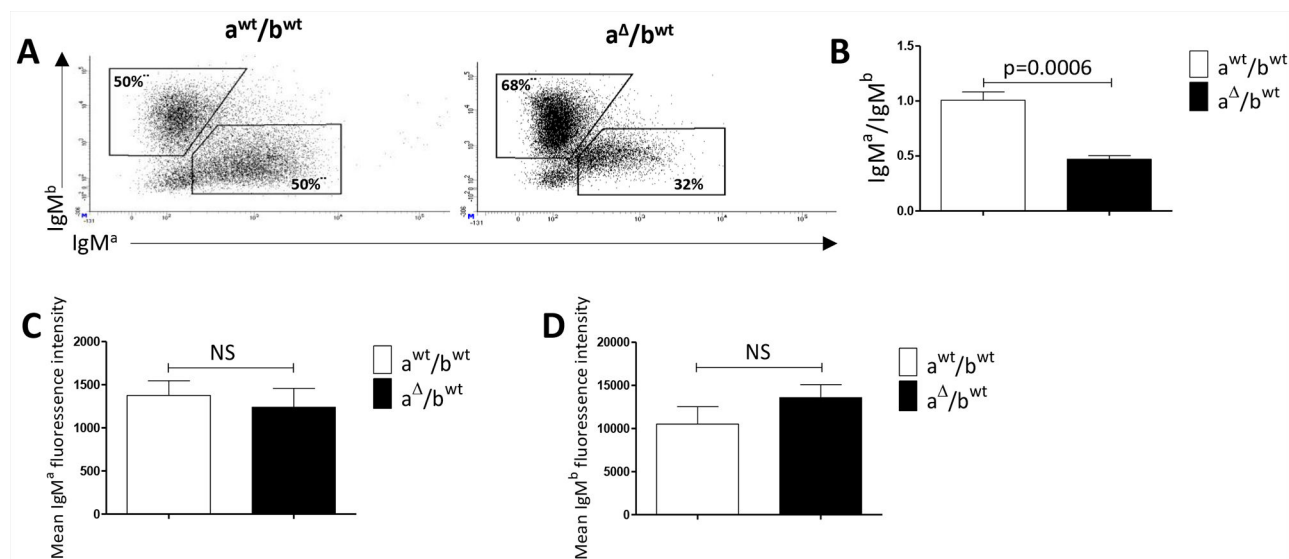


Figure 3: IgM^a and IgM^b in oil granulomas of heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. **A.** Flow cytometry analysis of the percentages of IgM^a and IgM^b in granulomas of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Cells were gated on B220⁺ cells. One representative experiment out of eight $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice and nine a^{wt}/b^{wt} mice is shown. **B.** IgM^a/IgM^b ratio in granulomas of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of eight $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice and nine a^{wt}/b^{wt} mice. Significance was assessed using the Mann-Whitney *U*-test. **C.** Mean \pm SEM membrane IgM^a density in granulomas of seven $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice and eight a^{wt}/b^{wt} mice. NS: not significant (Mann-Whitney *U*-test). **D.** Mean \pm SEM membrane IgM^b density in granulomas of seven $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice and eight a^{wt}/b^{wt} mice. NS: not significant (Mann-Whitney *U*-test).

allele are efficiently recruited in the granuloma structure. The 3'RR controls μ chain expression and 3'RR-deficient B-cells expressed reduced levels of membrane BCR [8]. BCR signalling is not only essential for normal B-cell development but also for B-cell-mediated inflammation via cytokine production and regulation of T-cell response [30]. The reduced BCR expression at the membrane of 3'RR-deficient B-cells is, thus, not crippling to generate an appropriated inflammatory response in the oil granuloma model. By using homozygous 3'RR-deficient mice we demonstrated a similar granuloma response compared to *wt* mice. Oil granuloma formation was severely abrogated

in B-cell-deficient mice while T-cells were dispensable for pristine-induced oil granuloma formation [23]. Functional B-cells are thus required for the initiation and development of oil granulomas. Our results with 3'RR-deficient mice indicate that a fully efficient CSR, SHM, BCR expression and μ transcription are not mandatory for the initiation/development of oil granulomas. Inflammation induces local expression of chemokines that attract leukocytes into the site of inflammation. The local balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines is also of importance for the initiation/development of oil granulomas [23, 25, 31]. Pristine activates resident

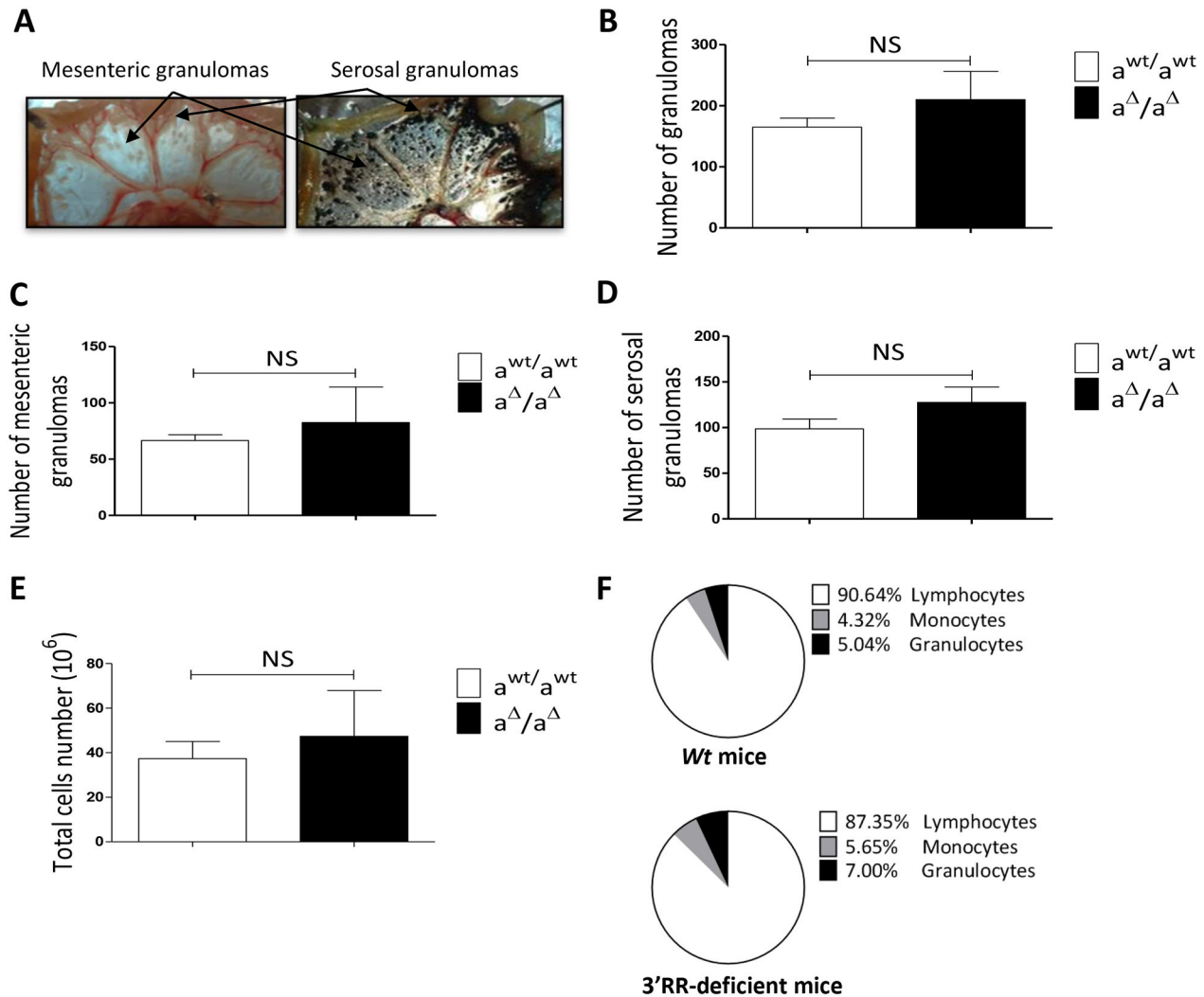


Figure 4: Oil granulomas in homozygous 3'RR-deficient mice. A. Response to the mesentery to pristine in 3'RR-deficient mice. After *i.p.* injection of 1ml of pristine, mice were sacrificed at week 3. The gut associated whole mesenteric tissue was photographed (right part). In another set of experiment 2 week before sacrifice mice were injected *i.p.* with 0.5 ml of a 1/10 dilution of India ink in PBS. Since pristine droplets are surrounded by phagocytes, carbon particules were internalised into phagocytes better highlighting mesenteric and serosal granulomas. Black arrows locate mesenteric granulomas (MG) and serosal granulomas (SG). One representative experiment out of 10 is shown. **B-D.** Number of total granulomas (B), mesenteric granulomas (C) and serosal granulomas (D) in 3'RR-deficient and *wt* mice. Mean \pm SEM of four 3'RR-deficient mice and six *wt* mice. NS: not significant (Mann-Whitney *U*-test). **E:** Total cell number in the gut associated whole mesenteric tissue. Mean \pm SEM of four 3'RR-deficient mice and six *wt* mice. NS: not significant (Mann-Whitney *U*-test). **F:** Percentage of lymphocytes, monocytes and granulocytes in the gut associated whole mesenteric tissue. Mean \pm SEM of four 3'RR-deficient mice and six *wt* mice.

Table 1: INF- γ , TNF- α , CXCL2, IL-12, IL-6, IL-4, IL-10 and TGF- β mRNA transcripts in adherent and non-adherent granuloma cells from 3'RR-deficient mice and *wt* mice

Cytokines	Non-adherent cells			Adherent cells		
	<i>Wt</i> mice	3'RR-deficient mice	Significance	<i>Wt</i> mice	3'RR-deficient mice	Significance
<i>IL-10</i>	102.2 \pm 24.0	170.7 \pm 184.6	1.0	18.3 \pm 18.2	57 \pm 59.5	0.7
<i>IL-4</i>	22.3 \pm 10.4	5.5 \pm 3.0	0.1	187.6 \pm 92.6	58.1 \pm 68.8	0.2
<i>TGF-β</i>	10.0 \pm 5.7	7.3 \pm 4.8	0.8	18182.8 \pm 13113.5	17473.4 \pm 12895.2	1.0
<i>IL-6</i>	104.6 \pm 127.0	265.6 \pm 451.4	1.0	12043.4 \pm 15219.9	37439.7 \pm 57409.8	1.0
<i>TNF-α</i>	21.4 \pm 2.8	26.9 \pm 32.9	0.4	432.6 \pm 493.9	615.2 \pm 585.8	0.6
<i>IL-12</i>	736.5 \pm 244.3	1448.1 \pm 1346.8	0.6	1044.1 \pm 1111.5	2038.1 \pm 2411.3	1.0
<i>INF-γ</i>	41.0 \pm 12.8	50.7 \pm 34.0	0.6	64 \pm 13.4	60.06 \pm 72.6	1.0
<i>CXCL2</i>	31.1 \pm 15.3	43.3 \pm 64.6	0.4	612.3 \pm 704.4	543.3 \pm 612.4	1.0

Gene expression levels were normalized to GAPDH mRNA. Amounts of transcripts were compared to sample with the lowest level of transcripts. Results are reported as Mean \pm SEM from 4 independent experiments per group. Significance was assessed with the Mann-Whitney *U*-test. No significant differences were documented between groups.

peritoneal cells such as B-cells and monocytes/macrophage leading to the secretion of various cytokines. Analysis of several pro-inflammatory (INF- γ , TNF- α , CXCL2, IL-12, IL-6) and anti-inflammatory (IL-4, IL-10, TGF- β) cytokines by granuloma cells did not evidenced any differences between 3'RR-deficient mice and *wt* mice. These results reinforce the hypothesis of a similar mechanistic/kinetic of granuloma formation in mice with 3'RR-deficient B-cells and *wt* B-cells.

In conclusion the 3'RR targeting has no significant effect on the acute inflammatory B-cell-mediated oil granuloma model. The 3'RR is a major lymphoma oncogene deregulator [10–19]. The 3'RR might be considered as a potential target for anti-lymphoma pharmacological therapy without significant impact on the normal immune and inflammatory networks [32]. 3'RR activation and transcriptional activity are altered by a diverse range of chemicals, including ones with anti-carcinogenic properties [33]. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) might be of interest since 3'RR-induced activation is mediated through activation of specific epigenetic marks [7] and since the *hs1.2* enhancer (located in the central palindromic 3'RR structure) is sensitive to HDACi [34]. A limitation of the pristine mouse model is that inflammation is restricted to the peritoneal cavity. Other mice models of inflammatory reactions must be tested before definitive validation of this hypothesis such as the pathogenic role of B-cells in the development of diffuse alveolar hemorrhage induced by pristine [35] and the inflammatory pathology induced by surgical implants [36].

MATERIALS AND METHODS

Animals

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 129 background [5]. The presence of the 3'RR-deleted allele was verified by PCR. 3'RR-deficient mice (IgH *a^{Δ3'RR}/a^{Δ3'RR}*) and *wt* 129 mice (IgH *a^{wt}/a^{wt}*) were investigated. Heterozygous IgH *a^{Δ3'RR}/b^{wt}* mice were generated by crossing homozygous 3'RR-deficient mice (IgH *a^{Δ3'RR}/a^{Δ3'RR}*) with C57BL/6 mice (IgH *b^{wt}/b^{wt}*) mice. Mixed Sv/129 x C57BL/6 mice (IgH *a^{wt}/b^{wt}*) were used as control mice.

PCR

PCR experiments for detection of the *wt* 3'RR allele were carried out with specific forward 5'-CCAAAAATGGCCAGGCCTAGG-3' and reverse 5'-GACCCTGCTATGGCT 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'-GACCCTGCTATGGCTGAC-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.

Granulomas induction

To induce inflammatory process, 12-14-weeks-old mice received a single *i.p.* injection of 1 ml of 2,6,10,14 tetramethyl-pentadecane (pristine) (95%, Sigma). After 3 weeks mice were euthanized.

Flow cytometry analysis

Gut associated whole mesenteric tissue was obtained from each animal. A single-cell suspension was obtained after filtration through a fine nylon mesh. Cells were incubated with monoclonal antibodies for 30 min at 4°C. The following antibodies were used: IgM^a-FITC, IgM^b-PE and B220-BV510. Labelled cells were analyzed on a Fortessa LSR2 (Beckman Coulter).

Isolation of adherent and non adherent granuloma cells

Animals were sacrificed, gut associated whole mesenteric tissue collected and single cell suspension obtained as described above. Samples (2×10^6 cells) were cultured in a 6 well plate at 37°C with 5% CO₂ for 2 hours. Total RNA was isolated using Tri-Reagent (Sigma) from both adherent and non adherent cells. Samples were stored at -20°C until used.

Cell counts

Single cell suspension of granulomas were counted and characterised in the CELL-DYN Emerald (Abbot), a compact bench-top hematology analyzer that can be used for a three-part white cell differential analysis of human and mouse samples [37].

Real-time PCR analysis

RNA was extracted according to the manufacturer's instruction. Complementary DNA (cDNA) was synthesized with 1 µg of total RNA using the high capacity cDNA reverse transcription kit from Applied biosystems. Real-time PCR analysis was performed using TaqMan reagents: TNF- α (Mm00443258-m1), IL-6 (Mm00446190-m1), IL-12-P40 (Mm00434189-m1), CXCL2 (Mm00436450-m1), IL-10 (Mm01288386-m1), IL-4 (Mm00445259-m1), INF- γ (Mm00801778-m1), TGF- β (Mm01178820-m1) and GAPDH (Mm99999915-g1). Experiments were performed using the Step One Plus (Applied biosystems). Amounts of various transcripts were compared to sample with the lowest level of transcripts. The relative quantification of gene expression was performed using the comparative C_T method ($\Delta\Delta C_T$). Experiments were made in duplicate.

Mean C_T values were used in the $\Delta\Delta C_T$ calculation by using the "relative quantitation calculation and analysis software for Applied Biosystems real-time PCR systems".

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Comité d'Orientation de la Recherche Cancérologie du Limousin (CORC:FJA/NP-2015-109), Association pour la Recherche sur le Cancer (PJA 20141201649), Ligue Contre le Cancer (comité de la Corrèze et Haute Vienne) and "Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud". A. Saintamand was supported by a grant from fondation ARC (DOC20150602943). N. Ghazzaui was supported by a grant from Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique (Lebanon) and the municipality of Khiam (Lebanon).

CONFLICTS OF INTEREST

None.

Author contributions

N. Ghazzaui, H. Issaoui, A. Saintamand, F. Saad and Y. Denizot actively participated to the experimental design of the study and participated to the scientific discussion for manuscript writing. Y. Denizot obtained financial grants to perform the study.

REFERENCES

1. Henderson A and 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 and Cogné M. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol.* 2011; 110:27-70.
3. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, Reina-San-Martin B, Pinaud E, Cogné M and 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.
4. Saintamand A, Vincent-Fabert C, Garot A, Rouaud P, Oruc Z, Magnone V, Cogné M and Denizot Y. Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region. *Nature Commun.* 2016; 7:10730.
5. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M and 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 and 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. Saintamand A, Rouaud P, Saad F, Rios G, Cogné M, Denizot Y. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nature Commun*. 2015; 6:7084.
8. Saintamand A, Rouaud P, Garot A, Saad F, Carrion C, Oblet C, Cogné M, Pinaud E and Denizot Y. The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget*. 2015; 6:4845-4852. doi: 10.18632/oncotarget.3010.
9. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogné M, Pinaud E and 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.
10. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Cogné M, Pinaud E and Denizot Y. The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur J Immunol*. 2010; 40:3306-3311.
11. Park SS, Kim JS, Tessarollo L, Owens JD, Peng L, Han SS, Tae Chung S, Torrey TA, Cheung WC, Polakiewicz RD et al. Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res*. 2005; 65:1306-1315.
12. Park SS, Shaffer AL, Kim JS, duBois W, Potter M, Staudt LM and Janz S. Insertion of Myc into Igh accelerates peritoneal plasmacytomas in mice. *Cancer Res*. 2005; 65:7644-7652.
13. Wang J and 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.
14. Truffinet V, Pinaud E, Cogné N, Petit B, Guglielmi L, Cogné M and 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.
15. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Rouaud P, Baudet C, Truffinet V, Magnone V, Guillaudeau A, Cogné M, Dubus P and 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.
16. Fiancette R, Rouaud P, Vincent-Fabert C, Laffleur B, Magnone V, Cogné M and 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.
17. Rouaud P, Fiancette R, Vincent-Fabert C, Magnone V, Cogné M, Dubus P and 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. doi: 10.18632/oncotarget.474.
18. Amin R, Marfak A, Pangault C, Oblet C, Chanut A, Tarte K, Denizot Y and Cogné M. The class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a c-myc deregulation transgenic model. *Oncotarget*. 2014; 15:8995-9006. doi: 10.18632/oncotarget.2297.
19. Saad F, Saintamand A, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Ig λ -Myc mice. *Oncotarget*. 2015; 6:20302-20311. doi: 10.18632/oncotarget.3963.
20. Saad F, Saintamand A, Rouaud P and 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. doi: 10.18632/oncoscience.81.
21. Potter M. Neoplastic development in plasma cells. *Immunol Rev*. 2003; 194:177-195.
22. Byrd LG, McDonald AH, Gold LG and Potter M. Specific pathogen-free balb/cAn mice are refractory to plasmacytoma induction by pristine. *J Immunol*. 1991; 147:3632-3637.
23. Chen H, Liao D, Holl TM, Snowden P, Ueda Y and Kelsoe G. Genetic regulation of pristinely-induced oil granuloma responses. *Int J Exp Path*. 2010; 91:472-483.
24. Chen H, Liao D, Cain D, McLeod I, Ueda Y, Guan Z, Raetz C and Kelsoe G. Distinct granuloma responses in C57BL/6J and BALB/cByJ mice in response to pristinely. *Int J Exp Path*. 2010; 91:460-471.
25. Brand C, de Costa TP, Bernardes ES, Machado CML, Andrade LR, Chammass R, de Oliveira FL and El-Cheikh MC. Differential development of oil granulomas induced by pristinely injection in galectin-3 deficient mice. *BMC Immunol*. 2015; 16:68.
26. Verkoczy L, Moody MA, Holl TM, Bouton-Verville H, Scarce RM, Hutchinson J, Alam SM, Kelsoe G and Haynes BF. Functional, non-clonal IgMa-restricted B cell receptor interaction with HIV-1 envelope gp41 membrane proximal external region. *Plos One*. 2009; 4:e7215.
27. Kaminsky DA, Stavneser J. Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice. *Int Immunol*. 2007; 19:545-556.
28. Shen C, Xu H, Alvarez X, Lackner AA, Veazey RS, Wang X. Reduced expression of CD27 by collagenase treatment: implications for interpreting B cell data in tissues. *Plos One*. 2015; 10:e0116667.
29. Kim EY, Moudgil KD. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. *Immunol Lett*. 2008; 120:1-5.
30. Puri KD, Di Paolo JA, Gold MR. B-cell receptor signalling inhibitors for treatment of Autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *Int Rev Immunol*. 2013; 32:397-427.
31. Nacionales DC, Kelly KM, Lee PY, Zhuang H, Li Y, Weinstein JS, Sobel E, Kuroda Y, Akaogi J, Satoh M, Reeves WH. Type I interferon production by tertiary lymphoid tissue developing in response to 2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane (pristinely). *Am J Pathol*. 2006; 168:1227-1240.

32. Saintamand A, Saad F, Denizot Y. 3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy? *Cell Cycle*. 2015; 14:789-790.
33. Henseler RA, Romer EJ, Sulentic CE. Diverse chemicals including aryl hydrocarbon receptor ligands modulate transcriptional activity of the 3' immunoglobulin heavy chain regulatory region. *Toxicology*. 2009; 261:9-18.
34. Lu ZP, Ju ZL, Shi GY, Zhang JW, Sun J. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 330:204-209.
35. Barker T, Lee PY, Kelly-Scumpia K, Weinstein J, Nacionales DC, Kumagai Y, Akira S, Croker BP, Sobel ES, Reeves WH, Satoh M. Pathogenic role of B-cells in the development of diffuse alveolar hemorrhage induced by pristane. *Lab Invest*. 2011; 91:1540-1550.
36. Gualini F, Berglundh T. Immunohistochemical characteristics of inflammatory lesions at implants. *J Clin Periodontol*. 2003; 30:14-18.
37. Khoo TL, Xiros N, Guan F, Orellana D, Holst J, Joshua DE, Rasko JE. Performance evaluation of the Abbott CELL-DYN Emerald for use as a bench-top analyzer in a research setting. *Int J Lab Hematol*. 2013; 35:447-456.

Discussion

1. Coopérations entre les *enhancers* E μ et 3'RR :

Plusieurs études avaient mis en évidence différents rôles et cinétiques d'activation pour les *enhancers* du locus IgH au cours du développement B. E μ régule les recombinaisons V_HDJ_H dans les cellules pro-B (Marquet et al., 2014; Perlot et al., 2005), mais n'est pas crucial pour la SHM et la CSR aux stades matures (Li et al., 2010). 3'RR, quant à lui, est essentiel pour les SHM et CSR chez ces derniers (Rouaud et al., 2014; Saintamand et al., 2015b; Vincent-Fabert et al., 2010b), mais dispensable pour les recombinaisons V_HDJ_H (Rouaud et al., 2012b). De vieilles études avaient montré qu'un transgène E μ -GFP s'exprimait aux stades pro-B/pré-B (Guglielmi et al., 2005) alors qu'un transgène GFP-3'RR le faisait des stades B-immature à mature (Guglielmi et al., 2003b). Cependant des expériences de 3C montrent que le locus IgH adopte une énigmatique conformation en boucle dans les cellules B au repos ou lors de la CSR, avec E μ et la 3'RR à proximité l'un à l'autre, suggérant ainsi des interactions transcriptionnelles potentielles.

Les cellules pro-B et B matures des souris déficientes pour E μ ou la 3'RR ont été utilisées pour étudier ce potentiel « *cross-talk* ». L'ensemble de nos résultats suggèrent un « *cross-talk* » unidirectionnel au stade B mature. La 3'RR s'y présente comme un module complètement autonome. Par contre, E μ y est dispensable. Sa délétion est sans effet sur la transcription germinale sens/antisens requise au cours de la CSR, sur l'expression des eRNA de la 3'RR et sur l'enrichissement en marques épigénétiques associées à l'activation. S'il n'a aucun rôle sur l'activation de la 3'RR lors de la CSR, E μ semble en être partiellement dépendant. La délétion de la 3'RR a un impact sur les marques épigénétiques associées à l'activation d'E μ (H3K9ac) et sa transcription.

Au cours de la CSR, le locus adopte une conformation en boucle. Son intérêt semble de mettre à proximité mutuelle l'ensemble des *enhancers*, régions « *switch* » et promoteurs. Nos données suggèrent un autre rôle fonctionnel : celui de placer E μ sous l'autorité de la 3'RR. La structure E μ /S μ /S α /3'RR pourrait avoir plusieurs objectifs successifs. Notamment, elle apporterait la région « *switch* » acceptrice à proximité de la 3'RR pour permettre son activation d'une manière efficace en agissant sur sa transcription ainsi que sur son ciblage par AID (Saintamand et al., 2015b). Elle supporterait les interactions physiques/fonctionnelles entre les différents *enhancers* constituant la 3'RR ainsi que leurs synergies (Pinaud et al., 2011). Elle faciliterait enfin la synapse S μ /S α grâce à l'augmentation de la probabilité d'une jonction légitime entre ces dernières tout en réduisant le risque de translocation oncogénique (Ghazzaoui et al., 2017; Klein et al., 2011; Zhang et al., 2012b). Les phénotypes précédemment rapportés

dans des souris déficientes pour $E\mu$ et la 3'RR, maintenant complétés par nos études montrent que les deux *enhancers* du locus IgH se comportent d'une manière autonome en ce qui concerne les marques chromatinienne, l'expression des eRNA et l'accessibilité. $E\mu$ contrôle toute seule les réarrangements précoces des cellules B immatures et la 3'RR est à la fois nécessaire et suffisante pour les événements aux stades tardifs du développement B. Cependant, dans les lymphocytes B matures, $E\mu$ est sous le contrôle de la 3'RR en subissant une transcription 3'RR dépendante et un remodelage chromatinien comme presque tous les promoteurs basiques du locus.

Pour parfaire notre connaissance des éléments *cis*-régulateurs du locus IgH, nous avons étudié ce « *cross-talk* » au stade pro-B par une approche RNAseq. Aucune expression d'eRNA de la 3'RR n'est mise en évidence dans les souris déficientes pour l'enzyme Rag. Ce résultat confirme une récente étude faite à partir de PCR quantitatives spécifiques (Braikia et al., 2015). Nos données sont en accord avec celles montrant que la 3'RR n'a aucun effet évident sur les recombinaisons V_HDJ_H (Ghazzoui et al., 2018; Medvedovic et al., 2013; Rouaud et al., 2012b). La délétion d' $E\mu$ réduit la transcription sens/antisens autour de son emplacement aussi que celle de $C\mu$. Mais, d'une manière surprenante, la déficience en 3'RR augmente la transcription (surtout antisens) des segments D et J_H , de $E\mu$ et de $C\mu$. On observe ainsi une augmentation des transcrits $I\mu$ partant de $E\mu$ et $\mu 0$ partant de PDQ52. Cette activité de *silencer* de transcription de la 3'RR confirme celle rapportée précédemment par Braikia et coll (Braikia et al., 2015).

Nos travaux ont montré que les deux *enhancers* $E\mu$ et 3'RR sont indépendants malgré la formation de boucles chromatinienne. Leurs fonctions ne sont pas intimement liées et leurs activations optimales ne nécessitent pas de contact physique. Ils soulignent le fait que la 3'RR agit comme activateur transcriptionnel aux stades B matures et *silencer* transcriptionnel aux stades immatures. Trouver comment est médiée cette activité de *silencer* reste un challenge à relever. On peut émettre l'hypothèse de la séquestration, par la 3'RR, de divers types de facteurs nucléaires impliqués dans la transcription des segments V_H , D et J_H . Celle-ci doit être strictement régulée pour éviter, par exemple, son déroulement dans les cellules non B mais aussi permettre le développement séquentiel de synthèse des différentes chaînes d'Ig (lourdes puis légères).

L'existence d'une activité résiduelle mais non négligeable des événements de recombinaison dans des modèles déficients pour $E\mu$ suggère l'implication d'autre(s) élément(s). Le PDQ52, un des candidats potentiels, est exclu puisque le phénotype engendré par la simple délétion d' $E\mu$ n'est pas aggravé par son KO conjoint avec ce dernier (Afshar et al., 2006). La 3'RR semble être un candidat potentiel pour une possible coopération avec $E\mu$.

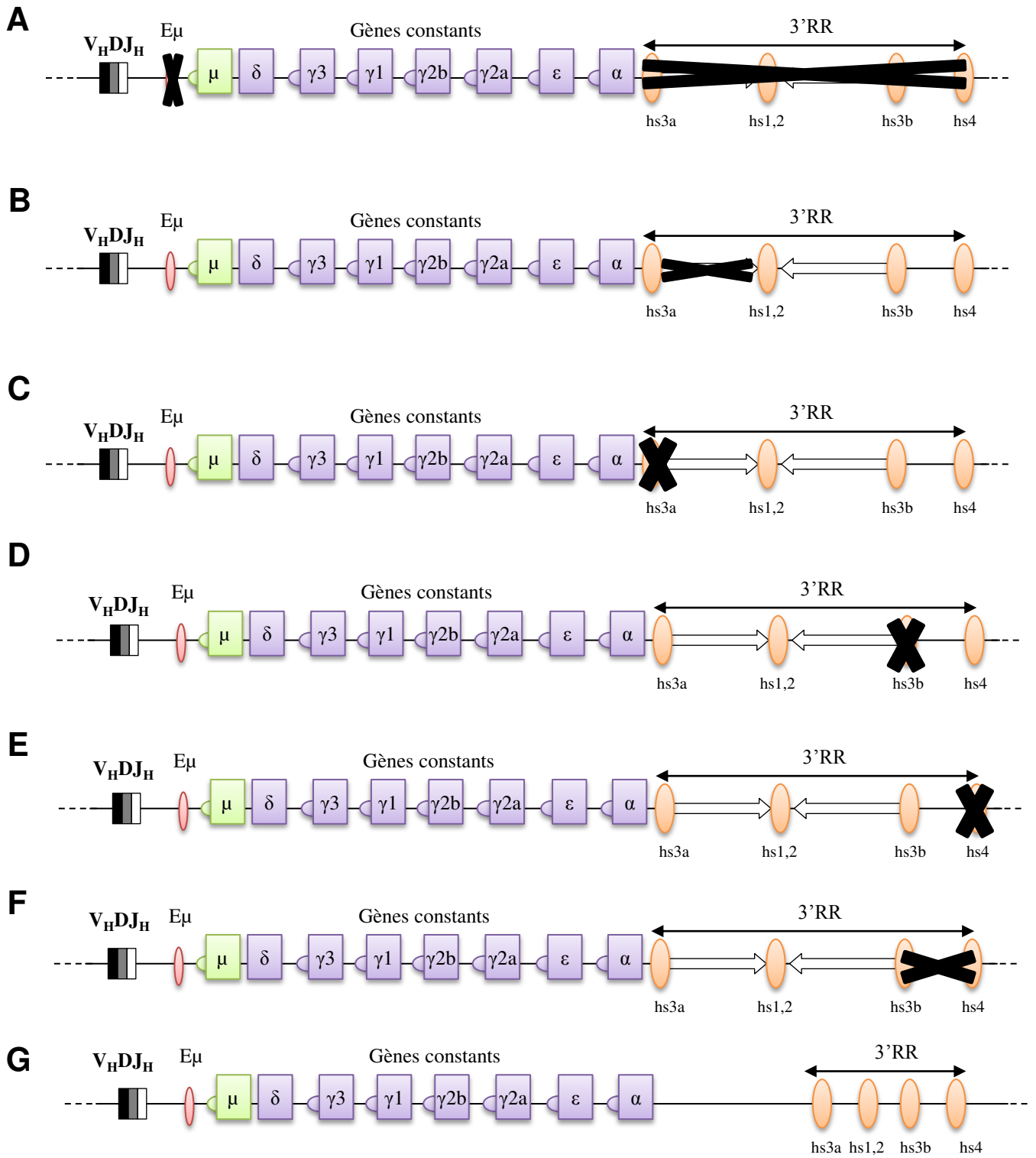


Figure 30 – Représentation schématique des modèles murins.

A- Modèle double KO.

B- Modèle Δ IRIS.

C- Modèle Δ hs3a.

D- Modèle Δ hs3b.

E- Modèle Δ hs4.

F- Modèle Δ hs3b/hs4.

G- Modèle 3'RR minilocus.

au cours des recombinaisons VDJ. En effet, des études ont montré que la délétion conjointe de E_{μ} et des activateurs transcriptionnels $3'RR$ bloque complètement les recombinaisons $V_{\kappa}J_{\kappa}$ (Inlay et al., 2002), alors que le simple KO de E_{μ} les réduit (Xu et al., 1996). Guo et coll ont montré une interaction physique entre E_{μ} et la $3'RR$ par la technique de 3C lors des réarrangements VDJ (Changying Guo et al., 2011). Par analogie au locus $Ig\kappa$, il serait intéressant de tester cette hypothèse au locus IgH avec des modèles double KO pour E_{μ} et la $3'RR$ sur le même allèle (**Figure 30A**). Nous générons actuellement ces souris KO pour clarifier définitivement cette éventuelle coopération.

L'étude du « *cross-talk* » E_{μ} - $3'RR$ au stade pro-B a révélé un autre résultat curieux : le *silencing* en *trans* de la $3'RR$ sur la transcription au locus $Ig\kappa$, mais pas $Ig\lambda$. Plusieurs études ont mis en évidence des interactions physiques entre les chromosomes portant les loci IgH et $Ig\kappa$. Ils se rapprochent au stade pré-B. Les activateurs du locus κ ont un effet *silencer* pour l'exclusion allélique d'un des deux chromosomes IgH . Nos résultats sont les premiers à mettre en évidence un effet *silencer* en *trans* de la $3'RR$. Cet effet n'est pas observable aux stades matures de la lymphopoïèse B ni au locus $Ig\lambda$. Des différences entre les loci des chaînes légères λ et κ existent. Le locus $Ig\lambda$ n'est utilisé que si les recombinaisons sont infructueuses au locus $Ig\kappa$. Notre hypothèse est que le *silencing* de la $3'RR$ sur le locus κ , au stade pro-B, bloque temporairement son activation jusqu'au stade pré-B. Ceci permet ainsi d'éviter l'expression d'une chaîne légère avant celle d'une chaîne lourde fonctionnelle, participant ainsi au déroulement séquentiel des différents événements de recombinaison aux stades précoces du développement.

L'ensemble de nos études confirment ainsi l'hypothèse du rôle séquentiel des *enhancers* E_{μ} et $3'RR$ sur la transcription de l'oncogène transloqué : E_{μ} aux stades de développement B précoces et la $3'RR$ au cours des stades tardifs.

2. Activateurs transcriptionnels et lymphomagenèse :

La plupart des lymphoproliférations B sont caractérisées par l'existence d'une translocation déplaçant un oncogène au locus IgH provoquant sa juxtaposition à un élément régulateur. C'est par exemple la translocation du gène *Myc* au locus IgH lors du BL. La dérégulation de *Myc*, par E_{μ} ou la $3'RR$, a été montrée dans des modèles transgéniques murins (transgène avec *Myc* sous la dépendance de E_{μ} ou de la $3'RR$), comme conduisant à l'émergence de lymphomes (Ghazzoui et al., 2017). Les souris porteuses de translocations IgH -*Myc* ont mis en évidence le rôle important de la $3'RR$ dans le développement des lymphomes B matures (Cheung et al., 2004; Han et al., 2010; Park et al., 2005a, 2005b; Rosean et al.,

2016). Vu la grande homologie entre les 3'RR murines et humaines, les résultats obtenus sur ces modèles animaux peuvent être considérés comme pertinents pour la lymphomagenèse chez l'homme.

Le KI de Myc, au locus IgH, derrière un segment VDJ recombiné en 5' de E μ (souris Myc-E μ), modélisant le BL endémique humain, induit l'apparition de lymphomes B (Park et al., 2005a). Chez ces souris, Myc est sous le contrôle transcriptionnel des deux *enhancers* 3'RR et E μ . Les cinétiques d'activation d'E μ et de la 3'RR sont clairement différentes, E μ agissant aux stades précoces du développement B et la 3'RR aux phases matures. La preuve définitive de l'implication de la 3'RR dans la lymphomagenèse B est apportée par les souris Myc-C μ , modélisant le BL sporadique humain, portant un KI de Myc en 5' de C μ avec la délétion de l'*enhancer* E μ . La 3'RR seule (sans E μ) suffit à déréguler l'expression de l'oncogène Myc (Rosean et al., 2016). Le KI de Myc au locus IgH dans C α (c.à.d sous la dépendance transcriptionnel de la 3'RR mais pas de E μ) conduit également à l'émergence de lymphomes B matures. Cette lignée mime un stigmate oncogénique observé dans certains myélomes (souris Myc-C α) (cf. résultats p.74). Elle nous permettra de voir si le site d'intégration de Myc au locus IgH est important pour la lymphomagenèse. Notre objectif a été de comparer ces trois modèles murins.

Avant le déclenchement des lymphomes, l'analyse des transcrits Myc par PCR quantitative et de la protéine Myc par Western blot (dans les LB de la rate) a montré une augmentation de son expression dans ces 3 lignées, (sans différence observable entre elles). L'expression de Myc a été montrée comme augmentant le potentiel prolifératif de la cellule (Arabi et al., 2005; pour revue: Dang et al., 2006; Gomez-Roman et al., 2003; Grandori et al., 2005; Grewal et al., 2005; Schmidt, 2004). C'est ce qui est observé dans nos trois lignées en réponse à de faibles doses stimulantes (LPS et anti-CD40). Egalement, Myc a été décrit comme jouant un rôle pro-apoptotique (Askew et al., 1991; Evan et al., 1992; Shi et al., 1992). C'est ce qui est visualisé dans l'augmentation de l'apoptose B en réponse à l'H₂O₂. Une analyse transcriptomique complète des cellules B (stimulées ou non pendant 2 jours avec du LPS) n'a montré aucune différence qualitative et quantitative. Nos résultats renforcent l'hypothèse que la translocation de Myc au locus IgH n'est, à elle seule, pas suffisante pour induire des modifications conduisant à la lymphomagenèse.

L'analyse des cinétiques d'apparition et des phénotypes des lymphomes issus de nos trois lignées murines, sur une période de 18 mois, nous a permis d'étudier l'éventuelle coopération transcriptionnelle entre E μ et la 3'RR dans leurs survenus. Le retard dans leur

cinétique d'apparition en absence d'E μ montre sa contribution aux stades immatures de la lymphopoïèse en augmentant le risque d'acquisition de mutations oncogéniques dans les LB. Les effets d'E μ et de la 3'RR semblent être additifs et non synergiques. Ces résultats sont en accord avec nos trois premières études (Articles 1, 2 et 3). Ils semblent confirmer l'hypothèse du rôle séquentiel des *enhancers* E μ et 3'RR sur la transcription de l'oncogène transloqué : E μ aux stades de développement précoce et la 3'RR au cours des stades tardifs.

Le site d'insertion de Myc au locus IgH perturbe également la cinétique d'émergence des lymphomes. Insérer Myc devant E μ ou dans C α change leur vitesse d'émergence. L'hypothèse est que comme E μ n'agit que durant les recombinaisons VDJ, la localisation de Myc à l'autre bout du locus IgH, dans C α à côté de la 3'RR, fait qu'E μ n'aurait aucun effet sur sa transcription aux stades précoces, ni aux stades tardifs puisqu'il ne participe pas à la transcription du locus IgH. Ceci pourra être confirmé par de futures études de PCR quantitative pour étudier la transcription de Myc dans les cellules pro-B de nos souris. Nos résultats n'ont montré aucune différence notable sur le phénotype des lymphomes entre nos 3 lignées. L'absence d'E μ n'aboutit pas à l'émergence de moins de lymphomes B immatures. La 3'RR, à elle seule, étant l'élément majeur de régulation de la transcription au locus IgH, est capable de déclencher des lymphomes. L'insertion de Myc dans C α , sous la dépendance unique de la 3'RR aux stades tardifs de la maturation B, ne conduit pas à l'émergence de plus de lymphomes B matures. Ces résultats confirment l'hypothèse que seule la 3'RR est utile pour l'hypertranscription du Myc inséré au locus IgH lors des stades matures de la lymphopoïèse B.

L'index de prolifération des lymphomes B est significativement diminué en absence d'E μ ou quand Myc est inséré dans C α . L'accélération de la lymphomagenèse chez les souris Myc-E μ par rapport aux souris Myc-C μ suggère, *in vivo*, des coopérations transcriptionnelles entre les 2 *enhancers* E μ et 3'RR. La co-localisation nucléaire Myc/E μ /3'RR pour détecter la présence de boucles d'activation dans nos lymphomes sera étudiée par FISH-3D ainsi que leur localisation dans l'hétérochromatine vs l'euchromatine par « *super-résolution imaging* ». L'analyse transcriptomique de lymphomes de même phénotype entre les trois lignées, ainsi que ceux phénotypiquement différents au sein d'une même lignée, sera effectuée pour détecter de possibles différences dans les voies de prolifération/apoptose pour leur émergence. Les profils de transcription au locus IgH normal seront comparés à ceux de nos lymphomes B pour tenter de détecter d'éventuelles nouvelles interactions transcriptionnelles suite à l'insertion de Myc au locus IgH.

L'inhibition ciblée de la 3'RR pourrait constituer une stratégie thérapeutique potentielle pour le traitement des lymphomes B matures. Savoir comment s'active la 3'RR en est le prérequis. Nos résultats préliminaires confirment d'anciennes données où HDAC1 se fixe sur l'*enhancer* hs1,2 de la 3'RR (Lu et al., 2005). Qu'en est-il d'autres HDAC ubiquitaires (HDAC2, HDAC3) ? Des acétyl-transférases ? Il serait intéressant de définir si la structure 3D de la 3'RR influe sur cette fixation en utilisant des modèles murins l'ayant déstructurée (élimination de la structure palindromique, d'un ou de plusieurs *enhancers*) (**Figure 30 B, C, D, E, F, G**). Nos résultats préliminaires montrent que le traitement de cellules B saines par un HDACi, le SAHA, a un effet inhibiteur négligeable sur la prolifération cellulaire, mais significatif sur le « *switch* » et la synthèse d'Ig. Il sera intéressant de le tester, *in vivo* et *in vitro*, dans nos modèles murins tumoraux, ainsi que dans des lignées humaines de BL ou de lymphomes du manteau et folliculaires.

Des études ultérieures seront nécessaires pour clarifier la rationelle du traitement des lymphomes B par des HDACi en identifiant les modifications épigénétiques survenant au locus IgH suite à l'insertion de Myc ou lors de l'acquisition d'une résistance aux médicaments.

Enfin, un modèle d'insertion de Myc dans un locus IgH, déficient pour la 3'RR sera nécessaire pour finaliser notre étude. Dans ce modèle, il sera intéressant de refaire la même démarche : observer la cinétique d'émergence des lymphomes (s'il y en a) ainsi que leur phénotype qui devrait être principalement immature vue l'absence de la 3'RR.

3. Targeting de la 3'RR et réaction inflammatoire induite :

La 3'RR est un élément de régulation très important au cours de la maturation B (Rouaud et al., 2013, 2014; Saintamand et al., 2015b, 2015a, 2016; Vincent-Fabert et al., 2010b). Comme dérégulateur oncogénique (Amin et al., 2014; Fiancette et al., 2011; Park et al., 2005a, 2005b; Rouaud et al., 2012a; Saad et al., 2015; Truffinet et al., 2007; Vincent-Fabert et al., 2010a, 2012; Wang and Boxer, 2005), son ciblage pourrait se révéler une approche thérapeutique potentiellement intéressante. Ceci ne peut se concevoir que si cela n'altère pas les coopérations immunitaires normales T, B, monocytaires, macrophagiques nécessaires pour le maintien de l'homéostasie et le développement de réponses immuno-inflammatoires normales. Nous avons donc étudié l'impact de la délétion de la 3'RR sur la formation, *in vivo*, de granulomes induite par le pristane. Celle-ci est sévèrement abrogée chez les souris déficientes en cellules B mais pas en cellules T (Chen et al., 2010). Une cellule B fonctionnelle est donc un prérequis pour le développement de cette réaction inflammatoire expérimentale.

En utilisant des modèles murins hétérozygotes, déficients ou non pour la 3'RR, nous avons démontré que les cellules B exprimant un allèle sans 3'RR sont efficacement recrutées dans la structure du granulome. Pour ces cellules, l'expression des BCR membranaires est réduite, confirmant le contrôle de l'expression de la chaîne μ par la 3'RR (Saintamand et al., 2015a). La signalisation BCR n'est pas uniquement essentielle pour le développement normal des cellules B, mais également pour l'inflammation médiée par ces cellules *via* la production de cytokines et la régulation de la réponse T (Puri et al., 2013). Nos résultats ont montré que cette baisse d'expression du BCR n'est pas gênante pour la génération d'une réponse inflammatoire appropriée. Dans des modèles murins déficients pour la 3'RR, nous avons montré une réponse similaire au pristane en nombres de granulomes mésentériques ou séreux, nombres de cellules, compositions en cellules (T, B et monocytes) et contenus en transcrits pour diverses cytokines pro- et anti-inflammatoires. Ceci indique qu'une CSR, une SHM, une expression du BCR et une transcription au locus IgH pleinement efficaces ne sont pas obligatoires pour l'initiation et le développement de granulomes huileux.

Le ciblage de la 3'RR est donc sans effet significatif sur la formation des granulomes huileux; une réponse inflammatoire aiguë médiée par les cellules B. Une limitation de notre étude est que ce modèle n'est pas le plus physiologique qui soit. Cependant, il permet de montrer que la 3'RR pourrait être considérée comme une cible pharmacologique potentielle dans le traitement anti-lymphome, sans avoir un impact significatif sur les réseaux immunitaires et inflammatoires classiques (Saintamand et al., 2015c). Récemment le concept de lymphocytes B régulateurs a été développé. En particulier l'équipe de Fillatreau a montré l'existence d'une sous-population B productrice d'IL10 qui se développe en réponse à une infection par Salmonella (Lino et al., 2018). Cette population, de phénotype plasmablastique, joue un rôle comme première ligne de défense en réponse à des signaux TLR. Il serait intéressant de démontrer (ou non) l'existence de cette population de B régulateurs chez nos souris déficientes pour la 3'RR. D'autres modèles de réactions inflammatoires plus physiologiques (infections bactériennes ou parasitaires, réactions antigéniques...) où les cellules B jouent un rôle essentiel doivent être testés chez la souris avant la validation de notre hypothèse.

Bibliographie

- Adams, J.M., Gerondakis, S., Webb, E., Corcoran, L.M., Cory, S., 1983. Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 1982–1986.
- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D., Brinster, R.L., 1985. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* 318, 533–538. <https://doi.org/10.1038/318533a0>
- Adhikary, S., Eilers, M., 2005. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 635–645. <https://doi.org/10.1038/nrm1703>
- Afshar, R., Pierce, S., Bolland, D.J., Corcoran, A., Oltz, E.M., 2006. Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 2439–2447.
- Alessandrini, A., Desiderio, S.V., 1991. Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2096–2107.
- Alitalo, K., Schwab, M., Lin, C.C., Varmus, H.E., Bishop, J.M., 1983. Homogeneously staining chromosomal regions contain amplified copies of an abundantly expressed cellular oncogene (c-myc) in malignant neuroendocrine cells from a human colon carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 1707–1711.
- Allman, D., Lindsley, R.C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., Hardy, R.R., 2001. Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 6834–6840.
- Allman, D., Srivastava, B., Lindsley, R.C., 2004. Alternative routes to maturity: branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells. *Immunol. Rev.* 197, 147–160.
- Allman, D.M., Ferguson, S.E., Cancro, M.P., 1992. Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 149, 2533–2540.
- Allman, D.M., Ferguson, S.E., Lentz, V.M., Cancro, M.P., 1993. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 151, 4431–4444.
- Almqvist, N., Mårtensson, I.-L., 2012. The pre-B cell receptor; selecting for or against autoreactivity. *Scand. J. Immunol.* 76, 256–262. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02751.x>
- Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., Baltimore, D., 1984. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* 3, 1209–1219.
- Alt, F.W., Zhang, Y., Meng, F.-L., Guo, C., Schwer, B., 2013. Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell* 152, 417–429. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.007>

- Amin, R., Marfak, A., Pangault, C., Oblet, C., Chanut, A., Tarte, K., Denizot, Y., Cogné, M., 2014. The class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a c-myc deregulation transgenic model. *Oncotarget* 5, 8995–9006.
- Aoki-Ota, M., Torkamani, A., Ota, T., Schork, N., Nemazee, D., 2012. Skewed Primary Ig Repertoire and V-J Joining in C57BL/6 Mice: Implications for Recombination Accessibility and Receptor Editing. *J. Immunol.* 188, 2305–2315. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103484>
- Aoufouchi, S., Faili, A., Zober, C., D'Orlando, O., Weller, S., Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., 2008. Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J. Exp. Med.* 205, 1357–1368. <https://doi.org/10.1084/jem.20070950>
- Arabi, A., Wu, S., Ridderstråle, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlén, S., Hydbring, P., Söderberg, O., Grummt, I., Larsson, L.-G., Wright, A.P.H., 2005. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat. Cell Biol.* 7, 303–310. <https://doi.org/10.1038/ncb1225>
- Aranburu, A., Ceccarelli, S., Giorda, E., Lasorella, R., Ballatore, G., Carsetti, R., 2010. TLR ligation triggers somatic hypermutation in transitional B cells inducing the generation of IgM memory B cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 7293–7301. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002722>
- Arcinas, M., Boxer, L.M., 1994. Differential protein binding to the c-myc promoter during differentiation of hematopoietic cell lines. *Oncogene* 9, 2699–2706.
- Arpin, C., de Bouteiller, O., Razanajaona, D., Fugier-Vivier, I., Brière, F., Banchereau, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., 1998. The normal counterpart of IgD myeloma cells in germinal center displays extensively mutated IgVH gene, Cmu-Cdelta switch, and lambda light chain expression. *J. Exp. Med.* 187, 1169–1178.
- Askew, D.S., Ashmun, R.A., Simmons, B.C., Cleveland, J.L., 1991. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* 6, 1915–1922.
- Augenlicht, L.H., Wadler, S., Corner, G., Richards, C., Ryan, L., Multani, A.S., Pathak, S., Benson, A., Haller, D., Heerdt, B.G., 1997. Low-level c-myc amplification in human colonic carcinoma cell lines and tumors: a frequent, p53-independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi-institutional trial. *Cancer Res.* 57, 1769–1775.
- Avrameas, S., Hösli, P., Stanislawski, M., Rodrigot, M., Vogt, E., 1979. A Quantitative Study at the Single Cell Level of Immunoglobulin Antigenic Determinants Present on the Surface of Murine B and T Lymphocytes. *J. Immunol.* 122, 648–659.
- Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C.K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., Iacovoni, J., Daburon, V., Miller, K.M., Jackson, S.P., Legube, G., 2014. Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 366–374. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2796>
- Aziz, M., Holodick, N.E., Rothstein, T.L., Wang, P., 2015. The Role of B-1 Cells in Inflammation. *Immunol. Res.* 63, 153–166. <https://doi.org/10.1007/s12026-015-8708-3>
- Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C., Larsson, L.G., 2000. c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood* 95, 2104–2110.

- Banerji, J., Olson, L., Schaffner, W., 1983. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 33, 729–740.
- Basso, K., Saito, M., Sumazin, P., Margolin, A.A., Wang, K., Lim, W.-K., Kitagawa, Y., Schneider, C., Alvarez, M.J., Califano, A., Dalla-Favera, R., 2010. Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* 115, 975–984. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-227017>
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., Alt, F.W., 2005. The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 438, 508–511. <https://doi.org/10.1038/nature04255>
- Baumgarth, N., 2011. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 34–46. <https://doi.org/10.1038/nri2901>
- Bentley, D.L., Groudine, M., 1986. A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature* 321, 702–706. <https://doi.org/10.1038/321702a0>
- Birshtein, B.K., 2014. Epigenetic Regulation of Individual Modules of the immunoglobulin heavy chain locus 3' Regulatory Region. *Front. Immunol.* 5, 163. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00163>
- Birshtein, B.K., 2012. The role of CTCF binding sites in the 3' immunoglobulin heavy chain regulatory region. *Front. Genet.* 3, 251. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00251>
- Blackwell, T.K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F.W., Eisenman, R.N., Weintraub, H., 1993. Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.* 13, 5216–5224.
- Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., Weintraub, H., 1990. Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250, 1149–1151.
- Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., 1991. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211–1217.
- Blattner, F.R., Tucker, P.W., 1984. The molecular biology of immunoglobulin D. *Nature* 307, 417–422.
- Boboila, C., Alt, F.W., Schwer, B., 2012. Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv. Immunol.* 116, 1–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394300-2.00001-6>
- Boboila, C., Jankovic, M., Yan, C.T., Wang, J.H., Wesemann, D.R., Zhang, T., Fazeli, A., Feldman, L., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M., Alt, F.W., 2010. Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3034–3039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915067107>
- Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B.C., Marshak-Rothstein, A., Chen, J., 2000. Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 1184–1189.

- Bokelmann, I., Mahlke, U., 2008. Valproic acid sensitizes chronic lymphocytic leukemia cells to apoptosis and restores the balance between pro- and antiapoptotic proteins. *Mol. Med. Camb. Mass* 14, 20–27. <https://doi.org/10.2119/2007-00084.Bokelmann>
- Bolden, J.E., Peart, M.J., Johnstone, R.W., 2006. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 769–784. <https://doi.org/10.1038/nrd2133>
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Afshar, R., Featherstone, K., Oltz, E.M., Corcoran, A.E., 2007. Antisense intergenic transcription precedes Igh D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer Emu. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5523–5533. <https://doi.org/10.1128/MCB.02407-06>
- Bouchard, C., Lee, S., Paulus-Hock, V., Loddenkemper, C., Eilers, M., Schmitt, C.A., 2007. FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. *Genes Dev.* 21, 2775–2787. <https://doi.org/10.1101/gad.453107>
- Braikia, F.-Z., Conte, C., Moutahir, M., Denizot, Y., Cogné, M., Khamlichi, A.A., 2015. Developmental Switch in the Transcriptional Activity of a Long-Range Regulatory Element. *Mol. Cell. Biol.* 35, 3370–3380. <https://doi.org/10.1128/MCB.00509-15>
- Brandt, V.L., Roth, D.B., 2009. Recent insights into the formation of RAG-induced chromosomal translocations. *Adv. Exp. Med. Biol.* 650, 32–45.
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Lorient, A., Viré, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., Pelicci, P.G., Amati, B., Kouzarides, T., de Launoit, Y., Di Croce, L., Fuks, F., 2005. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.* 24, 336–346. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600509>
- Buchanan, K.L., Hodgetts, S.I., Byrnes, J., Webb, C.F., 1995. Differential transcription efficiency of two Ig VH promoters in vitro. *J. Immunol.* 155, 4270–4277.
- Calado, D.P., Sasaki, Y., Godinho, S.A., Pellerin, A., Köchert, K., Sleckman, B.P., de Alborán, I.M., Janz, M., Rodig, S., Rajewsky, K., 2012. MYC is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat. Immunol.* 13, 1092–1100. <https://doi.org/10.1038/ni.2418>
- Calsou, P., Delteil, C., Frit, P., Drouet, J., Salles, B., 2003. Coordinated assembly of Ku and p46 subunits of the DNA-dependent protein kinase on DNA ends is necessary for XRCC4-ligase IV recruitment. *J. Mol. Biol.* 326, 93–103.
- Campbell, P.J., Stephens, P.J., Pleasance, E.D., O'Meara, S., Li, H., Santarius, T., Stebbings, L.A., Leroy, C., Edkins, S., Hardy, C., Teague, J.W., Menzies, A., Goodhead, I., Turner, D.J., Clee, C.M., Quail, M.A., Cox, A., Brown, C., Durbin, R., Hurles, M.E., Edwards, P.A.W., Bignell, G.R., Stratton, M.R., Futreal, P.A., 2008. Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing. *Nat. Genet.* 40, 722–729. <https://doi.org/10.1038/ng.128>
- Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein, J.N., Collisson, E.A., Mills, G.B., Shaw, K.R.M., Ozenberger, B.A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., Stuart, J.M., 2013. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat. Genet.* 45, 1113–1120. <https://doi.org/10.1038/ng.2764>
- Capolunghi, F., Cascioli, S., Giorda, E., Rosado, M.M., Plebani, A., Auriti, C., Seganti, G., Zuntini, R., Ferrari, S., Cagliuso, M., Quinti, I., Carsetti, R., 2008. CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 800–808.

- Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K., Pillai, S., 2001. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21. *Immunity* 14, 603–615.
- Casellas, R., Shih, T.A., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K., Nussenzweig, M.C., 2001. Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* 291, 1541–1544. <https://doi.org/10.1126/science.291.5508.1541>
- Cattoretti, G., Büttner, M., Shaknovich, R., Kremmer, E., Alobeid, B., Niedobitek, G., 2006. Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* 107, 3967–3975. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4170>
- Cerutti, A., Cols, M., Puga, I., 2013. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 118–132. <https://doi.org/10.1038/nri3383>
- Chakraborty, T., Chowdhury, D., Keyes, A., Jani, A., Subrahmanyam, R., Ivanova, I., Sen, R., 2007. Repeat organization and epigenetic regulation of the DH-Cmu domain of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Mol. Cell* 27, 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.07.010>
- Chakraborty, T., Perlot, T., Subrahmanyam, R., Jani, A., Goff, P.H., Zhang, Y., Ivanova, I., Alt, F.W., Sen, R., 2009. A 220-nucleotide deletion of the intronic enhancer reveals an epigenetic hierarchy in immunoglobulin heavy chain locus activation. *J. Exp. Med.* 206, 1019–1027. <https://doi.org/10.1084/jem.20081621>
- Chateauvieux, S., Morceau, F., Dicato, M., Diederich, M., 2010. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. *BioMed Res. Int.* 2010.
- Chaudhuri, J., Alt, F.W., 2004. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 541–552. <https://doi.org/10.1038/nri1395>
- Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., Manis, J., Alt, F.W., 2007. Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv. Immunol.* 94, 157–214. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)94006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)94006-1)
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., Alt, F.W., 2003. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422, 726–730. <https://doi.org/10.1038/nature01574>
- Chauveau, C., Cogné, M., 1996. Palindromic structure of the IgH 3'locus control region. *Nat. Genet.* 14, 15–16. <https://doi.org/10.1038/ng0996-15>
- Chauveau, C., Pinaud, E., Cogne, M., 1998. Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur. J. Immunol.* 28, 3048–3056. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199810\)28:10<3048::AID-IMMU3048>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3048::AID-IMMU3048>3.0.CO;2-V)
- Chen, C., Birshtein, B.K., 1997. Virtually identical enhancers containing a segment of homology to murine 3'IgH-E(hs1,2) lie downstream of human Ig C alpha 1 and C alpha 2 genes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 159, 1310–1318.
- Chen, H., Liao, D., Matt Holl, T., Snowden, P., Ueda, Y., Kelsoe, G., 2010. Genetic regulation of pristane-induced oil granuloma responses. *Int. J. Exp. Pathol.* 91, 472–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00732.x>

- Chen, J., Young, F., Bottaro, A., Stewart, V., Smith, R.K., Alt, F.W., 1993. Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *EMBO J.* 12, 4635–4645.
- Chen, K., Cerutti, A., 2010. New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunol. Rev.* 237, 160–179. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00929.x>
- Chen, K., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N.W., Bengten, E., Edholm, E.-S., Santini, P.A., Rath, P., Chiu, A., Cattalini, M., Litzman, J., Bussel, J., Huang, B., Meini, A., Riesbeck, K., Cunningham-Rundles, C., Plebani, A., Cerutti, A., 2009. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, pro-inflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat. Immunol.* 10, 889–898. <https://doi.org/10.1038/ni.1748>
- Cheung, W.C., Kim, J.S., Linden, M., Peng, L., Van Ness, B., Polakiewicz, R.D., Janz, S., 2004. Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-X(L) to cause plasma cell neoplasms in mice. *J. Clin. Invest.* 113, 1763–1773. <https://doi.org/10.1172/JCI20369>
- Chiarle, R., Zhang, Y., Frock, R.L., Lewis, S.M., Molinie, B., Ho, Y.-J., Myers, D.R., Choi, V.W., Compagno, M., Malkin, D.J., Neubergh, D., Monti, S., Giallourakis, C.C., Gostissa, M., Alt, F.W., 2011. Genome-Wide Translocation Sequencing Reveals Mechanisms of Chromosome Breaks and Rearrangements in B Cells. *Cell* 147, 107–119. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.049>
- Choi, J.H., Wang, K.-W., Zhang, D., Zhan, Xiaowei, Wang, T., Bu, C.-H., Behrendt, C.L., Zeng, M., Wang, Y., Misawa, T., Li, X., Tang, M., Zhan, Xiaoming, Scott, L., Hildebrand, S., Murray, A.R., Moresco, E.M.Y., Hooper, L.V., Beutler, B., 2017. IgD class switching is initiated by microbiota and limited to mucosa-associated lymphoid tissue in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E1196–E1204. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621258114>
- Chung, J.B., Silverman, M., Monroe, J.G., 2003. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* 24, 343–349.
- Ci, W., Polo, J.M., Cerchietti, L., Shaknovich, R., Wang, L., Yang, S.N., Ye, K., Farinha, P., Horsman, D.E., Gascoyne, R.D., Elemento, O., Melnick, A., 2009. The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* 113, 5536–5548. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-193037>
- Ciechanover, A., DiGiuseppe, J.A., Schwartz, A.L., Brodeur, G.M., 1991. Degradation of MYCN oncoprotein by the ubiquitin system. *Prog. Clin. Biol. Res.* 366, 37–43.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., Busslinger, M., 2007. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* 8, 463–470. <https://doi.org/10.1038/ni1454>
- Collins, S., Groudine, M., 1982. Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature* 298, 679–681.
- Constantinescu, A., Schlissel, M.S., 1997. Changes in Locus-specific V(D)J Recombinase Activity Induced by Immunoglobulin Gene Products during B Cell Development. *J. Exp. Med.* 185, 609–620.
- Corcoran, A.E., 2005. Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin. Immunol.* 17, 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.01.002>
- Corfe, S.A., Paige, C.J., 2012. The many roles of IL-7 in B cell development; mediator of survival, proliferation and differentiation. *Semin. Immunol.* 24, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.02.001>

- Cortizas, E.M., Zahn, A., Hajjar, M.E., Patenaude, A.-M., Di Noia, J.M., Verdun, R.E., 2013. Alternative end-joining and classical nonhomologous end-joining pathways repair different types of double-strand breaks during class-switch recombination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 5751–5763. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301300>
- Cory, S., Gerondakis, S., Adams, J.M., 1983. Interchromosomal recombination of the cellular oncogene c-myc with the immunoglobulin heavy chain locus in murine plasmacytomas is a reciprocal exchange. *EMBO J.* 2, 697–703.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M.D., Avrameas, S., 1995. Natural autoantibodies. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 812–818.
- Cowling, V.H., Chandriani, S., Whitfield, M.L., Cole, M.D., 2006. A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4226–4239. <https://doi.org/10.1128/MCB.01959-05>
- Cremer, T., Cremer, M., 2010. Chromosome Territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003889>
- Crews, S., Barth, R., Hood, L., Prehn, J., Calame, K., 1982. Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmacytomas. *Science* 218, 1319–1321.
- D’Addabbo, P., Scascitelli, M., Giambra, V., Rocchi, M., Frezza, D., 2011. Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1.2 within the palindrome of IgH 3’Regulatory Region. *BMC Evol. Biol.* 11, 71. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-71>
- Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., Croce, C.M., 1982. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7824–7827.
- Daly, J., Licence, S., Nanou, A., Morgan, G., Mårtensson, I.-L., 2007. Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion. *EMBO J.* 26, 4273–4282. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601846>
- Dang, C.V., 1999. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1–11.
- Dang, C.V., O’Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., Li, F., 2006. The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* 16, 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.014>
- Daniel, J.A., Santos, M.A., Wang, Z., Zang, C., Schwab, K.R., Jankovic, M., Filsuf, D., Chen, H.-T., Gazumyan, A., Yamane, A., Cho, Y.-W., Sun, H.-W., Ge, K., Peng, W., Nussenzweig, M.C., Casellas, R., Dressler, G.R., Zhao, K., Nussenzweig, A., 2010. PTIP promotes chromatin changes critical for immunoglobulin class switch recombination. *Science* 329, 917–923. <https://doi.org/10.1126/science.1187942>
- Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R., Bradley, A., 1993. A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev.* 7, 671–682.
- de Alborán, I.M., Baena, E., Martinez-A, C., 2004. c-Myc-deficient B lymphocytes are resistant to spontaneous and induced cell death. *Cell Death Differ.* 11, 61–68. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401319>

- De Silva, N.S., Klein, U., 2015. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148. <https://doi.org/10.1038/nri3804>
- Degner, S.C., Wong, T.P., Jankevicius, G., Feeney, A.J., 2009. Cutting edge: developmental stage-specific recruitment of cohesin to CTCF sites throughout immunoglobulin loci during B lymphocyte development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 44–48.
- Desiderio, S.V., Yancopoulos, G.D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M.A., Landau, N., Alt, F.W., 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. <https://doi.org/10.1038/311752a0>
- Di Noia, J.M., Neuberger, M.S., 2007. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740>
- Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., Papavasiliou, F.N., 2003. AID Mediates Hypermutation by Deaminating Single Stranded DNA. *J. Exp. Med.* 197, 1291–1296. <https://doi.org/10.1084/jem.20030481>
- Dominguez-Sola, D., Vitorica, G.D., Ying, C.Y., Phan, R.T., Saito, M., Nussenzweig, M.C., Dalla-Favera, R., 2012. c-MYC is required for germinal center selection and cyclic re-entry. *Nat. Immunol.* 13, 1083–1091. <https://doi.org/10.1038/ni.2428>
- Dominguez-Sola, D., Ying, C.Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D.A., Gu, W., Gautier, J., Dalla-Favera, R., 2007. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* 448, 445–451. <https://doi.org/10.1038/nature05953>
- Dudley, J.P., Mertz, J.A., Rajan, L., Lozano, M., Broussard, D.R., 2002. What retroviruses teach us about the involvement of c-Myc in leukemias and lymphomas. *Leukemia* 16, 1086–1098. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402451>
- Dunleavy, E., Pidoux, A., Allshire, R., 2005. Centromeric chromatin makes its mark. *Trends Biochem. Sci.* 30, 172–175. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.02.007>
- Duong, B.H., Ota, T., Ait-Azzouzene, D., Aoki-Ota, M., Vela, J.L., Huber, C., Walsh, K., Gavin, A.L., Nemazee, D., 2010. Peripheral B cell tolerance and function in transgenic mice expressing an IgD superantigen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 4143–4158. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903564>
- Duyao, M.P., Kessler, D.J., Spicer, D.B., Bartholomew, C., Cleveland, J.L., Siekevitz, M., Sonenshein, G.E., 1992. Transactivation of the c-myc promoter by human T cell leukemia virus type 1 tax is mediated by NF kappa B. *J. Biol. Chem.* 267, 16288–16291.
- Dyson, P.J., Littlewood, T.D., Forster, A., Rabbitts, T.H., 1985. Chromatin structure of transcriptionally active and inactive human c-myc alleles. *EMBO J.* 4, 2885–2891.
- Dyson, P.J., Rabbitts, T.H., 1985. Chromatin structure around the c-myc gene in Burkitt lymphomas with upstream and downstream translocation points. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 1984–1988.
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., Hood, L., 1980. An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell* 19, 981–992.

- Ebert, A., McManus, S., Tagoh, H., Medvedovic, J., Salvaggio, G., Novatchkova, M., Tamir, I., Sommer, A., Jaritz, M., Busslinger, M., 2011. The distal V(H) gene cluster of the Igh locus contains distinct regulatory elements with Pax5 transcription factor-dependent activity in pro-B cells. *Immunity* 34, 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.005>
- Eckhardt, L.A., Birshstein, B.K., 1985. Independent immunoglobulin class-switch events occurring in a single myeloma cell line. *Mol. Cell. Biol.* 5, 856–868.
- Ehrenstein, M.R., Notley, C.A., 2010. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 778–786. <https://doi.org/10.1038/nri2849>
- Eick, D., Bornkamm, G.W., 1986. Transcriptional arrest within the first exon is a fast control mechanism in c-myc gene expression. *Nucleic Acids Res.* 14, 8331–8346. <https://doi.org/10.1093/nar/14.21.8331>
- Eischen, C.M., Woo, D., Roussel, M.F., Cleveland, J.L., 2001. Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5063–5070. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.15.5063-5070.2001>
- Eisen, H.N., Reilly, E.B., 1985. Lambda Chains and Genes in Inbred Mice. *Annu. Rev. Immunol.* 3, 337–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.03.040185.002005>
- Enders, A., Short, A., Miosge, L.A., Bergmann, H., Sontani, Y., Bertram, E.M., Whittle, B., Balakishnan, B., Yoshida, K., Sjollem, G., Field, M.A., Andrews, T.D., Hagiwara, H., Goodnow, C.C., 2014. Zinc-finger protein ZFP318 is essential for expression of IgD, the alternatively spliced Igh product made by mature B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4513–4518. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402739111>
- Engel, H., Rolink, A., Weiss, S., 1999. B cells are programmed to activate kappa and lambda for rearrangement at consecutive developmental stages. *Eur. J. Immunol.* 29, 2167–2176. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199907\)29:07<2167::AID-IMMU2167>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199907)29:07<2167::AID-IMMU2167>3.0.CO;2-H)
- Erikson, J., Ar-Rushdi, A., Drwina, H.L., Nowell, P.C., Croce, C.M., 1983. Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 820–824.
- Ernst, P., Smale, S.T., 1995. Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* 2, 427–438.
- Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., Hancock, D.C., 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119–128.
- Facchini, L.M., Penn, L.Z., 1998. The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 633–651.
- Featherstone, K., Wood, A.L., Bowen, A.J., Corcoran, A.E., 2010. The mouse immunoglobulin heavy chain V-D intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V(D)J recombination. *J. Biol. Chem.* 285, 9327–9338. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.098251>
- Fiancette, R., Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Laffleur, B., Magnone, V., Cogné, M., 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. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 187, 5772–5782. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102059>

- Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J., Lobanenkova, V.V., 1996. An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2802–2813.
- Fischle, W., Wang, Y., Allis, C.D., 2003. Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 172–183.
- Fitzsimmons, S.P., Bernstein, R.M., Max, E.E., Skok, J.A., Shapiro, M.A., 2007. Dynamic changes in accessibility, nuclear positioning, recombination, and transcription at the Ig kappa locus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 5264–5273.
- Förster, I., Rajewsky, K., 1990. The bulk of the peripheral B-cell pool in mice is stable and not rapidly renewed from the bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4781–4784.
- Fu, S.M., Winchester, R.J., Kunkel, H.G., 1975. Similar idiotypic specificity for the membrane IgD and IgM of human B lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 114, 250–252.
- Galaktionov, K., Chen, X., Beach, D., 1996. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* 382, 511–517. <https://doi.org/10.1038/382511a0>
- Gallant, P., Shio, Y., Cheng, P.F., Parkhurst, S.M., Eisenman, R.N., 1996. Myc and Max homologs in *Drosophila*. *Science* 274, 1523–1527.
- Garrett, F.E., Emelyanov, A.V., Sepulveda, M.A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L.A., Lobanenkova, V.V., Birshtein, B.K., 2005. Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1511–1525. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1511-1525.2005>
- Gaszner, M., Felsenfeld, G., 2006. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 7, 703–713. <https://doi.org/10.1038/nrg1925>
- Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E., Schiff, C., 2002. Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13014–13019. <https://doi.org/10.1073/pnas.202323999>
- Geisberger, R., Lamers, M., Achatz, G., 2006. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* 118, 429–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02386.x>
- Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., Defrance, T., 2007. TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 178, 7779–7786.
- Genetta, T., Ruezinsky, D., Kadesch, T., 1994. Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6153–6163.
- Gerasimova, T., Guo, C., Ghosh, A., Qiu, X., Montefiori, L., Verma-Gaur, J., Choi, N.M., Feeney, A.J., Sen, R., 2015. A structural hierarchy mediated by multiple nuclear factors establishes IgH locus conformation. *Genes Dev.* 29, 1683–1695. <https://doi.org/10.1101/gad.263871.115>
- Ghazzaoui, N., Issaoui, H., Saintamand, A., Oblet, C., Carrion, C., Denizot, Y., 2018. The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region superenhancer controls mouse B1 B-cell fate

and late VDJ repertoire diversity. *Blood Adv.* 2, 252–262. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017014423>

Ghazzaoui, N., Saintamand, A., Issaoui, H., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., 2017. The IgH 3' regulatory region and c-myc-induced B-cell lymphomagenesis. *Oncotarget* 8, 7059–7067. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12535>

Giallourakis, C.C., Franklin, A., Guo, C., Cheng, H.-L., Yoon, H.S., Gallagher, M., Perlot, T., Andzelm, M., Murphy, A.J., Macdonald, L.E., Yancopoulos, G.D., Alt, F.W., 2010. Elements between the IgH variable (V) and diversity (D) clusters influence antisense transcription and lineage-specific V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22207–22212. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015954107>

Gilbert, N., Boyle, S., Fiegler, H., Woodfine, K., Carter, N.P., Bickmore, W.A., 2004. Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. *Cell* 118, 555–566. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.011>

Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T., Tonegawa, S., 1983. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* 33, 717–728.

Goh, A.M., Coffill, C.R., Lane, D.P., 2011. The role of mutant p53 in human cancer. *J. Pathol.* 223, 116–126. <https://doi.org/10.1002/path.2784>

Goldmit, M., Ji, Y., Skok, J., Roldan, E., Jung, S., Cedar, H., Bergman, Y., 2005. Epigenetic ontogeny of the Igk locus during B cell development. *Nat. Immunol.* 6, 198–203. <https://doi.org/10.1038/ni1154>

Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N., White, R.J., 2003. Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* 421, 290–294. <https://doi.org/10.1038/nature01327>

Good-Jacobson, K.L., Tarlinton, D.M., 2012. Multiple routes to B-cell memory. *Int. Immunol.* 24, 403–408. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs050>

Gostissa, M., Yan, C.T., Bianco, J.M., Cogné, M., Pinaud, E., Alt, F.W., 2009. Long-range oncogenic activation of Igh-c-myc translocations by the Igh 3' regulatory region. *Nature* 462, 803–807. <https://doi.org/10.1038/nature08633>

Grandori, C., Cowley, S.M., James, L.P., Eisenman, R.N., 2000. The Myc/Max/Mad Network and the Transcriptional Control of Cell Behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 653–699. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.653>

Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z.A., Ngouenet, C., Galloway, D.A., Eisenman, R.N., White, R.J., 2005. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat. Cell Biol.* 7, 311–318. <https://doi.org/10.1038/ncb1224>

Grant, S., Easley, C., Kirkpatrick, P., 2007. Vorinostat. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 21–22. <https://doi.org/10.1038/nrd2227>

Greenbaum, S., Zhuang, Y., 2002. Identification of E2A target genes in B lymphocyte development by using a gene tagging-based chromatin immunoprecipitation system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15030–15035. <https://doi.org/10.1073/pnas.232299999>

Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E.E., Avis, T., Barthorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jenkinson, A., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Cahill, D.P., Louis, D.N., Goldstraw, P., Nicholson, A.G., Brasseur, F., Looijenga, L., Weber, B.L., Chiew, Y.-E., DeFazio, A., Greaves, M.F., Green, A.R., Campbell, P., Birney, E., Easton, D.F., Chenevix-Trench, G., Tan, M.-H., Khoo, S.K., Teh, B.T., Yuen, S.T., Leung, S.Y., Wooster, R., Futreal, P.A., Stratton, M.R., 2007. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153–158. <https://doi.org/10.1038/nature05610>

Grewal, S.S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R.N., Edgar, B.A., 2005. Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nat. Cell Biol.* 7, 295–302. <https://doi.org/10.1038/ncb1223>

Griep, A.E., Westphal, H., 1988. Antisense Myc sequences induce differentiation of F9 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6806–6810.

Guglielmi, L., Le Bert, M., Comte, I., Dessain, M.L., Drouet, M., Ayer-Le Lievre, C., Cogné, M., 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. *Biochim. Biophys. Acta* 1642, 181–190.

Guglielmi, L., Le Bert, M., Truffinet, V., Cogné, M., Denizot, Y., 2003b. Insulators to improve expression of a 3'(')IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 466–471.

Guglielmi, L., Truffinet, V., Carrion, C., Le Bert, M., Cogné, N., Cogné, M., Denizot, Y., 2005. The 5'HS4 insulator element is an efficient tool to analyse the transient expression of an Eμ-GFP vector in a transgenic mouse model. *Transgenic Res.* 14(4), 361–364. <https://doi.org/10.1007/s11248-005-3239-7>

Gunn, K.E., Brewer, J.W., 2006. Evidence that marginal zone B cells possess an enhanced secretory apparatus and exhibit superior secretory activity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 3791–3798.

Guo, Changying, Gerasimova, T., Hao, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Selimyan, R., Oltz, E.M., Sen, R., 2011. Two forms of loops generate the chromatin conformation of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Cell* 147, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.049>

Guo, Chunguang, Yoon, H.S., Franklin, A., Jain, S., Ebert, A., Cheng, H.-L., Hansen, E., Despo, O., Bossen, C., Vettermann, C., Bates, J.G., Richards, N., Myers, D., Patel, H., Gallagher, M., Schlissel, M.S., Murre, C., Busslinger, M., Giallourakis, C.C., Alt, F.W., 2011. CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* 477, 424–430. <https://doi.org/10.1038/nature10495>

Guo, L., Tian, J., Guo, Z., Zheng, B., Han, S., 2011. The absence of immunoglobulin D B cell receptor-mediated signals promotes the production of autoantibodies and exacerbates glomerulonephritis in murine lupus. *Clin. Exp. Immunol.* 164, 227–235. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04332.x>

- Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A., Tedder, T.F., 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.011>
- Hamlyn, P.H., Rabbitts, T.H., 1983. Translocation joins c-myc and immunoglobulin gamma 1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-myc oncogene. *Nature* 304, 135–139.
- Han, S.-S., Yun, H., Son, D.-J., Tompkins, V.S., Peng, L., Chung, S.-T., Kim, J.-S., Park, E.-S., Janz, S., 2010. NF-kappaB/STAT3/PI3K signaling crosstalk in iMyc E mu B lymphoma. *Mol. Cancer* 9, 97. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-97>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hann, S.R., 2006. Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function. *Semin. Cancer Biol.* 16, 288–302. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.08.004>
- Hann, S.R., Eisenman, R.N., 1984. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2486–2497.
- Haque, S.F.Y., Bevington, S.L., Boyes, J., 2013. The E λ (3-1) enhancer is essential for V(D)J recombination of the murine immunoglobulin lambda light chain locus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441, 482–487.
- Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Riblet, R.J., Hayakawa, K., 1989. A single VH gene is utilized predominantly in anti-BrMRBC hybridomas derived from purified Ly-1 B cells. Definition of the VH11 family. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 142, 3643–3651.
- Hardy, R.R., Kincade, P.W., Dorshkind, K., 2007. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* 26, 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.013>
- Havran, W.L., DiGiusto, D.L., Cambier, J.C., 1984. mIgM:mIgD ratios on B cells: mean mIgD expression exceeds mIgM by 10-fold on most splenic B cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 132, 1712–1716.
- Hayakawa, K., Hardy, R.R., Honda, M., Herzenberg, L.A., Steinberg, A.D., Herzenberg, L.A., 1984. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 2494–2498.
- Helmink, B.A., Sleckman, B.P., 2012. The response to and repair of RAG-mediated DNA double-strand breaks. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 175–202. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101320>
- Hemann, M.T., Bric, A., Teruya-Feldstein, J., Herbst, A., Nilsson, J.A., Cordon-Cardo, C., Cleveland, J.L., Tansey, W.P., Lowe, S.W., 2005. Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* 436, 807–811. <https://doi.org/10.1038/nature03845>
- Henderson, A., Calame, K., 1998. TRANSCRIPTIONAL REGULATION DURING B CELL DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 163–200. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.163>

Henseler, R.A., Romer, E.J., Sulentic, C.E.W., 2009. Diverse chemicals including aryl hydrocarbon receptor ligands modulate transcriptional activity of the 3'immunoglobulin heavy chain regulatory region. *Toxicology* 261, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.03.015>

Hentges, P., Ahnesorg, P., Pitcher, R.S., Bruce, C.K., Kysela, B., Green, A.J., Bianchi, J., Wilson, T.E., Jackson, S.P., Doherty, A.J., 2006. Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *J. Biol. Chem.* 281, 37517–37526. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608727200>

Herbst, A., Hemann, M.T., Tworkowski, K.A., Salghetti, S.E., Lowe, S.W., Tansey, W.P., 2005. A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep.* 6, 177–183. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400333>

Herrick, D.J., Ross, J., 1994. The half-life of c-myc mRNA in growing and serum-stimulated cells: influence of the coding and 3' untranslated regions and role of ribosome translocation. *Mol. Cell. Biol.* 14, 2119–2128.

Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., 1989. Toward a layered immune system. *Cell* 59, 953–954.

Herzog, S., Reth, M., Jumaa, H., 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 195–205. <https://doi.org/10.1038/nri2491>

Hirano, M., Das, S., Guo, P., Cooper, M.D., 2011. Chapter 4 - The Evolution of Adaptive Immunity in Vertebrates, in: Alt, F.W. (Ed.), *Advances in Immunology*. Academic Press, pp. 125–157. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387664-5.00004-2>

Hoffman, B., Liebermann, D.A., 2008. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* 27, 6462–6472. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.312>

Holodick, N.E., Rothstein, T.L., 2015. B cells in the aging immune system: time to consider B-1 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1362, 176–187. <https://doi.org/10.1111/nyas.12825>

Holt, J.T., Redner, R.L., Nienhuis, A.W., 1988. An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 8, 963–973. <https://doi.org/10.1128/MCB.8.2.963>

Hung, T., Chang, H.Y., 2010. Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms. *RNA Biol.* 7, 582–585.

Hwang, J.K., Alt, F.W., Yeap, L.-S., 2015. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol. Spectr.* 3, MDNA3-0037–2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0037-2014>

Inlay, M., Alt, F.W., Baltimore, D., Xu, Y., 2002. Essential roles of the kappa light chain intronic enhancer and 3' enhancer in kappa rearrangement and demethylation. *Nat. Immunol.* 3, 463–468. <https://doi.org/10.1038/ni790>

Inlay, M.A., Lin, T., Gao, H.H., Xu, Y., 2006. Critical roles of the immunoglobulin intronic enhancers in maintaining the sequential rearrangement of IgH and Igk loci. *J. Exp. Med.* 203, 1721–1732. <https://doi.org/10.1084/jem.20052310>

Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., Altucci, L., Nervi, C., Minucci, S., Pelicci, P.G., 2005. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat. Med.* 11, 71–76. <https://doi.org/10.1038/nm1160>

- Issaoui, H., Ghazzoui, N., Denizot, Y., 2018. [The enigmatic IgD class switch recombination]. *Med. Sci. MS* 34, 294–296. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183404005>
- Ito, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M., Honjo, T., 2004. Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1975–1980. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307335101>
- Jaeger, S., Fernandez, B., Ferrier, P., 2013. Epigenetic aspects of lymphocyte antigen receptor gene rearrangement or “when stochasticity completes randomness.” *Immunology* 139, 141–150. <https://doi.org/10.1111/imm.12057>
- Jeevan-Raj, B.P., Robert, I., Heyer, V., Page, A., Wang, J.H., Cammas, F., Alt, F.W., Losson, R., Reina-San-Martin, B., 2011. Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 208, 1649–1660. <https://doi.org/10.1084/jem.20110118>
- Jenuwein, T., Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>
- Ji, Y., Resch, W., Corbett, E., Yamane, A., Casellas, R., Schatz, D.G., 2010. The in vivo pattern of binding of RAG1 and RAG2 to antigen receptor loci. *Cell* 141, 419–431. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.010>
- Johnston, L.A., Prober, D.A., Edgar, B.A., Eisenman, R.N., Gallant, P., 1999. *Drosophila myc* regulates cellular growth during development. *Cell* 98, 779–790.
- Jones, J.M., Gellert, M., 2002. Ordered assembly of the V(D)J synaptic complex ensures accurate recombination. *EMBO J.* 21, 4162–4171.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., 2006. MECHANISM AND CONTROL OF V(D)J RECOMBINATION AT THE IMMUNOGLOBULIN HEAVY CHAIN LOCUS. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 541–570. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115830>
- Kadesch, T., 1992. Helix-loop-helix proteins in the regulation of immunoglobulin gene transcription. *Immunol. Today* 13, 31–36.
- Kantor, A.B., 1996. V-gene usage and N-region insertions in B-1a, B-1b and conventional B cells. *Semin. Immunol.* 8, 29–35. <https://doi.org/10.1006/smim.1996.0005>
- Kantor, A.B., Herzenberg, L.A., 1993. Origin of murine B cell lineages. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 501–538. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.002441>
- Kantor, A.B., Merrill, C.E., Herzenberg, L.A., Hillson, J.L., 1997. An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 158, 1175–1186.
- Karasuyama, H., Kudo, A., Melchers, F., 1990. The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J. Exp. Med.* 172, 969–972.
- Kerr, W.G., Hendershot, L.M., Burrows, P.D., 1991. Regulation of IgM and IgD expression in human B-lineage cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 146, 3314–3321.
- Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J.M., 2015. Enhancer RNAs: a class of long noncoding RNAs synthesized at enhancers. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a018622. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018622>

- Kirillova, I., Chaisson, M., Fausto, N., 1999. Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 819–828.
- Kirschbaum, M., Frankel, P., Popplewell, L., Zain, J., Delioukina, M., Pullarkat, V., Matsuoka, D., Pulone, B., Rotter, A.J., Espinoza-Delgado, I., Nademanee, A., Forman, S.J., Gandara, D., Newman, E., 2011. Phase II study of vorinostat for treatment of relapsed or refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 29, 1198–1203. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.1398>
- Kläsener, K., Maity, P.C., Hobeika, E., Yang, J., Reth, M., 2014. B cell activation involves nanoscale receptor reorganizations and inside-out signaling by Syk [WWW Document]. *eLife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.02069>
- Klefstrom, J., Arighi, E., Littlewood, T., Jäättelä, M., Saksela, E., Evan, G.I., Alitalo, K., 1997. Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-Myc involves p53 and impaired NF-kappaB activation. *EMBO J.* 16, 7382–7392. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.24.7382>
- Klein, I.A., Resch, W., Jankovic, M., Oliveira, T., Yamane, A., Nakahashi, H., Di Virgilio, M., Bothmer, A., Nussenzweig, A., Robbiani, D.F., Casellas, R., Nussenzweig, M.C., 2011. Translocation-Capture Sequencing Reveals the Extent and Nature of Chromosomal Rearrangements in B Lymphocytes. *Cell* 147, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.048>
- Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., Dalla-Favera, R., 2003. Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2639–2644. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437996100>
- Knoepfler, P.S., 2007. Myc goes global: new tricks for an old oncogene. *Cancer Res.* 67, 5061–5063. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0426>
- Koelsch, K., Zheng, N.-Y., Zhang, Q., Duty, A., Helms, C., Mathias, M.D., Jared, M., Smith, K., Capra, J.D., Wilson, P.C., 2007. Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals. *J. Clin. Invest.* 117, 1558–1565. <https://doi.org/10.1172/JCI27628>
- Kosak, S.T., 2004. Form follows function: the genomic organization of cellular differentiation. *Genes Dev.* 18, 1371–1384. <https://doi.org/10.1101/gad.1209304>
- Kosak, S.T., Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Le Beau, M.M., Fisher, A.G., Singh, H., 2002. Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* 296, 158–162. <https://doi.org/10.1126/science.1068768>
- Kracker, S., Radbruch, A., 2004. Immunoglobulin class switching: in vitro induction and analysis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 271, 149–159. <https://doi.org/10.1385/1-59259-796-3:149>
- Kroese, F.G., Ammerlaan, W.A., Deenen, G.J., 1992. Location and function of B-cell lineages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 651, 44–58.
- Kroese, F.G., de Waard, R., Bos, N.A., 1996. B-1 cells and their reactivity with the murine intestinal microflora. *Semin. Immunol.* 8, 11–18. <https://doi.org/10.1006/smim.1996.0003>
- Küppers, R., 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 251–262. <https://doi.org/10.1038/nrc1589>

- Kurosaki, T., Kometani, K., Ise, W., 2015. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 149–159. <https://doi.org/10.1038/nri3802>
- Lai, F., Shiekhatter, R., 2014. Enhancer RNAs: the new molecules of transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 25, 38–42. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.11.017>
- Lefranc, M.-P., 2009. [Antibody databases: IMGT, a French platform of world-wide interest]. *Med. Sci. MS* 25, 1020–1023. <https://doi.org/10.1051/medsci/200925121020>
- Lefranc, M.-P., Clement, O., Kaas, Q., Duprat, E., Chastellan, P., Coelho, I., Combres, K., Ginestoux, C., Giudicelli, V., Chaume, D., Lefranc, G., 2005. IMGT-Choreography for immunogenetics and immunoinformatics. *In Silico Biol.* 5, 45–60.
- Lemaître, C., Grabarz, A., Tsouroula, K., Andronov, L., Furst, A., Pankotai, T., Heyer, V., Rogier, M., Attwood, K.M., Kessler, P., Dellaire, G., Klaholz, B., Reina-San-Martin, B., Soutoglou, E., 2014. Nuclear position dictates DNA repair pathway choice. *Genes Dev.* 28, 2450–2463. <https://doi.org/10.1101/gad.248369.114>
- Li, F., Yan, Y., Pieretti, J., Feldman, D.A., Eckhardt, L.A., 2010. Comparison of identical and functional Igh alleles reveals a nonessential role for E μ in somatic hypermutation and class-switch recombination. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 185, 6049–6057. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902992>
- Li, L.H., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D., Ziff, E.B., 1994. c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J.* 13, 4070–4079.
- Li, W., Ty Lam, M., Notani, D., 2014. Enhancer RNAs. *Cell Cycle Georget. Tex* 13, 3151–3152. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.962860>
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragozy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M.A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L.A., Lander, E.S., Dekker, J., 2009. Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289–293. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>
- Limpens, J., de Jong, D., van Krieken, J.H., Price, C.G., Young, B.D., van Ommen, G.J., Kluin, P.M., 1991. Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 6, 2271–2276.
- Lin, C.Y., Lovén, J., Rahl, P.B., Paranal, R.M., Burge, C.B., Bradner, J.E., Lee, T.I., Young, R.A., 2012. Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* 151, 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.026>
- Lin, D., Ippolito, G.C., Zong, R.-T., Bryant, J., Koslovsky, J., Tucker, P., 2007. Bright/ARID3A contributes to chromatin accessibility of the immunoglobulin heavy chain enhancer. *Mol. Cancer* 6, 23. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-6-23>
- Lin, Y., Wong, K., Calame, K., 1997. Repression of c-myc transcription by Blimp-1, an inducer of terminal B cell differentiation. *Science* 276, 596–599.
- Lino, A.C., Dang, V.D., Lampropoulou, V., Welle, A., Joedicke, J., Pohar, J., Simon, Q., Thalmensi, J., Baures, A., Flühler, V., Sakwa, I., Stervbo, U., Ries, S., Jouneau, L., Boudinot, P., Tsubata, T., Adachi, T., Hutloff, A., Dörner, T., Zimmer-Strobl, U., de Vos, A.F., Dahlke, K., Loh, G., Korniotis, S., Goosmann, C., Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., Kaufmann, S.H.E., Walter,

- J., Fillatreau, S., 2018. LAG-3 Inhibitory Receptor Expression Identifies Immunosuppressive Natural Regulatory Plasma Cells. *Immunity* 49, 120–133.e9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.007>
- Little, C.D., Nau, M.M., Carney, D.N., Gazdar, A.F., Minna, J.D., 1983. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature* 306, 194–196.
- Liu, Y., Subrahmanyam, R., Chakraborty, T., Sen, R., Desiderio, S., 2007. A plant homeodomain in RAG-2 that binds Hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. *Immunity* 27, 561–571. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.005>
- Liubchenko, G.A., Appleberry, H.C., Holers, V.M., Banda, N.K., Willis, V.C., Lyubchenko, T., 2012. Potentially autoreactive naturally occurring transitional T3 B lymphocytes exhibit a unique signaling profile. *J. Autoimmun.* 38, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2011.12.005>
- Loder, B.F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., Carsetti, R., 1999. B Cell Development in the Spleen Takes Place in Discrete Steps and Is Determined by the Quality of B Cell Receptor–Derived Signals. *J. Exp. Med.* 190, 75–90. <https://doi.org/10.1084/jem.190.1.75>
- Lovely, G.A., Brewster, R.C., Schatz, D.G., Baltimore, D., Phillips, R., 2015. Single-molecule analysis of RAG-mediated V(D)J DNA cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1715–1723. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503477112>
- Lu, Z.P., Ju, Z.L., Shi, G.Y., Zhang, J.W., Sun, J., 2005. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 204–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.147>
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., Lieber, M.R., 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781–794.
- MacLennan, I.C., 1994. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 117–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001001>
- Macpherson, A.J., Slack, E., 2007. The functional interactions of commensal bacteria with intestinal secretory IgA. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 23, 673–678. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282f0d012>
- Maity, P.C., Blount, A., Jumaa, H., Ronneberger, O., Lillemeier, B.F., Reth, M., 2015. B cell antigen receptors of the IgM and IgD classes are clustered in different protein islands that are altered during B cell activation. *Sci. Signal.* 8, ra93. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005887>
- Maki, R., Roeder, W., Traunecker, A., Sidman, C., Wabl, M., Raschke, W., Tonegawa, S., 1981. The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* 24, 353–365.
- Mani, R.-S., Chinnaiyan, A.M., 2010. Triggers for genomic rearrangements: insights into genomic, cellular and environmental influences. *Nat. Rev. Genet.* 11, 819–829. <https://doi.org/10.1038/nrg2883>

- Mariani-Costantini, R., Escot, C., Theillet, C., Gentile, A., Merlo, G., Lidereau, R., Callahan, R., 1988. In situ c-myc expression and genomic status of the c-myc locus in infiltrating ductal carcinomas of the breast. *Cancer Res.* 48, 199–205.
- Marquet, M., Garot, A., Bender, S., Carrion, C., Rouaud, P., Lecardeur, S., Denizot, Y., Cogné, M., 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. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 193, 1171–1183. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302868>
- Mårtensson, I.-L., Almqvist, N., Grimsholm, O., Bernardi, A.I., 2010. The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett.* 584, 2572–2579. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.057>
- Martin, F., Kearney, J.F., 2002. Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 323–335. <https://doi.org/10.1038/nri799>
- Martin, F., Kearney, J.F., 2001. B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 195–201.
- Martin, F., Oliver, A.M., Kearney, J.F., 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617–629.
- Mateyak, M.K., Obaya, A.J., Adachi, S., Sedivy, J.M., 1997. Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 8, 1039–1048.
- Matthews, A.J., Zheng, S., DiMenna, L.J., Chaudhuri, J., 2014. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Adv. Immunol.* 122, 1–57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800267-4.00001-8>
- Matthias, P., Baltimore, D., 1993. The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3' enhancer close to the alpha constant region. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1547–1553. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.3.1547>
- Mauri, C., Menon, M., 2015. The expanding family of regulatory B cells. *Int. Immunol.* 27, 479–486. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv038>
- McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., Oettinger, M.A., 1995. Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83, 387–395.
- McDonnell, T.J., Korsmeyer, S.J., 1991. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 349, 254–256. <https://doi.org/10.1038/349254a0>
- McHeyzer-Williams, M.G., McLean, M.J., Lallor, P.A., Nossal, G.J., 1993. Antigen-driven B cell differentiation in vivo. *J. Exp. Med.* 178, 295–307.
- Meaburn, K.J., Misteli, T., Soutoglou, E., 2007. Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin. Cancer Biol.* 17, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.10.008>
- Mebius, R.E., Kraal, G., 2005. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 606–616. <https://doi.org/10.1038/nri1669>
- Medvedovic, J., Ebert, A., Tagoh, H., Tamir, I.M., Schwickert, T.A., Novatchkova, M., Sun, Q., Huis In 't Veld, P.J., Guo, C., Yoon, H.S., Denizot, Y., Holwerda, S.J.B., de Laat, W., Cogné,

- M., Shi, Y., Alt, F.W., 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. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.011>
- Meyer, K.B., Skogberg, M., Margenfeld, C., Ireland, J., Pettersson, S., 1995. Repression of the immunoglobulin heavy chain 3' enhancer by helix-loop-helix protein Id3 via a functionally important E47/E12 binding site: implications for developmental control of enhancer function. *Eur. J. Immunol.* 25, 1770–1777. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250643>
- Michaelson, J.S., Singh, M., Snapper, C.M., Sha, W.C., Baltimore, D., Birshstein, B.K., 1996. Regulation of 3' IgH enhancers by a common set of factors, including kappa B-binding proteins. *J. Immunol.* 156, 2828–2839.
- Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M., Busslinger, M., 2002. Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science* 297, 110–113. <https://doi.org/10.1126/science.1067518>
- Mills, F.C., Harindranath, N., Mitchell, M., Max, E.E., 1997. Enhancer complexes located downstream of both human immunoglobulin Calpha genes. *J. Exp. Med.* 186, 845–858.
- Miyagaki, T., Fujimoto, M., Sato, S., 2015. Regulatory B cells in human inflammatory and autoimmune diseases: from mouse models to clinical research. *Int. Immunol.* 27, 495–504. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv026>
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., Papaioannou, V.E., 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869–877.
- Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K., 2012. B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity* 36, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.11.017>
- Moore, K.W., Rogers, J., Hunkapiller, T., Early, P., Nottenburg, C., Weissman, I., Bazin, H., Wall, R., Hood, L.E., 1981. Expression of IgD may use both DNA rearrangement and RNA splicing mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 1800–1804. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.3.1800>
- Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Rajewsky, K., 2004. The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* 118, 539–544. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.023>
- Müller, J.R., Janz, S., Goedert, J.J., Potter, M., Rabkin, C.S., 1995. Persistence of immunoglobulin heavy chain/c-myc recombination-positive lymphocyte clones in the blood of human immunodeficiency virus-infected homosexual men. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6577–6581.
- Mundy, C.L., Patenge, N., Matthews, A.G.W., Oettinger, M.A., 2002. Assembly of the RAG1/RAG2 Synaptic Complex. *Mol. Cell. Biol.* 22, 69–77. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.1.69-77.2002>
- Münzel, P., Marx, D., Köchel, H., Schauer, A., Bock, K.W., 1991. Genomic alterations of the c-myc protooncogene in relation to the overexpression of c-erbB2 and Ki-67 in human breast and cervix carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 117, 603–607.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563.

- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., 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. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476.
- Muto, A., Hoshino, H., Madisen, L., Yanai, N., Obinata, M., Karasuyama, H., Hayashi, N., Nakauchi, H., Yamamoto, M., Groudine, M., Igarashi, K., 1998. Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer. *EMBO J.* 17, 5734–5743. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.19.5734>
- Muto, T., Muramatsu, M., Taniwaki, M., Kinoshita, K., Honjo, T., 2000. Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene. *Genomics* 68, 85–88. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6268>
- Nagasawa, T., 2006. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 107–116. <https://doi.org/10.1038/nri1780>
- Nahar, R., Ramezani-Rad, P., Mossner, M., Duy, C., Cerchietti, L., Geng, H., Dovat, S., Jumaa, H., Ye, B.H., Melnick, A., Müschen, M., 2011. Pre-B cell receptor-mediated activation of BCL6 induces pre-B cell quiescence through transcriptional repression of MYC. *Blood* 118, 4174–4178. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-331181>
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.-G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., Shimizu, A., 2003. Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* 302, 2137–2140. <https://doi.org/10.1126/science.1092481>
- Neel, B.G., Jhanwar, S.C., Chaganti, R.S., Hayward, W.S., 1982. Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7842–7846.
- Nepveu, A., Marcu, K.B., 1986. Intragenic pausing and anti-sense transcription within the murine c-myc locus. *EMBO J.* 5, 2859–2865.
- Neurath, M.F., Max, E.E., Strober, W., 1995. Pax5 (BSAP) regulates the murine immunoglobulin 3' alpha enhancer by suppressing binding of NF-alpha P, a protein that controls heavy chain transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 5336–5340. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5336>
- Neurath, M.F., Strober, W., Wakatsuki, Y., 1994. The murine Ig 3' alpha enhancer is a target site with repressor function for the B cell lineage-specific transcription factor BSAP (NF-HB, S alpha-BP). *J. Immunol. Baltim. Md* 153, 730–742.
- Neves, H., Ramos, C., da Silva, M.G., Parreira, A., Parreira, L., 1999. The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 93, 1197–1207.
- Nie, Z., Hu, G., Wei, G., Cui, K., Yamane, A., Resch, W., Wang, R., Green, D.R., Tessarollo, L., Casellas, R., Zhao, K., Levens, D., 2012. c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* 151, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.033>
- Norvell, A., Monroe, J.G., 1996. Acquisition of surface IgD fails to protect from tolerance-induction. Both surface IgM- and surface IgD-mediated signals induce apoptosis of immature murine B lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 156, 1328–1332.

- Nussenzweig, A., Chen, C., da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M.C., Li, G.C., 1996. Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 382, 551–555. <https://doi.org/10.1038/382551a0>
- Oestreich, K.J., Mohn, S.E., Weinmann, A.S., 2012. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nat. Immunol.* 13, 405–411. <https://doi.org/10.1038/ni.2242>
- Ogura, M., Ando, K., Suzuki, T., Ishizawa, K., Oh, S.Y., Itoh, K., Yamamoto, Kazuhito, Au, W.Y., Tien, H.-F., Matsuno, Y., Terauchi, T., Yamamoto, Keiko, Mori, M., Tanaka, Y., Shimamoto, T., Tobinai, K., Kim, W.S., 2014. A multicentre phase II study of vorinostat in patients with relapsed or refractory indolent B-cell non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 165, 768–776. <https://doi.org/10.1111/bjh.12819>
- Ohta, Y., Flajnik, M., 2006. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10723–10728. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601407103>
- Oprea, M., Perelson, A.S., 1997. Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 158, 5155–5162.
- Oracki, S.A., Walker, J.A., Hibbs, M.L., Corcoran, L.M., Tarlinton, D.M., 2010. Plasma cell development and survival. *Immunol. Rev.* 237, 140–159. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00940.x>
- O’Riordan, M., Grosschedl, R., 1999. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* 11, 21–31.
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Mitchell, J.A., Horton, A., Wood, A.L., Bolland, D.J., Corcoran, A.E., Fraser, P., 2007. Myc Dynamically and Preferentially Relocates to a Transcription Factory Occupied by Igh. *PLoS Biol.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050192>
- Oster, S.K., Ho, C.S.W., Soucie, E.L., Penn, L.Z., 2002. The myc oncogene: Marvelously Complex. *Adv. Cancer Res.* 84, 81–154.
- Packard, T.A., Cambier, J.C., 2013. B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000Prime Rep.* 5. <https://doi.org/10.12703/P5-40>
- Pan-Hammarström, Q., Jones, A.-M., Lähdesmäki, A., Zhou, W., Gatti, R.A., Hammarström, L., Gennery, A.R., Ehrenstein, M.R., 2005. Impact of DNA ligase IV on nonhomologous end joining pathways during class switch recombination in human cells. *J. Exp. Med.* 201, 189–194. <https://doi.org/10.1084/jem.20040772>
- Pape, K.A., Taylor, J.J., Maul, R.W., Gearhart, P.J., Jenkins, M.K., 2011. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science* 331, 1203–1207. <https://doi.org/10.1126/science.1201730>
- Park, S.-K., Xiang, Y., Feng, X., Garrard, W.T., 2014. Pronounced cohabitation of active immunoglobulin genes from three different chromosomes in transcription factories during maximal antibody synthesis. *Genes Dev.* 28, 1159–1164. <https://doi.org/10.1101/gad.237479.114>
- 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, H.C.,

- Janz, S., 2005a. Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res.* 65, 1306–1315. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0268>
- Park, S.S., Shaffer, A.L., Kim, J.S., duBois, W., Potter, M., Staudt, L.M., Janz, S., 2005b. Insertion of Myc into Igh accelerates peritoneal plasmacytomas in mice. *Cancer Res.* 65, 7644–7652. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1222>
- Patenaude, A.-M., Di Noia, J.M., 2010. The mechanisms regulating the subcellular localization of AID. *Nucl. Austin Tex* 1, 325–331. <https://doi.org/10.4161/nucl.1.4.12107>
- Pawlitzy, I., Angeles, C.V., Siegel, A.M., Stanton, M.L., Riblet, R., 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 6839–6851.
- Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F., Scharff, M.D., 2008. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 481–511. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090236>
- Pelengaris, S., Khan, M., Evan, G., 2002. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer* 2, 764–776. <https://doi.org/10.1038/nrc904>
- Peng, C., Eckhardt, L.A., 2013. Role of the Igh intronic enhancer E μ in clonal selection at the pre-B to immature B cell transition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 4399–4411. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301858>
- Pérez-Durán, P., Belver, L., de Yébenes, V.G., Delgado, P., Pisano, D.G., Ramiro, A.R., 2012. UNG shapes the specificity of AID-induced somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* 209, 1379–1389. <https://doi.org/10.1084/jem.20112253>
- Perlot, T., Alt, F.W., 2008. Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. *Adv. Immunol.* 99, 1–32. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)00601-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)00601-9)
- Perlot, T., Alt, F.W., Bassing, C.H., Suh, H., Pinaud, E., 2005. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14362–14367. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507090102>
- Perlot, T., Pawlitzy, I., Manis, J.P., Zarrin, A.A., Brodeur, P.H., Alt, F.W., 2010. Analysis of Mice Lacking DNaseI Hypersensitive Sites at the 5' End of the IgH Locus. *PLOS ONE* 5, e13992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013992>
- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., Cogné, M., 2012. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 336, 931–934. <https://doi.org/10.1126/science.1218692>
- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., Goodman, M.F., 2003. Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* 424, 103–107. <https://doi.org/10.1038/nature01760>
- Phan, R.T., Saito, M., Basso, K., Niu, H., Dalla-Favera, R., 2005. BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat. Immunol.* 6, 1054–1060. <https://doi.org/10.1038/ni1245>

- Pieper, K., Grimbacher, B., Eibel, H., 2013. B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 959–971. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
- Pike, B.L., Boyd, A.W., Nossal, G.J., 1982. Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2013–2017.
- Pillai, S., Cariappa, A., 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 767–777. <https://doi.org/10.1038/nri2656>
- Pinaud, E., Aupetit, C., Chauveau, C., Cogné, M., 1997. Identification of a homolog of the C α 3'/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH/hs1,2 enhancer downstream the human immunoglobulin α 1 gene. *Eur. J. Immunol.* 27, 2981–2985. <https://doi.org/10.1002/eji.1830271134>
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., Cogné, M., 2011. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110, 27–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8>
- Pioli, P.D., Debnath, I., Weis, J.J., Weis, J.H., 2014. Zfp318 regulates IgD expression by abrogating transcription termination within the Ighm/Ighd locus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 2546–2553. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401275>
- Pott, S., Lieb, J.D., 2015. What are super-enhancers? *Nat. Genet.* 47, 8–12. <https://doi.org/10.1038/ng.3167>
- Prochownik, E.V., Kukowska, J., 1986. Deregulated expression of c-myc by murine erythroleukaemia cells prevents differentiation. *Nature* 322, 848–850. <https://doi.org/10.1038/322848a0>
- Prochownik, E.V., Kukowska, J., Rodgers, C., 1988. c-myc antisense transcripts accelerate differentiation and inhibit G1 progression in murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3683–3695.
- Puri, K.D., Di Paolo, J.A., Gold, M.R., 2013. B-cell receptor signaling inhibitors for treatment of autoimmune inflammatory diseases and B-cell malignancies. *Int. Rev. Immunol.* 32, 397–427. <https://doi.org/10.3109/08830185.2013.818140>
- Pusapati, R.V., Rounbehler, R.J., Hong, S., Powers, J.T., Yan, M., Kiguchi, K., McArthur, M.J., Wong, P.K., Johnson, D.G., 2006. ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1446–1451. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507367103>
- Quinodoz, S., Guttman, M., 2014. Long noncoding RNAs: an emerging link between gene regulation and nuclear organization. *Trends Cell Biol.* 24, 651–663. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.08.009>
- Rada, C., Ehrenstein, M.R., Neuberger, M.S., Milstein, C., 1998. Hot spot focusing of somatic hypermutation in MSH2-deficient mice suggests two stages of mutational targeting. *Immunity* 9, 135–141.
- Rada, C., Williams, G.T., Nilsen, H., Barnes, D.E., Lindahl, T., Neuberger, M.S., 2002. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr. Biol. CB* 12, 1748–1755.

- Ramírez, J., Lukin, K., Hagman, J., 2010. From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 177. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.02.003>
- Rauta, P.R., Nayak, B., Das, S., 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. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>
- Ray, A., Wang, L., Dittel, B.N., 2015. IL-10-independent regulatory B-cell subsets and mechanisms of action. *Int. Immunol.* 27, 531–536. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv033>
- Reth, M., Nielsen, P., 2014. Signaling circuits in early B-cell development. *Adv. Immunol.* 122, 129–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800267-4.00004-3>
- Reth, M.G., Alt, F.W., 1984. Novel immunoglobulin heavy chains are produced from DJH gene segment rearrangements in lymphoid cells. *Nature* 312, 418–423.
- Retter, I., Chevillard, C., Scharfe, M., Conrad, A., Hafner, M., Im, T.-H., Ludewig, M., Nordsiek, G., Severitt, S., Thies, S., Mauhar, A., Blöcker, H., Müller, W., Riblet, R., 2007. Sequence and Characterization of the Ig Heavy Chain Constant and Partial Variable Region of the Mouse Strain 129S1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 2419–2427.
- Rincón-Arévalo, H., Sanchez-Parra, C.C., Castaño, D., Yassin, L., Vásquez, G., 2016. Regulatory B Cells and Mechanisms. *Int. Rev. Immunol.* 35, 156–176. <https://doi.org/10.3109/08830185.2015.1015719>
- Robbiani, D.F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D.J., Chen, H.T., Corcoran, A.E., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M.C., 2008. Activation Induced Deaminase is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* 135, 1028–1038. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.062>
- Robbiani, D.F., Nussenzweig, M.C., 2013. Chromosome Translocation, B Cell Lymphoma, and Activation-Induced Cytidine Deaminase. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 8, 79–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164004>
- Roix, J.J., McQueen, P.G., Munson, P.J., Parada, L.A., Misteli, T., 2003. Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat. Genet.* 34, 287–291. <https://doi.org/10.1038/ng1177>
- Roldán, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M., Skok, J.A., 2005. Locus “decontraction” and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat. Immunol.* 6, 31–41. <https://doi.org/10.1038/ni1150>
- Ronai, D., Iglesias-Ussel, M.D., Fan, M., Shulman, M.J., Scharff, M.D., 2005. Complex regulation of somatic hypermutation by cis-acting sequences in the endogenous IgH gene in hybridoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 11829–11834. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505449102>
- Roschke, V., Kopantzev, E., Dertzbaugh, M., Rudikoff, S., 1997. Chromosomal translocations deregulating c-myc are associated with normal immune responses. *Oncogene* 14, 3011–3016. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201156>
- Rosean, T.R., Holman, C.J., Tompkins, V.S., Jing, X., Krasowski, M.D., Rose-John, S., Janz, S., 2016. KSHV-encoded vIL-6 collaborates with deregulated c-Myc to drive plasmablastic neoplasms in mice. *Blood Cancer J.* 6, e398. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.6>

- Rosser, E.C., Mauri, C., 2015. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 42, 607–612. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.04.005>
- Rother, M.B., Palstra, R.-J., Jhunjunwala, S., van Kester, K.A.M., van IJcken, W.F.J., Hendriks, R.W., van Dongen, J.J.M., Murre, C., van Zelm, M.C., 2016. Nuclear positioning rather than contraction controls ordered rearrangements of immunoglobulin loci. *Nucleic Acids Res.* 44, 175–186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv928>
- Rouaud, P., Fiancette, R., Vincent-Fabert, C., Magnone, V., Cogné, M., Dubus, P., Denizot, Y., 2012a. 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. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.474>
- Rouaud, P., Saintamand, A., Saad, F., Carrion, C., Lecardeur, S., Cogné, M., Denizot, Y., 2014. Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region. *J. Exp. Med.* 211, 975–985. <https://doi.org/10.1084/jem.20131385>
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogné, M., Pinaud, E., Denizot, Y., 2012b. 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341024>
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Saintamand, A., Fiancette, R., Marquet, M., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Pinaud, E., Cogné, M., Denizot, Y., 2013. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 210, 1501–1507. <https://doi.org/10.1084/jem.20130072>
- Roussel, M.F., 1998. Key effectors of signal transduction and G1 progression. *Adv. Cancer Res.* 74, 1–24.
- Rowley, Janet D., 1973. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* 243, 290–293. <https://doi.org/10.1038/243290a0>
- Rowley, J. D., 1973. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann. Genet.* 16, 109–112.
- Roy, A.L., Sen, R., Roeder, R.G., 2011. Enhancer-promoter communication and transcriptional regulation of Igh. *Trends Immunol.* 32, 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.012>
- Rubtsov, A.V., Swanson, C.L., Troy, S., Strauch, P., Pelanda, R., Torres, R.M., 2008. TLR agonists promote marginal zone B cell activation and facilitate T-dependent IgM responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 180, 3882–3888.
- Rumfelt, L.L., Zhou, Y., Rowley, B.M., Shinton, S.A., Hardy, R.R., 2006. Lineage specification and plasticity in CD19⁻ early B cell precursors. *J. Exp. Med.* 203, 675–687. <https://doi.org/10.1084/jem.20052444>
- Russell, D.M., Dembić, Z., Morahan, G., Miller, J.F., Bürki, K., Nemazee, D., 1991. Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature* 354, 308–311. <https://doi.org/10.1038/354308a0>
- Ryan, K.M., Birnie, G.D., 1996. Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem. J.* 314 (Pt 3), 713–721.
- Saad, F., Saintamand, A., Cogné, M., Denizot, Y., 2015. The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Igλ-Myc mice. *Oncotarget* 6, 20302–20311.

- Saintamand, A., Ghazzoui, N., Issaoui, H., Denizot, Y., 2017. [the Igh 3'rr: Doctor Jekyll and Mister Hyde of B-Cell Maturation and Lymphomagenesis]. *Med. Sci. MS* 33, 963–970. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173311013>
- Saintamand, A., Rouaud, P., Garot, A., Saad, F., Carrion, C., Oblet, C., Cogné, M., Pinaud, E., Denizot, Y., 2015a. The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget* 6, 4845–4852. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3010>
- Saintamand, A., Rouaud, P., Saad, F., Rios, G., Cogné, M., Denizot, Y., 2015b. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat. Commun.* 6, 7084. <https://doi.org/10.1038/ncomms8084>
- Saintamand, A., Saad, F., Denizot, Y., 2015c. 3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy? *Cell Cycle* 14, 789–790. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1010964>
- Saintamand, A., Vincent-Fabert, C., Garot, A., Rouaud, P., Oruc, Z., Magnone, V., Cogné, M., Denizot, Y., 2016. Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy-chain 3' regulatory region. *Nat. Commun.* 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10730>
- 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).
- Sandel, P.C., Monroe, J.G., 1999. Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity* 10, 289–299.
- Schatz, D.G., Spanopoulou, E., 2005. Biochemistry of V(D)J recombination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 290, 49–85.
- Schauer, S.L., Wang, Z., Sonenshein, G.E., Rothstein, T.L., 1996. Maintenance of nuclear factor-kappa B/Rel and c-myc expression during CD40 ligand rescue of WEHI 231 early B cells from receptor-mediated apoptosis through modulation of I kappa B proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 157, 81–86.
- Schlissel, M.S., 2004. Regulation of activation and recombination of the murine Igkappa locus. *Immunol. Rev.* 200, 215–223. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00157.x>
- Schmidt, E.V., 2004. The role of c-myc in regulation of translation initiation. *Oncogene* 23, 3217–3221. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207548>
- Schmidt, E.V., 1999. The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene* 18, 2988–2996. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202751>
- Schreiber-Agus, N., Stein, D., Chen, K., Goltz, J.S., Stevens, L., DePinho, R.A., 1997. Drosophila Myc is oncogenic in mammalian cells and plays a role in the diminutive phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1235–1240.
- Seifert, M., Scholtysik, R., Küppers, R., 2013. Origin and pathogenesis of B cell lymphomas. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 971, 1–25. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-269-8_1
- Seki, M., Gearhart, P.J., Wood, R.D., 2005. DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *EMBO Rep.* 6, 1143–1148. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400582>
- Sen, R., Oltz, E., 2006. Genetic and epigenetic regulation of IgH gene assembly. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2006.03.008>

- Sepulveda, M.A., Garrett, F.E., Price-Whelan, A., Birshtein, B.K., 2005. Comparative analysis of human and mouse 3' Igh regulatory regions identifies distinctive structural features. *Mol. Immunol.* 42, 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.09.006>
- Serwe, M., Sablitzky, F., 1993. V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *EMBO J.* 12, 2321–2327.
- Sewastianik, T., Prochorec-Sobieszek, M., Chapuy, B., Juszczynski, P., 2014. MYC deregulation in lymphoid tumors: molecular mechanisms, clinical consequences and therapeutic implications. *Biochim. Biophys. Acta* 1846, 457–467. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.08.006>
- Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P., Staudt, L.M., 2000. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 13, 199–212.
- Shaw, P.X., Hörkkö, S., Chang, M.K., Curtiss, L.K., Palinski, W., Silverman, G.J., Witztum, J.L., 2000. Natural antibodies with the T15 idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J. Clin. Invest.* 105, 1731–1740. <https://doi.org/10.1172/JCI8472>
- Sheiness, D., Fanshier, L., Bishop, J.M., 1978. Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J. Virol.* 28, 600–610.
- Shi, Y., Glynn, J.M., Guilbert, L.J., Cotter, T.G., Bissonnette, R.P., Green, D.R., 1992. Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* 257, 212–214.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855–867.
- Singh, M., Birshtein, B.K., 1996. Concerted repression of an immunoglobulin heavy-chain enhancer, 3' alpha E(hs1,2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4392–4397.
- Skok, J.A., Brown, K.E., Azuara, V., Caparros, M.L., Baxter, J., Takacs, K., Dillon, N., Gray, D., Perry, R.P., Merckenschlager, M., Fisher, A.G., 2001. Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2, 848–854. <https://doi.org/10.1038/ni0901-848>
- Song, H., Cerny, J., 2003. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J. Exp. Med.* 198, 1923–1935. <https://doi.org/10.1084/jem.20031498>
- Soucie, E.L., Annis, M.G., Sedivy, J., Filmus, J., Leber, B., Andrews, D.W., Penn, L.Z., 2001. Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4725–4736. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.14.4725-4736.2001>
- Soutoglou, E., Dorn, J.F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., Danuser, G., Misteli, T., 2007. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 675–682. <https://doi.org/10.1038/ncb1591>
- Spencer, C.A., Groudine, M., 1991. Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res.* 56, 1–48.

- Stavnezer, J., 2000. Molecular processes that regulate class switching. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 245, 127–168.
- Stavnezer, J., Schrader, C.E., 2014. IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 193, 5370–5378. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401849>
- Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mitnacht, S., Bartek, J., Eilers, M., 1995. Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *EMBO J.* 14, 4814–4826.
- Stephens, P.J., Greenman, C.D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G.R., Mudie, L.J., Pleasance, E.D., Lau, K.W., Beare, D., Stebbings, L.A., McLaren, S., Lin, M.-L., McBride, D.J., Varela, I., Nik-Zainal, S., Leroy, C., Jia, M., Menzies, A., Butler, A.P., Teague, J.W., Quail, M.A., Burton, J., Swerdlow, H., Carter, N.P., Morsberger, L.A., Iacobuzio-Donahue, C., Follows, G.A., Green, A.R., Flanagan, A.M., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Campbell, P.J., 2011. Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development. *Cell* 144, 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.055>
- Su, T.T., Rawlings, D.J., 2002. Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 168, 2101–2110.
- Summers, K.E., Goff, L.K., Wilson, A.G., Gupta, R.K., Lister, T.A., Fitzgibbon, J., 2001. Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 19, 420–424. <https://doi.org/10.1200/JCO.2001.19.2.420>
- Sun, T., Storb, U., 2001. Insertion of phosphoglycerine kinase (PGK)-neo 5' of Jlambda1 dramatically enhances VJlambda1 rearrangement. *J. Exp. Med.* 193, 699–712.
- Sun, X.H., 1994. Constitutive expression of the Id1 gene impairs mouse B cell development. *Cell* 79, 893–900.
- Taccioli, G.E., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P., 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.
- Tang, H., Sharp, P.A., 1999. Transcriptional regulation of the murine 3' IgH enhancer by OCT-2. *Immunity* 11, 517–526.
- Tantin, D., Tussie-Luna, M.I., Roy, A.L., Sharp, P.A., 2004. Regulation of Immunoglobulin Promoter Activity by TFII-I Class Transcription Factors. *J. Biol. Chem.* 279, 5460–5469. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311177200>
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., Leder, P., 1982. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 7837–7841.
- Teague, B.N., Pan, Y., Mudd, P.A., Nakken, B., Zhang, Q., Szodoray, P., Kim-Howard, X., Wilson, P.C., Farris, A.D., 2007. Cutting edge: Transitional T3 B cells do not give rise to mature B cells, have undergone selection, and are reduced in murine lupus. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 178, 7511–7515.

- Tinguely, A., Chemin, G., Péron, S., Sirac, C., Reynaud, S., Cogné, M., Delpy, L., 2012. Cross Talk between Immunoglobulin Heavy-Chain Transcription and RNA Surveillance during B Cell Development. *Mol. Cell. Biol.* 32, 107–117. <https://doi.org/10.1128/MCB.06138-11>
- Translocation-Capture Sequencing Reveals the Extent and Nature of Chromosomal Rearrangements in B Lymphocytes [WWW Document], n.d. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3190307/> (accessed 8.31.18).
- Truffinet, V., Pinaud, E., Cogné, N., Petit, B., Guglielmi, L., Cogné, M., 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 6033–6042.
- Tsai, A.G., Lieber, M.R., 2010. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. *BMC Genomics* 11, S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-S1-S1>
- Tsai, A.G., Lu, H., Raghavan, S.C., Muschen, M., Hsieh, C.-L., Lieber, M.R., 2008. Human Chromosomal Translocations at CpG Sites and a Theoretical Basis for their Lineage and Stage Specificity. *Cell* 135, 1130–1142. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.035>
- Tsubata, T., Reth, M., 1990. The products of pre-B cell-specific genes (λ 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J. Exp. Med.* 172, 973–976.
- Tsuneto, M., Kajikhina, E., Seiler, K., Reimer, A., Tornack, J., Bouquet, C., Simmons, S., Knoll, M., Wolf, I., Tokoyoda, K., Hauser, A., Hara, T., Tani-ichi, S., Ikuta, K., Grün, J.R., Grützkau, A., Engels, N., Wienands, J., Yanagisawa, Y., Ohnishi, K., Melchers, F., 2014. Reprint of: Environments of B cell development. *Immunol. Lett., Immune-related Pathologies: Understanding Leukocyte Signaling and Emerging therapies - IMPULSE 2013* 160, 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.05.005>
- Tung, J.W., Herzenberg, L.A., 2007. Unraveling B-1 progenitors. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.02.012>
- Vaidyanathan, B., Yen, W.-F., Pucella, J.N., Chaudhuri, J., 2014. AIDing Chromatin and Transcription-Coupled Orchestration of Immunoglobulin Class-Switch Recombination. *Front. Immunol.* 5, 120. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00120>
- Vallespinós, M., Fernández, D., Rodríguez, L., Alvaro-Blanco, J., Baena, E., Ortiz, M., Dukovska, D., Martínez, D., Rojas, A., Campanero, M.R., Moreno de Alborán, I., 2011. B Lymphocyte commitment program is driven by the proto-oncogene c-Myc. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 6726–6736. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002753>
- Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., Bishop, J.M., 1982. Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J. Virol.* 42, 773–779.
- Victora, G.D., Nussenzweig, M.C., 2012. Germinal Centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075032>
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogné, M., Pinaud, E., Denizot, Y., 2010a. The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur. J. Immunol.* 40, 3306–3311. <https://doi.org/10.1002/eji.201040778>

- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., Denizot, Y., 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. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-264689>
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Rouaud, P., Baudet, C., Truffinet, V., Magnone, V., Guillaudeau, A., Cogné, M., Dubus, P., Denizot, Y., 2012. A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and Myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma-like lymphoma formation in mice. *Am. J. Pathol.* 180, 1688–1701. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.004>
- Vita, M., Henriksson, M., 2006. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin. Cancer Biol.* 16, 318–330. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.015>
- Vlach, J., Hennecke, S., Alevizopoulos, K., Conti, D., Amati, B., 1996. Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *EMBO J.* 15, 6595–6604.
- Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* TIG 9, 138–141.
- Volpi, S.A., Verma-Gaur, J., Hassan, R., Ju, Z., Roa, S., Chatterjee, S., Werling, U., Hou, H., Will, B., Steidl, U., Scharff, M., Edelman, W., Feeney, A.J., Birshtein, B.K., 2012. Germline deletion of Igh 3' regulatory region elements hs5-7 affects B cell specific regulation, rearrangement and insulation of the Igh locus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 2556–2566. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102763>
- Waibel, M., Christiansen, A.J., Hibbs, M.L., Shortt, J., Jones, S.A., Simpson, I., Light, A., O'Donnell, K., Morand, E.F., Tarlinton, D.M., Johnstone, R.W., Hawkins, E.D., 2015. Manipulation of B-cell responses with histone deacetylase inhibitors. *Nat. Commun.* 6, 6838. <https://doi.org/10.1038/ncomms7838>
- Wakatsuki, Y., 1994. The B cell-specific transcription factor BSAP regulates B cell proliferation. *J. Exp. Med.* 179, 1099–1108. <https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1099>
- Wang, J., Boxer, L.M., 2005. Regulatory Elements in the Immunoglobulin Heavy Chain Gene 3'-Enhancers Induce c-myc Deregulation and Lymphomagenesis in Murine B Cells. *J. Biol. Chem.* 280, 12766–12773. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412446200>
- Wang, J.H., Gostissa, M., Yan, C.T., Goff, P., Hickernell, T., Hansen, E., Difilippantonio, S., Wesemann, D.R., Zarrin, A.A., Rajewsky, K., Nussenzweig, A., Alt, F.W., 2009. Mechanisms Promoting Translocations in Editing and Switching Peripheral B Cells. *Nature* 460, 231–236. <https://doi.org/10.1038/nature08159>
- Wartman, L.D., Larson, D.E., Xiang, Z., Ding, L., Chen, K., Lin, L., Cahan, P., Klco, J.M., Welch, J.S., Li, C., Payton, J.E., Uy, G.L., Varghese, N., Ries, R.E., Hoock, M., Koboldt, D.C., McLellan, M.D., Schmidt, H., Fulton, R.S., Abbott, R.M., Cook, L., McGrath, S.D., Fan, X., Dukes, A.F., Vickery, T., Kalicki, J., Lamprecht, T.L., Graubert, T.A., Tomasson, M.H., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Ley, T.J., 2011. Sequencing a mouse acute promyelocytic leukemia genome reveals genetic events relevant for disease progression. *J. Clin. Invest.* 121, 1445–1455. <https://doi.org/10.1172/JCI45284>
- Weill, J.-C., Weller, S., Reynaud, C.-A., 2009. Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 267–285. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132607>

- Whyte, W.A., Orlando, D.A., Hnisz, D., Abraham, B.J., Lin, C.Y., Kagey, M.H., Rahl, P.B., Lee, T.I., Young, R.A., 2013. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 153, 307–319. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.035>
- Wierstra, I., Alves, J., 2008. The c-myc promoter: still MysterY and challenge. *Adv. Cancer Res.* 99, 113–333. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(07\)99004-1](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(07)99004-1)
- Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F.W., Cogne, M., Pinaud, E., Kenter, A.L., 2007. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* 27, 711–722. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.09.007>
- Xu, M.Z., Stavnezer, J., 1992. Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line gamma 1 RNA: analysis of the promoter/enhancer. *EMBO J.* 11, 145–155.
- Xu, Y., Davidson, L., Alt, F.W., Baltimore, D., 1996. Deletion of the Ig kappa light chain intronic enhancer/matrix attachment region impairs but does not abolish V kappa J kappa rearrangement. *Immunity* 4, 377–385. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80251-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80251-4)
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., Casali, P., 2012. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 517–531. <https://doi.org/10.1038/nri3216>
- Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P., Rajewsky, K., Alt, F.W., 2007. IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* 449, 478–482. <https://doi.org/10.1038/nature06020>
- Yancopoulos, G.D., Alt, F.W., 1986. Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Annu. Rev. Immunol.* 4, 339–368. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.04.040186.002011>
- Yancopoulos, G.D., Alt, F.W., 1985. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* 40, 271–281.
- Yancopoulos, G.D., Desiderio, S.V., Paskind, M., Kearney, J.F., Baltimore, D., Alt, F.W., 1984. Preferential utilization of the most JH-proximal VH gene segments in pre-B-cell lines. *Nature* 311, 727–733. <https://doi.org/10.1038/311727a0>
- Yang, L., Froberg, J.E., Lee, J.T., 2014. Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem. Sci.* 39, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.10.002>
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D.W., Hofmann, C.S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., Freedman, L.P., Sonenshein, G.E., 2001. Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* 20, 1688–1702. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204245>
- Yu, J., Angelin-Duclos, C., Greenwood, J., Liao, J., Calame, K., 2000. Transcriptional Repression by Blimp-1 (PRDI-BF1) Involves Recruitment of Histone Deacetylase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2592–2603.
- Zaller, D.M., Eckhardt, L.A., 1985. Deletion of a B-Cell-Specific Enhancer Affects Transfected, but not Endogenous, Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 5088–5092.

- Zhang, Q., Iida, R., Yokota, T., Kincaid, P.W., 2013. Early events in lymphopoiesis: an update. *Curr. Opin. Hematol.* 20, 265–272. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283612628>
- Zhang, Y., Gallastegui, N., Rosenblatt, J.D., 2015. Regulatory B cells in anti-tumor immunity. *Int. Immunol.* 27, 521–530. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv034>
- Zhang, Y., Gostissa, M., Hildebrand, D.G., Becker, M.S., Boboila, C., Chiarle, R., Lewis, S., Alt, F.W., 2010. The Role of Mechanistic Factors in Promoting Chromosomal Translocations Found in Lymphoid and Other Cancers. *Adv. Immunol.* 106, 93–133. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(10\)06004-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(10)06004-9)
- Zhang, Y., McCord, R.P., Ho, Y.-J., Lajoie, B.R., Hildebrand, D.G., Simon, A.C., Becker, M.S., Alt, F.W., Dekker, J., 2012a. Chromosomal translocations are guided by the spatial organization of the genome. *Cell* 148, 908–921. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.002>
- Zhang, Y., McCord, R.P., Ho, Y.-J., Lajoie, B.R., Hildebrand, D.G., Simon, A.C., Becker, M.S., Alt, F.W., Dekker, J., 2012b. Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations. *Cell* 148, 908–921. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.002>
- Zheng, N.-Y., Wilson, K., Wang, X., Boston, A., Kolar, G., Jackson, S.M., Liu, Y.-J., Pascual, V., Capra, J.D., Wilson, P.C., 2004. Human immunoglobulin selection associated with class switch and possible tolerogenic origins for C delta class-switched B cells. *J. Clin. Invest.* 113, 1188–1201. <https://doi.org/10.1172/JCI20255>
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., Roussel, M.F., 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* 12, 2424–2433.

Annexes

1. Article 1

Deletion of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer affects somatic hypermutation in B1 Bcells

ISSAOUI H*, GAZZAUI N*, BOYER F, DENIZOT Y, SAINTAMAND A.

Contribution équivalente

Cellular and Molecular Immunology, <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0091-2>



CORRESPONDENCE

Deletion of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer affects somatic hypermutation in B1 B cells

Issaoui Hussein¹, Ghazzai Nour¹, Boyer François¹, Denizot Yves¹ and Saintamand Alexis^{1,2}*Cellular & Molecular Immunology* _____; <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0091-2>

Mouse B1 B cells originate in the embryonic liver and are the major B-cell population in the peritoneal and pleural cavities.^{1–5} By contrast, mouse B2 B cells originate in the bone marrow and are the major B-cell population in the bone marrow, spleen, and blood. B1 and B2 B cells differ not only in their origin and locations, but also in their antigen specificity, cell surface markers, capacities for class-switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM). IgH *cis*-regulatory regions and, particularly, transcriptional super-enhancers are major locus regulators under both normal and pathological conditions.^{6,7} Important differences have been found regarding the ability of the IgH 3' regulatory region (3'RR) super-enhancer to control the B1 and B2 B-cell fate.^{8,9} Thus, the 3'RR super-enhancer controls the IgA CSR in B2 B cells,^{10,11} but not in B1 B cells.¹² On the other hand, the 3'RR super-enhancer controls the late VDJ repertoire diversity in B1 B cells,⁹ but not in B2 B cells.^{13,14} Taken together, these data indicate similarities and differences in the 3'RR control of B1 and B2 B-cell maturation. Similar to CSR, SHM requires activation-induced cytidine deaminase (AID) activity.¹⁵ While AID targets the switch region during CSR, generating double-strand DNA breaks to change the Ig heavy-chain isotype for new effector functions, the enzyme targets VDJ regions during SHM to improve the Ig affinity for antigens.¹⁵ Previous studies have highlighted the role of the 3'RR super-enhancer as the master control element of SHM in B2 B cells.^{16,17} We thus investigated whether the 3'RR super-enhancer also controls SHM in B1 B cells.

Our research was approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and carried out according to the European guidelines for animal experimentation. The disruption of the 3'RR was carried out in the Sv/129 embryonic stem cell line.¹⁰ Mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions. Sv/129 *wt* mice were used as control mice. AID-deficient mice were used as a negative control (to correct for baseline noise due to PCR errors and mutations in the VDJ segment, induced during the generation of the VDJ repertoire). B1 B cells were isolated from the peritoneal cavity of mice immunized orally with sheep red blood cells for 2 weeks and intraperitoneally with 10 µg of LPS (Invivogen, Toulouse, France) for 3 days. B1 B cells were sorted using a BD FACSAria III sorter (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) (Flow cytometry and

cell sorting platform of the University of Limoges, France). The following antibodies were used: anti-B220-BV510 (Biolegend, San Diego, CA), anti-CD23-PC (Biolegens) 7, anti-IgM-FITC (eBioscience, San Diego CA), anti-CD11b-eF780 (eBioscience), anti-IgD-BV421 (Biolegend), and anti-CD19-PE (Biolegend). Mouse B1 B cells are distinguished based on cell membrane surface markers (CD19⁺B220^{low}IgM^{high}IgD^{low}CD23⁺CD11b^{+/low}).^{9,12} RNA was extracted from sorted B1 B cells, and 250 ng of RNA was used for sequencing. Transcripts were amplified by 5' Rapid Amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction (5'RACE PCR) using a reverse primer hybridizing within the μ C_{H1} exon as described.¹⁸ Sequencing adapter sequences were thus added by primer extension, and resulting amplicons were sequenced on a MiSeq system (Illumina, Evry, France). Sequence analysis was performed using the IMG/High-V-Quest¹⁹ and R programs.

B1 B cells are the major B-cell population in the pleural and peritoneal cavities, but are rarely detected in lymph nodes and the spleen and almost undetectable in the bone marrow. We thus sorted B1 B cells from the mouse peritoneal cavity (Fig. 1a). B1 B cells were reported to accumulate SHMs in V_H regions (albeit at a lower frequency than B2 B cells do).²⁰ Investigation in the 3'RR-deficient mice showed that the levels of SHM in B1 B-cell V_H regions were significantly ($p = 0.008$, *t*-test with Welch's correction) reduced, by 38% compared with those in B1 B cells from the *wt* mice (Fig. 1b, left part). The numbers of investigated sequences and mutations are presented in the right part of Fig. 1b. The proportions of mutations at the A, T, G, and C nucleotides in the 3'RR-deficient and *wt* mice are shown in Fig. 1c. AID-deficient mice are an appropriate control for the baseline values of mutations in the V_H region. As shown in Fig. 1b, the number of mutations in the 3'RR-deficient mice was not reduced relative to the baseline level found in the AID-deficient mice (9094 analyzed sequences for these mice), highlighting the presence of remaining SHM in B1 B-cell V_H regions of the 3'RR-deficient mice. Finally, no difference was found when investigating fetal liver B1 B cells (Fig. 1d, left part) from the 3'RR-deficient and *wt* mice, strengthening the hypothesis that deletion of the 3'RR super-enhancer (known to act at the mature B-cell stage)²¹ reduces the SHM process only in mature B1 B cells. The numbers of investigated sequences and mutations are presented in the right part of Fig. 1d. Interestingly, our results show an increased number of N nucleotides added during VDJ recombination in B1 B cells of the 3'RR-deficient

¹Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7276, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1262, CBRS, rue du Pr. Descottes, 87025 Limoges, France

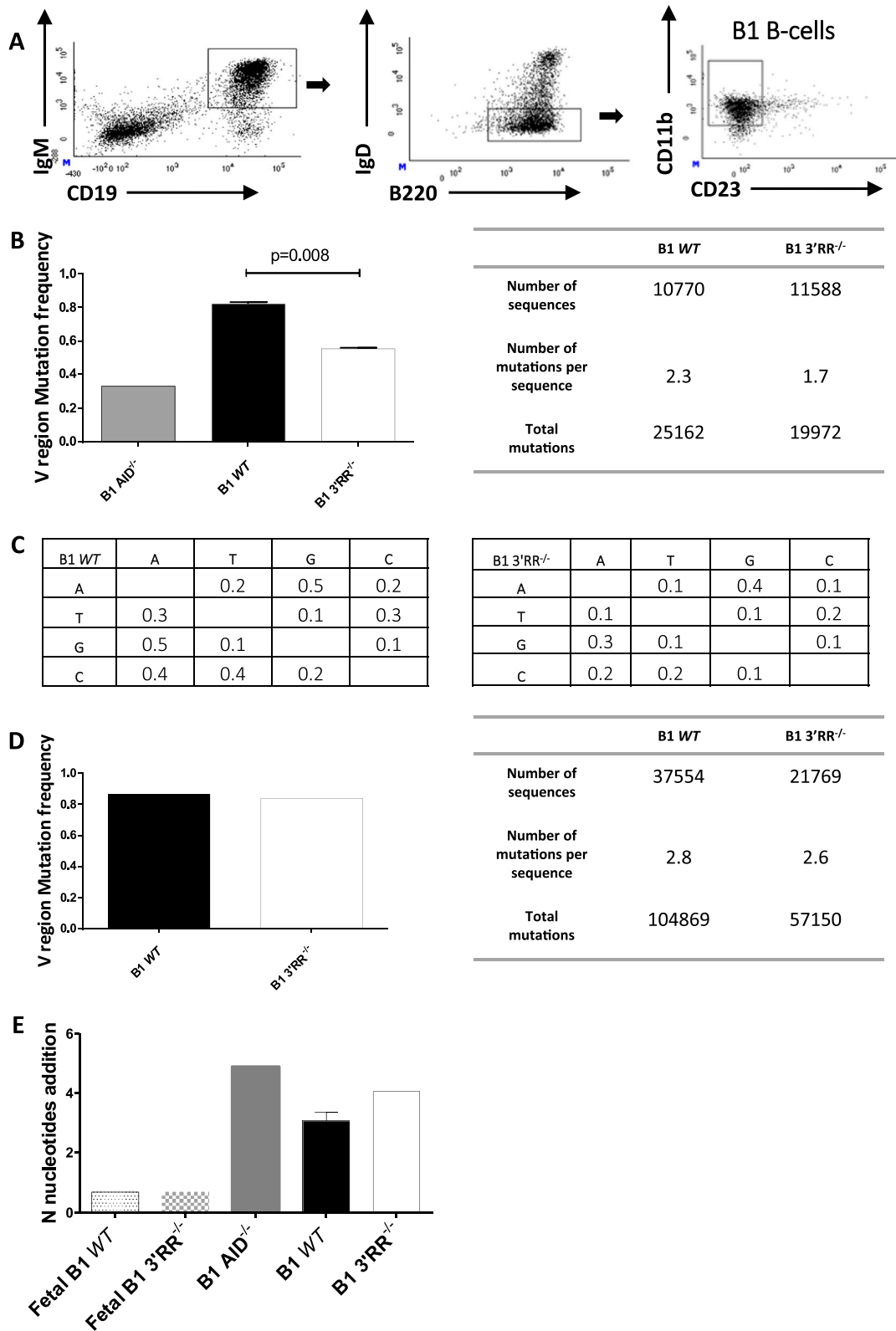
Correspondence: Denizot Yves (yves.denizot@unilim.fr) or Saintamand Alexis (alexis.saintamand@live.fr)

²Present address: INSERM U1236, Université Rennes 1, Rennes, France

These authors contributed equally: Issaoui Hussein, Ghazzai Nour.

Received: 28 June 2018 Accepted: 4 July 2018

Published online: 20 August 2018



mice and even more in the AID-deficient mice (Fig. 1e). Although not statistically significant, this increase appears to be inversely correlated with the SHM frequency and can reflect the existence of a mechanism of compensation for the lack of diversity due to the lack of AID-induced mutations. We have previously shown that the 3'RR deficiency does not affect the repertoire generation in immature B

cells,^{9,13} therefore, this difference between the *wt* mice and 3'RR-deficient and AID-deficient mice more likely reveals a biased antigen-dependent selection. This hypothesis is strengthened by the strongly decreased amounts of N nucleotides in fetal liver B1 B cells from both *wt* and 3'RR-deficient mice, which are generated before any antigen-dependent selection.

Fig. 1 3'RR super-enhancer and SHM in B1 B cells. **a** Cell sorting of B1 B cells from the peritoneal cavity. Representative flow cytometry profiles of B1 B cells from the peritoneal cavity of 3'RR-deficient and *wt* mice are presented. Cells were first gated on the CD19⁺IgM⁺ subset, then on the B220⁺IgD^{low} subset, and finally on the CD11b⁺CD23⁻ subset to obtain the B220⁺CD19⁺IgM⁺IgD^{low}CD11b⁺CD23⁻ B1 B-cell population. **b** Left part: mutation frequencies (per 100 bp) in the V_H regions of B1 B cells from the peritoneal cavity of 3'RR-deficient mice, AID-deficient mice, and *wt* mice. B1 B cells were pooled from nine *wt* mice, nine 3'RR-deficient mice, and nine AID-deficient mice. One experiment for AID-deficient mice and two independent experiments for *wt* mice and 3'RR-deficient mice each were performed. Right part: numbers of sequences and mutations for 3'RR-deficient and *wt* mice. **c** Mutation frequencies at the A, T, C, and G nucleotides for 3'RR-deficient and *wt* mice. **d** Left part: mutation frequencies in V_H regions of fetal (12 h before birth) liver B1 B cells of 3'RR-deficient and *wt* mice. Cells were pooled from six fetuses of 3'RR-deficient mice and six fetuses of *wt* mice. B220⁺ cells were cell-sorted for these experiments. Right part: numbers of sequences and mutations for 3'RR-deficient and *wt* mice. **e** The mean number of N nucleotides added in each B1 B-cell clone sequence during VDJ recombination. B1 B cells were pooled from nine *wt* mice, nine 3'RR-deficient mice, and nine AID-deficient mice. Fetal B1 B cells were pooled from six fetuses of 3'RR-deficient mice and six fetuses of *wt* mice

During evolution, Ig synthesis was followed by SHM and CSR.^{22,23} While both SHM and CSR require specific and precise AID targeting, mechanistic differences in the control of AID recruitment and AID-induced DNA breaks have been demonstrated between these two processes.²⁴ The results of the present study indicate that similar to B2 B cells,¹⁶ deletion of the 3'RR super-enhancer reduces SHM in B1 B cells. The evolution of the immune system involves an overlap between innate and adaptive immunity. B1 B cells represent an early B-cell lineage, whereas B2 B cells appear to have arisen later in evolution. The 3'RR controls the IgH transcription and SHM in both B1 and B2 B cells,^{8,9} but CSR (except that in IgD)^{25,25} is only controlled by the super-enhancer in specialized B2 B cells,^{11,12,16} confirming its involvement in adaptive immunity, and showing the segregation in the mechanisms of CSR and SHM between B1 and B2 B cells during evolution.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Ligue Contre le Cancer (Equipe labellisée LIGUE 2018) and Agence Nationale de la Recherche (ANR: projet EpiSwitch-3'RR 2016). N.G. was supported by a grant from Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique (Lebanon), the municipality of Kham (Lebanon) and the Société Française d'Hématologie. H.I. is supported by a fellowship from the University of Limoges. F.B. is supported by Fondation Partenariale de l'Université de Limoges and ALURAD. We thank the flow cytometry facility of the Limoges University for B-cell sorting.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.I., N.G., A.S., F.B., and Y.D. designed and performed the experiments and wrote the manuscript. Y.D. obtained financial grants.

ADDITIONAL INFORMATION

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

- Ehrenstein, M. R. & Notley, C. A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 253–300 (2010).
- Tung, J. W. & Herzenberg, L. A. Unraveling B-1 progenitors. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 150–155 (2007).
- Holodick, N. E. & Rothstein, T. L. B cells in the aging immune system: time to consider B-1 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1362**, 176–187 (2015).
- Baumgarth, N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 34–46 (2011).
- Azir, M., Holodick, N. E., Rothstein, T. L. & Wang, P. The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol. Res.* **63**, 153–166 (2015).
- Pinaud, E. et al. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* **110**, 27–70 (2011).
- Ghazzaoui, N., Saintamand, A., Issaoui, H., Vincent-Fabert, C. & Denizot, Y. The IgH 3' regulatory region and c-myc induced B-cell lymphomagenesis. *Oncotarget* **8**, 7059–7067 (2017).
- 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).
- Ghazzaoui, N. et al. The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer controls mouse B1 B-cell fate and late VDJ repertoire diversity. *Blood Adv.* **2**, 252–262 (2018).
- 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).
- Saintamand, A. et al. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat. Commun.* **6**, 7084 (2015).
- Issaoui, H. et al. The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer does not control IgA class switch recombination in B1 lineage. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 289–291 (2018).
- 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 facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity* **39**, 229–244 (2013).
- Laffleur, B. et al. AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* **5**, 1118–1131 (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).
- Le Noir, S. et al. Functional anatomy of the immunoglobulin heavy chain 3' super-enhancer needs not only core enhancer elements but also their unique DNA context. *Nucleic Acids Res.* **45**, 5829–5837 (2017).
- Boice, M. et al. Loss of the HVEM tumor suppressor in lymphoma and restoration by modified CAR-T Cells. *Cell* **167**, 405–418 (2016).
- Alamyar, E., Giudicelli, V., Shuo, L., Duroux, P. & Lefranc, M. P. IMGT/HighV-QUEST: the IMGT® web portal for immunoglobulin (IG) or antibody and T cell receptor (TR) analysis from NGS high throughput and deep sequencing. *Methods Immunome Res.* **88**, 569–604 (2012).
- Roy, B. et al. Somatic hypermutation in peritoneal B1b cells. *Mol. Immunol.* **46**, 1613–1619 (2009).
- Saintamand, A. et al. E μ and 3'RR IgH enhancers show hierarchic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci. Rep.* **7**, 442 (2017).
- Kato, L. et al. An evolutionary view of the mechanism for immune and genome diversity. *J. Immunol.* **188**, 3559–3566 (2012).
- Stavnezer, J. & Amemiya, C. T. Evolution of isotype switching. *Semin. Immunol.* **16**, 257–275 (2004).
- Maul, R. W. et al. Spt5 accumulation at variable genes distinguishes somatic hypermutation in germinal center B cells ex vivo-activated cells. *J. Exp. Med.* **211**, 2297–2306 (2014).
- Issaoui, H., Ghazzaoui, N., Saintamand, A., Denizot, Y. & Boyer, F. IgD class switch recombination is not controlled through the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer. *Cell. Mol. Immunol.* **14**, 871–874 (2017).
- 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).

2. Article 2

Uracil-DNA glycosylase is not implicated in the choice of the DNA repair pathway during B-cell class switch recombination

GHAZZAUI N*, ISSAOUI H*, SAINTAMAND A, DENIZOT Y, BOYER F.

Contribution équivalente

Cellular and Molecular Immunology, <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0034-y>



CORRESPONDENCE

Uracil-DNA glycosylase is not implicated in the choice of the DNA repair pathway during B-cell class switch recombination

Nour Ghazzaoui¹, Hussein Issaoui¹, Alexis Saintamand², Yves Denizot¹ and François Boyer¹

Cellular & Molecular Immunology _#####_ <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0034-y>

Mature B-cells express membrane IgM and IgD (of same specificity) through alternative splicing of a pre-mRNA encompassing constant (C_{μ}) and C_{δ} genes. After encountering antigen, B-cells undergo class switch recombination (CSR) that substitutes the C_{μ} gene with C_{γ} , C_{ϵ} , or C_{α} , thereby generating IgG, IgE, and IgA antibodies with the same antigenic specificity but new effector functions. DNA-editing enzyme activation-induced deaminase (AID) is essential for CSR by targeting switch (S) regions preceding C_{μ} (namely, the S_{μ} donor region) and the C_{γ} , C_{ϵ} , and C_{α} genes (namely, the $S_{\gamma,\epsilon,\alpha}$ acceptor regions).^{1,2} CSR is controlled in *cis* by IgH locus super-enhancers³ and in *trans* by a wide spectrum of enzymes and proteins.^{1,2} Among them, the role of the uracil DNA glycosylase (UNG) remains controversial. UNG is a key enzyme of base excision repair, which carries out faithful repair. Some authors estimate that during CSR, the UNG enzymatic activity removes the AID-induced dC to dU converted base of single-strand DNA, generating abasic sites and leading to DNA strand breaks.¹ For other authors, the role of UNG is to stabilize the S–S synapse and to recruit DNA repair factors that facilitate the end-joining process.^{4,5} Thus, the classical non-homogenous end joining pathway would be increased over the alternative end joining (A-EJ) pathway in UNG-deficient mice,⁴ suggesting an intriguing role of UNG in promoting the A-EJ pathway. These results were based on the analysis of several S_{μ} – S_{γ_1} sequences obtained in UNG-deficient conditions due to technical limitations (conventional Sanger sequencing) to investigate S–S junction molecular signatures. We recently reported a new computational tool (CSReport) for automatic analysis of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing.⁶ We used this tool to analyze the rare S_{μ} – S_{δ} junctions formed during IgD CSR^{7,8} and S_{μ} – S_{γ_3} , S_{μ} – S_{γ_1} , and S_{μ} – S_{α} junctions in wild-type (wt) mice.⁹ We thus used CSReport and high-throughput sequencing to analyze the junctional signature of S_{μ} – S_{γ_3} , S_{μ} – S_{γ_1} , and S_{μ} – S_{α} junctions in UNG-deficient mice in detail.

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 out according to the European guidelines for animal experimentation. Wt mice and UNG-deficient mice (a gift from Dr. Tomas Lindahl, UK) were used. Single-cell suspensions of spleen cells were cultured for 4 days at 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum and 5 μ g/ml LPS, with (CSR toward IgG₁) or without (CSR toward IgG₃) addition of 20 ng/ml IL-4 or 2 ng/ml TGF β (PeproTech, Rocky Hill, NJ) (CSR toward IgA).^{3,9,10} Splenocytes were washed in PBS and stained with various antibodies: anti-B220-PC5, anti-CD138-

APC, anti-IgM PECy7, anti-IgG₃-FITC, anti-IgG₁-FITC, and anti-IgA-FITC. Cells were analyzed on a Fortessa LSR2 (Beckman Coulter). In parallel experiments, stimulated splenocyte DNA was extracted for investigation of S_{μ} – S_{γ_3} , S_{μ} – S_{γ_1} , and S_{μ} – S_{α} junctions. As previously described in detail,⁶ junctions were amplified with PCR. Libraries of 200 bp were prepared from the 1–2 kb PCR products of S_{μ} – S_{γ_1} , S_{μ} – S_{γ_3} , and S_{μ} – S_{α} amplified for Ion Proton sequencing (“GénoLim platform” of the Limoges University, France). Sequenced reads were then mapped to the S_{μ} , S_{γ_1} , S_{γ_3} , and S_{α} regions using BLAST algorithms. The computational tool developed for experiments performs junction assembly; identifies breakpoints in S_{μ} , S_{γ_1} , S_{γ_3} , and S_{α} ; identifies junction structure (blunt, micro-homology, large-homology, or junction with insertions) and outputs a statistical summarization of the identified junctions.

The UNG deficiency markedly reduced CSR toward IgG₃ (mean 0.1 vs 6.9%), IgG₁ (mean 1.9 vs 14.7%), and IgA (mean 1.4 vs 2.5%) compared to that of wt mice (Fig. 1a). After DNA extraction, the molecular signatures of the S_{μ} – S_{γ_1} , S_{μ} – S_{γ_3} , and S_{μ} – S_{α} junctions were investigated. The structural profiles of the S_{μ} – S_{γ_1} , S_{μ} – S_{γ_3} , and S_{μ} – S_{α} junctions (blunt, micro-homology, large-homology, or junction with insertions) for UNG-deficient and wt mice are shown in Fig. 1b. The distributions of the IgG₁, IgG₃, and IgA junctions in terms of distance from the forward PCR primer in S_{μ} and from one of the reverse primers in S_{γ_3} , S_{γ_1} , and S_{α} are reported in Fig. 1c. Localizations of breakpoints within AID hotspots (AGCT, WRCY, RGYW) and other motifs are shown in Fig. 1d (displayed along specifically targeted segments within S regions).

The data indicated that if UNG deficiency markedly affected CSR efficiency, it did not significantly affect the pattern of blunt vs micro-/large-homology remaining junctions. Similarly, the positions of IgG₃, IgG₁, and IgA junctions (in term of distance from S_{μ} and $S_{\gamma_1,\gamma_3,\alpha}$) and their colocalization with AID-attack motifs were not affected. Summarization of these 1568 independent junctions provided a description of the CSR sequences in UNG-deficient mice at an unprecedented level. To date, only a few had been reported after cloning and subsequent sequencing by Sanger's method.⁴ In this study, the panel of wt junctions was markedly different (in terms of blunt vs micro-homology junctions) from ours and those of Panchakshari and colleagues.² Our results undoubtedly demonstrate that CSR in UNG-deficient conditions did not affect the balance between N-HEJ and A-EJ. These results also showed that μ – γ_1 , μ – γ_3 , and μ – α CSR in UNG-deficient mice is regulated and that double-strand breaks for IgG₁, IgG₃, and IgA CSR are not random breaks. In conclusion, our results strengthen the hypothesis that during AID-induced CSR, UNG in association

¹UMR CNRS 7276, INSERM U1262, University of Limoges, CBRS, rue Pr. Descottes, 87025 Limoges, France and ²INSERM U1236, Rennes 1 University, Rennes, France

Correspondence: Yves Denizot (yves.denizot@unilim.fr)

These authors contributed equally: Nour Ghazzaoui and Hussein Issaoui.

Received: 12 April 2018 Revised: 13 April 2018 Accepted: 13 April 2018

Published online: 07 May 2018

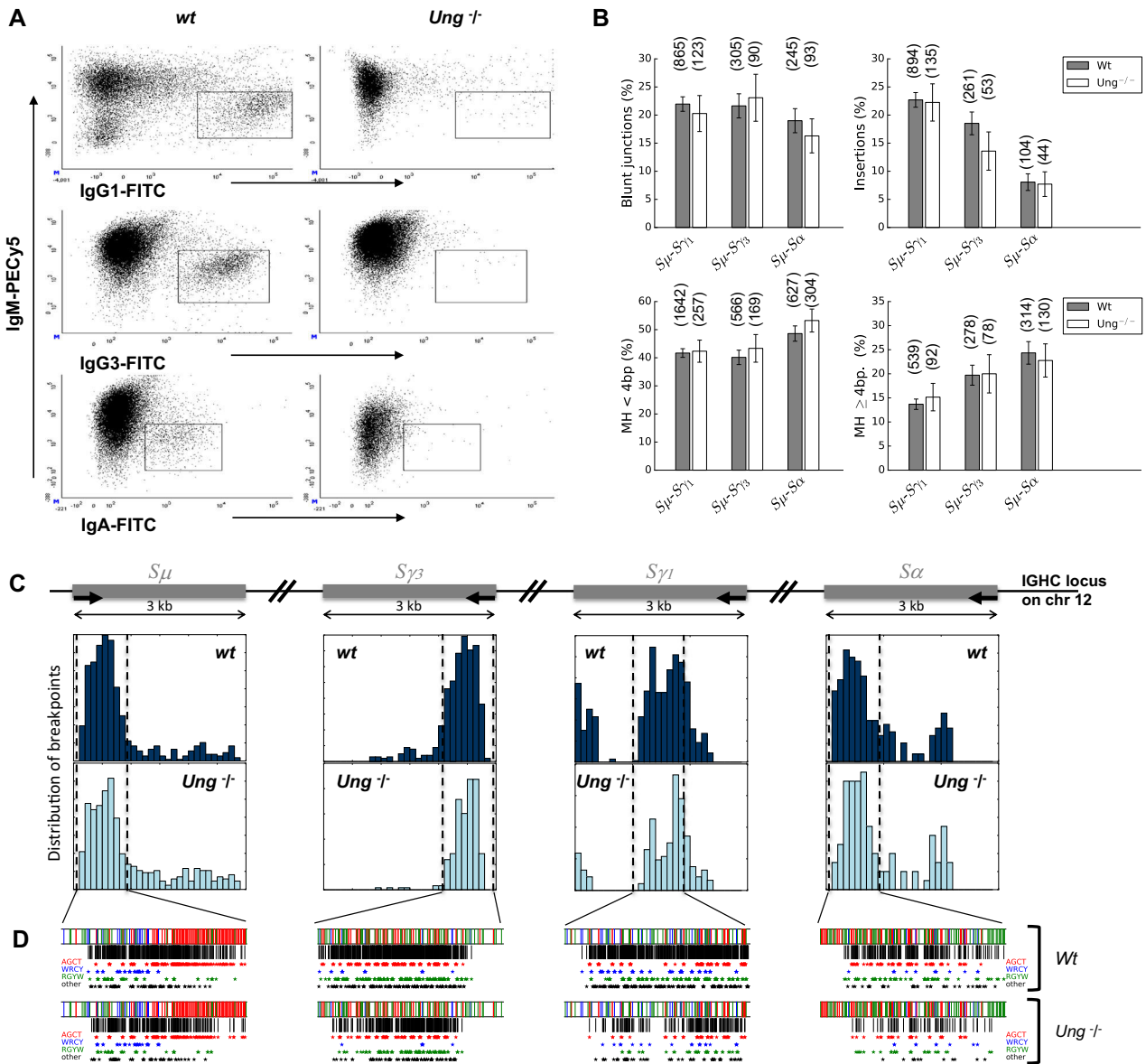


Fig. 1 Class switch recombination in UNG-deficient and wt mice. **a** IgG₁, IgG₃, and IgA CSR in UNG-deficient and wt mice. Spleen cells were cultured with LPS for 4 days with (CSR toward IgG₁) or without (CSR toward IgG₃) addition of IL-4 or TGFβ (CSR toward IgA). Cells gated on B220⁺ and/or CD138⁺ cells were investigated with anti-IgMPECy5, anti-IgG₃-FITC, anti-IgG₁-FITC, and anti-IgA-FITC antibodies. One representative experiment out of three to five for each genotype is shown. **b** Structure profiles of S_μ-S_{γ1}, S_μ-S_{γ3}, and S_μ-S_α junctions in UNG-deficient and wt mice. Junctions are classified in terms of junction types (junction with insertions, blunt junction, junction with micro- or large-homology). Numbers in parenthesis indicate the number of junctions of each type. The junction profile was not significantly different in the wt and UNG-deficient mice ($p = 0.65$, $p = 0.15$, and $p = 0.28$ for S_μ-S_{γ1}, S_μ-S_{γ3}, and S_μ-S_α respectively; chi-squared test). The results are pooled from three to five mice per experiment. **c** Breakpoint localizations in S_μ-S_{γ1}, S_μ-S_{γ3}, and S_μ-S_α junctions in wt and UNG-deficient mice (same junctions as in Fig. 1b). **d** Motif targeting in S_μ-S_{γ1}, S_μ-S_{γ3}, and S_μ-S_α junctions. Stars identify breakpoint positions in AGCT, WRCY, and RGYW AID hotspots and others (same junctions as in Fig. 1b)

with recombination factors may facilitate the stabilization of the S-S synapse to facilitate efficient recombination. In contrast, our results do not argue in favor of an UNG role in the recruitment of specific DNA repair factors.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Tomas Lindahl for sending us the UNG-deficient mice. This work was supported by ANR (projet EpiSwitch-3^{RR} 2016). N.G. was supported by a grant from the Association de Spécialisation et d’Orientation Scientifique (Lebanon) and the municipality of Khiam (Lebanon). H.I. is supported by CORC (FJA/NP 2015-109) and the University of Limoges. The authors are “Equipe Labellisée LIGUE 2018.” We thank

the GéoLim platform and the Cytometry platform of the University of Limoges for sequencing and cell sorting. F.B. is supported by Fondation Partenariale de l’Université de Limoges and ALURAD.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Y.D. designed the research. N.G., H.I., and A.S. performed the research. A.S., F.B., and Y. D. analyzed the data. A.S., F.B., and Y.D. wrote the paper.

ADDITIONAL INFORMATION

Competing interests: The authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. Chaudhuri, J. & Alt, F. W. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 541–552 (2004).
2. Panchakshari, R. A. et al. DNA double-strand break response factors influence end-joining features of IgH class switch and general translocation junctions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **115**, 762–767 (2018).
3. Saintamand, A. et al. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat. Commun.* **6**, 7084 (2015).
4. Yousif, A. S., Stanlie, A., Mondal, S., Honjo, T. & Begum, N. A. Differential regulation of S-region hypermutation and class-switch recombination by noncanonical functions of uracil DNA glycosylase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, E1016–E1024 (2014).
5. Yousif, A. S., Stanlie, A., Begum, N. A. & Honjo, T. Opinion: uracil DNA glycosylase (UNG) plays distinct and non-canonical roles in somatic hypermutation and class switch recombination. *Int. Immunol.* **26**, 575–578 (2014).
6. Boyer, F. et al. CSReport: a new computational tool designed for automatic analysis of class switch recombination junctions sequenced by high-throughput sequencing. *J. Immunol.* **198**, 4148–4155 (2017).
7. Ghazzaoui, N., Issaoui, H., Saintamand, A., Boyer, F. & Denizot, Y. Analysis of IgD CSR junctions by high-throughput sequencing. *Immunol. Lett.* **188**, 86–88 (2017).
8. Issaoui, H., Ghazzaoui, N., Saintamand, A., Denizot, Y. & Boyer, F. IgD class switch recombination is not controlled through the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer. *Cell. Mol. Immunol.* **14**, 871–874 (2017).
9. Issaoui, H., Ghazzaoui, N., Saintamand, A., Denizot, Y., Boyer, F. High throughput sequencing reveals similar molecular signatures for class switch recombination junctions for the γ and α isotypes. *Cell. Mol. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0025-z> (2018).
10. Issaoui, H. et al. The IgH 3' regulatory region super-enhancer does not control IgA class switch recombination in the B1 lineage. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 289–291 (2018).

3. Article3

L'énigmatique recombinaison isotypique vers les IgD

ISSAOUI H*, GHAZZAUI N*, DENIZOT Y.

Contribution équivalente

Médecine Science, <https://doi.org/10.1051/medsci/20183404005>

L'énigmatique recombinaison isotypique vers les IgD

Hussein Issaoui*, Nour Ghazzaoui*, Yves Denizot

CNRS UMR 7276, Inserm U1262,
Contrôle des réponses immunes B
et des lymphoproliférations (CRIBL),
université de Limoges, CBRS, rue Pr Descottes,
87025 Limoges, France.

* Contribution des auteurs équivalente.
yves.denizot@unilim.fr

► Les lymphocytes B matures expriment à leur surface un récepteur spécifique appelé BCR (pour *B-cell receptor*) constitué d'une immunoglobuline (Ig) d'isotype μ (IgM) et δ (IgD) spécifique d'un antigène. Cette Ig est associée à diverses chaînes de transduction qui permettent une signalisation efficace. Les IgM et IgD membranaires sont produites après épissage alternatif d'un long transcrite comprenant la partie variable de l'Ig (région VDJ) et les régions codantes des gènes constants μ et δ . La recombinaison de classe (CSR, pour *class switch recombination*) également appelée recombinaison isotypique ou commutation de classe, permet au lymphocyte B d'exprimer à sa surface un BCR d'un isotype différent des isotype μ et δ (Figure 1) [1] (→).

(→) Voir la Synthèse de S. Péron *et al.*, *m/s* n° 5, mai 2012, page 551

Cette nouvelle Ig de surface diffère uniquement par la partie constante de sa chaîne lourde assurant ainsi des fonctions effectrices différentes. La région variable ne subissant aucune modification¹, la spécificité et l'affinité pour l'antigène sont conservées. La recombinaison isotypique se produit entre deux régions *switch* (S), localisées en amont de chaque gène constant, excepté C δ [1]. Les régions S sont riches en désoxynucléotides guanine et cytosine et sont de taille variable (de 1 à 12 kb). La recombinaison s'effectue toujours entre une région S donneuse (en général S μ) et une région S receveuse variant selon l'environnement cytokinique. L'ADN situé entre ces deux régions S est excisé, circularisé puis éliminé. Les régions codantes sont,

quant à elles, liées entre elles pour conduire à la juxtaposition d'un exon codant une chaîne lourde et un segment de la partie variable VDJ de l'Ig. La transcription et l'épissage de cette chaîne aboutissent à l'expression d'un nouvel isotype d'Ig.

D'un point de vue moléculaire, l'enzyme AID (*activation-induced cytidine deaminase*) désamine des cytosines en uraciles dans les régions S. Les mésappariements générés entre le déoxy-uracile et le déoxy-guanine dans ces régions sont excisés par l'enzyme UNG (uracyle-ADN glycolase) créant des sites abasiques qui conduisent à l'apparition de cassures simple brin (SSB pour *single strand break*). Ces SSB peuvent devenir des cassures double brin (DSB pour *double strand break*) si elles sont proches sur les deux brins d'ADN. Les cassures sont reconnues et prises en charge par un grand nombre de complexes protéiques qui forment des foyers de réparation qui stabilisent les DSB et recrutent les molécules impliquées dans deux voies de réparation de l'ADN : la voie de réparation classique ou NHEJ (*non-homologous end-joining*), et la voie alternative A-EJ (*alternative end-joining*) qui utilise des micro-homologies de séquences entre les régions S à recombinaison. L'analyse de la jonction S μ -S x générée permet de définir la voie de réparation impliquée. Ainsi, la liaison franche (aussi appelée jonction directe) entre les deux régions S, ou la présence de quelques bases homologues aux deux régions S (jonction par micro-homologie), révèle une activité de type NHEJ. À l'inverse, la présence de plusieurs bases homologues aux deux régions S traduit une activité de type A-EJ. Des mutations, conséquences directes des mécanismes de réparation, sont également présentes à proximité de la jonction¹. Des

mutations éloignées de la jonction sont interprétées comme un stigmate du ciblage d'AID sur ces régions.

La recombinaison isotypique se produit donc entre deux régions S localisées en amont de chaque gène constant excepté C δ . Le paradigme a longtemps été « absence de région S δ devant C δ , donc pas de recombinaison isotypique vers les IgD » et ceci malgré la description depuis plusieurs années de myélomes à IgD avec délétion de C μ [2]. La démonstration d'une recombinaison isotypique vers les IgD n'est que très récente (Figure 1) [3-5]. Comment a-t-elle pu rester si longtemps ignorée ? Principalement parce qu'elle est totalement atypique et qu'elle ne respecte quasiment aucune des règles canoniques de la recombinaison isotypique classique. Il n'y a pas de région S évidente et structurée devant C δ , comme devant les gènes C γ , C ϵ et C α . Seule est présente une petite séquence S rudimentaire (appelée S δ pour S δ -like) en 5' de C δ [6]. Le *switch* vers les IgD n'est observable que dans des sous-populations lymphocytaires B très particulières : les lymphocytes B des voies aériennes [3], digestives [4, 5] et péritonéales [7, 8]. Il est absent des populations spléniques et ganglionnaires à partir desquelles les mécanismes de recombinaisons isotypiques vers les IgG, IgE et IgA (et la plupart des bases de l'immunologie lymphocytaire B) ont été décrits. Contrairement aux autres recombinaisons, la recombinaison isotypique vers les IgD n'est pas inductible *in vitro*, par des cocktails cytokiniques, comme ce qui est observé pour les cellules B de la rate par exemple après stimulation par le LPS (lipopolysaccharide) et l'interleukine-4 (IL-4) pour une commutation IgG1, ou par le LPS

¹ Il existe le mécanisme d'hypermutation somatique (SMH) et certaines de ces mutations entraînent des changements d'affinité.

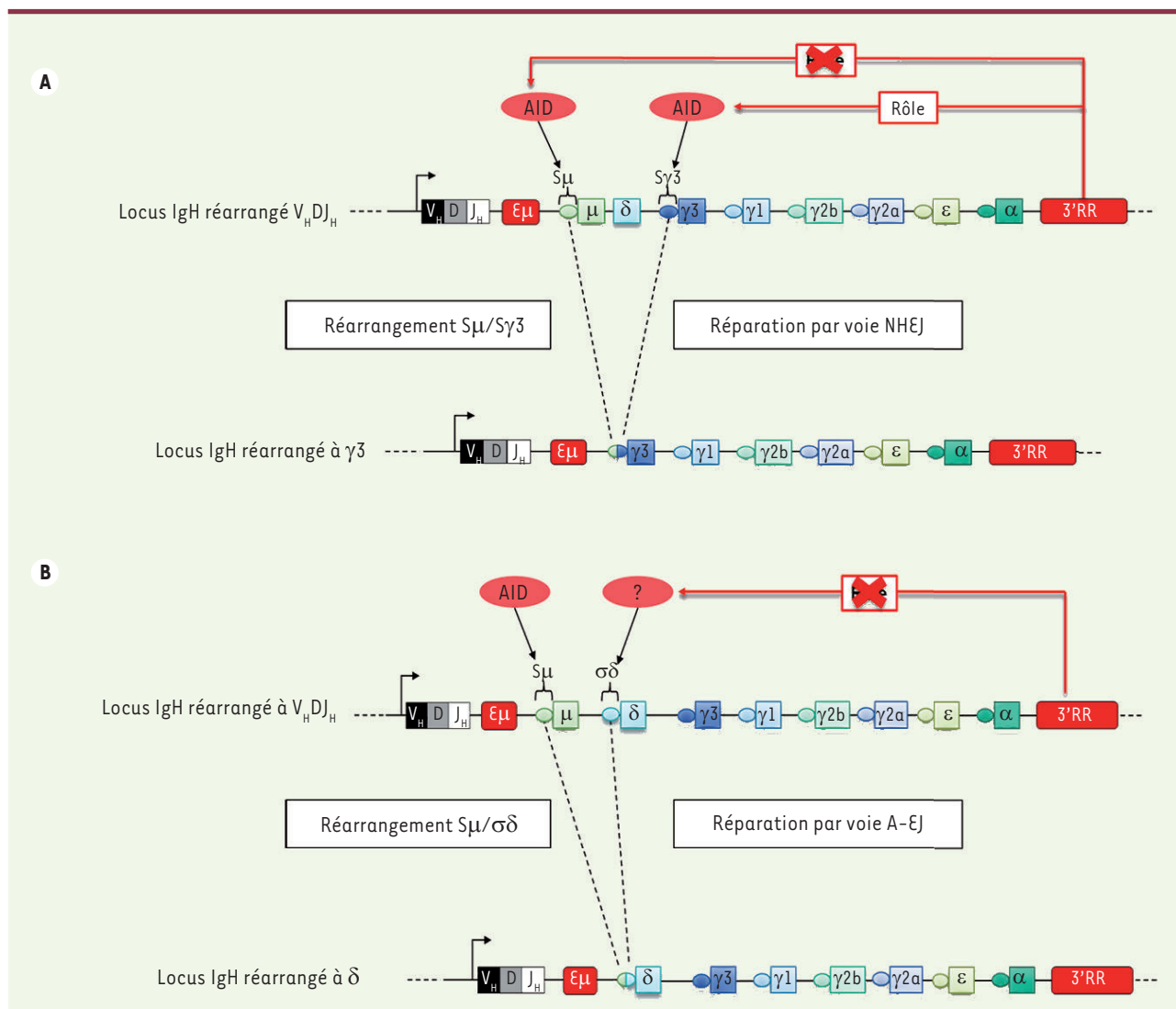


Figure 1. La recombinaison isotypique (ou commutation de classe). **A.** Recombinaison isotypique vers IgG3 (immunoglobuline d'isotype G3). Attaque de l'enzyme AID (*activation-induced cytidine deaminase*) sur S_μ et $S_{\gamma 3}$ pour générer des cassures de l'ADN. Il existe une contribution importante de la région régulatrice en 3' ($3'RR$) du locus IgH pour le ciblage d'AID sur la région switch receveuse (ici $S_{\gamma 3}$). La ligature S_μ - $S_{\gamma 3}$ fait appel principalement à la voie de réparation NHEJ (*non-homologous end-joining*). **B.** Recombinaison isotypique vers IgD. Attaque de l'enzyme AID sur S_μ . Pas de contribution de la $3'RR$ pour le ciblage d'AID sur la région $\sigma\delta$. La ligature S_μ - $\sigma\delta$ fait appel principalement à la voie de réparation A-EJ (*alternative end-joining*).

et le TGF β (*transforming growth factor* β) pour une IgA. Contrairement aux recombinaisons isotypiques conventionnelles vers les IgG, IgA et IgE, celle vers les IgD n'est pas sous le contrôle de la région régulatrice en 3' ($3'RR$) du locus des chaînes lourdes d'Ig (IgH) [4, 8].

Cette région régulatrice est essentielle pour le recrutement d'AID sur la région S receveuse [9] (→).

(→) Voir la Synthèse de A. Saintamand *et al.*, *m/s* n° 11, novembre 2017, page 663

L'analyse des jonctions S_μ - $\sigma\delta$ par les nouvelles technologies de séquençage à haut débit, indique une majorité de jonctions par micro-homologie et donc une réparation des DSB par la voie A-EJ plutôt que par la voie NHEJ contrairement à la recombinaison isotypique classique [7, 8]. Toujours par séquençage à haut débit, l'analyse des mutations autour des jonctions S_μ - $\sigma\delta$ décrit des stigmates AID en 5' de S_μ , mais pas en 3' de $\sigma\delta$ [8]. Cette contribution d'AID sur S_μ est cohérente

avec son action lors de la recombinaison de classe vers les IgG, IgA et IgE ainsi qu'avec l'absence de jonctions S_μ - $\sigma\delta$ chez les souris déficientes pour AID [10]. Par contre, l'absence de stigmates AID sur la jonction $\sigma\delta$, contrairement à ceux observés sur les régions S_γ , S_ϵ et S_α receveuses lors de la commutation vers les IgG, IgE et IgA est intrigante. Elle suggère une attaque par une activité enzymatique différente d'AID. L'absence de ces stigmates est cohérente avec l'absence

de participation de la région 3'RR à la recombinaison isotypique vers les IgD puisque c'est elle qui assure le recrutement d'AID sur la région S receveuse, en l'occurrence $\sigma\delta$. AID appartient à la famille des déaminases APOBEC (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme-catalytic*). Une attaque de la région $\sigma\delta$ par un autre membre de la famille APOBEC lors de la recombinaison isotypique vers les IgD est donc envisageable, mais jusqu'ici non démontrée.

Si l'existence de la recombinaison isotypique vers les IgD est maintenant reconnue, sa mécanistique précise et ses fonctions restent à élucider. La récente mise en évidence d'une recombinaison vers les IgD qui dépend de la flore bactérienne intestinale (et d'une stimulation impliquant les TLR [*Toll-like receptor*]) suggère qu'elle peut contribuer, *in vivo*, à la régulation homéostatique des communautés microbiennes [5]. Ces données renforcent l'hypothèse d'un caractère très ancien de

la recombinaison isotypique vers les IgD et donc de sa régulation particulière par rapport à celles vers les IgG, IgA et IgE. \diamond

The enigmatic IgD class switch recombination

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par l'ANR (projet EpiSwitch-3'RR 2016) et le CORC (FJA/NP-2015-109). Nour Ghazzaoui est financée par l'association de spécialisation et d'orientation scientifique et la municipalité de Khiam (Liban).

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Péron S, Laffleur B, Denis-Lagache N, et al. Recombinaisons suicides du locus IgH : quand le lymphocyte B dépose les armes ! *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 551-4.
2. Arpin C, de Bouteiller O, Razanajaona D, et al. The normal counterpart of IgD myeloma cells in germinal center displays extensively mutated Ig VH gene, Cmu- δ delta switch, and lambda I igh chain expression. *J Exp Med* 1998 ; 187 : 1169-78.
3. Chen K, Xu W, Wilson M, et al. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol* 2009 ; 10 : 889-98.
4. Rouaud P, Saintamand A, Saad F, et al. Elucidation of the enigmatic IgD class switch recombination via germ-line deletion of the IgH 3' regulatory region. *J Exp Med* 2014 ; 211 : 975-85.
5. Choi JH, Wang KW, Zhang D, et al. IgD class switching is initiated by microbiota and limited to mucosa-associated lymphoid tissue in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017 ; 114 : E1196-204.
6. Preud'homme JL, Petit I, Barra A, et al. Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Mol Immunol* 2000 ; 37 : 871-87.
7. Ghazzaoui N, Issaoui H, Saintamand A, et al. Analysis of IgD CSR junctions by high-throughput sequencing. *Immunol Lett* 2017 ; 188 : 86-8.
8. Issaoui H, Ghazzaoui N, Saintamand A, et al. Contrasting to other isotypes IgD class switch recombination is not controlled by the immunoglobulin heavy chain (Igh) 3' regulatory region super-enhancer. *Cell Mol Immunol* 2017 ; 14 : 871-4.
9. Saintamand A, Ghazzaoui N, Issaoui H, et al. 3'RR : Docteur Jekyll et Mister Hyde de la lymphopoïèse/lymphomagenèse B. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 963-70.
10. Saintamand A, Lecron JC, Morel F, et al. Comment on IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J Immunol* 2015 ; 194 : 2039-40.

NOUVELLE

Antagonistes du récepteur CB1 des cannabinoïdes et obésité

Le tissu adipeux au cœur du débat !

Hélène Gilgenkrantz, Sophie Lotersztajn

CRI (centre de recherche sur l'inflammation), Inserm UMR 1149 - université Paris Diderot, faculté de médecine Xavier Bichat, 16, rue Henri Huchard, 75018 Paris, France.
helene.gilgenkrantz@inserm.fr

L'obésité : une maladie inflammatoire
On le sait, on nous le répète, l'obésité (définie par un indice de masse corporelle supérieur à 30), est un fléau qui a désormais pris une ampleur épidémique dans les pays développés. En France, elle touche 16 % des hommes et des femmes avec une répartition inégale en fonction de la tranche d'âge et de la catégorie socio-économique. Si on y ajoute les individus en surpoids (indice de masse corporelle supérieur à 25), 57 % de la population masculine française et 41 % des femmes sont touchés. Ce que l'on sait moins, c'est que l'obésité est une maladie

inflammatoire à bas bruit. En effet, elle est associée à une augmentation des cytokines dans le sang et dans le tissu adipeux des patients (IL-6 [interleukine-6], TNF α [tumor necrosis factor- α], CRP [*C-reactive protein*]), mais également à une infiltration macrophagique du tissu adipeux. Il faut ajouter à ce cocktail, la dysbiose, c'est à dire la modification du microbiote qui a été décrite chez les patients diabétiques et obèses [1, 2] (→).

(→) Voir la Nouvelle d'A.L. Barbotin et al., *m/s* n° 11, novembre 2016, page 930 et la Synthèse de R. Burcelin et al., *m/s* n° 11, novembre 2016, page 952

L'inflammation chronique est ainsi corrélée aux complications cardiovasculaires et métaboliques, comme le diabète, de l'obésité. Malheureusement, lorsque les tentatives de régimes ont échoué, l'arsenal thérapeutique efficace reste limité et souvent invasif (anneau gastrique, sleeve gastrectomie¹ ou bypass gastrique²).

¹ L'intervention ne conserve que la partie verticale de l'estomac, créant un petit réservoir tubulaire sans interrompre le circuit alimentaire et sans anneau à surveiller ou à serrer.

² Le bypass gastrique est une réduction de la taille de l'estomac par lequel passent les aliments et un court-circuit d'une partie de l'intestin.

4. Article 4

High-throughput sequencing reveals similar molecular signatures for class switch recombination junctions for the γ and α isotypes

ISSAOUI H*, GAZZAUI N*, SAINTAMAND A, DENIZOT Y, BOYER F.

Contribution équivalente

Cellular and Molecular Immunology, <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0025-z>



CORRESPONDENCE

High-throughput sequencing reveals similar molecular signatures for class switch recombination junctions for the γ and α isotypes

Cellular & Molecular Immunology _#####_
<https://doi.org/10.1038/s41423-018-0025-z>

INTRODUCTION

After encountering an antigen, B cells undergo class switch recombination (CSR), which substitutes the C_μ gene with C_γ , C_ϵ , or C_α to generate IgG, IgE, and IgA antibodies with the same antigenic specificity but new effector functions.¹ The DNA-editing enzyme activation-induced deaminase (AID) is essential for CSR by targeting switch (S) regions preceding C_μ (namely, the S_μ donor region) and the C_γ , C_ϵ , and C_α genes (namely, the $S_{\gamma,\epsilon,\alpha}$ acceptor regions).¹ *Cis*- and *trans*-controlled DNA double strand breaks are generated during this process.^{2–6} Recruitment of DNA repair factors that facilitate the end-joining process is a crucial step of class switch recombination. Two pathways are implicated in this end joining. The classical non-homogenous end joining (c-NHEJ) pathway ligates DNA ends with no or little homology. By contrast, the alternative end joining (A-EJ) pathway is used to ligate DNA ends that have microhomology.^{3–6} Previous reports have suggested that IgG and IgA CSR might be differentially regulated, with preferential use of c-NHEJ for γ CSR and A-EJ for α CSR.^{7, 8} We recently reported a computational tool (CSReport) for automatic analysis of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing⁹ and used it to analyze the rare S_μ - S_δ junctions that formed during IgD CSR.^{10, 11} We thus used CSReport and high-throughput sequencing to analyze the molecular signature of S_μ - S_{γ_3} , S_μ - S_{γ_1} , and S_μ - S_α junctions in *wt* mice in greater detail.

Our research was approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Éthique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and conducted according to the European guidelines for animal experimentation. Single-cell suspensions of spleen cells from wild-type (*wt*) 129 mice were cultured 4 days at 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum (FCS) and 5 μ g/ml LPS, with or without the addition of 20 ng/ml IL-4 or 2 ng/ml TGF β (PeproTech, Rocky Hill, NJ). Splenocyte DNA was then extracted for investigation of S_μ - S_{γ_3} , S_μ - S_{γ_1} , and S_μ - S_α junctions. As previously described in detail,⁹ the junctions were PCR amplified. Libraries of 200 bp were prepared from the 1 to 2 kb PCR products of S_μ - S_{γ_1} , S_μ - S_{γ_3} , and S_μ - S_α amplification for Ion Proton sequencing ("GénoLim platform" of Limoges University, France). The sequenced reads were then mapped to S_μ and acceptor S_{γ_1} , S_{γ_3} , and S_α regions using the BLAST algorithm. The

computational tool developed for the experiments performs junction assembly, identifies breakpoints in S_μ , S_{γ_1} , S_{γ_3} , S_α , identifies the junction structure (blunt, micro-homology or junction with insertions), and outputs a statistical summary of the identified junctions.

LPS, LPS + IL4, and LPS + TGF β stimulated B-cell CSR to IgG3, IgG1, and IgA, respectively.^{2, 5, 12} We detected 4140, 3798, and 1955 S_μ - S_{γ_1} , S_μ - S_{γ_3} , and S_μ - S_α junctions, respectively. The structural profiles of these junctions (blunt, micro-homology or junction with insertions) are reported in Fig. 1a. The positions of IgG1, IgG3, and IgA junctions in terms of distance from the forward PCR primer in S_μ are reported in Fig. 1b. The localizations of the S_μ breakpoints within AID hotspots (AGCT, WRCY, RGYW) and other motifs are shown in Fig. 1c (both displayed along the S_μ region and expressed in % of junctions). The analysis of 5000 synthetic junctions simulated from the random association of 100-bp S_μ segments with 100-bp segments of S_{γ_1} , S_{γ_3} , or S_α revealed a similar pattern of blunt and micro-homology junctions (junction with insertions are not produced with this numerical approach) (Fig. 1d) compared with true junctions (Fig. 1a). As shown in Fig. 1e, the frequency of S_μ - S_{γ_1} , S_μ - S_{γ_3} , and S_μ - S_α junctions with large (>5 bp) micro-homology was higher in S_μ - S_α than in S_μ - S_{γ_1} and S_μ - S_{γ_3} for both sequenced junctions and randomly simulated junctions. Figure 1f shows dot plots for the S_μ vs S_{γ_1} , S_μ vs S_{γ_3} , and S_μ vs S_α sequence comparisons.

Confirming the validity of our technical approach, the structural profile of our S_μ - S_{γ_1} junctions was similar to that reported a few weeks ago using a high-throughput translocation sequencing method.⁵ We also confirmed the previously reported slight increase in small insertions for S_μ - S_γ compared to S_μ - S_α .⁸ Finally, we demonstrated that the slight increase in S_μ - S_α junctions with large micro-homology can be numerically reproduced using randomly generated synthetic junctions. As this simulation mimics a pure NHEJ process (linking two free DNA ends without any resection), it demonstrates that it is not necessary to invoke another molecular mechanism (such as A-EJ) to explain the observed structural alteration of S_μ - S_α junctions. Those micro-homologies arise solely by chance and are favored by the repetitive structure of the S_α region and its high degree of similarity to the S_μ region. In conclusion, the structural profiles of S_μ - S_{γ_1} , S_μ - S_{γ_3} , and S_μ - S_α junctions are similar, indicating that they use the same CSR process and partners regardless of cytokine stimulation, length of the S acceptor region and its distance from the S_μ donor region. Analysis of the molecular signature of CSR junctions does not support a preferential use of c-NHEJ and A-EJ for γ CSR and α CSR, respectively.

Received: 26 February 2018 Revised: 28 February 2018 Accepted: 28 February 2018
 Published online: 23 March 2018

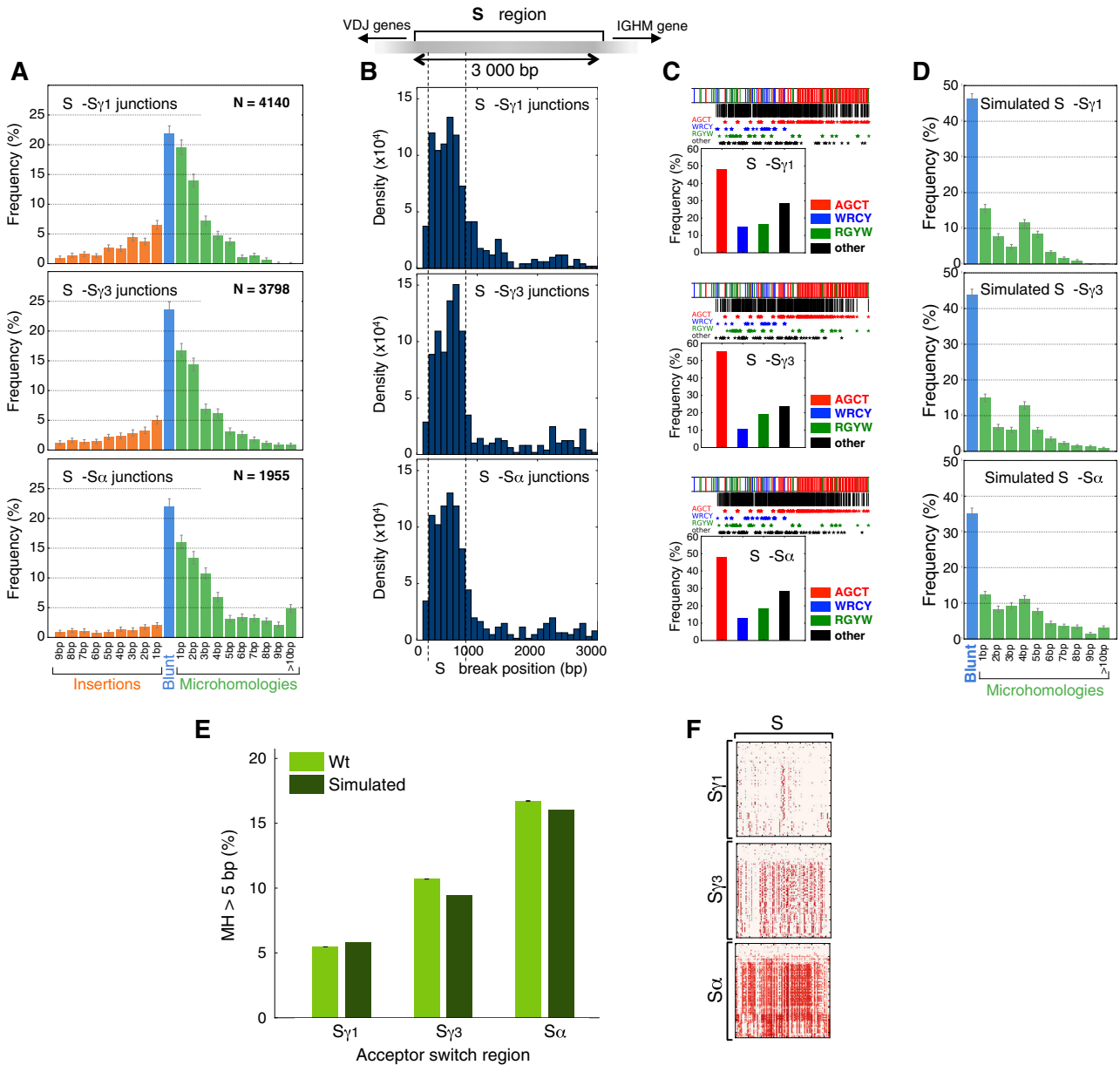


Fig. 1 CSR in wt mice. **a** Structural profiles of S_{μ} - $S_{\gamma 1}$, S_{μ} - $S_{\gamma 3}$, and S_{μ} - S_{α} junctions. The junctions are classified in terms of junction types (junction with insertions, blunt junction, or junction with micro-homology). **b** Breakpoint localizations in S_{μ} for S_{μ} - $S_{\gamma 1}$, S_{μ} - $S_{\gamma 3}$, and S_{μ} - S_{α} junctions. **c** (top) Location of breakpoints with respect to the AID hotspots AGCT, WRCY, RGYW, and other motifs along the first 1 kb in S_{μ} . Identified breaks are shown as a black line, and co-location with a sequence motif is indicated with a colored asterisk. (bottom) Frequency of hotspot/break co-location events. **d** Structural profiles of synthetic S_{μ} - $S_{\gamma 1}$, S_{μ} - $S_{\gamma 3}$, and S_{μ} - S_{α} junctions. Three sets of 5000 synthetic junctions were simulated from the random association of 100-bp S_{μ} segments with 100-bp segments of $S_{\gamma 1}$, $S_{\gamma 3}$, or S_{α} and analyzed with the same computational tool (CSRReport) used for the sequencing reads. **e** Frequency of junctions with long micro-homology (>5 bp) for S_{μ} - $S_{\gamma 1}$, S_{μ} - $S_{\gamma 3}$, and S_{μ} - S_{α} junctions. Simulated datasets are compared to the junctions identified from high-throughput sequencing. **f** Sequence similarity dot plots of S_{μ} vs $S_{\gamma 1}$, S_{μ} vs $S_{\gamma 3}$ and S_{μ} vs S_{α} . Similarity was evaluated with a 20-bp window and reported when >60%

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by ANR (project EpiSwitch-3'RR 2016). N.G. was supported by a grant from Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique (Lebanon) and the municipality of Khiam (Lebanon). H.I. is supported by CORC (FJA/NP 2015-109) and the University of Limoges. The authors are "Equipe Labellisée LIGUE 2018". We thank the GéoLim platform and the Cytometry platform of the University of Limoges for sequencing and cell sorting. F.B. is supported by Fondation Partenariale de l'Université de Limoges and ALURAD.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.I. and N.G. contributed equally to this work. Y.D. designed the research. N.G. and H.I. performed the research. A.S., F.B., and Y.D. analyzed the data. N.G., H.I., F.B., and Y.D. wrote the paper.

ADDITIONAL INFORMATION

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Hussein Issaoui¹, Nour Ghazzaoui¹, Alexis Saintamand²,
Yves Denizot¹ and François Boyer¹

¹UMR CNRS 7276, INSERM U1262, CBRS, Limoges University, rue Pr.
Descottes, Limoges 87025, France and ²INSERM U1236, Rennes 1
University, Rennes, France

Correspondence: Yves Denizot (yves.denizot@unilim.fr)

REFERENCES

1. Pinaud, E. et al. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* **110**, 27–70 (2011).
2. Saintamand, A. et al. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat. Commun.* **6**, 7084 (2015).
3. Methot, S. P. & Di Noia, J. M. Molecular mechanisms of somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv. Immunol.* **133**, 37–87 (2017).
4. Chaudhuri, J. & Alt, F. W. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 541–552 (2004).
5. Panchakshari, R. A. et al. DNA double-strand break response factors influence end-joining features of IgH class switch and general translocation junctions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **115**, 762–767 (2018).
6. Matthews, A., 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).
7. Pan-Hammarström, Q. et al. Impact of DNA ligase IV on nonhomologous end joining pathways during class switch recombination in human cells. *J. Exp. Med.* **201**, 189–194 (2005).
8. Björkman, A. et al. DNA-PKcs is involved in Ig class switch recombination in human B cells. *J. Immunol.* **195**, 5608–5615 (2015).
9. Boyer, F. et al. CSReport: a new computational tool designed for automatic analysis of class switch recombination junctions sequenced by high-throughput sequencing. *J. Immunol.* **198**, 4148–4155 (2017).
10. Ghazzaoui, N., Issaoui, H., Saintamand, A., Boyer, F. & Denizot, Y. Analysis of IgD CSR junctions by high-throughput sequencing. *Immunol. Lett.* **188**, 86–88 (2017).
11. Issaoui, H., Ghazzaoui, N., Saintamand, A., Denizot, Y. & Boyer, F. IgD class switch recombination is not controlled through the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer. *Cell Mol. Immunol.* **14**, 871–874 (2017).
12. Issaoui, H., et al. The IgH 3' regulatory region super-enhancer does not control IgA class switch recombination in the B1 lineage. *Cell Mol. Immunol.* in press (2018) <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.103>.

5. Article 5

The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region superenhancer controls mouse B1 B-cell fate and late VDJ repertoire diversity

GHAZZAUI N*, ISSAOUI H*, SAINTAMAND A, OBLET C, CARRION C, DENIZOT Y.

Contribution équivalente

Blood advances, DOI 10.1182/bloodadvances.2017014423.

The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region superenhancer controls mouse B1 B-cell fate and late VDJ repertoire diversity

Nour Ghazzai,* Hussein Issaoui,* Alexis Saintamand,* Christelle Oblet, Claire Carrion, and Yves Denizot

Unité Mixte de Recherche Centre national de la Recherche Scientifique 7276, INSERM U1262 Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations, Université de Limoges, Limoges, France

Key Points

- Similar to B2 B cells, the IgH 3'RR superenhancer controls μ -chain transcription and cell fate in B1 B cells.
- In contrast to B2 B cells, deletion of the IgH 3'RR superenhancer affects B1 B-cell late repertoire diversity.

The immunoglobulin heavy chain (IgH) 3' regulatory region (3'RR) superenhancer controls B2 B-cell IgH transcription and cell fate at the mature stage but not early repertoire diversity. B1 B cells represent a small percentage of total B cells differing from B2 B cells by several points such as precursors, development, functions, and regulation. B1 B cells act at the steady state to maintain homeostasis in the organism and during the earliest phases of an immune response, setting them at the interface between innate and acquired immunity. We investigated the role of the 3'RR superenhancer on B1 B-cell fate. Similar to B2 B cells, the 3'RR controls μ transcription and cell fate in B1 B cells. In contrast to B2 B cells, 3'RR deletion affects B1 B-cell late repertoire diversity. Thus, differences exist for B1 and B2 B-cell 3'RR control during B-cell maturation. For the first time, these results highlight the contribution of the 3'RR superenhancer at this interface between innate and acquired immunity.

Introduction

B cells play a central role both in adaptive immunity and innate immunity via B2 B cells and B1 B cells, respectively.¹⁻⁵ B1 and B2 B cells differ by their origin, antigen specificity, diversity of the antigenic repertoire, cell surface markers, and tissue distribution. B1 and B2 B cells have a different origin: B1 B cells develop earlier than B2 B cells during fetal development and keep their self-renewal capacity all throughout their life, whereas B2 B cells originate from bone marrow precursors. B1 B cells are the major B-cell population in the pleural and peritoneal cavities (almost 50% of total B cells), are rarely detected in the lymph nodes and spleen (~1% of total B cells), and are almost undetectable in bone marrow (<0.1% of total B cells).¹⁻⁵ Besides these differences for cell precursors and anatomic locations, B1 and B2 B cells exhibit other important differences during their development and maturation. Compared with B2 B cells, B1 B cells have a specific repertoire of B-cell receptor (BCR) characterized by the production of natural immunoglobulin M (NIgM) frequently polyreactive or autoreactive, with low affinity.¹⁻⁵ Compared with B2 B cells, B1 B cells exhibit a marked predisposition for class switch recombination (CSR) toward IgA. Compared with B2 B cells, B1 B cells exhibited a lower hypermutation somatic rate than B2 B cells.¹⁻⁵ Both B1 and B2 B cells thus produce immunoglobulins, but their cell fate is evidently differently regulated.

Immunoglobulin heavy chain (IgH) cis-regulatory regions and especially transcriptional superenhancers are major locus regulators.⁶ The IgH 3' regulatory region (3'RR) superenhancer is reported to control B2 B-cell IgH transcription and B-cell fate^{7,8} but has little influence on variable, diversity, and joining (VDJ) recombination.^{9,10} Because B1 and B2 B cells originate from different precursors and have clearly different development, function, and regulation, we postulated that the 3'RR superenhancer might differently regulate B1 and B2 B-cell behaviors. Strengthening this hypothesis, other authors have reported that IgA CSR 3'RR controlled in B2 B cells^{11,12} is not affected by the 3'RR deletion in B1 B cells.¹³ In this study, we report that similar to B2 B cells, the 3'RR controls μ transcription and cell fate in B1 B cells. In contrast to

B2 B cells, deletion of the 3'RR affects B1 B-cell late VDJ repertoire diversity. The impact on the expressed VDJ repertoire stands as a new feature and highlights the broad contribution of the 3'RR to humoral immune responses, from innate to adaptive immunity.

Materials and methods

Mice

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. Disruption of the 3'RR was carried out in a Sv/129 embryonic stem cell line.¹¹ Mice were bred and maintained under specific pathogen-free conditions. Age-matched littermates (8-12 weeks old) were used in all experiments. 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.⁷

Cell cytometry analysis

Peritoneal cavity cells, splenocytes, and liver cells (fetal and post-birth) were recovered onto Lympholyte (Cedarlane Labs, Burlington, ON, Canada) according to the manufacturer's recommendations. Cells were then washed, counted, and 2×10^6 cells were incubated with anti-B220-BV510, anti-IgD-BV421, anti-CD23-PC7, anti-IgM^a-fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-IgM^b-PE, anti-CD11b-eF780, and anti-CD5-APC antibodies (SouthernBiotech, Birmingham, AL; Becton Dickinson [BD], Franklin Lakes, NJ) and were analyzed on a Fortessa LSR2 (BD).^{13,14}

Transcript analysis

Peritoneal cavity B1 B cells were sorted from 3'RR-deficient mice and 129 wild-type (wt) mice using a BD FACSAria III.⁷ The following antibodies were used: anti-B220-BV510, anti-CD23-PC7, anti-IgM-FITC, anti-CD11b-eF780, anti-IgD-BV421, anti-CD19-PE, and anti-CD5-APC. Total RNA was extracted and real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed in duplicate by use of TaqMan and SYBR assay reagents and analyzed on an ABI Prism 7000 system (Applied Biosystems, Foster City, CA).⁷ μ Membrane forward (in exon μ : 4): 5'-TGGAAGCTCCGGAGAGACCTA-3'; μ Membrane reverse (in exon μ membrane 1): 5'-TTCCCTCTCAGCATTACCT-3'. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used for normalization of gene expression levels (reference Mm99999915-g1).

ELISA for NIgM

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for NIgM were performed in 96 multi-well plates coated overnight at 4°C with 100 μ L of 10- μ g/mL kidney cell lysates. After washing (0.1% Tween20 in phosphate-buffered saline [PBS] buffer), we performed a blocking step for 1 hour at 37°C with 100 μ L of 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS buffer. After washing, we incubated 75 μ L-assayed sera (20 μ g/mL of IgM diluted in 1% BSA in PBS buffer) for 2 hours at 37°C. IgM levels were investigated as described,^{11,15} and sera were appropriately diluted. Sera from wt mice and 3'RR-deficient mice were investigated. Sera from Rag-deficient mice were used as a negative control. After washing, we added 100 μ L/well of anti-mouse-IgM-alkaline phosphatase (AP) (1/2000) for 1.5 hours at 37°C. After washing, we assayed AP activity using AP substrate at room temperature and measured optical density at 405 nm.

Next-generation sequencing for repertoire analysis

We performed repertoire sequencing analysis using the strategy described by Li et al.¹⁶ developed for T-cell repertoire diversity and clonotype. These experiments used a new generation methodology, which combines 5'RACE PCR; sequencing; and, for analysis, the international ImMunoGeneTics information system (IMGT), IMGT/HighV-QUEST Web portal, and IMGT-ONTOLOGY concepts. In brief, RNA was extracted from sorted B1 and B2 B cells. RNA (500 ng) was used for sequencing. We amplified transcripts with 5'RACE PCR using a reverse primer hybridizing within the μ C_{H1} exon, as described previously.¹⁷ Sequencing adapter sequences was thus added by primer extension, and resulting amplicons were sequenced on a GS FLX⁺ sequencing system (Roche, Pleasanton, CA). Repertoire was done using IMGT/High-V-Quest¹⁸ and the bcRep R package¹⁹; associated tools are available on the IMGT Web site.

Results

B1 B-cell usage of a 3'RR-deleted allele

Mouse B1 and B2 B cells are distinguished on the basis of membrane cell surface markers. B1 B cells are B220^{low}IgM^{high}IgD^{low}CD23⁻CD11b^{+/low}, whereas B2 B cells are B220^{high}IgM^{high}IgD^{high}CD23⁺CD11b⁻.^{2,4,20} B1 B cells represent the first population of B cells during fetal life. In adult mice, they are mainly located in the spleen and peritoneal cavity where they represent the minority and majority of B-cell subpopulations, respectively.⁴ First, we investigated the impact of the expression of a 3'RR-deleted allele on B1 B-cell fate. The 3'RR deletion was done in a 129 ES cell line (IgH a allotype) and developed in a 129 background (IgH a^{wt}/a^{wt}). Heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice were generated by crossing homozygous 3'RR-deficient mice (IgH $a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$) with C57BL/6 mice bearing an IgH b allotype (IgH b^{wt}/b^{wt}). Mixed 129 \times C57BL/6 mice (IgH a^{wt}/b^{wt}) were used as control mice. A scheme of the backcross experiments is reported in Figure 1. The complete staining strategy in flow cytometry experiments is reported in Figure 2. Flow cytometry analysis of splenic B cells with IgM allotype-specific antibodies indicated lowered ($P = .0004$, Mann-Whitney U test) percentages of B1 B cells expressing an allotype in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ (IgM^a/IgM^b ratio: 0.26) but not in a^{wt}/b^{wt} mice (IgM^a/IgM^b ratio: 1.09) (Figure 3A-B). As a positive control, we confirmed the significant disadvantage ($P = .0004$) of $a^{\Delta 3'RR}$ -expressing mature splenic B2 B cells of IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice vs b^{wt} -expressing cells (IgM^a/IgM^b ratio: 1.07 vs 0.35 for a^{wt}/b^{wt} and $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice, respectively) (Figure 3C-D).⁷ Analysis of peritoneal cavity B cells also showed a strong disadvantage ($P = .002$) of the mutated a allotype both in B1 (Figure 3E-F) and B2 B cells (Figure 3G-H) of IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice. In the peritoneal cavity and in the absence of a 3'RR defect, we noted a bias toward higher expression of the IgH^a allele in B1 B cells (but not in B2 B cells) from a^{wt}/b^{wt} control mice (Figure 3E-F). It is interesting to note that this bias was not found in the fetal liver, from where B1 B cells originate (Figure 3I-J). Various signaling pathways are implicated in the efficient B1 B-cell maturation, including a high tonic BCR signaling.^{4,21} Several differences in signaling pathways between C57BL/6 and Sv/129 mice, resulting in variations of the B-cell fate, have previously been described.²² The peritoneal B1 B-cell allelic bias might thus be linked with a differential strength of expression and/or signaling between IgM^a and IgM^b BCR for

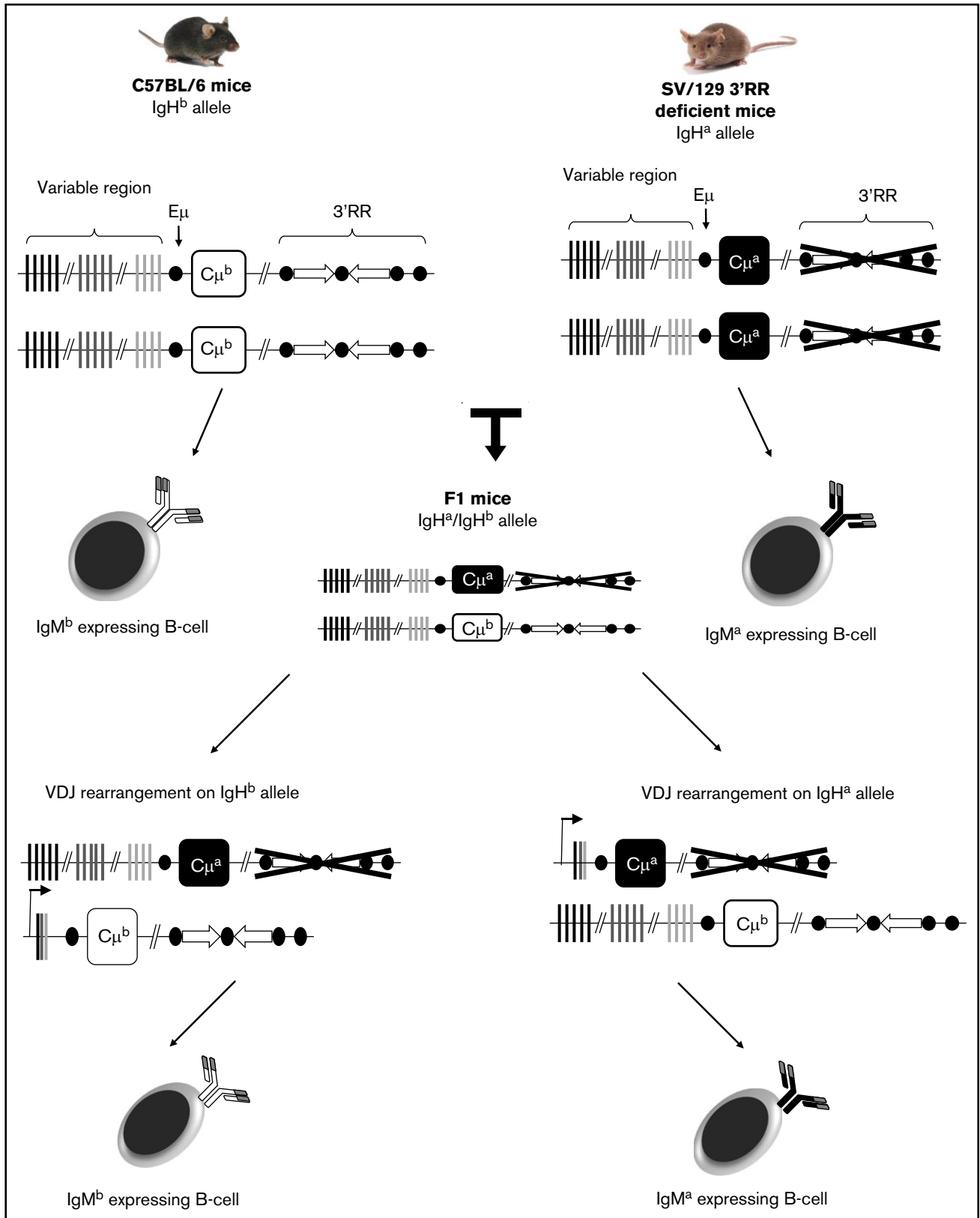


Figure 1. Backcross for $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice, and membrane expression of IgM^a or IgM^b allele by B cells. The equilibrium between IgM^a- or IgM^b-expressing B cells will be disrupted if the expression of the 3'RR-deleted allele impedes B-cell development. Lowered number of IgM^a-expressing B cells in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice thus will demonstrate that deletion of the 3'RR alters B-cell development or recruitment.

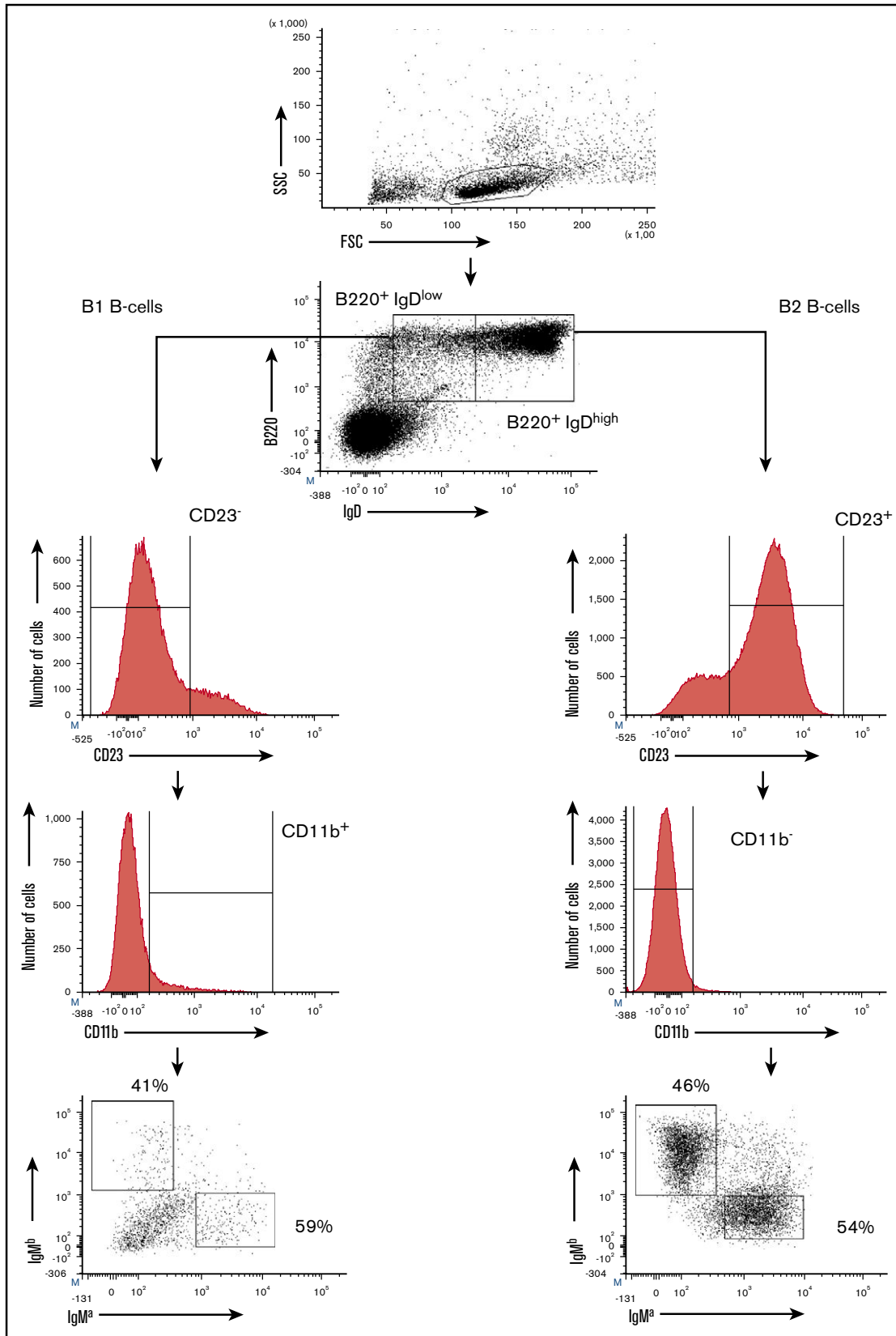


Figure 2. Flow cytometry for mouse B1 and B2 B cells. B1 and B2 B cells are distinguished on the basis of membrane cell surface markers. B1 B cells are B220^{low}IgM^{high}IgD^{low}CD23⁻CD11b^{+/low}, whereas B2 B cells are B220^{high}IgM^{high}IgD^{high}CD23⁺CD11b⁻.^{2,4,20}

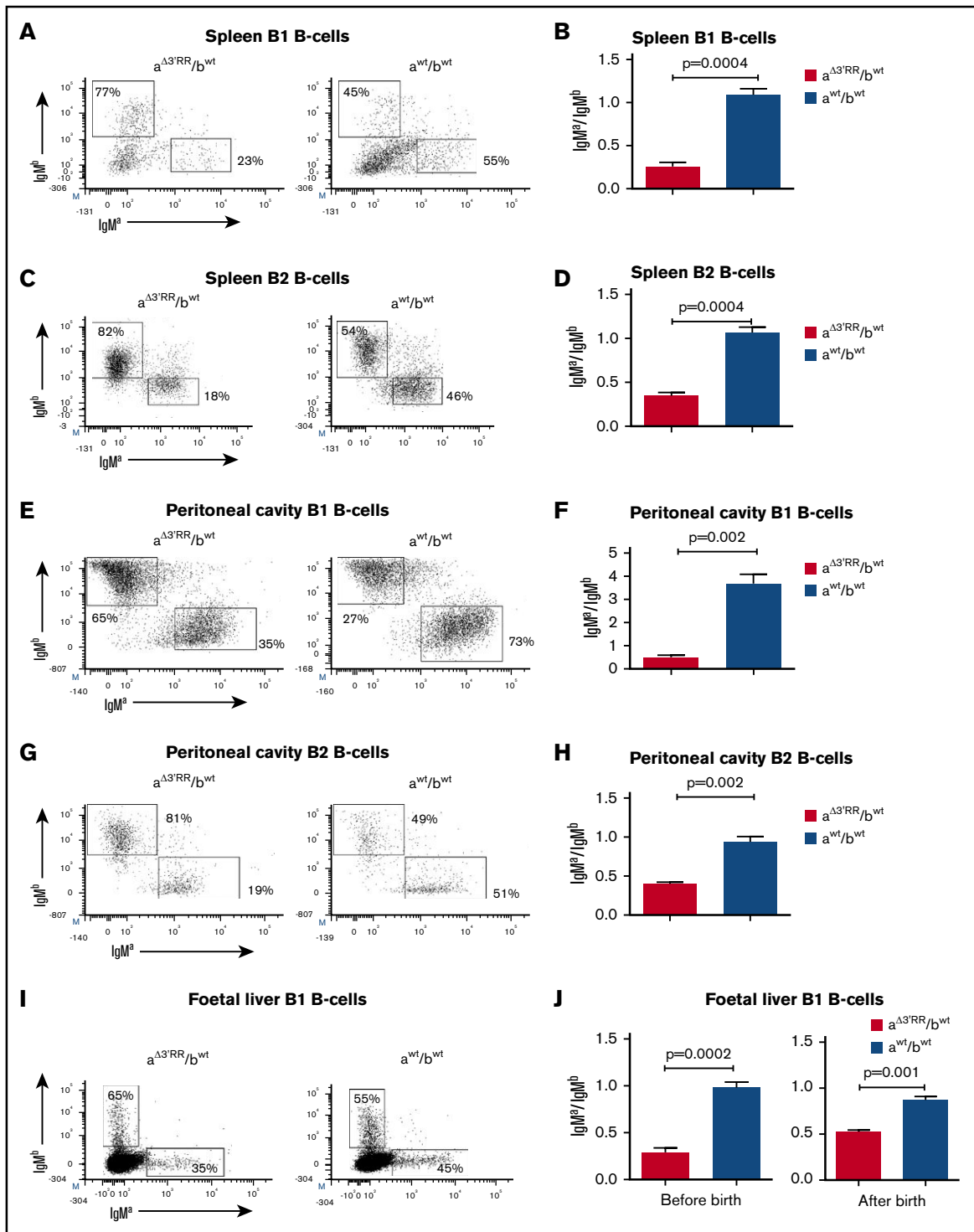
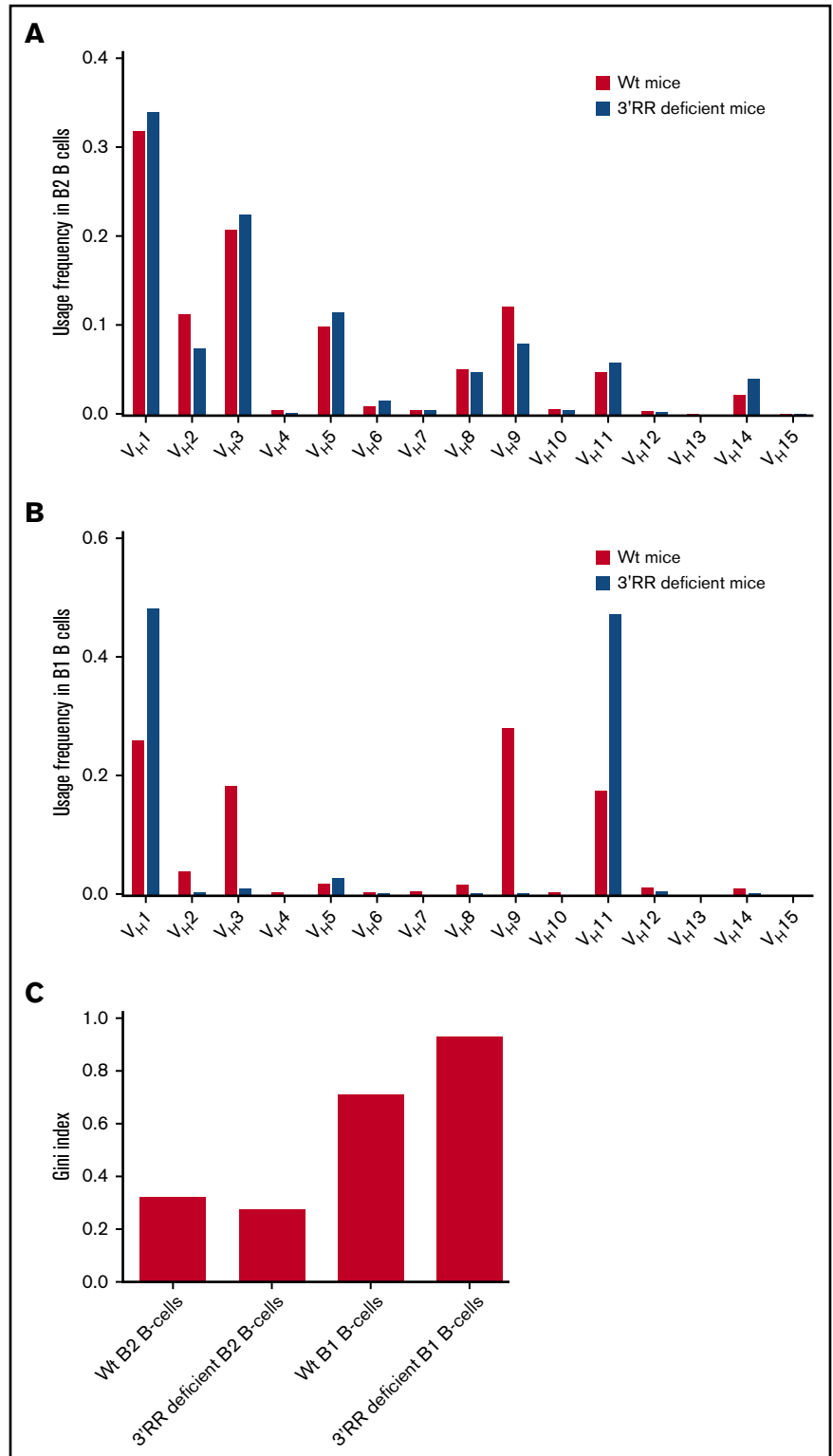


Figure 3. Expression of a 3'RR-deleted allele in B1 B cells of the spleen, peritoneal cavity, and fetal liver. (A) Flow cytometry analysis of IgM^a and IgM^b on spleen B1 B cells of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment is shown. (B) IgM^a/IgM^b ratios for spleen B1 B cells. Six $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and nine a^{wt}/b^{wt} mice were investigated. Results are reported as means \pm standard error of the mean (SEM), Mann-Whitney U test for significance. (C) IgM^a and IgM^b on spleen B2 B cells of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment is shown. (D) IgM^a/IgM^b ratios for spleen B2 B cells. Same mice as in panel B. (E) IgM^a and IgM^b on peritoneal cavity B1 B cells of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment is shown. (F) IgM^a/IgM^b ratios for peritoneal cavity B1 B cells, 7 mice per groups. (G) IgM^a and IgM^b on peritoneal cavity B2 B cells of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment is shown. (H) IgM^a/IgM^b ratio for peritoneal cavity B2 B cells, 7 mice per groups. Same mice as in panel E. (I) IgM^a and IgM^b on B1 B cells in fetal liver (12 hours before birth) of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment is shown. (J) IgM^a/IgM^b ratio for B1 B cells in the liver 12 hours before and 12 hours after birth. Eleven $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and nine a^{wt}/b^{wt} mice were investigated before birth. Twelve $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and seven a^{wt}/b^{wt} mice were investigated after birth.

Figure 4. B1 and B2 B-cell repertoire in 3'RR-deficient and wt mice. B1 and B2 B cells of wt and 3'RR-deficient mice were cell sorted from pooled cells of 12 and 13 mice, respectively. 2.1×10^6 and 2.8×10^6 B1 B cells were sorted for wt and 3'RR-deficient mice, respectively. 0.8×10^6 and 1.3×10^6 B2 B cells were sorted for wt and 3'RR-deficient mice, respectively. (A-B) V usage frequency in (A) B2 and (B) B1 B cells of 3'RR and wt mice. (C) Gini index for B1 and B2 B cells of 3'RR and wt mice. The Gini index measures the inequality of clone size distribution and is bound between zero and 1. An index of zero represents a clone set of equally distributed clones, all having the same size, whereas a Gini index of 1 would point to a set including only 1 clone.



proliferation/survival of peritoneal B1 B cells.¹⁻⁵ We thus investigated the impact of the expression of a 3'RR defect on liver B1 B cells from newborn mice. Lower percentages of $a^{\Delta 3'RR}$ -expressing B1 B cells in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice were observed at 2 different timepoints, both 12 hours before or 12

hours after birth with an IgM^a/IgM^b ratio of 0.29 ($P = .0002$) and 0.59 ($P = .001$), respectively (Figure 3I-J). Altogether, these results indicate that, similar to B2 B cells, although the 3'RR superenhancer is not essential for B1 B-cell development, it influences their accumulation as early as the fetal liver.

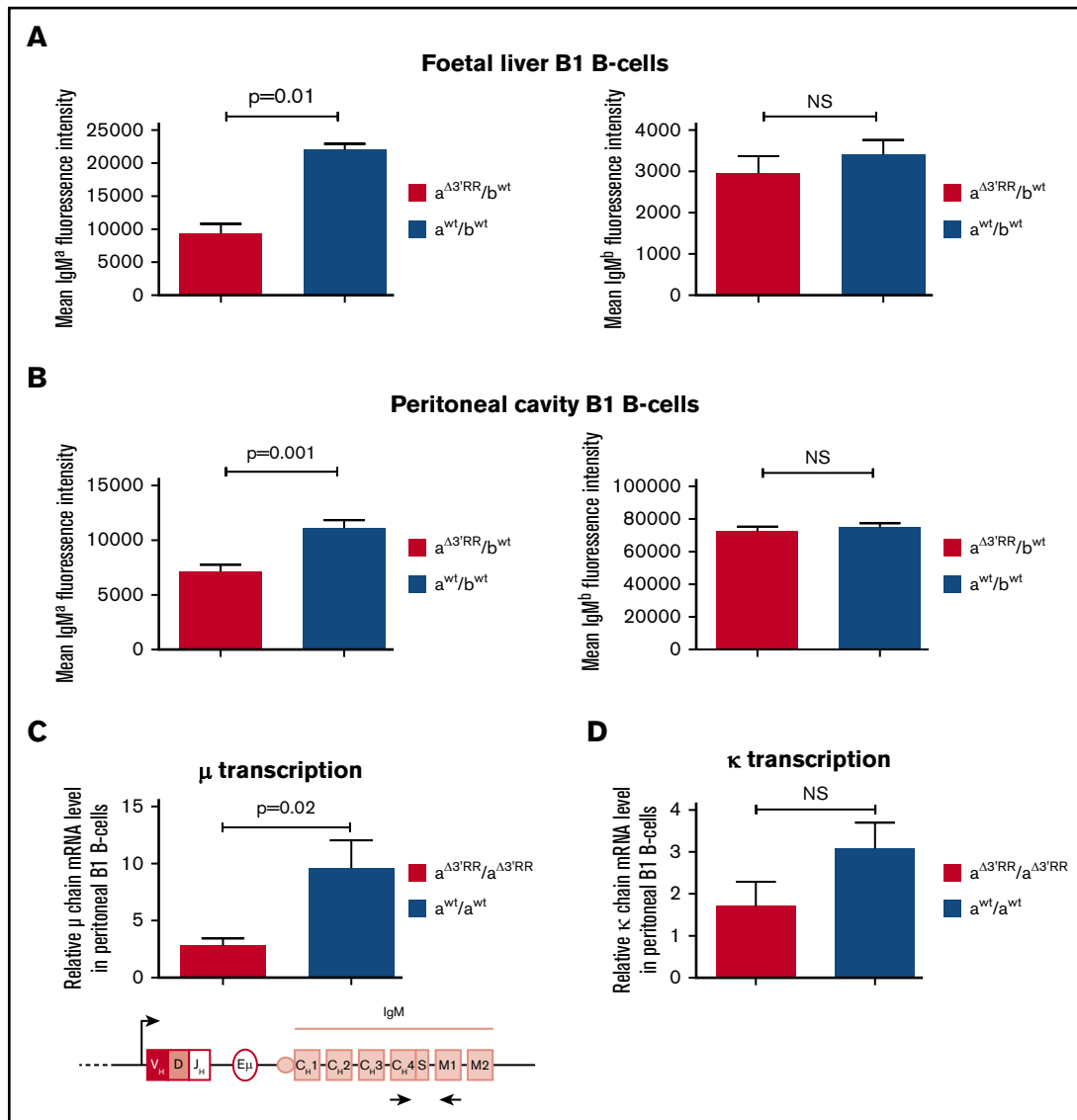


Figure 5. Effect of the 3'RR on BCR intensity and μ transcription in B1 B cells. (A) IgM^a and IgM^b intensities on the membrane of fetal liver B1 B cells. Results are reported as means \pm SEM. Mann-Whitney *U* test for significance. Four $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and five a^{wt}/b^{wt} mice were investigated. NS: not significant. (B) IgM^a and IgM^b intensities on the membrane of peritoneal cavity B1 B cells. Seven $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and seven a^{wt}/b^{wt} mice were investigated. (C) μ transcription in sorted peritoneal cavity B1 B cells of 3'RR-deficient mice and wt mice. Four separate experiments with pooled peritoneal cells from 4 to 6 mice for each genotype. Values were normalized to GAPDH transcripts. Locations of PCR primers are indicated in the scheme. (D) κ transcription in sorted peritoneal cavity B1 cells of 3'RR-deficient mice and wt mice. Same mice as in panel C.

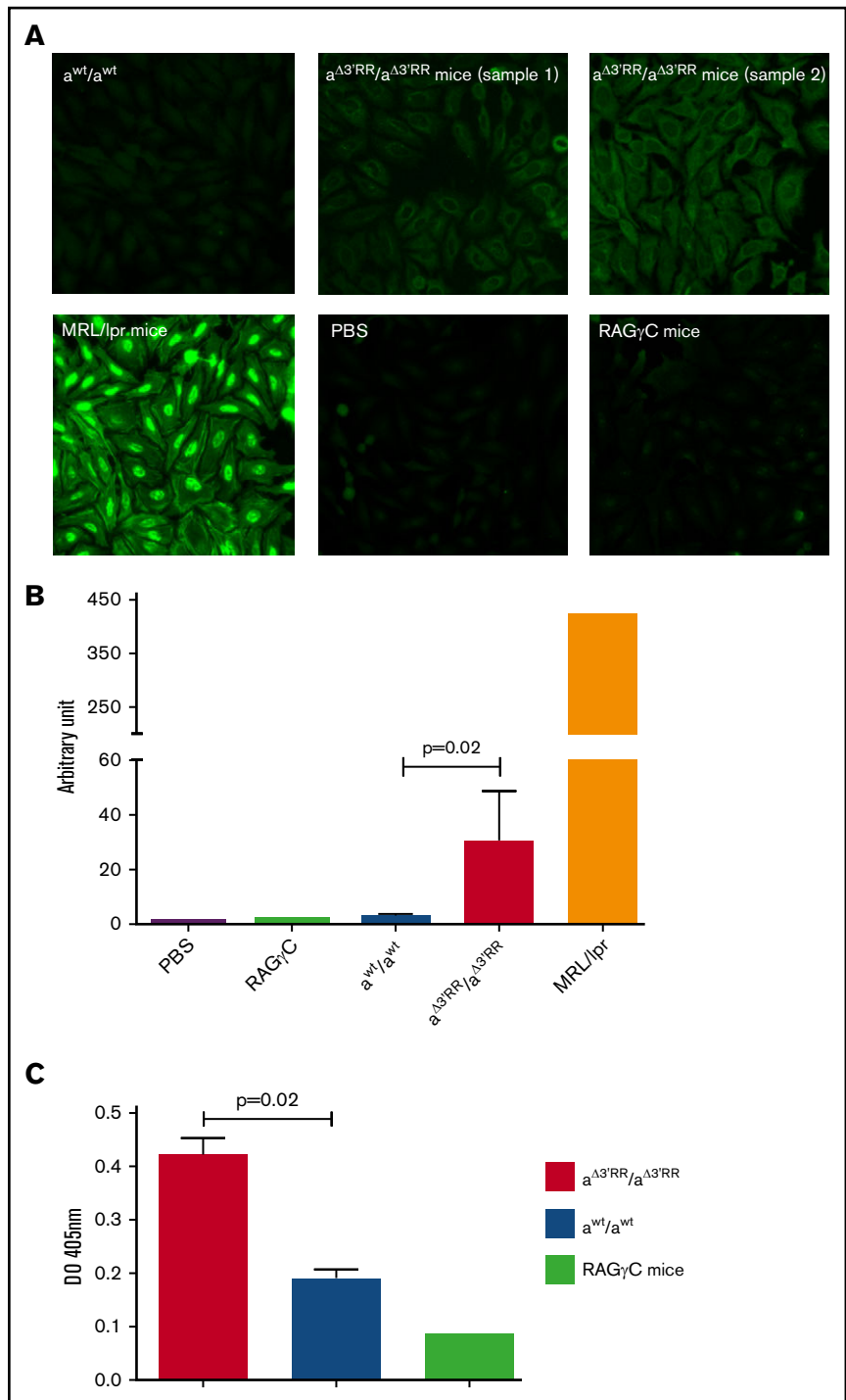
3'RR and B1 B-cell repertoire diversity

The IgH 3'RR has no role on B2 B-cell V(D)J recombination,^{9,10} except for silencing early transcription in pro-B cells.²³ If deletion of the 3'RR did not affect follicular B2 B-cell fate, it markedly reduced the peripheral accumulation of marginal zone (MZ) B2 B cells,⁷ another B-cell population connected with innate immunity as are B1 B cells.⁴ Because our data show that the 3'RR deletion quantitatively affects the B1 B-cell compartment, we also wished to qualitatively evaluate these cells. We thus investigated the repertoire diversity in sorted peritoneal cavity B1 and B2 B cells from 3'RR-deficient and wt mice by high-throughput repertoire sequencing. Our data first validate that deletion of the 3'RR did not affect

repertoire diversity in mature B2 B cells (Figure 4A; supplemental Figures 1 and 2), in accordance with previously reported results in bone marrow preimmune B2 B cells using a multiplex PCR strategy.⁹ These experiments highlighted the previously reported^{4,24} lower repertoire diversity in B1 B cells compared with B2 B cells (Figure 4B; supplemental Figures 1 and 2) and confirmed the oligoclonal expansion in the B1 B-cell population of the peritoneal cavity (Figure 4C; supplemental Figures 1 and 2) previously reported using the Sanger dideoxy method.²⁵ In addition, and contrasting with the B2 compartment, the B1 B-cell repertoire diversity was markedly lowered in 3'RR-deficient mice (Figure 4B; supplemental Figures 1 and 2), suggesting a role for the 3'RR superenhancer in the development of a diversified B1 B-cell repertoire. Because B1

Figure 6. NIgM in sera of 3'RR-deficient mice and wt mice.

(A) Indirect immunofluorescence assay for detection of NIgM. Sera from wt and 3'RR-deficient mice were investigated on Hep-2 cell-coated slides. Because reduced circulating IgM levels were found in 3'RR-deficient mice, sera were adjusted at 20- μ g/mL IgM. MLR/lpr and RAG γ C sera were used as positive and negative controls, respectively (1/10 dilution). Representative experiments from 1 to 5 sera per genotypes. Original magnification $\times 20$. (B) Data, expressed as means \pm SEM of the indicated number (n) of values, were analyzed using Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Significance was calculated with a nonparametric Mann-Whitney *U* test. PBS signal was arbitrary quoted to 1. (C) ELISA for detection of NIgM against kidney cell lysates. Sera from 3'RR-deficient and wt mice were adjusted at 20- μ g/mL IgM. Data are reported as means \pm SEM of 4 sera. **P* = .02, Mann-Whitney *U* test for significance. A RAG γ C serum was used as a negative control (1/10 dilution) to define baseline value.



B cells require a strong tonic BCR signaling for efficient maturation,²¹ the decrease of this signaling induced by the deletion of the 3'RR might explain this bias. Indeed, the lowered signaling may strengthen the selection pressure for strong-signaling, BCR-expressing B cells to differentiate into B1 B cells. Strengthening this hypothesis, the B1 B-cell population of the peritoneal cavity in 3'RR-deficient mice (Figure 4B) preferentially expresses V_H1 and V_H11 subtypes known to be associated with autoreactive antibodies.²⁶⁻²⁸

3'RR and B1 B-cell IgH transcription

Notably, the intensity of the BCR signaling is related to membrane BCR density and to expression of coreceptors. The 3'RR controls IgH expression and, thus, BCR density at the membrane of B2 B cells.⁷ Lower BCR density was also found at the membrane of B1 B cells from the fetal liver (Figure 5A) and peritoneal cavity (Figure 5B) when expressing a 3'RR-deficient IgM^a allotype in $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ mice compared with a^{wt}/b^{wt} mice. Likely accounting for

this lowered expression and reminiscent of the defect previously documented in 3'RR-deficient B2 B cells,⁷ primary μ transcript evaluation by real-time PCR on sorted peritoneal cavity B1 B cells showed a significant defect ($P = .02$) in 3'RR-deficient mice compared with wt mice (Figure 5C). As a control, the κ light-chain transcription was not significantly reduced by the 3'RR deletion (Figure 5D). Thus, and similar to B2 B cells, the 3'RR is of importance in B1 B cells for μ chain transcription at the IgH locus without effect on transcription at the Igk locus. The lower μ chain synthesis in B1 B cells from 3'RR-deficient mice fits well with the hypothesis of a lowered BCR density inducing a change in BCR signaling, and thus affecting the repertoire of B1 B cells.

3'RR and NIgM

NIgM, which is produced at birth in the absence of exposure to foreign antigens, makes up ~80% of circulating IgM. B1 B cells are believed to be the primary source of NIgM.¹ NIgM are selected on self-antigens and show dual reactivity to both self and common microbial antigens.²⁹ We investigated the presence of NIgM in the sera of 3'RR-deficient mice known to have markedly decreased circulating IgM levels,¹¹ by searching self-reactive IgM. Indirect immunofluorescence assay (Figure 6A) and ELISA assay (Figure 6B) indicated that autoreactive IgMs represent a greater proportion of total serum IgMs in 3'RR-deficient mice compared with wt mice. In contrast to autoimmune-prone mouse strain MLR/lpr used as a positive control, the autoreactive IgMs detected here appear to be polyreactive and are thus most probably NIgMs than pathologic monoclonal immunoglobulins. This result might be linked to the bias repertoire toward subtypes known to be associated with autoreactive antibodies.²⁶⁻²⁸

Discussion

Functional comparison of B1 lineage cells from teleost to mammal places B1 B cells between macrophages and B2 B cells (ie, at the interface between innate and humoral adaptive immune cells). Indeed B1 B cells share several similarities with innate macrophages such as phagocyte functions, microbicidal abilities, antigen presentation initiation, and location in serous cavities. B1 B cells share several similarities with humoral adaptive immune B2 B cells such as Ig secretion (mostly NIg). Results from the present study indicate that the 3'RR superenhancer differently regulates B1 and B2 B-cell maturation. Cell fate and μ transcription are 3'RR controlled, both in B1 and B2 B cells. In contrast, the VDJ diversity of B1 B cells is affected by 3'RR deletion for reasons that remain to be characterized precisely but most probably is related to a defective survival and/or self-renewal of B1 B cells carrying a BCR with faint expression. Indeed, several studies have reported that BCR signaling is critical for B1 B-cell development.²¹ Ligand-mediated BCR signaling is necessary for the expansion and/or survival of B1 B cells. Mutation-disrupted BCR signaling lowers B1 B-cell development, whereas mutation-enhanced BCR signaling enhances B1 B-cell development. Further studies are required to prove that the lowered expression of IgM on B1 B cells of 3'RR-deficient mice leads to a significant change in the signaling (eg, Syk/BLNK phosphorylation or calcium influx) of B1 B cells.

The position, the palindrome structure, and sequence conservation of the 3'RR superenhancer in amniota show its relevance in the control and modulation of Ig production.³⁰ The effect of the 3'RR on B1 B-cell μ transcription (the most ancestral specific B-cell

function) and B1 B-cell fate is coherent with its similar role on B2 B cells. Of interest, deletion of the 3'RR was reported to strongly reduce levels of MZ B2 B cells.⁷ MZ B2 B cells express several phenotypic and functional similarities with B1 B cells. The role of the 3'RR superenhancer on μ transcription in B1 B cells is of importance for an efficient BCR expression to ensure the development of a large VDJ repertoire, but no such effect has been found for the B2 B-cell VDJ repertoire. 3'RR targeting has been suggested as a potential therapeutic strategy in mature lymphomas³¹⁻³³ because of its important role on the entire IgH locus transcription (including transcription of the inserted oncogene) at the mature B-cell stage. Given the importance of B1 B cells and NIgM in maintenance of homeostasis and in prevention of autoimmune diseases, the contributions of 3'RR to μ transcription of B1 B-cell synthesis (and, thus, of NIg synthesis) and to efficient BCR expression to ensure the development of a large VDJ repertoire may be harmful parameters to be taken into account for the 3'RR targeting strategy during treatment of B-cell lymphoma.

In conclusion, evolution of the immune system occurs with overlap between innate and adaptive immunity. B1 B cells represent an early B-cell lineage when B2 B cells appear to have arisen later in evolution. IgA CSR that is 3'RR controlled in B2 B cells^{11,12} was recently reported to be unaffected by the 3'RR deletion in B1 B cells.¹³ The 3'RR superenhancer controls IgH transcription both in B1 and B2 B cells. In contrast to B2 B cells, deletion of the 3'RR affects B1 B-cell late VDJ repertoire diversity. The impact on the expressed VDJ repertoire stands as a new feature and highlights the broad contribution of the 3'RR to humoral immune responses, from innate to adaptive immunity. The role of the 3'RR on B1 B-cell somatic hypermutation (under 3'RR control in B2 B cells)^{34,35} remains to be investigated in order to have an overview about 3'RR control on B1 B-cell maturation.

Acknowledgments

The authors thank the flow cytometry facility of Université de Limoges for B-cell sorting.

This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Comité d'Orientation de la Recherche Cancérologie du Limousin (CORC:FJA/NP-2015-109), Ligue Contre le Cancer (Comité de la Corrèze et Haute Vienne), and Agence Nationale de la Recherche (ANR: projet EpiSwitch-3'RR 2016). N.G. was supported by a grant from Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique (Beirut, Lebanon) and the municipality of Khiam (Lebanon).

Authorship

Contribution: H.I., N.G., and Y.D. designed and performed experiments; H.I., N.G., A.S., and Y.D. wrote the manuscript; Y.D. obtained financial grants; A.S. designed and performed VDJ repertoire; C.O. designed and performed NIgM experiments; and C.C. designed and performed flow cytometry analysis.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

The current affiliation for A.S. is INSERM U1236, Université Rennes 1, Rennes, France.

Correspondence: Yves Denizot, CNRS UMR 7276, INSERM U 1262, CBRS, rue du Pr. Descottes, 87025 Limoges, France; e-mail: yves.denizot@unilim.fr.

References

1. Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(11):778-786.
2. Tung J-W, Herzenberg L-A. Unraveling B-1 progenitors. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(2):150-155.
3. Holodick N-E, Rothstein T-L. B cells in the aging immune system: time to consider B-1 cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1362(1):176-187.
4. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(1):34-46.
5. Aziz M, Holodick N-E, Rothstein T-L, Wang P. The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol Res*. 2015;63(1-3):153-166.
6. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, et al. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol*. 2011;110:27-70.
7. Saintamand A, Rouaud P, Garot A, et al. The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget*. 2015;6(7):4845-4852.
8. Saintamand A, Vincent-Fabert C, Marquet M, et al. E μ and 3'RR IgH enhancers show hierarchic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):442.
9. 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(11):8356-8360.
10. Medvedovic J, Ebert A, Tagoh H, et al. Flexible long-range loops in the VH gene region of the Igh locus facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity*. 2013;39(2):229-244.
11. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, et al. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood*. 2010;116(11):1895-1898.
12. Saintamand A, Rouaud P, Saad F, Rios G, Cogné M, Denizot Y. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat Commun*. 2015;6:7084.
13. Issaoui H, Ghazzaoui N, Saintamand A, Carrion C, Oblat C, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region superenhancer does not control IgA class switch recombination in the B1 lineage. [published online ahead of print 9 October 2017]. *Cell Mol Immunol*. doi:10.1038/cmi.2017.103.
14. Saintamand A, Vincent-Fabert C, Garot A, et al. Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy-chain 3' regulatory region. *Nat Commun*. 2016;7:10730.
15. 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(11):6926-6932.
16. Li S, Lefranc M-P, Miles J-J, et al. IMGT/HighV QUEST paradigm for T cell receptor IMGT clonotype diversity and next generation repertoire immunoprofiling. *Nat Commun*. 2013;4:2333.
17. Boice M, Salloum D, Mourcin F, et al. Loss of the HVEM tumor suppressor in lymphoma and restoration by modified CAR-T cells. *Cell*. 2016;167(2):405-418.e13.
18. Alamyar E, Duroux P, Lefranc MP, Giudicelli V. IMGT(®) tools for the nucleotide analysis of immunoglobulin (IG) and T cell receptor (TR) V-(D)-J repertoires, polymorphisms, and IG mutations: IMGT/V-QUEST and IMGT/HighV-QUEST for NGS. *Methods Mol Biol*. 2012;882:569-604.
19. Bischof J, Ibrahim S-M. bcRep: R Package for Comprehensive Analysis of B Cell Receptor Repertoire Data. *PLoS One*. 2016;11(8):e0161569.
20. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(7):441-451.
21. Berland R, Wortis HH. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):253-300.
22. Kaminski D-A, Stavnez J. Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice. *Int Immunol*. 2007;19(4):545-556.
23. Braikia F-Z, Conte C, Moutahir M, Denizot Y, Cogné M, Khamlich A-A. Developmental switch in the transcriptional activity of a long-range regulatory element. *Mol Cell Biol*. 2015;35(19):3370-3380.
24. Lobo P-I. Role of natural autoantibodies and natural IgM anti-leucocyte autoantibodies in health and disease. *Front Immunol*. 2016;7:198.
25. Tornberg U-C, Holmberg D. B-1a, B-1b and B-2 B cells display unique V_HDJ_H repertoires formed at different stages of ontogeny and under different selection pressures. *EMBO J*. 1995;14(8):1680-1689.
26. Behar SM, Corbet S, Diamond B, Scharff M-D. The molecular origin of anti-DNA antibodies. *Int Rev Immunol*. 1989;5(1):23-42.
27. Hardy R-R, Hayakawa K. Development of B cells producing natural autoantibodies to thymocytes and senescent erythrocytes. *Springer Semin Immunopathol*. 2005;26(4):363-375.
28. Lai M, Gonzalez-Martin A, Cooper A-B, et al. Regulation of B-cell development and tolerance by different members of the miR-17~92 family microRNAs. *Nat Commun*. 2016;7:12207.
29. Nguyen T-T, Elsner R-A, Baumgarth N. Natural IgM prevents autoimmunity by enforcing B cell central tolerance induction. *J Immunol*. 2015;194(4):1489-1502.
30. D'Addabbo P, Scascitelli M, Giambra V, Rocchi M, Frezza D. Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1.2 within the palindrome of IgH 3'Regulatory Region. *BMC Evol Biol*. 2011;11(1):71.
31. Ghazzaoui N, Saintamand A, Issaoui H, Saad F, Denizot Y. Efficient role of IgH 3' regulatory region deficient B-cells in the development of oil granulomas. *Oncotarget*. 2016;7(25):38741-38749.

32. Ghazzoui N, Saintamand A, Issaoui H, Vincent-Fabert C, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region and c-myc-induced B-cell lymphomagenesis. *Oncotarget*. 2017;8(4):7059-7067.
33. 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(9):591-598.
34. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, et al. The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal center B cells. *J Exp Med*. 2013;210(8):1501-1507.
35. Le Noir S, Boyer F, Lecardeur S, et al. Functional anatomy of the immunoglobulin heavy chain 3' superenhancer needs not only core enhancer elements but also their unique DNA context. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(10):5829-5837.

6. Article 6

The IgH 3' regulatory region super-enhancer does not control IgA class switch recombination in the B1 lineage

ISSAOUI H*, GAZZAUI N*, SAINTAMAND A, CARRION C, OBLET C, DENIZOT Y.

Contribution équivalente

Cellular and Molecular Immunology, 289–291; doi:10.1038/cmi.2017

LETTER TO THE EDITOR

The IgH 3' regulatory region super-enhancer does not control IgA class switch recombination in the B1 lineage

Hussein Issaoui¹, Nour Ghazzaoui¹, Alexis Saintamand², Claire Carrion, Christelle Oblet and Yves Denizot

Cellular & Molecular Immunology (2018) 15, 289–291; doi:10.1038/cmi.2017.103; published online 9 October 2017

The bone marrow-derived B2 population represents the vast majority of bone marrow, blood, lymph node and splenic B-cells. Mouse B1 B-cells mostly originate during embryonic life in the liver and represent the main B-cell population in the pleural and peritoneal cavities.^{1–5} B1 and B2 B-cells differ in their origin, antigen specificity, cell surface markers, tissue distribution and capacity for class switch recombination (CSR). Schematically, B1 B-cells appear earlier than B2 B-cells during fetal development and maintain their self-renewal ability throughout their life. Furthermore, they display a CSR biased toward IgA.^{1–5} IgH cis-regulatory regions, especially transcriptional super-enhancers, are major locus regulators.⁶ The IgH 3' regulatory region (3'RR) super-enhancer promotes CSR in B2 B-cells.^{7,8} As B1 and B2 B-cells originate from different precursors and have clearly different development, function and regulation, we postulated that the 3'RR super-enhancer might differently regulate B1 and B2 B-cell IgA CSR.

The 3'RR super-enhancer plays a key regulatory role in B2 B-cell CSR by poising the S acceptor region for efficient recombination toward all isotypes⁸ except IgD.^{9,10} Peritoneal cavity B1 B-cells switch preferentially to IgA.^{11,12} We thus investigated B1 B-cell IgA CSR in 3'RR-deficient mice.⁷ Our research was approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and carried out according to the European guidelines for animal experimentation. The 3'RR deletion was performed in a 129 ES cell line (IgH *a* allotype) and developed in a 129 background (IgH *a*^{wt/a^{wt}). In this study, homozygous 3'RR-deficient mice (IgH *a*^{Δ3'RR/a^{Δ3'RR}) were compared with 129 IgH *a*^{wt/a^{wt} mice. Mouse B1 and B2 B-cells are distinguished on the basis of membrane cell surface markers. B1 B-cells are B220^{low}IgM^{high}IgD^{low}CD23[–]CD11b^{+/low}, whereas B2 B-cells are B220^{high}IgM^{high}IgD^{high}CD23⁺CD11b[–].^{2,4,13} As shown in Figure 1a, similar (*P*=0.5) percentages of IgA⁺ B1 B-cells were found in the peritoneal cavity of 3'RR-deficient and wild type (*wt*) mice in response to a pristane-induced local inflammatory reaction. Almost all recruited inflammatory B-cells in response to pristane had a B1 B-cell phenotype. We next investigated their ability to switch *in vitro* toward IgA (LPS+BAFF+TGFβ stimulation). As shown in Figure 1b, no}}}

difference (*P*=0.3) was found in B1 B-cell IgA CSR between 3'RR-deficient mice and *wt* mice. Despite similar *in vivo* and *in vitro* IgA CSR, lowered (*P*=0.0003) levels of IgA were found in peritoneal ascites of 3'RR-deficient mice compared with *wt* mice (Figure 1c) and in IgA⁺ cell culture supernatants (*P*=0.002) of 3'RR-deficient B1 B-cells compared with *wt* B1 B-cells (Figure 1d). q-PCR analysis indicated that the latter result originated from a significant (*P*=0.01) decrease in I_μ-C_α transcripts in 3'RR-deficient mice compared with *wt* mice (Figure 1e). Taken together, these results suggest that in contrast to B2 B-cells, 3'RR deletion did not affect the B1 B-cell CSR toward IgA but only decreased C_α transcription after CSR. The IgA-producing B1 B-cells contribute substantially to mucosal IgA production and thus play a key role in regulating commensal microbiota.^{4,14} We thus investigated IgA production in the intestinal tract of 3'RR-deficient mice and *wt* mice. Mouse feces were recovered and tested for the presence of IgA. We found a significant (*P*=0.002) and marked (up to 99%) decrease in secreted IgA levels in feces of 3'RR-deficient mice (0.08 ± 0.03 μg/g, six mice) compared with *wt* mice (11.34 ± 0.63 μg/g, six mice). Confirming that this result is related to an IgA secretion deficiency but not to an IgA CSR or a plasma cell maturation defect, immunohistochemistry experiments indicated similar IgA⁺

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

¹These authors contributed equally to this work.

²Present address: INSERM U1236, Université Rennes 1, Rennes, France.

Correspondence: Dr Y Denizot, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7276CBRS, 2 rue du Pr. Descottes, Limoges 87025, France.

E-mail: yves.denizot@unilim.fr

Received: 14 August 2017; Accepted: 18 August 2017

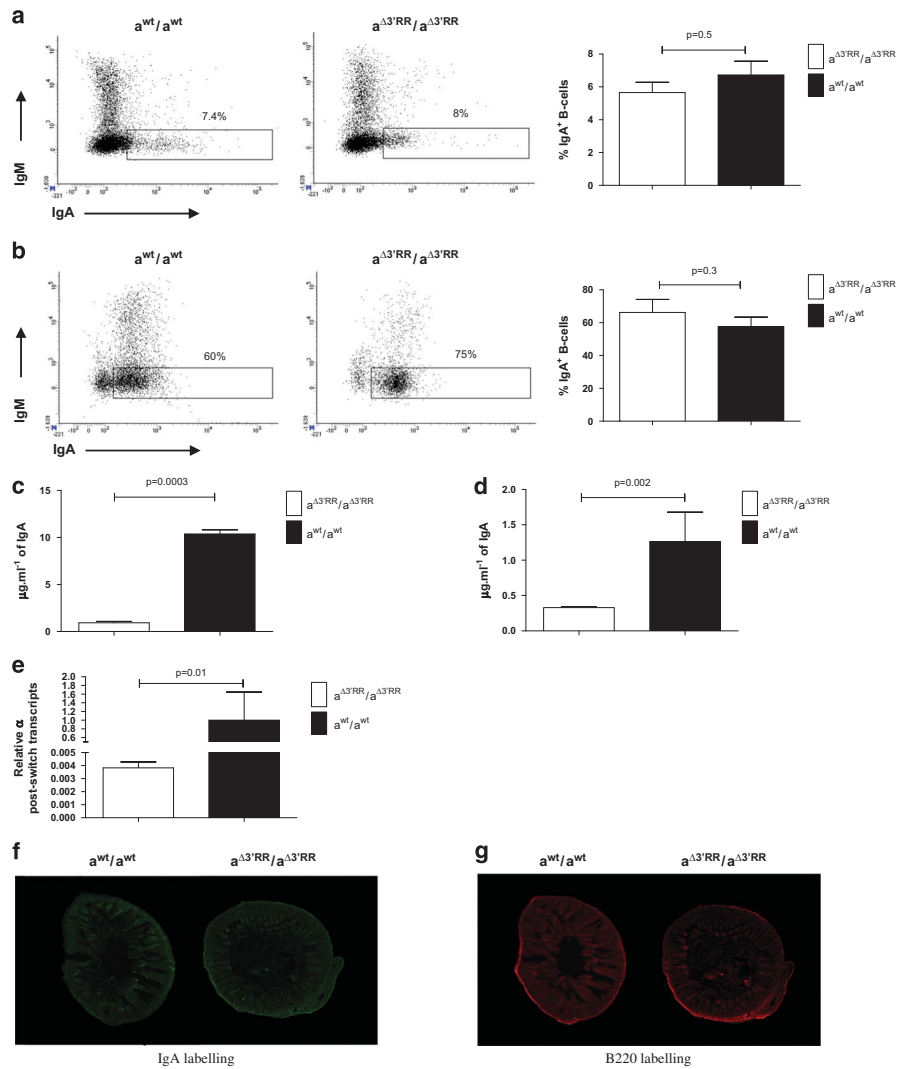


Figure 1 3'RR and B1 B-cell IgA CSR. **(a)** Flow cytometry analysis of IgA⁺ B1 B-cells in the peritoneal cavities of 3'RR-deficient mice and *wt* mice in response to pristane. Mice were treated with 1 ml of pristane for 2 months prior to experiments. Cells were washed and counted and 2×10^6 cells were incubated with anti-B220-BV510, anti-IgD-BV421, anti-CD23-PC7, anti-IgM-PE, anti-CD11b-eF780 and anti-IgA-FITC antibodies (Southern Biotechnologies, Birmingham, AL, USA and Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using a Fortessa LSR2 (Beckton Dickinson). Left: A representative experiment is shown. Cells were gated on B220^{low}IgD^{low}CD23⁻CD11b^{+/low} cells. Right: Percentages of IgA⁺ B1 B-cells in seven 3'RR-deficient mice and nine *wt* mice. The results are reported as mean \pm SEMs. Significance was determined using the Mann–Whitney *U*-test. **(b)** *In vitro* CSR toward IgA in peritoneal cavity B-cells from 3'RR-deficient mice and *wt* mice. Same mice as in part **(a)**. Single-cell suspensions of CD43⁻ peritoneal cells were cultured for 4 days at 1×10^6 cells per ml in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum, 5 μ g/ml LPS, 5 ng/ml TGF β 1 and 5 ng/ml BAFF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). Single-cell suspensions of cultured B-cells were incubated with anti-B220-BV510, anti-CD19-PE and anti-IgA-FITC labeled antibodies (Southern Biotechnologies) and analyzed using a Fortessa LSR2 (Beckton Dickinson). Left: A representative experiment is shown. Right: Percentages of IgA⁺ B1 B-cells in eight 3'RR-deficient mice and eight *wt* mice. The results are reported as the means \pm SEMs. **(c)** IgA levels in the peritoneal cavity of pristane-treated 3'RR-deficient mice and *wt* mice. Same mice as in part **(a)**. ELISAs were performed as described.⁷ Results are reported as the means \pm s.e.m for eleven 3'RR-deficient mice and eight *wt* mice. **(d)** IgA levels in culture supernatants of IgA⁺ B1 B-cells. Same mice as in part **(b)**. ELISAs were performed as described.⁷ Results are reported as the means \pm SEMs for twelve 3'RR-deficient mice and eleven *wt* mice. **(e)** q-PCR analysis of I μ -C α transcripts in cultured IgA⁺ B1 B-cells from 3'RR-deficient mice and *wt* mice. q-PCR analyses of I μ -C α transcripts were performed as previously described.⁸ Same mice as in part **(b)**. The results are reported as the means \pm s.e.m. of five 3'RR-deficient mice and four *wt* mice. **(f)** Representative immunostaining ($\times 200$ magnitude) with antibodies against IgA in the guts of 3'RR-deficient mice (right) and *wt* mice (left). A representative experiment out of three mice per genotype is shown. **(g)** Representative immunostaining ($\times 200$ magnitude) with antibodies against B220 in the guts of 3'RR-deficient mice (right) and *wt* mice (left). A representative experiment out of three mice per genotype is shown.

(Figure 1f) and CD138⁺ (Figure 1g) labeling in the intestinal tract of 3'RR-deficient mice and *wt* mice. Thus, similar to B2 B-cells, the 3'RR is of importance in B1 B-cells for the transcriptional burst associated with Ig synthesis and secretion by terminally differentiated switched plasma cells.

In contrast to B2 B-cells, IgA CSR in B1 B-cells is 3'RR-independent. Previous results reported that this CSR in B1 B-cells is particularly unique because it occurs in minimal stimulatory conditions and is suppressed by the addition of stimuli that enhance B2 B-cell IgA CSR.¹¹ Moreover, B1 B-cell derived IgA is the most abundant Ig of the mucosal immune system.¹⁵ Recently, efficient IgA CSR has been shown in the CH12F3 cell line in the absence of the 3'RR.¹⁶ CH12F3 cells are derived from CH12 cells known to have a B1 B-cell phenotype,^{17,18} confirming our results concerning 3'RR-independent IgA CSR in B1 B-cells. Our data also supports differences in CSR control between B1 and B2 B-cells already described at the cytokine level.^{11,12,15} Currently, the molecular CSR differences between B1 and B2 B-cells are unclear. If the 3'RR super-enhancer does not control IgA CSR, it controls IgA secretion via its key role in heavy chain transcription.¹⁹ In conclusion, the evolution of the immune system occurs with overlaps between innate and adaptive immunity. B1 B-cells represent an early B-cell lineage, whereas B2 B-cells appear to have arisen later in evolution. The 3'RR super-enhancer controls IgA CSR only in the specialized B2 B-cells, consolidating its involvement in adaptive immunology and indicating an evolution in the mechanism of CSR processes between B1 and B2 B-cells.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Conseil Régional du Limousin, Comité d'Orientation de la Recherche en Cancérologie du Limousin (CORC:FJA/NP-2015-109), Ligue Contre le Cancer (Comité de la Corrèze et Haute Vienne) and Agence Nationale de la Recherche (ANR: projet EpiSwitch-3'RR 2016). NG was supported by a grant from the Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique (Lebanon) and the municipality of Khiam (Lebanon).

AUTHOR CONTRIBUTIONS:

HI, NG, AS and YD designed and performed the experiments. HI, NG, AS and YD wrote the manuscript. YD obtained financial grants. CC and CO designed and performed flow cytometry analysis and immunostaining.

- 1 Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol* 2010; **20**: 253–300.
- 2 Tung JW, Herzenberg LA. Unraveling B-1 progenitors. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**: 150–155.
- 3 Holodick NE, Rothstein TL. B cells in the aging immune system: time to consider B-1 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2015; **1362**: 176–187.
- 4 Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 34–46.
- 5 Azir M, Holodick NE, Rothstein TL, Wang P. The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol Res* 2015; **63**: 153–166.
- 6 Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y *et al*. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol* 2011; **110**: 27–70.
- 7 Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M *et al*. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 2010; **116**: 1895–1898.
- 8 Saintamand A, Rouaud P, Saad F, Rios G, Cogné M, Denizot Y. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat Commun* 2015; **6**: 7084.
- 9 Rouaud P, Saintamand A, Saad F, Carrion C, Lecardeur S, Cogné M *et al*. 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.
- 10 Issaoui H, Ghazzaoui N, Saintamand A, Denizot Y, Boyer F. Contrasting to other isotypes IgD class switch recombination is not controlled by the immunoglobulin heavy chain (IgH) 3' regulatory region super-enhancer. *Cell Mol Immunol* 2017; e-pub ahead of print 4 September 2017; doi:10.1038/cmi.201781.
- 11 Kaminski DA, Stavnezer J. Enhanced IgA class switching in marginal zone and B1 B cells relative to follicular/B2 B cells. *J Immunol* 2006; **177**: 6025–6029.
- 12 Roy B, Brennecke AM, Agarwal S, Krey M, Düber S, Weiss S. An intrinsic property of murine peritoneal B1b cells to switch to IgA in presence of TGF- β and retinoic acid. *PLoS One* 2013; **8**: e82121.
- 13 Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B-cells: a focus on cytokines. *Nature Rev* 2015; **15**: 441–451.
- 14 Zhu LY, Shao T, Zhu LY, Xiang LX, Shao JZ. Evolutionary implication of B-1 lineage cells from innate to adaptive immunity. *Mol Immunol* 2016; **69**: 123–130.
- 15 Bao S, Beagley KW, Murray AM, Caristo V, Matthael KI, Young IG *et al*. Intestinal IgA plasma cells of the B1 lineage are IL-5 dependent. *Immunology* 1998; **94**: 181–188.
- 16 Kim A, Han L, Santiago GE, Verdun RE, Yu K. Class-switch recombination in the absence of the IgH 3' regulatory region. *J Immunol* 2016; **197**: 2930–2935.
- 17 Arnold LW, Grdina TA, Whitmore AC, Houghton G. Ig isotype switching in B lymphocytes. Isolation and characterisation of clonal variants of the murine Ly-1+ B cell lymphoma, CH12, expressing isotypes other than IgM. *J Immunol* 1988; **140**: 4355–4363.
- 18 Won WJ, Kearney JF. CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice. *J Immunol* 2002; **168**: 5605–5611.
- 19 Saintamand A, Vincent-Fanbert C, Marquet M, Ghazzaoui N, Magnone V, Pinaud E *et al*. $\epsilon\mu$ and 3'RR IgH enhancers show hierarchic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci Rep* 2017; **7**: 442.

7. Article 7

IgD class switch recombination is not controlled through the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer

ISSAOUI H*, GHAZZAUI N*, SAINTAMAND A, DENIZOT Y, BOYER F.

Contribution équivalente

Cellular and Molecular Immunology, 871–874; doi:10.1038/cmi.2017.81

LETTER TO THE EDITOR

IgD class switch recombination is not controlled through the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer

Hussein Issaoui¹, Nour Ghazzoui¹, Alexis Saintamand², Yves Denizot and François Boyer

Cellular & Molecular Immunology (2017) **14**, 871–874; doi:10.1038/cmi.2017.81; published online 4 September 2017

In secondary lymphoid organs, mature B cells express membrane immunoglobulin (Ig) of M and D isotypes (IgM and IgD, respectively) of the same specificity through alternative splicing of a pre-mRNA encompassing the VDJ variable region and C_μ and C_δ heavy chain constant exons.¹ After encountering antigen, B cells undergo class switch recombination (CSR) by which the C_μ gene is substituted with C_γ , C_ϵ or C_α thereby generating IgG, IgE and IgA antibodies of the same antigenic specificity but with new effector functions. CSR requires the DNA-editing enzyme activation-induced deaminase (AID), which targets switch (S) regions preceding C_μ (namely, the S_μ donor region) and C_γ , C_ϵ and C_α genes (namely, the $S_{\gamma,\epsilon,\alpha}$ acceptor regions).¹ CSR is controlled in *trans* through a wide spectrum of enzymes and proteins and in *cis* through the immunoglobulin heavy chain (IgH) 3' regulatory region (3'RR) super-enhancer that specifically AID-poises the S acceptor but not the S_μ donor region.² IgD CSR is a rare and

enigmatic event restricted to a few B-cell subsets in specific lymphoid tissues (such as mesenteric lymph nodes, peritoneal cavity and mucosa-associated tissue) in both mice and humans.^{3–5} A recent study suggested that IgD CSR is initiated by microbiota,⁵ demonstrating a role for IgD in the homeostatic regulation of the microbial community. The mechanistic regulation of IgD CSR remains enigmatic, reflecting the difficulty to obtain a sufficient number of S_μ – σ_δ (σ for S-like) junction sequences for molecular analysis. We recently reported a new computational tool (CSRreport) for the automatic analysis of CSR junctions sequenced using high-throughput sequencing,⁶ and we used this tool to analyze S_μ – σ_δ junctions in wild-type (*wt*) mice.⁷ Genomic deletion of the 3'RR super-enhancer abrogates CSR to IgG, IgE and IgA classes.^{2,8} In contrast, a unique study, based on the analysis of a few S_μ – σ_δ junctions, reported the 3'RR super-enhancer as dispensable for IgD CSR.⁴ We thus used CSRreport and high-throughput sequencing to conduct a more in depth analysis of S_μ – σ_δ junctions in 3'RR-deficient mice.

The present study was approved by our local ethics committee review board (Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale du Limousin, Limoges, France) and conducted according to the European guidelines for animal experimentation. Peritoneal cavity

3'RR-deficient mouse B cells were used for these experiments. In some experiments, 3'RR-deficient mice were pristane-treated (1 ml) for 2 months to induce inflammation prior to the recovery of peritoneal cavity cells. As previously described in detail,⁴ junctions were amplified using touchdown PCR followed by nested PCR. Libraries of 200 bp were prepared from the 1–2 kb PCR products of S_μ – σ_δ amplification for ion proton sequencing ('GénoLim platform' of the Limoges University, France). Sequenced reads were subsequently mapped to S_μ and σ_δ regions using the BLAST algorithm. The computational tool developed for experiments performs junction assembly, identifies break points in S_μ and σ_δ , identifies junction structures (blunt, micro-homology or junctions with insertions) and outputs a statistical summary of the identified junctions.

In 3'RR-deficient mice, among 4 904 163 raw reads, 39 046 reads were mapped to a switch junction, and the presence of 190 unique S_μ – σ_δ junctions was documented. The number of unique junctions (that is, clonally independent) was indeed dependent on the biological frequency of this CSR event in the studied samples. Compared to previous studies of other IgD⁷ and IgG⁶ junctions in *wt* animals, IgD CSR clearly appears as a rare event. The structural profiles of IgD junctions (blunt, micro-homology

UMR CNRS 7276, University of Limoges, CBRS, 87025 Limoges, France.

¹These authors contributed equally to this work.

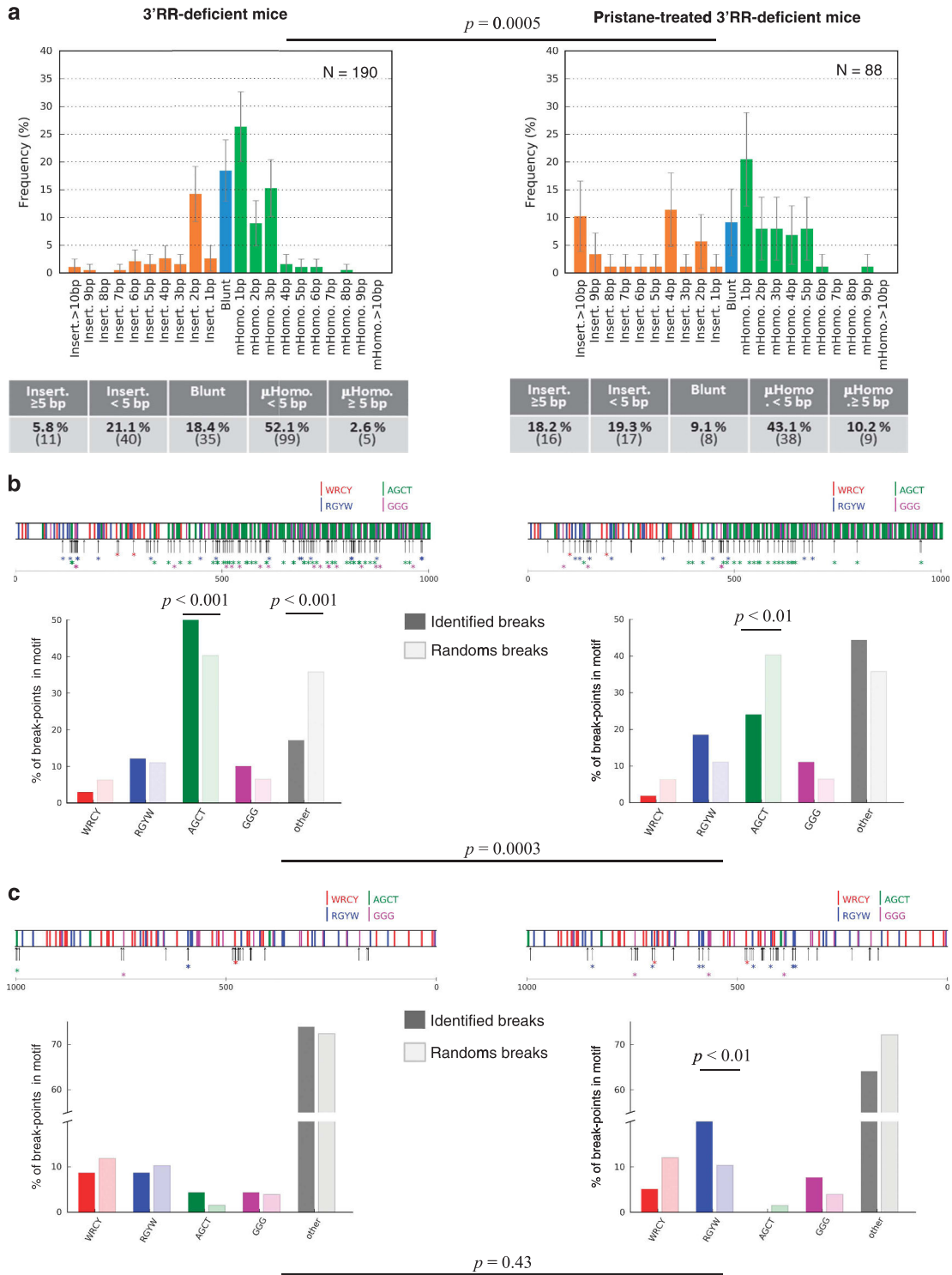
²Present address: INSERM U1236, Université Rennes 1, Rennes, France.

Correspondence: Dr Y Denizot, PhD, UMR CNRS 7276, University of Limoges, CBRS, Rue Pr. Descottes, 87025 Limoges, France.

E-mail: yves.denizot@unilim.fr

Received: 13 July 2017; Revised: 17 July 2017;

Accepted: 18 July 2017



or junction with insertions) in 3'RR-deficient mice are reported in Figure 1a (left panel). The positions of IgD junctions in terms of distance from the forward PCR primer in S_{μ} and the localization of IgD junctions with WRCY, RGYW, AGCT and GGG motifs are reported in Figure 1b (left panel).

The frequency of DNA breaks in S_{μ} was significantly elevated in AGCT sites compared to the frequency of theoretical random breaks. The positions of IgD junctions in terms of distance from the reverse PCR primer in σ_{δ} and the localizations of IgD junctions with WRCY, RGYW, AGCT and GGG motifs

are reported in Figure 1c (left panel). The breaks detected in the σ_{δ} region did not show a significant AID signature, with most of the break points observed outside AID motifs. Pristane injection increased the frequency of IgH/c-myc translocations; most of the IgH breaks occurred in the S_{μ} region. We thus used

Figure 1 Quantitative description of $S_{\mu}-\sigma_8$ junctions using CSReport workflow. Left panel: results from pooled peritoneal B cells obtained from 30 3'RR-deficient mice. Right panel: results from pooled peritoneal B cells from seven 3'RR-deficient mice treated with 1 ml of pristane for 2 months. (a) Structure profiles of $S_{\mu}-\sigma_8$ junctions. Junctions are classified in terms of junction types (junction with insertions, blunt junction or junction with micro-homology) and size (in bp of insertions or micro-homologies). The number in parentheses indicates the number of junctions of each type. The junction profile is significantly different ($P=0.0005$, Fisher's exact test) under basal and pristane-induced inflammatory conditions. (b) Break point localization and motif targeting of $S_{\mu}-\sigma_8$ junctions in the S_{μ} region (up to 1 kb from the 5' primer). Arrows indicate the break point positions. Color bars represent the occurrences of relevant AID motifs (forward/reverse hotspots, WRCY (red)/RGYW (blue), palindromic switch hotspot AGCT (green) and cold spot GGG (magenta)). The location of the break points with these motifs is emphasized with a colored asterisk. Proportions of the identified break points on these motifs are represented in the bar graphs (same colors). Significance was assessed based on comparisons with random break positions. For each $S_{\mu}-\sigma_8$ junction data set, N random positions were numerically drawn from the uniform distribution (0–1 kb), and motif co-localization was evaluated. Mean values over 10 000 simulations are reported in the bar graph, and the P -values of experimental versus random breaks were computed as the frequency of random events as extreme as experimental results. Motif targeting was significantly different ($P=0.0003$, Fisher's exact test) under basal and inflammatory conditions, as pristane-treated mice lost AGCT targeting in favor of break induction outside of canonical AID hotspots. (c) Break point localization and motif targeting of $S_{\mu}-\sigma_8$ junctions along the σ_8 region (up to 1 kb from the 3' primer). Breaks detected in the σ_8 region did not show a significant AID signature, with most of the break points detected outside AID motifs. Inflammatory conditions showed no significant differences in AID motif targeting in the σ_8 region compared with untreated mice ($P=0.43$, Fisher's exact test).

pristane to determine whether enhanced S_{μ} DNA double-strand breaks affected the structural profiles of IgD CSR. Among 11 358 929 raw reads, 87 728 reads were mapped to a switch junction, and the presence of 88 unique $S_{\mu}-\sigma_8$ junctions was documented. As shown in Figure 1a (right panel), the structural profiles of IgD junctions were significantly affected in pristane-treated 3'RR-deficient mice revealing less blunt junctions and elevated junctions with micro-homology or insertions. Localizations of break points were qualitatively different in both S_{μ} (Figure 1b, right panel) and σ_8 (Figure 1c, right panel) in pristane-treated mice compared with untreated mice.

A summary of these 190 independent junctions provided a description of the $S_{\mu}-\sigma_8$ CSR sequences in 3'RR-deficient mice at an unprecedented level. Until recently, only a few $S_{\mu}-\sigma_8$ CSR sequences have been reported after cloning and subsequent sequencing using Sanger's method.⁴ In the present study, the positions of IgD junctions (in terms of distance from S_{μ} and σ_8) and their structural profiles (blunt, micro-homology or junction with insertions) were similar to those previously reported for *wt* mice.⁷ These results undoubtedly demonstrate that IgD CSR markedly differs from conventional IgG, IgA and IgE CSR, reflecting the fact that IgD CSR is totally independent on the presence of

the 3'RR super-enhancer. Furthermore, these results also show that $\mu-\delta$ CSR is regulated and that double-strand breaks for $S_{\mu}-\sigma_8$ CSR are not random breaks. The structural profiles of IgD junctions revealed a majority of junctions with micro-homology or insertions compared to blunt junctions, that is, a junctional pattern that markedly differs from IgG, IgA and IgE CSR. Such junctional bias is strongly reminiscent of the junctions produced by the alternative end-joining (A-EJ) pathway rather than the classical non-homologous DNA end-joining (C-NHEJ) pathway used for IgG, IgA and IgE CSR.⁹ These results are consistent with the elevated IgD CSR in 53BP1-deficient mice,⁵ since in the absence of 53BP1, AID-dependent DNA double-strand breaks are repaired via the A-EJ pathway. Finally, in an intense unspecific inflammatory state (pristane injection), the phenotype of IgD junctions toward an A-EJ process was reinforced. In conclusion, double-strand breaks generated during IgG, IgA and IgE CSR are predominantly repaired through the C-NHEJ pathway, whereas for IgD CSR, there is a shift of DNA end repair to the auxiliary A-EJ pathway. At this time, the contribution of homologous recombination in IgD CSR remains an open question.

Not only *trans* but also *cis* molecular signals that mediate IgD CSR remain elusive. Since transcription is the *primum*

movens of CSR, which *cis*-regulatory IgH enhancer (if any) may be implicated in the control of IgD CSR? Clearly, the 3'RR super-enhancer that controls conventional CSR is not involved in this particular IgH recombination. The IgH intronic E_{μ} enhancer, previously reported to control VDJ recombination but not CSR, might be an appropriate candidate. Understanding the nature of the transcriptional enhancer that activates the regulation of IgD CSR remains an exciting challenge.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported through a grant from the ANR (project EpiSwitch-3'RR 2016). NG was supported through a grant from the Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique (Lebanon) and the municipality of Khiam (Lebanon). HI was supported through a grant from CORC (FJA/NP 2015-109) and the University of Limoges. The authors thank the GéoLim platform and the Cytometry platform of the University of Limoges for sequencing and cell sorting. FB was supported through a grant from the Fondation Partenariale de l'Université de Limoges and ALURAD.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YD and AS designed the study. NG and HI performed the experiments. FB and YD analyzed the data. NG, HI, FB, YD and AS drafted the manuscript.

- 1 Chen K, Cerutti A. New insights into the enigma of immunoglobulin D. *Immunol Rev* 2010; **237**: 160–179.
- 2 Saintamand A, Rouaud P, Saad F, Rios G, Cogné M, Denizot Y. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat Commun* 2015; **6**: 7084.
- 3 Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Miller NW, Bengtén E *et al*. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol* 2009; **10**: 889–898.
- 4 Rouaud P, Saintamand A, Saad F, Carrion C, Lecardeur S, Cogné M *et al*. Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region. *J Exp Med* 2014; **211**: 975–985.
- 5 Choi JH, Wang KW, Zhang D, Zhan X, Wang T, Bu CH *et al*. IgD class switching is initiated by microbiota and limited to mucosa-associated lymphoid tissue in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; **114**: E1196–E1204.
- 6 Boyer F, Boutouil H, Dalloul I, Dalloul Z, Cook-Moreau J, Aldigier JC *et al*. CSReport: a new computational tool designed for automatic analysis of class switch recombination junctions sequenced by high-throughput sequencing. *J Immunol* 2017; **198**: 4148–4155.
- 7 Ghazzaoui N, Issaoui H, Saintamand A, Boyer F, Denizot Y. Analysis of IgD CSR junctions by high-throughput sequencing. *Immunol Lett* 2017; **188**: 86–88.
- 8 Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M *et al*. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 2010; **116**: 1895–1898.
- 9 Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; **18**: 495–506.

8. Article 8

Analysis of IgD CSR junctions by high-throughput sequencing

GHAZZAUI N*, ISSAOUI H*, SAINTAMAND A, BOYER F, DENIZOT Y.

Contribution équivalente

Immunology Letters, 188: 86-88



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Immunology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/immlet

Letter to the editor

Analysis of IgD CSR junctions by high-throughput sequencing



IgD class switch recombination (CSR) is a rare and enigmatic event limited to few B-cell subsets in specific lymphoid tissues [1–4]. IgD CSR is differently regulated than conventional IgG, IgA and IgE CSR since it is not under the control of the IgH 3' regulatory region (3'RR) super-enhancer [2,5]. Molecular signals implicated in IgD CSR remain enigmatic. Recently it has been reported that IgD CSR is initiated by microbiota [4] highlighting the role of IgD in the homeostatic regulation of the microbial community. One of the main difficulties to investigate IgD CSR is to obtain a sufficient number of S μ - σ δ junctions for their molecular analysis. High throughput sequencing technologies now allow the acquisition of huge number of sequence, but raw data remain impossible to analyze by hand. Manually finding S μ - σ δ junction sequences in these huge amounts of data would be like searching needles in haystacks. We recently reported a new computational tool (CSRreport) for automatic analysis of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing [4] that we used to analyze IgD CSR more in depth.

PCR for S μ - σ δ junctions were done as previously described [2]. Junctions were studied using a touchdown PCR, followed by a nested PCR on freshly isolated IgM⁻ IgD⁺ peritoneal cavity sorted mouse B-cells using a BD FACSAria III (Cytometry platform of the University of Limoges). The sequencing and analysis methods have been described previously in details [4]. Briefly, 200 bp libraries were prepared from the 1–2 kb PCR products of S μ - σ δ amplification for Ion Proton sequencing. Data were done on the “GénoLim platform” of the University of Limoges. Sequenced reads were then mapped to each switch regions using BLAST algorithm. The computational tool we developed performs junction's assembly, identify junction's structure and breakpoint, and outputs results of statistical summarization of identified junctions.

Among 2,522,418 raw reads, 185,683 reads were mapped to a switch junction and the presence of 222 unique S μ - σ δ junctions was documented. As S μ - σ δ junctions are amplified as PCR products of variable length (roughly equal to 1 kb, according to double-strand breaks' location), they are fragmented in 150–250 bp for sequencing. Therefore, many reads do not contain the junctional site (but are mapped either to S μ or σ δ). From these figures, we estimate that only 5–10% of sequenced reads can be mapped to a S μ - σ δ junction with BLAST/CSRreport. This is therefore in agreement with our finding of 185,683 out of 2,522,418 reads (7%) are identified as a S μ - σ δ junction. The number of unique junctions (*i.e.* clonally independent) is indeed dependent of the biological frequency of this CSR event in the studied sample. When compared to previous studies of other switch junctions [4], IgD CSR clearly appears to be an elusive and rare event only occurring in specific B-cell compartments. The positions of IgD junctions (in term of distance from S μ and σ δ) are reported in Fig. 1A. The structural profiles of IgD junctions (blunt, micro-homology or junctions with insertion) are reported in Fig. 1B. The mutational profiles of IgD junctions are reported in Fig. 1C. The colocations of IgD junctions with WRCY/RGYW (AID sites) and TCY/WGA (APOBEC3 sites) motifs are reported in Fig. 1D. Finally the nucleotide motifs (most frequent 8-nt motifs at breakpoint in S μ and σ δ) are reported in Fig. 1E.

Summarization of these 222 independent junctions provided descriptions of S μ - σ δ CSR sequences at an unprecedented level. Until now only 21 had been reported after cloning and subsequent sequencing by Sanger's method [2]. In the present study the positions of IgD junctions (in term of distance from S μ and σ δ), their structural profiles (blunt, micro-homology or junctions with insertion) and their mutational profiles are similar to those previously reported [2] reinforcing the validity of our experimental protocol for automatic analysis of CSR junctions. The distribution of breakpoints along S regions gave indications of motif targeting during the generation of double-strand breaks. If collocation of breakpoints in S μ with WRCY/RGYW motifs was found as for conventional AID-induced CSR [6], it was not the case in σ δ where breakpoints collocated with TCY/WGA motif mostly targeted by APOBEC3. No data have currently reported a role of APOBEC3 during conventional CSR but studies have demonstrated that the APOBEC3 proteins act in the innate host response to viral infection [7]. Clearly, a role for APOBEC3 in the targeting of the σ δ region during the enigmatic IgD CSR deserves to be investigated. If mutation frequencies in S μ for S μ - σ δ junctions were of the order of magnitude of those for S μ -S γ ₁ and S μ -S γ ₃ junctions, it was not the case for mutation frequencies in the σ δ acceptor regions compared to S γ ₁ and S γ ₃ [5]. These results reinforce the hypothesis that σ δ is differently targeted than S μ during IgD CSR. Altogether these results reinforce the concept that IgD CSR markedly differs from conventional IgG, IgA and IgE CSR [2]. It is of evidence that IgD CSR is regulated and that double-strand breaks in the σ δ region are not random breaks. Since IgD CSR is restricted to specific B-cell subsets it is likely that specific microenvironments might promote activity of endonucleases yet to be identified. The nature of the molecular signature that activates regulation of the IgD CSR remains an exciting challenge to be met.

Author contributions

Y.D and A.S. designed research. N.G. and H.I. performed research. F.B, and Y.D. analysed data. N.G., H.I., F.B, Y.D., and A.S. wrote the paper.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2017.06.008>

Received 23 May 2017; Received in revised form 22 June 2017; Accepted 25 June 2017

Available online 27 June 2017

0165-2478/© 2017 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

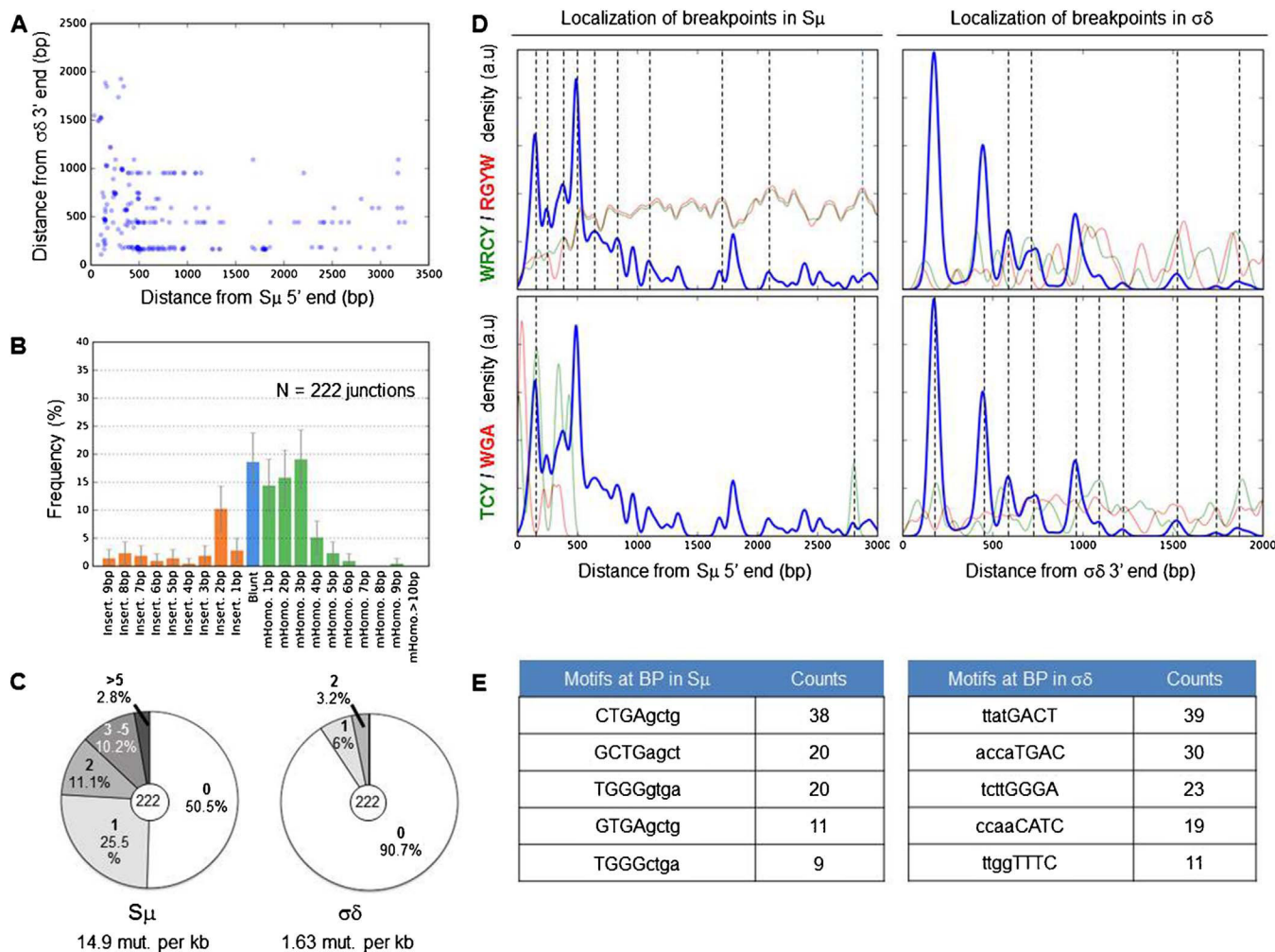


Fig. 1. CSReport provides valuable $S\mu$ - $\sigma\delta$ DNA break/repair information on larges data set. Structural and positional results obtained from analysis of $S\mu$ - $\sigma\delta$ junctions in $IgD^+ I gM^-$ sorted peritoneal B-cells (pool of 19 mice). **A:** Positions of junction breakpoint expressed in terms of distance from S region ends. Each point in the graph is a unique junction defined by 2-bp positions (in $S\mu$ and $\sigma\delta$). **B:** Structural profile of $S\mu$ - $\sigma\delta$ junctions. **C:** Mutation frequency in the donor region ($S\mu$) and the acceptor region ($\sigma\delta$) during $\mu\delta$ CSR. **D:** Estimation of local density of WRCY/RGYW (green/red) motifs, TCY/WGA (green/red) motifs and breakpoint along $S\mu$ and $\sigma\delta$ regions. Colocation events are highlighted by dotted lines. **E:** most frequent 8-nt motifs at breakpoints in $S\mu$ and $\sigma\delta$. Excised DNA at junctions is shown in lowercase.

Acknowledgments

This work was supported by ANR (projet EpiSwitch-3'RR 2016). N.G. was supported by a grant from Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique (Lebanon) and the municipality of Khiam (Lebanon). H.I. is supported by CORC (FJA/NP 2015-109) and University of Limoges. We thank the GénoLim platform and the Cytometry platform of the University of Limoges for sequencing and cell sorting. F.B. is supported by Fondation Partenariale de l'Université de Limoges and ALURAD.

References

[1] K. Chen, W. Xu, M. Wilson, B. He, N.W. Miller, E. Bengtén, E.S. Edholm, P.A. Santini, P. Rath, A. Chiu, M. Cattalini, J. Litzman, J.B. Bussel, B. Huang, A. Meini, K. Riesbeck, C. Cunningham-Rundles, A. Plebani, A. Cerutti, Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial: proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 889–898.

[2] P. Rouaud, A. Saintamand, F. Saad, C. Carrion, S. Lecardeur, M. Cogné, Y. Denizot, Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region, *J. Exp. Med.* 211 (2014) 975–985.

[3] A. Saintamand, J.C. Lecron, F. Morel, M. Cogné, Y. Denizot, Comment on IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation, *J. Immunol.* 194 (2015) 2039–2040.

[4] J.H. Choi, K.W. Wang, D. Zhang, X. Zhan, T. Wang, C.H. Bu, C.L. Behrendt, M. Zeng, Y. Wang, T. Misawa, X. Li, M. Tang, X. Zhan, L. Scott, S. Hildebrand, A.R. Murray, E.M. Moresco, L.V. Hooper, B. Beutler, IgD class switching is initiated by microbiota and limited to mucosa-associated lymphoid tissue in mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) E1196–E1204.

[5] A. Saintamand, P. Rouaud, F. Saad, G. Rios, M. Cogné, Y. Denizot, Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7084.

[6] F. Boyer, H. Boutouil, I. Dalloul, Z. Dalloul, J. Cook-Moreau, J.C. Aldigier, C. Carrion, B. Herve, E. Scaon, M. Cogné, S. Péron, CSReport: a new computational tool designed for automatic analysis of class switch recombination junctions sequenced by high-throughput sequencing, *J. Immunol.* 198 (2017) 4148–4155.

[7] B.R. Rosenberg, F.N. Papavasiliou, Beyond SHM and CSR: AID and related cytidine deaminases in the host response to viral infection, *Adv. Immunol.* 94 (2007) 215–244.

Nour Ghazzaoui¹, Hussein Issaoui¹, Alexis Saintamand², François Boyer, Yves Denizot*
UMR CNRS 7276, University of Limoges, CBRS, rue Pr. Descottes, 87025 Limoges, France
E-mail address: yves.denizot@unilim.fr

* Corresponding author.

¹ These authors contributed equally to this work.

² Present address: INSERM U1236, Université Rennes 1, France.

Résumé

Le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) subit trois processus de remaniements géniques durant la lymphopoïèse B. Ces événements induisent des cassures de l'ADN potentiellement oncogéniques, d'où la nécessité d'une régulation extrêmement stricte. Ceci est dû aux deux principaux éléments *cis*-régulateurs du locus IgH. L'*enhancer* 5'E μ régule les recombinaisons V_HDJ_H qui établissent un répertoire antigénique fonctionnel lors des phases précoces. La région régulatrice en 3' (3'RR) est essentielle aux hypermutations somatiques (SHM) et à la recombinaison de classe (CSR) aux stades tardifs, modifiant respectivement, l'affinité et les fonctions effectrices de l'Ig. La plupart des lymphomes B matures portent les stigmates de translocations d'oncogènes au locus IgH. Le but de ma thèse a été de mieux comprendre les interactions transcriptionnelles entre les *enhancers* E μ et 3'RR et évaluer si le ciblage de cette dernière pourrait se révéler une approche thérapeutique potentielle. Nous avons démontré que la 3'RR est l'élément essentiel qui contrôle la transcription du locus IgH dans les lymphocytes B matures. Elle est dispensable lors des phases initiales (recombinaisons V_HDJ_H), mais agit comme *silencer* sur l'expression des segments DJ_H. L'analyse de la lymphomagenèse dans trois modèles murins porteurs d'une insertion de Myc en trois points du locus IgH a montré des différences dans les cinétiques d'émergence des lymphomes, leurs phénotypes et index de prolifération. L'effet de la 3'RR sur l'oncogène est suffisant pour l'émergence de lymphomes B. Son absence ne semble pas être préjudiciable au développement de réactions inflammatoires/immunes. Son ciblage pourrait donc se révéler une approche thérapeutique intéressante pour diminuer son activité transcriptionnelle sur l'oncogène transloqué. Un rôle potentiel des inhibiteurs des histones désacétylases est à l'étude.

Mots-clés : Locus IgH, 3'RR, Myc, Lymphomes B matures, Activateurs transcriptionnels.

Abstract

The immunoglobulin heavy chain locus (IgH) undergoes several changes along B-cell differentiation. V_HDJ_H recombinations during the early stages give the diversity of the antigenic repertoire. Somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR) during late stages allow affinity maturation and the acquisition of new effector functions. These rearrangements are highly regulated and are under the control of the IgH locus *cis*-regulatory elements. The 5' E μ enhancer is important for V_HDJ_H recombination. The 3' regulatory region (3' RR) is essential for both CSR and SHM. These events induce breaks into the IgH locus, making it a hotspot for oncogenic translocations. The aim of my thesis was to understand the transcriptional interactions between E μ and 3'RR enhancers and to evaluate whether the targeting of the latter could be of a potential therapeutic approach. We have demonstrated that 3'RR is essential to control IgH transcription in mature B cells. It is dispensable during the initial stages of development (V_HDJ_H recombinations). At the pro-B cell stage, it has a silencer effect rather than a transcriptional one on the DJ_H segments expression. The analysis of lymphomagenesis in three mice models carrying an insertion of Myc in different locations at the IgH locus showed significant differences in lymphoma kinetics, phenotypes and proliferation index. 3'RR alone, as a major transcriptional activator of the IgH locus, is capable of leading to B-cell lymphomas. Its absence is not detrimental for the development of classical inflammatory/immune reactions. Its targeting may be of a potentially interesting therapeutic approach to decrease its transcriptional activity on the translocated oncogene. A potential role for histone deacetylase inhibitors is under study.

Keywords: IgH locus, 3'RR, Myc, mature B-cell lymphomas, Transcriptional enhancer.