



HAL
open science

Le rôle de la région régulatrice en 3' du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines sur le développement des lymphocytes B1

Hussein Issaoui

► **To cite this version:**

Hussein Issaoui. Le rôle de la région régulatrice en 3' du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines sur le développement des lymphocytes B1. Génétique. Université de Limoges, 2019. Français. NNT : 2019LIMO0051 . tel-02441719v1

HAL Id: tel-02441719

<https://theses.hal.science/tel-02441719v1>

Submitted on 16 Jan 2020 (v1), last revised 28 Jan 2020 (v2)

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 U1262
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
Hussein ISSAOUI

Le 12 décembre 2019

**Le rôle de la région régulatrice en 3' du locus des chaînes lourdes
d'immunoglobulines dans le développement des lymphocytes B1**

Thèse dirigée par Dr. Yves DENIZOT

JURY :

Président 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

Examineurs

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



Université de Limoges
ED 615 – Sciences Biologiques et Santé
UMR CNRS 7276 – Inserm U1262
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
Hussein ISSAOUI

Le 12 décembre 2019

**Le rôle de la région régulatrice en 3' du locus des chaînes lourdes
d'immunoglobulines dans le développement des lymphocytes B1**

Thèse dirigée par Dr. Yves DENIZOT

JURY :

Président 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

Examineurs

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



**Université
de Limoges**



Au cours de mes trois années de thèse, j'ai été financé par l'Université de Limoges dans le cadre d'un contrat doctoral.



Résumé

Durant l'ontogénie B, le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) subit trois processus majeurs de réarrangements géniques. Lors de la phase précoce du développement B, indépendamment de la rencontre avec un antigène (Ag), les recombinaisons V_HDJ_H donnent le répertoire diversifié des Ig fonctionnelles. Durant la phase tardive, suite à une activation par l'Ag, l'hypermutation somatique (SHM) permet l'augmentation de l'affinité de l'Ig à son Ag et la recombinaison isotypique (CSR) va modifier ses fonctions effectrices. Tous ces processus sont strictement régulés par différents éléments *cis*-régulateurs repartis tout au long du locus IgH. La région régulatrice en 3' (3'RR) en est un. Elle s'étend sur environ 30 Kb et est constituée de quatre activateurs transcriptionnels, dont les trois premiers forment une structure palindromique. La 3'RR contrôle, chez le lymphocyte B-2 (LB-2), la transcription du locus IgH, le devenir de la cellule B, la SHM et la CSR mais elle n'a aucun effet sur les recombinaisons V_HDJ_H et la diversité du répertoire antigénique. Les LB-1 représentent un petit pourcentage des LB totaux. Ils diffèrent des LB-2 par leur origine, développement, fonctions, marqueurs de surface et distribution tissulaire. Les LB-1 maintiennent l'homéostasie dans l'organisme et sont la source principale des Ig naturelles (NIgM et NIgA) au cours des premières phases d'une réponse immunitaire. Lors de ma thèse, nous avons étudié le rôle de la 3'RR sur le développement des LB-1. D'une façon identique aux LB-2, la 3'RR contrôle la transcription du locus IgH, le devenir des cellules B et la SHM dans les LB-1. A l'inverse des LB-2, la 3'RR joue un rôle indirect sur la diversité du répertoire antigénique dans les LB-1 et n'a aucun effet sur la CSR vers IgA. Ces résultats mettent en évidence, pour la première fois, la contribution de la 3'RR dans le développement d'une population cellulaire B à l'interface entre l'immunité innée et acquise. Ils renforcent nos connaissances sur le rôle des éléments *cis*-régulateurs du locus IgH dans le développement de ces deux immunités.

Mots clés : 3'RR/ LB-1/ LB-2/ Recombinaisons V_HDJ_H / Hypermutation somatique/ Recombinaison isotypique.

Abstract

During B-cell development, the immunoglobulin heavy chain locus (IgH) undergoes three major genic rearrangements. During the early stages, before encountering the antigen (Ag), V_HDJ_H rearrangements allow the generation of the Ig repertoire. During the late stages, after encountering the Ag, somatic hypermutation (SHM) increases the affinity of the Ig for its Ag, while class switch recombination (CSR) modifies its effector functions. All these genetic events are strictly regulated by *cis*-regulatory elements spread along the IgH locus, including the 3' regulatory region (3'RR). The 3'RR extends over more than 30kb and contains four transcriptional enhancers, the first three displaying a palindromic conformation. The 3'RR controls B2 B-cell IgH transcription, cell fate, SHM and CSR but not 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, surface markers and tissue distribution. B1 B-cells act at the steady state to maintain homeostasis and during the earliest phases of an immune response by secreting natural Ig (NIgM and NIgA). During my PhD, we investigated the role of the 3'RR on B1 B-cells. Similarly to B2 B-cells, the 3'RR controls IgH transcription, cell fate and SHM in B1 B-cells. In contrast to B2 B-cells, 3'RR deletion indirectly affects B1 B-cell repertoire diversity and has no effect on their CSR towards IgA. These results highlight, for the first time, the contribution of the 3'RR in the development of a B-cell population at the interface between innate and acquired immunity. Moreover, these results strengthen our knowledge of the role of the *cis*-regulatory elements of the IgH locus in the development of these two immune responses.

Key words: 3'RR/ B1 B-cell/ B2 B-cell/ V_HDJ_H recombination / Somatic hypermutation/ Class switch recombination.

A ma famille ♥,

« Je suis de ceux qui pensent que la science a une grande beauté. [...] Sans la curiosité de l'esprit, que serions nous ? Telle est bien la beauté et la noblesse de la science : désir sans fin de repousser les frontières du savoir, de traquer les secrets de la matière et de la vie sans idée préconçue des conséquences éventuelles »

Marie Curie

« The key to realising a dream is not to focus on success but significance, and then even the small steps and little victories along your path will take on greater meaning »

Oprah Winfrey

Remerciements

Ces trois années seront finalement passées très vite. Je suis convaincu que la thèse est loin d'être un travail solitaire. Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail et progresser dans cette période sans le soutien et l'aide d'un grand nombre de personnes.

Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse Dr Yves DENIZOT. Je peux dire aujourd'hui que j'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme directeur de thèse. Merci pour la confiance que vous m'aviez accordée pendant ces trois années. Merci pour votre encadrement, le temps que vous m'aviez accordé, votre aide, vos conseils et votre disponibilité sans faille tout au long de ces trois années de thèse. La réussite de cette thèse doit beaucoup à votre encadrement, je me considère chanceux d'avoir pu en bénéficier.

Je remercie également le Pr Michel COGNE de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement les membres de mon jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et de consacrer leur temps pour le juger. Merci aux Pr Pierre DUBUS et Pr Edith CHEVRET de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci au Pr Marie-Odile JAUBERTEAU de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.

Un très grand merci à mes collègues de la « Denizot team ». Merci à Alexis pour toutes les conseils que tu m'as donnés pendant ces trois années. Merci d'avoir été disponible pour nous expliquer le séquençage haut débit et ses analyses. Merci pour nos bonnes discussions surtout sur le sport. Je te souhaite toute la réussite pour ton nouveau poste. Merci à Nour qui, au fil des années, est devenue bien plus qu'une collègue de boulot. Merci pour tous les bons et les mauvais moments que nous avons partagés pendant ces 3 dernières années. Nous avons formé une très bonne équipe. Je te souhaite une grande réussite professionnelle. Et comme il n'y a pas que le travail dans la vie, je te souhaite également le bonheur familial, la sérénité en amour et en amitié et surtout une bonne santé. Mention pour la nouvelle entrante dans la « Denizot Team », Melissa. Bon courage pour la suite de ta thèse.

Un grand merci à toute l'équipe de l'UMR CNRS 7276, j'espère n'oublier personne, si c'était le cas, pardon d'avance.

Je remercie d'abord toute l'équipe de Jean Feuillard au sein de laquelle j'ai fait mes débuts dans l'UMR pendant mon M1. Merci à Jean avoir accueilli au sein de son équipe.

Merci Chantal pour ta gentillesse et ton encadrement pendant mon stage de M1. Merci Cathy, Héloïse, Hussein, Sophie, Christelle V-F, Emilie, Robin, Oussama, Nathalie, et Ahmed.

Merci à l'ensemble de l'équipe de Michel COGNÉ. Merci Eric pour tes conseils techniques et scientifiques ainsi que tes petites réparations de nos matériels. Merci    Christophe et Laurent pour tous vos conseils. Merci Claire pour la cytométrie, Christelle O pour le western blot, Sandrine pour la 3C et Zh  lia pour la transg  n  se. Merci Jean-Claude, Jeanne, Marie M, Armand, Stephanie, Tiffany, Cendrine et sebastien. Je voudrais remercier particulièrement François Boyer pour les efforts que tu as fait pour les analyses bio-informatiques.

Une pensée pour ceux qui m'ont précédé : Omar, Ophélie, H  nd, Anderson. Merci    Iman, Zeinab et Batoul mes voisines à CASTELL Phibus. Je veux aussi remercier les personnes qui me sont venues en aide tout au long de ce parcours. En particulier Nivine et Hussein El Akfirass.

Je souhaite également bon courage à ceux qui n'ont pas encore soutenu, et dont le tour viendra rapidement : Jean-Marie, Victoria, Leena, Anne, Audrey, Marine, Morgane, Charlotte, Lilian, Dina, Nader et Israa.

Une pensée pour toutes les personnes de l'ombre qui font tourner notre laboratoire. Merci aux animaliers : Bernadette, Ophélie, David et Martial. Je remercie Sylvie pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci   galement Séverine, Rhypsin et Julien. Merci    Christian, Sarah et Aurore pour la gestion de nos commandes et l'organisation de tous nos déplacements.

D'un côté plus personnel, je remercie mes cousins pour leur aide et leur soutien. Je remercie ma famille qui m'a soutenu pendant toutes ces années d'études, particulièrement mes deux sœurs. Sans elles je n'aurais jamais pu arriver jusqu'ici.

Mes derniers remerciements seront pour la personne qui est tous les jours à mes côtés. A chaque moment, tu étais là pour me réconforter et m'aider à avancer. Merci... C'est un mot trop simple. Ce que je souhaiterais exprimer est au-dessus de cela.

Un grand MERCI    TOUS

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Publications

Nour, G., **Issaoui, H.**, Ferrad, M., Carrion, C., Cook-Moreau, J., Boyer, F., and Denizot, Y. (2019). E μ and 3'RR transcriptional enhancers of the IgH locus cooperate to promote c-myc-induced mature B-cell lymphomas. (Accepté)

Issaoui, H., Ferrad, M., Nour, G., Lecardeur, S., Cook-Moreau, J., Boyer, F., and Denizot, Y. (2019). Molecular analysis of Υ 1, Υ 3 and α class switch recombination junctions in APOBEC3-deficient mice using high-throughput sequencing. (Accepté).

Issaoui, H., Ghazzaoui, N., Ferrad, M., Boyer, F., and Denizot, Y. (2019). Class switch recombination junctions are not affected by the absence of the immunoglobulin heavy chain E μ enhancer. *Cell. Mol. Immunol.* *16*, 671–673.

Hussein, I., Nour, G., François, B., Yves, D., and Alexis, S. (2019). Deletion of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer affects somatic hypermutation in B1 B cells. *Cell. Mol. Immunol.* *16*, 195–197.

Issaoui, H., Ghazzaoui, N., Ferrad, M., Lecardeur, S., and Denizot, Y. (2019). [Cis-regulatory elements of the IgH locus and B1 and B2 B-cell maturation]. *Med Sci (Paris)* *35*, 295–297.

Issaoui, H., Ghazzaoui, N., Saintamand, A., Denizot, Y., and Boyer, F. (2019). High-throughput sequencing reveals similar molecular signatures for class switch recombination junctions for the γ and α isotypes. *Cell. Mol. Immunol.* *16*, 90–92.

Ghazzaoui, N., **Issaoui, H.**, Martin, O.A., Saintamand, A., Cook-Moreau, J., Denizot, Y., and Boyer, F. (2019). Trans-silencing effect of the 3'RR immunoglobulin heavy chain enhancer on Igk transcription at the pro-B cell stage. *Cell. Mol. Immunol.* *16*, 668–670.

Ghazzaoui, N., **Issaoui, H.**, Boyer, F., Martin, O.A., Saintamand, A., and Denizot, Y. (2019). 3'RR and 5'E μ immunoglobulin heavy chain enhancers are independent engines of locus remodeling. *Cell. Mol. Immunol.* *16*, 198–200.

Ghazzaoui, N., **Issaoui, H.**, Saintamand, A., Denizot, Y., and Boyer, F. (2019). Uracil-DNA glycosylase is not implicated in the choice of the DNA repair pathway during B-cell class switch recombination. *Cell. Mol. Immunol.* *16*, 93–95.

Ghazzaoui, N., **Issaoui, H.**, Saintamand, A., Oblet, C., Carrion, C., and 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.

Issaoui, H., Ghazzaoui, N., and Denizot, Y. (2018). [The enigmatic IgD class switch recombination]. *Med Sci (Paris)* *34*, 294–296.

Issaoui, H., Ghazzaoui, N., Saintamand, A., Carrion, C., Oblet, C., and Denizot, Y. (2018). The IgH 3' regulatory region super-enhancer does not control IgA class switch recombination in the B1 lineage. *Cell. Mol. Immunol.* *15*, 289–291.

Ghazzaoui, N., Saintamand, A., **Issaoui, H.**, Vincent-Fabert, C., and Denizot, Y. (2017). The

IgH 3' regulatory region and c-myc-induced B-cell lymphomagenesis. *Oncotarget* 8, 7059–7067.

Ghazzoui, N., **Issaoui, H.**, Saintamand, A., Boyer, F., and Denizot, Y. (2017). Analysis of IgD CSR junctions by high-throughput sequencing. *Immunol. Lett.* 188, 86–88.

Issaoui, H., Ghazzoui, N., Saintamand, A., Denizot, Y., and Boyer, F. (2017). IgD class switch recombination is not controlled through the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer. *Cell. Mol. Immunol.* 14, 871–874.

Saintamand, A., Ghazzoui, N., **Issaoui, H.**, and Denizot, Y. (2017). [The IgH 3'RR: Doctor Jekyll and Mister Hyde of B-cell maturation and lymphomagenesis]. *Med Sci (Paris)* 33, 963–970.

Ghazzoui, N., Saintamand, A., **Issaoui, H.**, Saad, F., and Denizot, Y. (2016). Efficient role of IgH 3' regulatory region deficient B-cells in the development of oil granulomas. *Oncotarget* 7, 38741–38749.

Abréviations

3'RR	3' Regulatory Region	
Y	gamma	
μ	mu	
α	alpha	
δ	delta	
λ	lambda	
ε	Epsilon	
		A
Ag	Antigène	
Ac	Anticorps	
AID	Activation Induced cytidine Deaminase	
A-EJ	Alternative End-Joining Pathway	
ATM	Ataxia-Telangiestasia Mutated	
APOBEC	Apolipoprotein B RNA-Editing catalytic Component	
		B
BER	Base Excision Repair	
BAFF	B Cell Activating Factor	
BCR	B Cell Receptor	
BSAP	B Cell Specific Activator Protein	
53BP1	p53 Binding Protein 1	
BRIGHT	B Cell Regulator of IgH Transcription	
		C
ChIP	Chromatine ImmunoPrecipitation	
CDR	Complementary Determining Region	
CSR	Class Switch Recombination	
CLP	Common Lymphoid Progenitor	
CTCF	CCCTC Binding Factor	
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène	
C/EBP	Ccaat-Enhancer Binding Proteins	
CBE	CTCF Binding Element	
		D
DNase I	DésoxyriboNucléase I	
D	Diversité	
DSB	Double Strand Break	
DDR	DNA Damage Repair pathway	
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns	
DNA-PKcs	DNA Dependant Protein Kinase catalytic subunit	
DZ	Dark Zone	
DICE	Downstream Immunoglobulin Control Elements	
		E
E2A	E box protein binding 2 A	
EBF1	Early B cell Factor-1	
EC	Euchromatine	
		F
FR	Framework Region	
FO	Folliculaire	
FDC	Follicular Dendritic Cell	
		G
GC	Germinal Center	
		H
HSC	Hematopoietic Stem Cells	
Hs	hypersensibile	
HDAC	Histone Déacétylase	
HDACi	Histone Déacétylase inhibiteur	

HC	Hétérochromatine	
		I
IR	Inverted Repeat	
Ig	Immunoglobuline	
IgH	Immunoglobulin Heavy chain	
IgL	Immunoglobulin Light chain	
IL	Interleukine	
IGCR1	Intergenic Control Region 1	
		J
J	Jonction	
		K
KO	Knock-Out	
Kb	Kilobase	
		L
LB	Lymphocyte B	
LT	Lymphocyte T	
L	Leader	
LPS	Lipopolysaccharides	
LZ	Light Zone	
LMPP	Lymphoid-primed Pluripotent Progenitors	
LSR	Locus Suicide Recombination	
LS	Like Switch	
		M
MO	Moelle Osseuse	
MAR	Matrix Association Region	
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue	
MZ	Zone Marginale	
MMR	Mismatch Repair	
MLH	MutL Homologue 1	
MSH	MutS Homologue	
MARE	MAf Recognition Element	
		N
NK	Natural Killer	
NHEJ	Non Homologous End Joining	
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B pathway	
N	Non germline nucleotide	
NIg	Immunoglobuline Naturelle	
		P
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern	
Pb	Paire de base	
PALS	Periarterial Lymphatic Sheaths	
PAIR	Pax-5 Activated Intergenic Repeat	
PKA	c-AMP dependent Protein Kinase A	
PARP 1	poly ADP-ribose polymerase I	
PU.1	Purine box factor 1	
Pax-5	Paired box gene 5	
P	Palindromic nucleotide	
PMS2	Post Meiotic Segregation 2	
		R
RPA	Replication Associated Protein A	
RAG	Recombination Activating Gene	
RSS	Recombination Sequence Signal	
		S
SI	Système Immunitaire	
SHM	Somatic HyperMutation	
SSB	Single Strand Break	
SLC	Surrogate Light Chain	
		T

TGF-β	Transforming Growth Factor β	
T_{FH}	T Follicular Helper	
TdT	Terminal deoxynucleotide Transferase	
TLR	Toll Like Receptor	U
UNG	Uracil DNA Glycosylase	V
V	Variabilité	
V_H	Régions Variables des chaînes Lourdes	
V_L	Régions Variables des chaînes Légères	W
WT	Wild Type	X
XRCC4	X-ray Repair Cross-Complementing protein 4	
XLF	XRCC4-like Factor	Z
Zfp318	Zinc finger protein 318	

Table des matières

Remerciements	8
Publications	11
Abréviations	13
Table des illustrations.....	18
Préambule.....	20
Synthèse Bibliographique.....	23
Chapitre I. Ontogenèse B	24
I.1. Organisation des loci d'Ig	24
a) Locus des chaînes légères κ	24
b) Locus des chaînes légères λ	24
c) Locus des chaînes lourdes	24
I.2. Devenir une Ig fonctionnelle.....	25
I.2.1. Phase précoce Ag indépendante : formation d'un répertoire B primaire	26
a) Des cellules souches hématopoïétiques aux progéniteurs lymphoïdes communs	26
b) Le stade pré-pro-B	26
c) Le stade pro-B et réarrangements V_HDJ_H au locus IgH	27
d) Le stade pré-B et réarrangements aux loci IgL.....	27
e) Le stade B immature et l'édition du BCR	28
I.2.1.1. Les réarrangements V_HDJ_H	28
I.2.2. Phase tardive Ag dépendante : répertoire secondaire.....	30
a) Les LB transitionnels.....	30
i. IgD.....	31
b) LB matures et la formation du centre germinatif (GC)	33
i. Les cellules B2 de la zone marginale	33
ii. Les cellules B2 folliculaires et GC.....	33
c) Sortie des GC : plasmocytes et B mémoires.....	35
i. Plasmocytes	35
ii. LB mémoires	35
d) Les LB-1	35
I.2.3. Réarrangements secondaires : SHM et CSR	38
a) AID	38
b) SHM	39
c) CSR	40
Chapitre II. La régulation des événements géniques au locus IgH	43
II.1. Les promoteurs	43
II.1.1. Le promoteur DQ52.....	43
II.1.2. Les promoteurs V_H	44
II.1.3. Les promoteurs I.....	44
II.2. Les activateurs transcriptionnels.....	45
II.2.1. La région intronique $E\mu$	45
II.2.2. La région régulatrice en 3'	46
a. Découverte.....	46
b. Structure	47

c.	La cinétique d'activation des « <i>enhancers</i> » 3' et leur synergie durant l'ontogénie B.....	48
d.	Régulation de l'activité de la 3'RR par des facteurs <i>trans</i>	49
e.	Fonctions	51
II.2.3.	La région intergénique $\Upsilon 1$ - $\Upsilon 2b$: un troisième « <i>enhancer</i> » du locus IgH ?.....	52
II.3.	Les isolateurs	52
II.3.1.	La région 5'.....	52
II.3.2.	La région intergénique V_H -D.....	53
II.3.3.	hs5,6 et 7.....	53
II.4.	Régulation spatiale du locus IgH.....	54
a)	La localisation du locus IgH au cours du développement	54
b)	La structure tridimensionnelle du locus IgH	55
	Problématiques et objectifs	57
	Résultats	59
	Article 1.....	60
	Article 2.....	62
	Article 3.....	64
	Article 4.....	66
	Article 5.....	67
	Discussion et Perspectives.....	69
a)	B1, 3'RR et réarrangements V_HDJ_H	70
i.	Coopération $E\mu$ 3'RR ?	71
b)	B1, 3'RR, SHM et CSR.....	73
c)	Les LB-1 chez l'homme	74
d)	$E\mu$ et CSR.....	76
e)	Conclusion générale	76
	Références bibliographiques	78
	Annexes.....	99
Annexe 1	100
Annexe 2	101
Annexe 3	102
Annexe 4	103
Annexe 5	104
Annexe 6	105
Annexe 7	106

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 mécanismes de recombinaison lors de la lymphopoïèse B.

Figure 4 : Représentation schématique de l'ontogénie B précoce.

Figure 5 : Représentation des recombinaisons V_HDJ_H au locus IgH.

Figure 6 : Représentation schématique des RSS et de la règle « 12/23 ».

Figure 7 : Mécanistique des réarrangements V_HDJ_H .

Figure 8 : Mécanisme d'épissage alternatif : co-expression d'une IgM et d'une IgD.

Figure 9 : Représentation schématique des sélections négatives et positives des cellules B transitionnelles.

Figure 10 : Structure schématique d'un centre germinatif.

Figure 11 : Représentation schématique du développement des lymphocytes B-1.

Figure 12 : Représentation schématique du « switch développemental » des lymphocytes B.

Figure 13 : Profil d'hypermutation induit par AID aux loci d'Ig.

Figure 14 : Prise en charge des mésappariements générés lors de l'hypermutation somatique (SHM).

Figure 15 : Génération des transcrits germinaux dans les régions constantes.

Figure 16 : Représentation schématique d'une R-Loop.

Figure 17 : Représentation schématique du mécanisme de CSR.

Figure 18 : Voies de réparation de l'ADN impliquées dans la CSR.

Figure 19 : Représentation schématique du locus IgH et de ses éléments *cis*-régulateurs.

Figure 20 : Représentation schématique de la structure de la 3'RR.

Figure 21 : Représentation schématique de la LSR.

Figure 22 : Activité et synergie des enhancers du locus IgH au cours de l'ontogénie B.

Figure 23 : Localisation nucléaire des allèles IgH au cours du développement B.

Figure 24 : Représentation schématique de la contraction du locus IgH au cours des recombinaisons V_H-DJ_H.

Figure 26 : Représentation schématique du modèle de double KO.

Figure 27 : Représentation schématique des interactions chromosomiques lors de la CSR chez les souris E μ et 3'RR déficientes.

Figure 28 : La structure des jonctions S μ -S x chez les souris E μ déficientes.

Figure 29 : Représentation schématique des conclusions générales de ma thèse.

Préambule

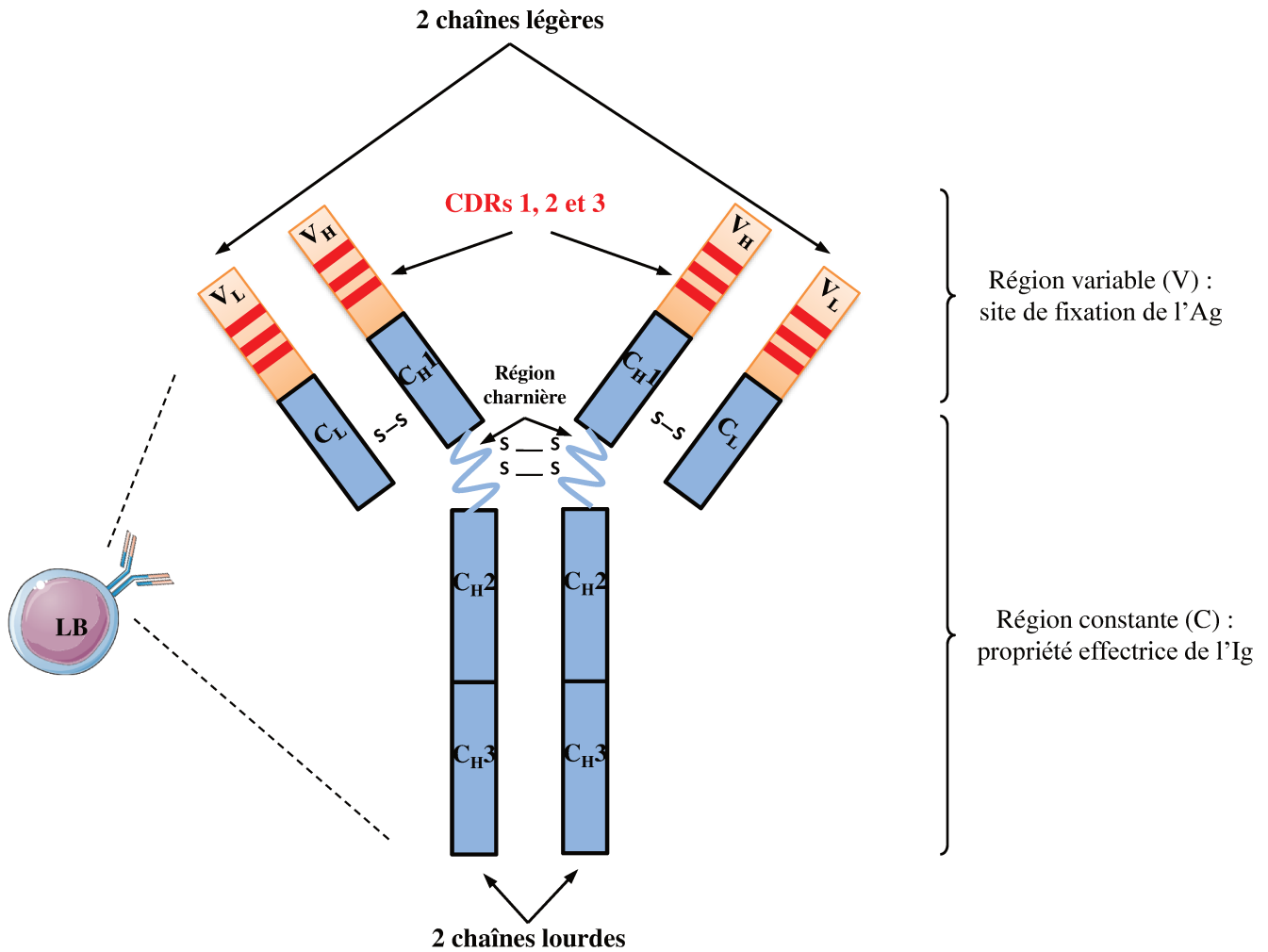


Figure 1 – Structure d'une immunoglobuline. Exemple d'une IgG1.

Les deux chaînes lourdes et les deux chaînes légères de l'Ig sont reliées entre elles par des ponts disulfures.

Le domaine variable (représenté en orange) est constitué des domaines variables des chaînes lourdes et des chaînes légères (respectivement V_H et V_L). Chacun de ces domaines est composé de trois régions hypervariables, notées CDR1 à 3 (représentées en rouge), séparant quatre régions moins variables (FR1 à 4).

Le domaine constant (représenté en bleu) est composé des domaines constants des chaînes lourdes et des chaînes légères (respectivement C_H et C_L). La région charnière, qui confère sa flexibilité à l'Ig, est située entre les domaines C_H1 et C_H2 .

Le système immunitaire (SI) des vertébrés est un mécanisme de défense qui assure la protection de l'organisme contre les pathogènes (virus, bactéries, parasites, ...), ainsi que le contrôle de certains dysfonctionnements cellulaires pouvant aboutir au développement de tumeurs. Ce rôle repose sur ses capacités à reconnaître et tolérer les antigènes (Ag) du « soi » et à éliminer les Ag du « non-soi ». Pour remplir cette fonction, ce système complexe mobilise divers organes et types cellulaires.

Il existe deux types de réponses immunitaires : la réponse innée et la réponse adaptative, capables de coopérer pour assurer une protection optimale. La réponse innée est non spécifique de l'Ag et sans mémoire immunitaire. Elle repose sur la reconnaissance des motifs communs à tous les pathogènes: les PAMPs (PAMPs pour *Pathogen Associated Molecular Pattern*). Les principaux acteurs de cette réponse sont les barrières physiques (peau, muqueuses, ...), les cellules phagocytaires (macrophages et polynucléaires), les cellules tueuses naturelles (NK pour *Natural Killer*) et certaines protéines circulantes (complément, chimiokines, ...). A l'inverse, la réponse adaptative est plus tardive à se mettre en place et est spécifique de l'Ag. Elle possède une mémoire immunitaire permettant une réaction plus rapide lors d'une deuxième rencontre avec l'Ag. Cette spécificité met en jeu deux acteurs principaux: les lymphocytes T (LT) cytotoxiques lors de la réponse cellulaire et les lymphocytes B (LB) lors d'une réponse humorale. Pour cette dernière, les LB, objet de mon travail, reconnaissent l'Ag grâce aux immunoglobulines (Ig) membranaires constituant le BCR (BCR pour *B Cell Receptor*). Ce dernier est associé à diverses protéines de signalisation. Suite à une activation, les LB se différencient en plasmocytes sécréteurs d'Ig solubles ou anticorps (ou 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.

Les Ig sont des hétérodimères protéiques, d'environ 150 KDa, exprimés à la surface des LB ou sécrétés par les plasmocytes. Elles sont constituées de deux chaînes lourdes (IgH chains, pour *Immunoglobulin Heavy chains*) identiques et deux chaînes légères (IgL chains pour *Immunoglobulin Light chains*) identiques, associées entre elles par des ponts disulfures (**Figure 1**). Il existe deux types de chaînes légères, appelées Kappa (κ) et Lambda (λ), qui peuvent s'associer à chacune des 5 classes de chaînes lourdes notées mu (μ), delta (δ), gamma (γ), epsilon (ϵ) et alpha (α), définissant respectivement les IgM, IgD, IgG, IgE et IgA (Porter, 1973). Les IgM sont les premières Ig synthétisées « par défaut » par les LB. Les IgD sont les deuxièmes Ig produites et sont la plupart du temps co-exprimées avec les IgM. Elles possèdent un rôle principalement dans la réponse anti-bactérienne. L'IgG est l'isotype majeur et peut être subdivisé en sous-classes : IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3 chez la souris. Elles interviennent, selon

le sous type, dans les réponses anti-virales, anti-parasitaires et/ou anti-bactériennes. Les IgE jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'hypersensibilité, mais sont aussi impliquées dans la défense anti-parasitaire. Finalement, les IgA sont principalement sécrétées dans les muqueuses.

Chaque Ig est composée de deux régions. La première région est appelée V pour "Variable" et est très différente d'une Ig à une autre. Le rassemblement des domaines variables des chaînes légères (V_L) et lourdes (V_H) constitue le site de reconnaissance spécifique de l'Ag, déterminant ainsi sa spécificité. Cette région contient trois domaines « hypervariables », autrement appelés CDRs (CDR pour *Complementarity Determining Region*), séparés par quatre régions charpentes, nommées FR (FR pour *Framework Region*) et de variabilité moindre. La seconde région est appelée C pour "Constante" et est très conservée entre les chaînes légères d'un même type et les chaînes lourdes d'une même classe. Elle confère à l'Ig ses fonctions effectrices. Les régions V_H , V_L et C_L sont constituées d'un seul domaine alors que la région C_H est constituée de trois à quatre domaines notés C_{H1} à C_{H4} . Une zone charnière, reliant les domaines C_{H1} et C_{H2} , confère à l'Ig sa flexibilité (**Figure 1**) (Schroeder and Cavacini, 2010).

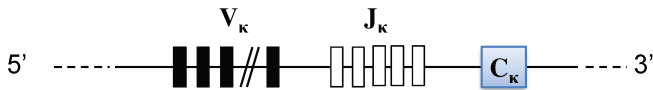
Trois complexes géniques distincts sont impliqués dans la synthèse des Ig : les loci $Ig\lambda$ et $Ig\kappa$ codant les chaînes légères et le locus IgH codant les chaînes lourdes. La particularité de ces loci est la structure morcelée des gènes. Cela correspond à la forme germinale non fonctionnelle. Lors de la différenciation lymphocytaire B, ces différents loci sont soumis à des remaniements géniques afin d'obtenir des chaînes d'Ig fonctionnelles. Tous ces événements sont hautement contrôlés par des éléments *cis*-régulateurs qui jalonnent les loci d'Ig et par des éléments *trans*-activateurs s'y fixant (Alt et al., 2013; Perlot and Alt, 2008).

Au cours de ma thèse, j'ai principalement travaillé sur le locus IgH murin. Je me suis essentiellement intéressé à ses mécanismes de recombinaison et à la façon dont ils sont contrôlés par des éléments *cis*-régulateurs, en particulier par la région régulatrice en 3' du locus IgH (IgH 3'RR, ou simplement 3'RR, pour *3' Regulatory Region*). Dans mon introduction bibliographique je détaillerai dans un premier temps les différentes étapes du développement lymphocytaire B, en insistant plus particulièrement sur les phénomènes de recombinaisons géniques qui le ponctuent. Je décrirai ensuite les principaux éléments *cis*-régulateurs qui assurent le contrôle de ces événements complexes.

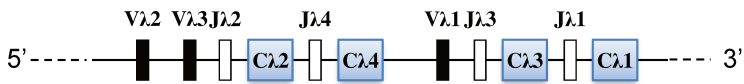
Synthèse bibliographique

A - Loci des chaînes légères

Locus Ig κ (chromosome 6)



Locus Ig λ (chromosome 16)



B - Locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines

Locus IgH (chromosome 12)

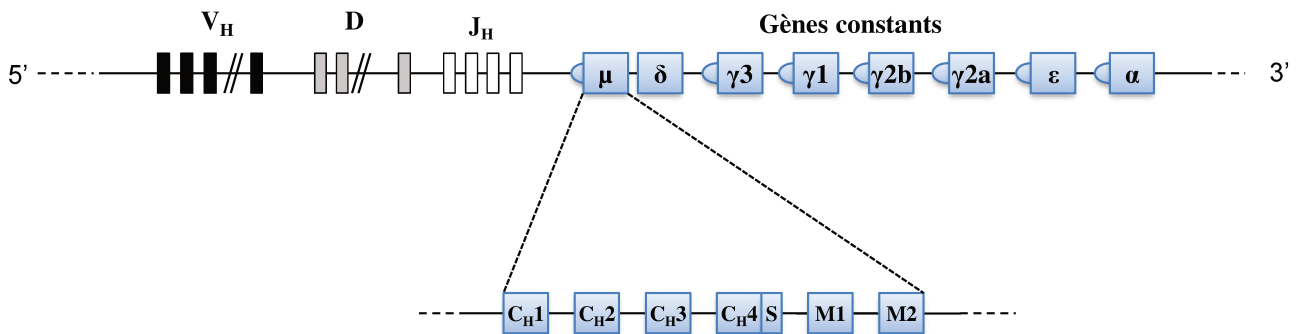


Figure 2 – Représentation schématique des loci d'immunoglobulines chez la souris.

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

A – Représentation schématique des loci des chaînes légères Ig κ et Ig λ .

B – Représentation schématique du locus IgH.

La dernière ligne est un grossissement de C μ montrant ses quatre exons C (C μ 1 à 4), suivis de l'exon de sécrétion S et des deux exons de membrane M1 et M2.

Chapitre I. Ontogenèse B

Maturation B et remaniements des gènes d'immunoglobulines

I.1. Organisation des loci d'Ig

Les gènes d'Ig chez la souris sont regroupés, comme chez l'homme, sur trois loci distincts, localisés sur trois chromosomes différents (2 codant pour les chaînes légères et 1 codant pour les chaînes lourdes). Dans leur configuration germinale, ces loci sont formés d'une succession de segments différents. De 5' en 3', on distingue les segments de variabilité « V », les segments de diversité « D » (présents uniquement sur le locus IgH), les segments de jonction « J » et enfin les segments constants « C ». Les segments V, D, et J codent la région variable de l'Ig, alors que les segments C en codent la région constante.

Ayant réalisé mes travaux uniquement sur des modèles murins, je ne détaillerai que l'organisation des gènes du locus IgH de souris. Ces derniers sont très identiques aux loci humains, ce qui fait de la souris un excellent modèle pour ce qu'il survient chez l'homme (Rauta et al., 2012).

a) Locus des chaînes légères κ

Le locus de la chaîne kappa (Ig κ) (**Figure 2A**) est situé sur le chromosome 6 chez la souris (chromosome 2 chez l'homme). Dans sa configuration germinale, on note 176 segments V κ (dont environ 96 sont fonctionnels) et 5 segments J κ (dont 4 fonctionnels). La région constante est codée par un seul segment C κ . Ce locus est exprimé par 95% des LB murins.

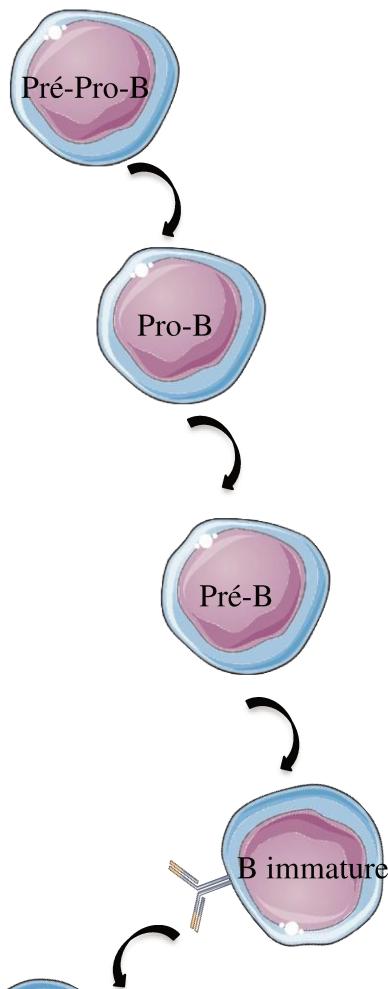
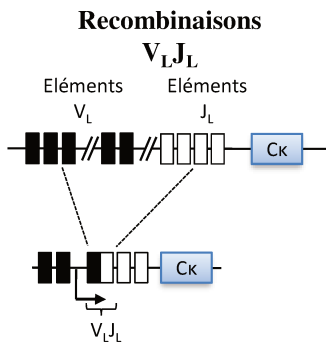
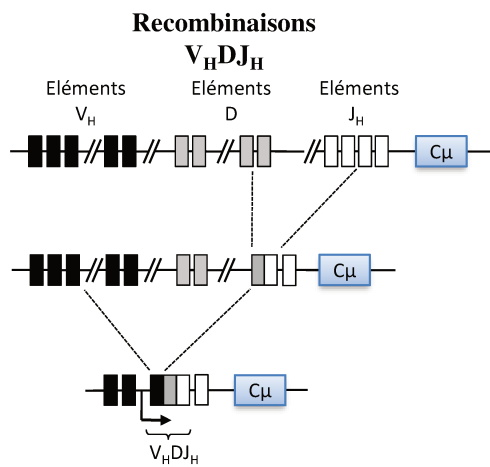
b) Locus des chaînes légères λ

Le locus de la chaîne lambda (Ig λ) (**Figure 2A**) est situé sur le chromosome 16 chez la souris (chromosome 22 chez l'homme). Il est composé de 3 segments V λ et de 4 familles comprenant chacune une paire de segments J λ et C λ (J λ 1 à J λ 4 et C λ 1 à C λ 4). Les segments J λ et C λ sont organisés en 2 clusters : J λ 2-C λ 2-J λ 4-C λ 4 (J λ 4 et C λ 4 étant défectifs) et J λ 3-C λ 3-J λ 1-C λ 1, précédés de V λ 2-V λ 3 et V λ 1 respectivement. Ce locus est exprimé par 5% des LB murins.

c) Locus des chaînes lourdes

Le locus IgH (**Figure 2B**) est situé sur le chromosome 12 chez la souris (chromosome 14 chez l'homme) et s'étend sur plus de trois mégabases. Il comprend 152 segments V_H (dont 97 sont fonctionnels) regroupés en 15 familles, 17 à 20 segments D (dont 14 sont fonctionnels)

Phase précoce du développement B :
création du répertoire des Ig fonctionnelles



Phase tardive du développement B :
augmentation de la spécificité de l'Ig

Recombinaison isotypique et hypermutation somatique

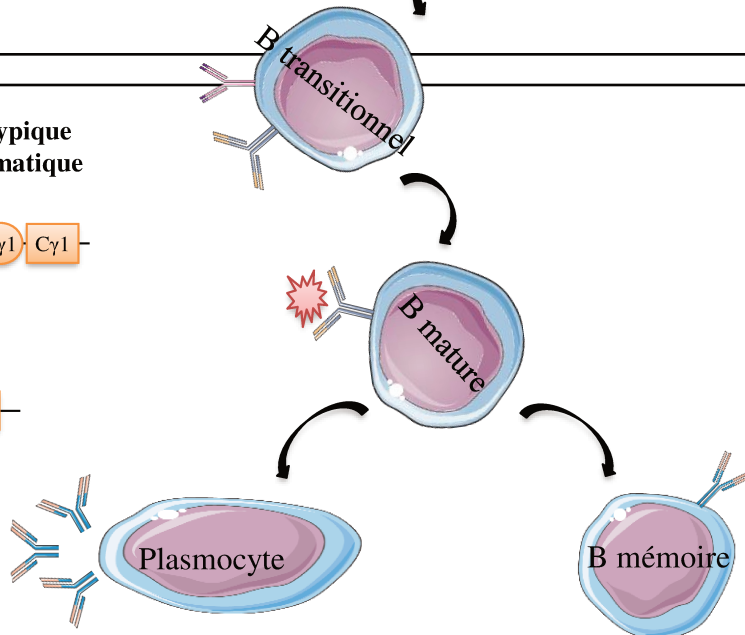
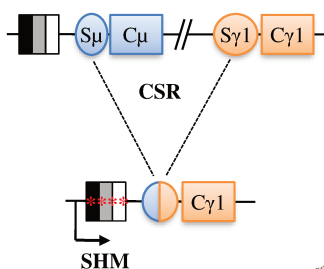


Figure 3 – Représentation schématique des mécanismes de recombinaison lors la lymphopoïèse B.

Durant la phase précoce, et avant la rencontre avec l'Ag, ont lieu les réarrangements V_HDJ_H et V_LJ_L (ici V_KJ_K) qui permettent l'expression d'un BCR.

Durant la phase tardive, en présence de l'Ag, ont lieu les mécanismes de SHM et de CSR, pour optimiser l'affinité du BCR pour son Ag et modifier l'isotype de l'Ig.

regroupés en 4 familles (DFL16, DSP2, DST4 et DQ52) et 4 segments J_H tous fonctionnels. Plus de la moitié des segments V_H appartiennent à la famille J558 (Giudicelli et al., 2005; Johnston et al., 2006). Les exons V sont précédés d'une petite séquence de 60 à 90 pb qui représente l'exon L (L pour *Leader*), codant la partie majeure du peptide signal de la protéine. La partie constante est codée par 8 gènes représentant les différents isotypes d'Ig, dans l'ordre suivant : μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2b$, $\gamma 2a$, ϵ et α . Chaque gène est formé de multiples exons codant les différents domaines de chaque classe d'Ig (C_{H1} à C_{H3} ou C_{H4} selon les isotypes). Enfin, on distingue des exons indépendants codant pour les régions transmembranaires et intracytoplasmiques des Ig membranaires, ou l'exon de sécrétion pour des Ig sécrétées (Lefranc, 2009).

Il est important de noter la présence de plusieurs éléments *cis*-régulateurs tout au long du locus IgH pouvant contrôler son expression. Ces éléments seront détaillés dans le chapitre II.

I.2. Devenir une Ig fonctionnelle

Les gènes d'Ig ne sont pas fonctionnels dans leur configuration germinale. Afin d'obtenir une Ig fonctionnelle, ils subissent plusieurs événements géniques tout au long du développement lymphocytaire B (**Figure 3**). On distingue deux phases durant l'ontogénie B : la phase précoce qui se déroule dans la moelle osseuse (MO) avant la rencontre de l'Ag et la phase tardive qui a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (comme la rate, les plaques de Peyer et les ganglions lymphatiques) après la rencontre avec l'Ag.

Durant la phase précoce, ce sont les recombinaisons $V_H D J_H$ et $V_L J_L$, respectivement des chaînes lourdes et légères qui surviennent. Ces segments codant la région variable de l'Ig doivent être réarrangés pour former des exons fonctionnels. Ceci permet la création du répertoire antigénique du BCR fonctionnel.

Lors de la phase tardive, deux autres recombinaisons géniques se produisent : l'hypermutation somatique (SHM, pour *Somatic HyperMutation*) et la recombinaison isotypique (CSR, pour *Class Switch Recombination* ou simplement « *switch* »). Dans le but d'optimiser l'efficacité de la réponse immune, ces deux mécanismes vont permettre de diversifier le répertoire antigénique en augmentant l'affinité de l'Ig pour son Ag et d'adapter ses fonctions effectrices.

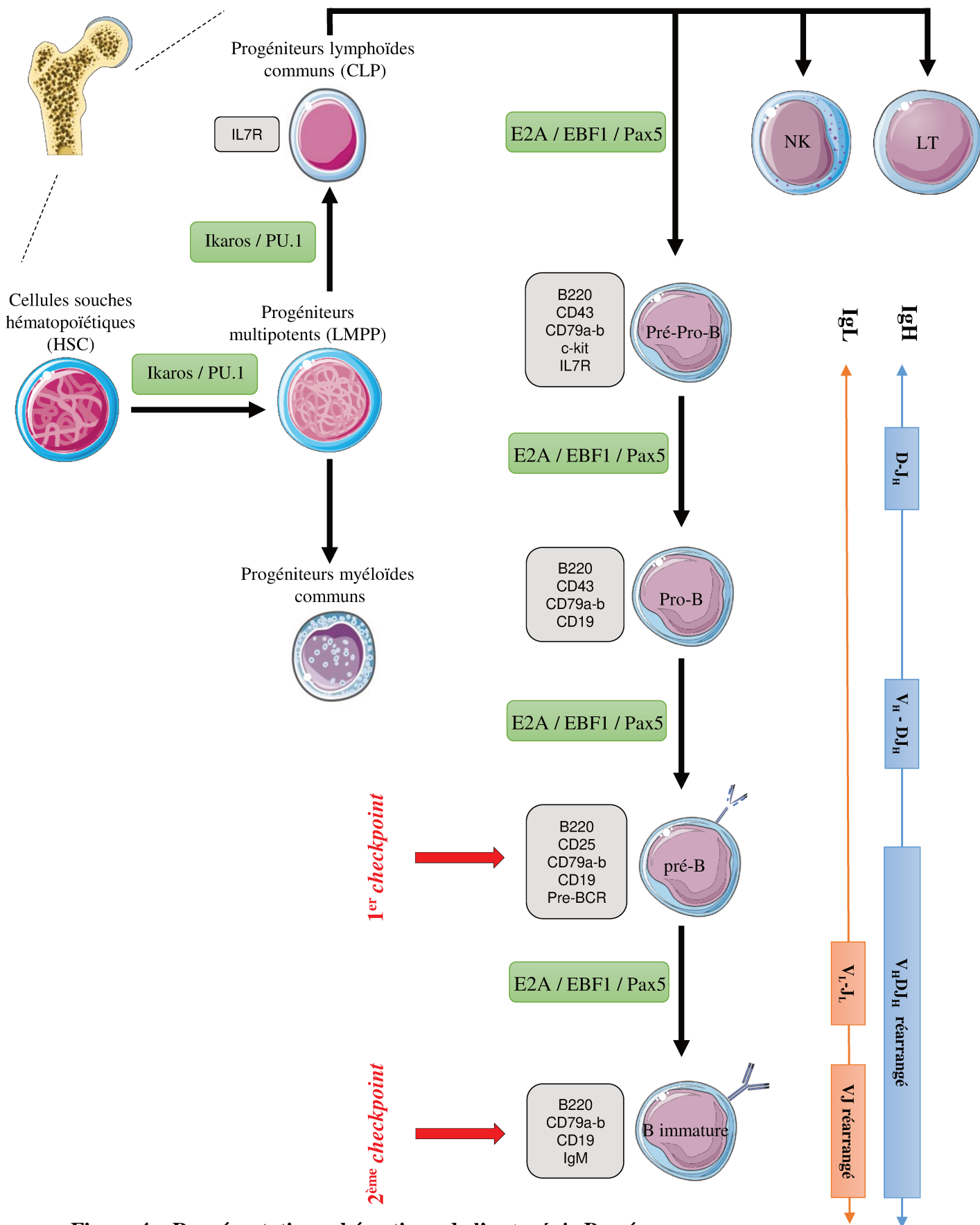


Figure 4 – Représentation schématique de l'ontogénie B précoce.

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

I.2.1. Phase précoce Ag indépendante : formation d'un répertoire B primaire

a) Des cellules souches hématopoïétiques aux progéniteurs lymphoïdes communs

L'ontogenèse B débute dans la MO et le foie fœtal en absence de l'Ag. Ce cheminement n'est pas clairement cloisonné (on parle plutôt de « continuum ») durant lequel les LB proviennent de cellules souches hématopoïétiques (HSC pour *Hematopoietic Stem Cells*) ayant une capacité d'auto-renouvellement et de génération de toutes les lignées cellulaires sanguines (Pieper et al., 2013; Tsuneto et al., 2014; Ye and Graf, 2007).

Ces HSC vont tout d'abord se différencier, sous l'action de différents facteurs de transcription tels que PU1 (PU1 pour *PURine box factor 1*) et Ikaros, en progéniteurs multipotents (LMPP pour *Lymphoid-primed Pluripotent Progenitors*) puis en précurseurs lymphoïdes communs (CLP pour *Common Lymphoid Precursors*) qui seront à l'origine des LB, LT et des cellules NK (**Figure 4**) (Barneda-Zahonero et al., 2012; Busslinger, 2004; Hardy et al., 2007; Miyazaki et al., 2014).

Les CLP sont caractérisés par une forte expression du récepteur à l'interleukine 7 (IL-7) qui est connu pour être indispensable à l'engagement dans la spécificité B (Corfe and Paige, 2012). Il est important de noter qu'il existe dès à présent une population lymphocytaire B, dite B1 et originaire du foie fœtal, capable de s'engager dans la lignée B en absence de l'IL-7 (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012). Cette population est l'objet d'une partie de mon travail de thèse. Je la détaillerai dans la suite du chapitre I.

Sous une stimulation par l'IL-7, les CLP vont ensuite exprimer les facteurs de transcription E2A (E2A pour *E box protein binding 2 A*), EBF1 (EBF1 pour *Early B cell Factor-1*) et Pax-5 (Pax-5 pour *Paired box gene 5*) afin de s'engager définitivement dans la lignée lymphocytaire B, tout en réprimant les lignées LT et NK. Pax-5 est le régulateur principal qui va jouer un rôle essentiel dans l'engagement et le maintien de l'identité B durant toute la maturation (Reth and Nielsen, 2014; Zandi et al., 2012). Des études ont montré que l'inactivation de l'expression de Pax-5 chez les souris bloque le développement B au stade pré-pro-B et entraîne leur retour à l'état de progéniteurs multipotents, ayant la capacité de se différencier en macrophages ou en LT (Cobaleda et al., 2007; Mikkola et al., 2002).

b) Le stade pré-pro-B

Le stade pré-pro-B représente le stade le plus immature de la lignée B. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de différents marqueurs de surface tels que les marqueurs spécifiques de la lignée B (comme le B220 ou CD45R), des molécules de transduction de signal (comme le CD79a (Ig α) et CD79b (Ig β)), mais aussi des marqueurs stades spécifiques (comme

CD43 et CD117 (c-kit)) et des récepteurs comme celui à l'IL-7 (**Figure 4**) (Hardy et al., 2007; Rolink et al., 1996). Jusqu'à ce stade, les loci des chaînes d'Ig sont en conformation germinale, incapables donc d'exprimer une Ig.

c) Le stade pro-B et réarrangements V_HDJ_H au locus IgH

Lors de leur passage au stade pro-B, les cellules commencent à exprimer le marqueur CD19. Celui-ci est particulièrement marqué par l'initiation du processus de réarrangements V_HDJ_H . C'est un mécanisme ordonné (réarrangements du locus IgH avant les loci IgL) et séquentiel (recombinaisons D- J_H avant V_H - DJ_H) (Alt et al., 1984; Jung et al., 2006).

Dans un premier temps, et simultanément sur les deux allèles du locus IgH, un segment D s'associe avec un segment J_H pour former une jonction D- J_H entraînant la délétion de l'ADN entre ces deux segments. Dans un second temps, le réarrangement V_H - DJ_H , qui associe un segment V_H au segment D- J_H préalablement formé, n'aura lieu que sur un seul allèle. C'est le mécanisme d'exclusion allélique qui assure l'unicité des Ig produites par une cellule (Corcoran, 2005; Jung et al., 2006). L'exon V_HDJ_H ainsi formé est transcrit puis épissé sur le premier exon C_μ aboutissant à l'expression d'une chaîne lourde μ .

d) Le stade pré-B et réarrangements aux loci IgL

La transition au stade pré-B est marquée par l'expression du marqueur CD25 et la perte du CD43. Ce stade est aussi caractérisé par l'expression de la chaîne lourde μ . Cette dernière, une fois produite, s'associe avec une pseudo-chaîne légère (SLC pour *Surrogate Light Chain*), codée par les gènes $V_{\text{préB}}$ (CD179a) et $\lambda 5$ (CD179b) (Herzog et al., 2009; Mårtensson et al., 2007; Melchers et al., 1993). Ce complexe, en association avec les molécules CD79a et CD79b, forme le pré-BCR.

La formation du pré-BCR constitue le premier point de contrôle (ou « *check-point* ») lors du développement lymphocytaire B (**Figure 4**). En effet, seules les cellules avec un pré-BCR poursuivent leur différenciation. Par contre, toute cellule incapable d'associer son pré-BCR ou exprimant un pré-BCR auto-réactif, c'est-à-dire qui reconnaît un Ag du soi, est éliminée par apoptose (Keenan et al., 2008; Mårtensson et al., 2010). Le pré-BCR exerce un propre rétrocontrôle négatif sur son expression, induisant ainsi une inhibition de la transcription des gènes codant la pseudo-chaîne légère. L'arrêt de la signalisation par le pré-BCR va déclencher les réarrangements V-J aux loci des chaînes légères et donc permettre le passage du stade pré-B à celui de B immature exprimant un BCR fonctionnel (Herzog et al., 2009).

Recombinaisons V_HDJ_H

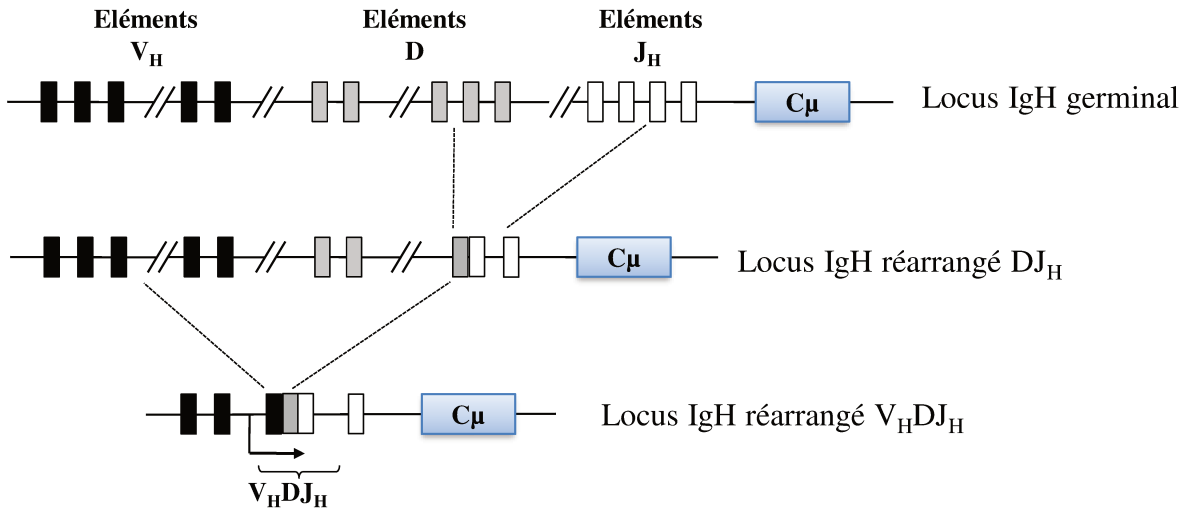


Figure 5 – Représentation des recombinaisons V_HDJ_H au locus IgH.

Les différentes lignes représentent le locus IgH germinal et réarrangé.

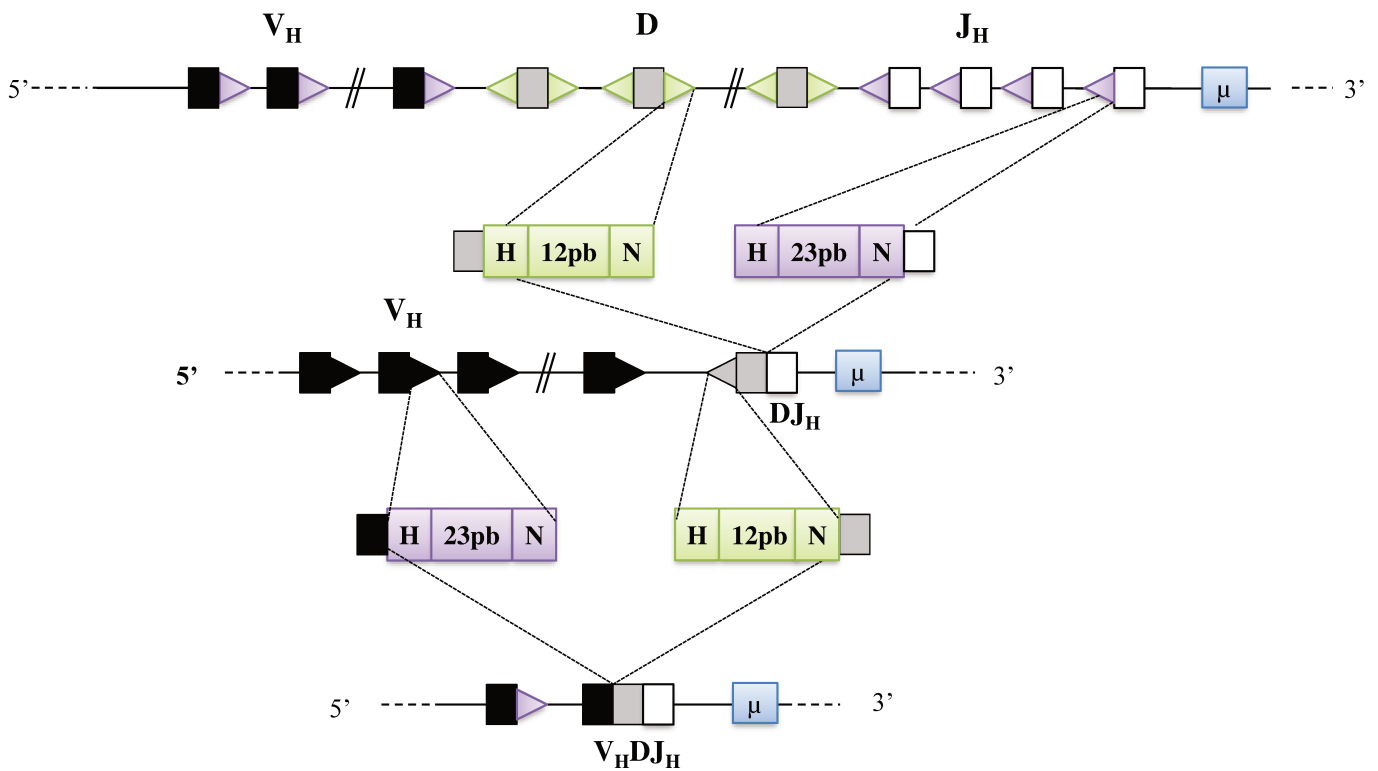


Figure 6 – Représentation schématique des RSS et de la règle « 12/23 ».

Les rectangles représentent les exons V_H , D , J_H et C_μ . Les triangles représentent les séquences RSS reconnues par les enzymes RAG lors des réarrangements V_HDJ_H .

H pour représenter la séquence heptamérique (CACAGTG) et N la séquence nanomérique (ACAAAACC).

e) Le stade B immature et l'édition du BCR

Les cellules B immatures expriment un BCR fonctionnel de type IgM et perdent le marqueur CD25 (Hardy et al., 2007). L'acquisition d'un BCR fonctionnel n'est pas suffisante pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires. A ce stade, les cellules vont subir un second point de contrôle du développement B (**Figure 4**). Celles exprimant un BCR auto-réactif seront éliminées par apoptose afin d'éviter le développement de maladies auto-immunes (Nemazee and Bürki, 1989; Russell et al., 1991).

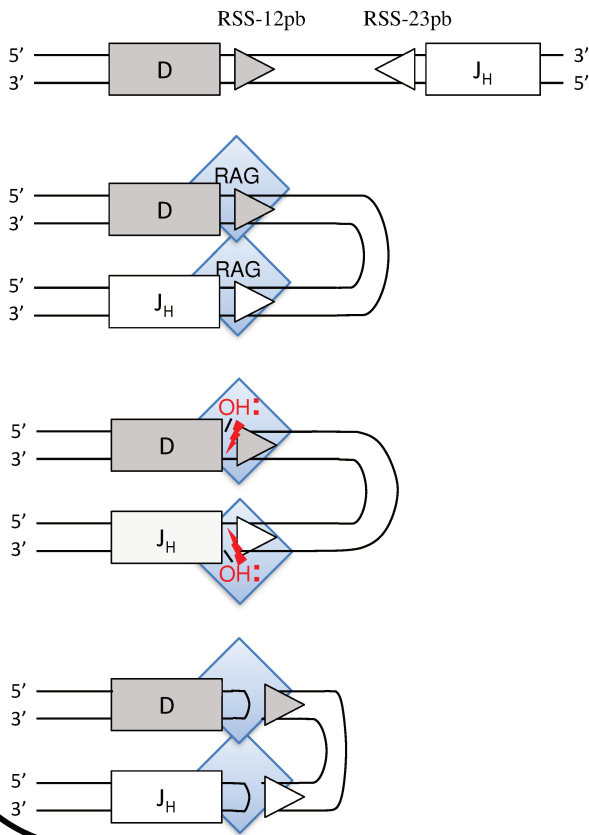
Pour contourner leur mort par apoptose, les cellules auto-réactives ont la possibilité de modifier leur BCR : c'est le mécanisme d'édition du BCR ou « *Receptor Editing* » (Halverson et al., 2004; Tiegs et al., 1993). Un réarrangement secondaire se fait aux loci IgL permettant d'obtenir une nouvelle chaîne légère et par conséquent un autre BCR, celui-ci plus compatible avec les éléments du soi.

Enfin, et après une éventuelle édition du BCR, les cellules en exprimant un fonctionnel et non auto-réactif quittent la MO pour rejoindre la circulation sanguine et les organes lymphoïdes secondaires où elles subiront les prochaines étapes de la maturation.

I.2.1.1. Les réarrangements $V_H D J_H$

Comme décrit précédemment, les recombinaisons $V_H D J_H$ sont des mécanismes ordonnés (réarrangements du locus IgH avant les loci IgL) et séquentiels (recombinaisons D- J_H avant V_H - $D J_H$) (**Figure 5**). Elles s'effectuent à des sites spécifiques appelés RSS (RSS pour *Recombination Sequence Signal*). Ces dernières sont des séquences hautement conservées. Elles sont constituées d'une séquence heptamérique (CACAGTG) et d'une séquence nonamérique (ACAAAACC) très conservées et séparées par des séquences de 12 ou 23 paires de bases nommées espaceurs (ou « *spacers* ») d'où leurs noms de RSS-12 et RSS-23 (Sawchuk et al., 1997; Tonegawa, 1983). Les recombinaisons ne peuvent avoir lieu qu'entre les RSS ayant des « *spacers* » de tailles différentes : C'est la règle 12/23 (**Figure 6**) (Early et al., 1980; Sawchuk et al., 1997). En effet, les RSS sont localisées en 5' et/ou en 3' des segments à réarranger, de manière à ce que les réarrangements puissent avoir lieu qu'entre segments D et J_H puis entre V_H et D- J_H . Ainsi, les D sont flanqués du même type de RSS en 5' et 3' (RSS-12) alors que les V_H et J_H sont flanqués, respectivement en 5' et en 3', du même type de RSS (RSS-23). Cette règle assure que les gènes se réarrangent d'une façon appropriée en empêchant non seulement tout réarrangement entre deux segments V_H , ou deux segments J_H mais également la formation de jonctions $V_H J_H$.

Phase de cassures double brin



- Fixation des RAG (RAG1 et RAG2) sur les RSS
 - Formation d'une synapse

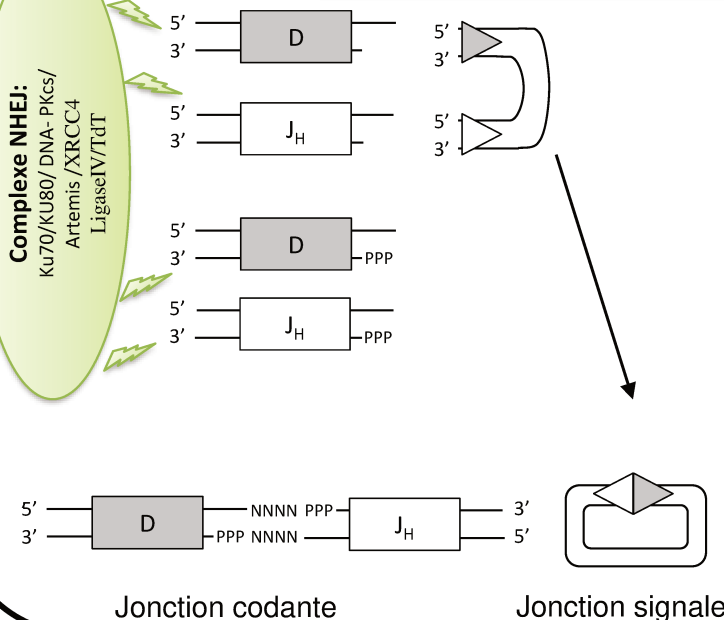


- Clivage simple brin et libération d'un groupement 3'hydroxyle
- Attaque du groupement 3'hydroxyle sur le 2^{ème} brin



- Formation d'une extrémité en « épingle à cheveux » et une autre en « bouts francs »

Phase de réparation par la voie NHEJ



- Ouverture asymétrique de la structure en épingle à cheveux



- Ajout de nucléotides P sur le brin le plus court



- Ajout de nucléotides N
- Réparation des cassures et formation d'une jonction codante et d'une jonction signal

Jonction codante

Jonction signal

Figure 7 – Mécanistique des réarrangements V_HDJ_H .

Les rectangles gris et blancs représentent respectivement les exons J_H et D. Les losanges bleus représentent les protéines RAG. Les protéines RAG provoquent des DSBs, formant ainsi des extrémités codantes « en épingles à cheveux » et des extrémités signales à bouts francs. Le complexe protéique de la voie NHEJ, représenté en cercle vert, ouvre la structure d'« épingle à cheveux » puis ligature les extrémités codantes et celles du signal. Adapté d'après *Schatz and Ji, 2011*.

D'un point de vue mécanistique, les recombinaisons V_HDJ_H sont divisées en deux étapes : l'induction de cassures double brin (DSB pour *Double Strand Break*) puis leur réparation (**Figure 7**) (Boboila et al., 2012; Nishana and Raghavan, 2012; Schatz and Ji, 2011; Schatz and Swanson, 2011). La première est initiée par une machinerie enzymatique formée de deux endonucléases RAG-1 et RAG-2 (RAG pour *Recombination-Activating Gene*). Elles sont exprimées lors des stades de développement où ont lieu les réarrangements DJ_H et V_HDJ_H (Oettinger et al., 1990; Schatz et al., 1989). La délétion des gènes codant ces deux protéines conduit à l'arrêt du développement lymphocytaire B au stade B précoce (Mombaerts et al., 1992; Nishana and Raghavan, 2012; Shinkai et al., 1992). Il s'agit d'un processus séquentiel : [1] les protéines RAG vont reconnaître et se fixer sur les deux séquences RSS-12 et RSS-23 en les rapprochant pour former une synapse en forme d'« épingle à cheveux » ; [2] elles vont ensuite provoquer une cassure simple brin entre le segment codant et la RSS, générant un groupement 3'hydroxyle libre qui attaquera le second brin ; [3] ceci formera une extrémité en « épingle à cheveux » du côté des segments codant et une autre à « bouts francs » du côté des RSS (**Figure 7**) (Jones and Gellert, 2002; Mundy et al., 2002).

La deuxième phase est l'étape de réparation des DSB générées par les RAG. Elle est assurée par la voie de réparation NHEJ (NHEJ pour *Non homologous End joining*) (Boboila et al., 2012; Weterings and Chen, 2008). Cette dernière va mobiliser plusieurs facteurs, dont notamment Ku70/Ku80, DNA-PKcs (DNA-PKcs pour *DNA Dependant Protein Kinase catalytic subunit*), XRCC4 (XRCC4 pour *X-ray Repair Cross-Complementing protein 4*), DNA ligase-IV, Artemis et Cernunnos (XLF pour *XRCC4-like Factor*) afin d'ouvrir les extrémités en « épingles à cheveux » et assurer la ligature des segments codants (**Figure 7**) (Ma et al., 2002; Schlissel, 2003).

En plus de la multiplicité des combinaisons entre les différents segments V, D et J disponibles (nommée « diversité combinatoire »), la diversité du répertoire antigénique est amplifiée par des modifications se produisant dans la jonction codante : c'est la « diversité jonctionnelle ». En effet, avant la ligation des segments codants, l'ouverture asymétrique de la structure de l'« épingle à cheveux » va aboutir à l'insertion de nucléotides sur le brin le plus court, induisant l'apparition de courtes séquences palindromiques nommés nucléotides P (P pour *Palindromic Nucleotide*). L'introduction aléatoire de nucléotides nommés nucléotides N (N pour *Non-germline nucleotide*) par l'enzyme TdT (Tdt pour *Terminal deoxynucleotidylTransferase*) aux extrémités des régions codantes est aussi observée (Alt and Baltimore, 1982; Desiderio et al., 1984; Motea and Berdis, 2010). L'ensemble de ces différents

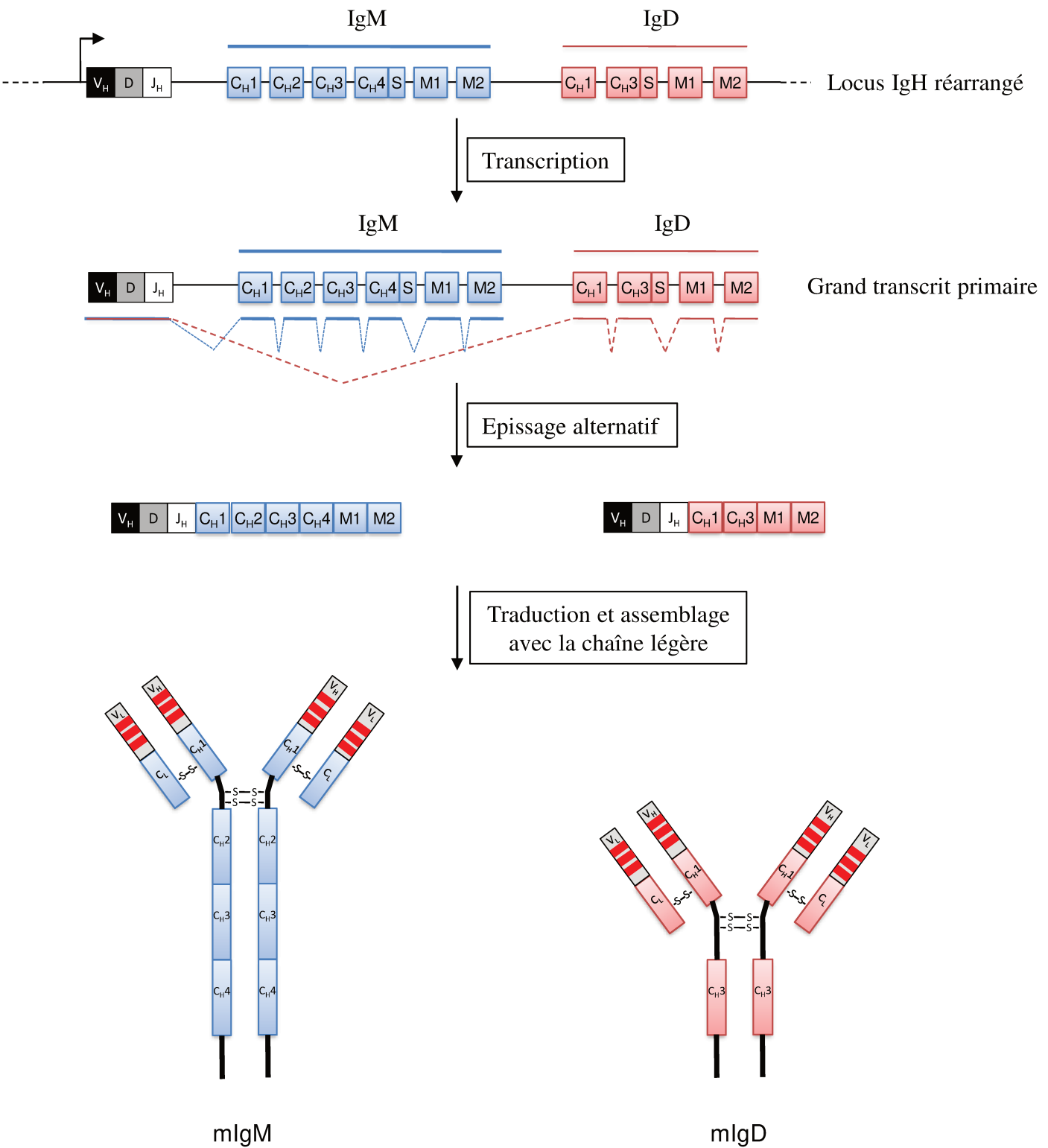


Figure 8 – Mécanisme d'épissage alternatif : co-expression d'une IgM et d'une IgD.

La synthèse d'IgM et d'IgD membranaires est assurée par les transcrits représentés respectivement par les lignes bleues et rouges. Les traits pleins représentent les exons conservés après l'épissage.

L'IgM possède 4 domaines C_H . L'IgD n'en possède que deux (le deuxième étant noté C_H3) et contient une région charnière plus longue.

mécanismes permet ainsi de générer un large éventail d'Ig à partir d'un nombre restreint de gènes et constitue le premier grand répertoire B.

I.2.2. Phase tardive Ag dépendante : répertoire secondaire

Après leur sortie de la MO, les cellules B immatures gagnent la circulation sanguine pour rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT pour *Mucosae Associated Lymphoid Tissue*)). Dans ces derniers, les LB doivent être activés par un Ag afin de continuer leur développement et se différencier en plasmocytes (le stade terminal de la différenciation B) sécrétant d'Ig et en cellules B mémoires. Dans ce but, ils passent par d'autres stades de développement aboutissant à la production d'Ig plus affines et plus adaptées à un Ag spécifique grâce à deux autres mécanismes de réarrangements géniques qui sont la SHM et la CSR.

a) Les LB transitionnels

Les cellules B immatures passent par un stade intermédiaire appelé B transitionnel, où elles vont acquérir progressivement leur capacité à répondre à une stimulation par un Ag. Ce stade est caractérisé par la répression des gènes RAG et l'expression du marqueur AA4.1 ou CD93 (Allman et al., 2001, 1992; Chung et al., 2003). Les LB transitionnels forment une population hétérogène qui peut être divisée en différentes sous-populations selon leur localisation, phénotype et fonction. On distingue :

- **Les LB transitionnels de type 1 (T1)** : ils ont un phénotype proche de celui des B immatures de la MO. Ils sont caractérisés par une forte expression d'IgM membranaires avec, peu ou pas d'expression d'IgD membranaires et la non expression des marqueurs CD21 et CD23. Ces cellules se situent dans la partie externe des manchons lymphoïdes péri-artériolaires (PALS pour *Periarterial Lymphatic Sheaths*) où elles subiront une sélection négative (Su and Rawlings, 2002).
- **Les LB transitionnels de type 2 (T2)** : les LB T1 qui ont surpassé la sélection négative rejoignent les follicules de la rate et deviennent des T2. Ils sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD21 et CD23. Ces cellules commencent à co-exprimer des IgM et IgD membranaires grâce à un mécanisme d'épissage alternatif (**Figure 8**) (Chen and Cerutti, 2011). Quelques études ont mis en évidence des cellules transitionnelles dites **T3**. C'est une population qui ne semble pas être à l'origine de cellules B matures et qui pourrait correspondre à des cellules anergiques (Liubchenko et al., 2012; Merrell et al., 2006; Teague et al., 2007).

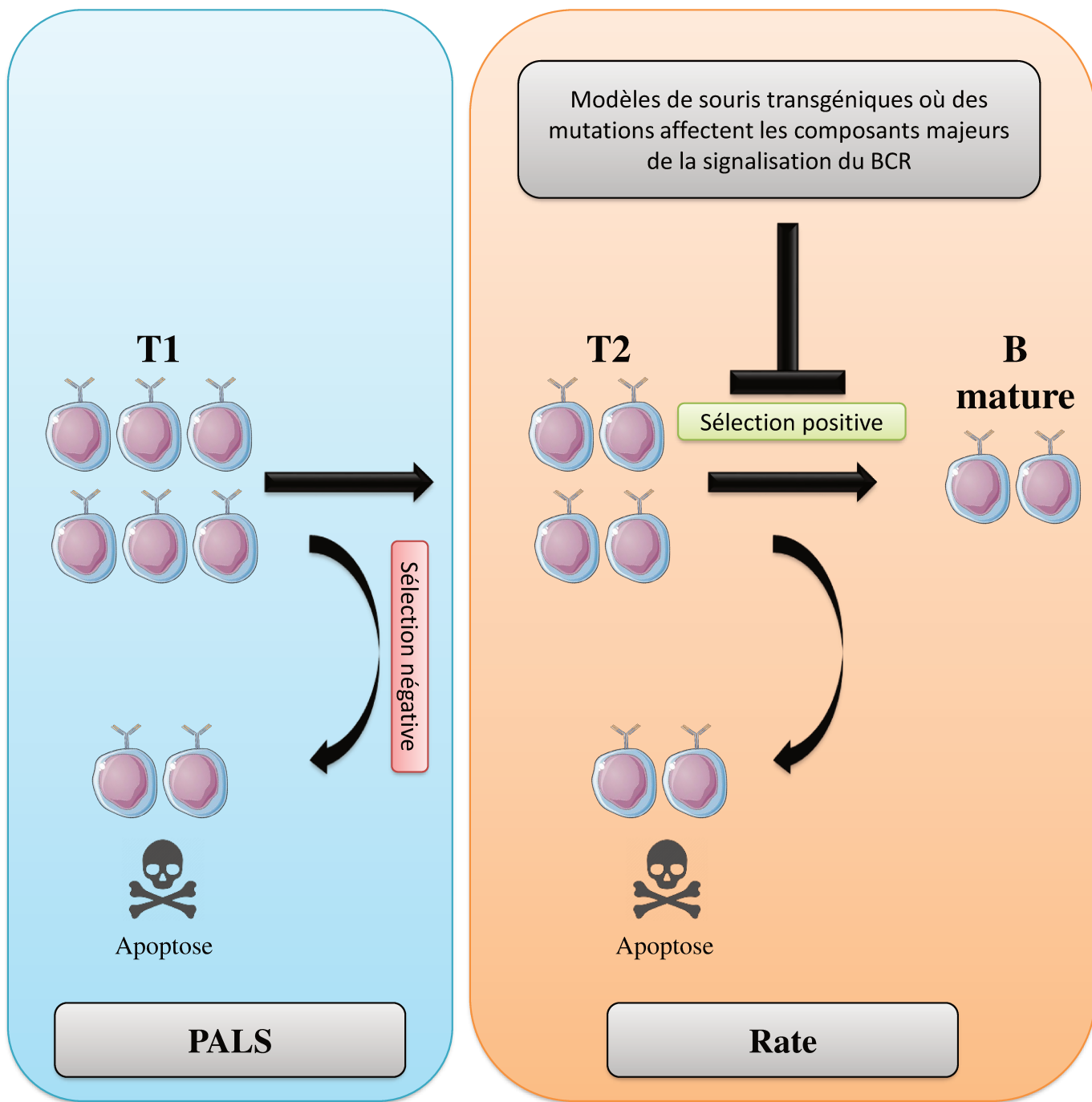


Figure 9 – Représentation schématique des sélections négatives et positives des cellules B transitionnelles.

Dans les manchons lymphoïdes péri-artériolaires (encadré bleu), les T1 auto-réactifs subissent une sélection négative par apoptose par leur BCR. Les T1 ayant surpassé la sélection négative rejoignent les follicules de la rate et deviennent des T2. Dans la rate (encadré orange), les T2 subissent une sélection positive afin de proliférer et de se différencier en cellules B matures. Des modèles de souris transgéniques ayant des mutations qui affectent la signalisation du BCR bloquent le passage du stade T2 au stade B mature. Adapté d'après *Su et al., 2002*.

Après l'engagement de leur BCR, les T1 et T2 présentent des réponses différentes. Les T1 subissent une sélection négative par leur BCR éliminant les cellules auto-réactives par apoptose. Les T2 subissent une sélection positive afin de proliférer et de se différencier en cellules B matures. Il est admis que les T2 acquièrent progressivement une résistance à l'apoptose et une capacité de prolifération en réponse à une stimulation par le BCR (**Figure 9**). L'inactivation de certains composants majeurs de la signalisation du BCR, grâce à des modèles de souris transgéniques, a montré un biais concernant le nombre et la répartition de cellules B matures dans la rate (Allman et al., 2004; Petro et al., 2002; Su and Rawlings, 2002). Ces études confirment donc le rôle du signal induit par le BCR sur le devenir des cellules B transitionnelles.

L'acquisition de la capacité des cellules B transitionnelles à répondre aux signaux par leur BCR assure deux fonctions : [1] la survie et la bonne progression dans le développement ; [2] le devenir des cellules B, nommé aussi « **B cell fate** » (Niuro and Clark, 2002; Pillai and Cariappa, 2009).

i. IgD

Suite à leur passage au stade T2, les LB commencent à co-exprimer les BCR IgM et IgD. L'expression de ce dernier est faite par un épissage alternatif d'un grand transcrite commun contenant l'exon VDJ réarrangé et les exons constants C μ et C δ tout en conservant la spécificité antigénique (**Figure 8**).

Les premières études sur l'IgM et l'IgD semblaient indiquer que, dans des modèles murins, l'un des deux récepteurs pouvait compenser la délétion de l'autre (Lutz et al., 1998; Nitschke et al., 1993). Cependant, des études plus fines ont permis de remettre en question ces résultats. En effet, la délétion de C μ perturbe le répertoire antigénique ainsi que la mémoire immunitaire et les réponses secondaires à une infection (Guo et al., 2008; Han et al., 2004). Une délétion de l'IgD, chez la souris, entraîne une perturbation de la lymphopoïèse avec une mise en place retardée du phénomène d'hypermutation somatique lors de réactions T-dépendantes. Ces résultats suggèrent un rôle du BCR IgD pour stimuler la réaction du lymphocyte B lors des premières phases d'une réaction immunitaire (Roes, 1993).

Actuellement, l'hypothèse admise est que le BCR à IgD jouerait un rôle de modulateur de la réponse immune en régulant l'homéostasie et la sélection des LB. Certaines études suggèrent que la sélection des clones positifs et le passage du stade transitionnel au stade mature, sont facilités par l'expression du BCR IgD qui amplifierait le signal du BCR IgM (Geisberger et al., 2006). Cependant, d'autres études suggèrent que le BCR IgD posséderait un rôle de transmetteur de signaux répresseurs ou apoptotiques. Les cellules matures anergiques

murines ont une expression d'IgD supérieure à celle de l'IgM. D'autre part, il a été démontré, chez l'homme, que les cellules exprimant plus d'IgD que d'IgM de surface répondent faiblement aux stimulations par le BCR (Duty et al., 2009; Goodnow et al., 1988; Koelsch et al., 2007; Zheng et al., 2004). L'IgD aurait alors un rôle important dans la tolérance immunitaire. Ceci a été confirmé dans des souris MRL- lpr (un modèle murin fréquemment utilisé pour étudier les maladies auto-immunes). La délétion de l'IgD chez ces souris entraîne une augmentation de la synthèse d'auto-Ac (Guo et al., 2011c).

L'ensemble de ces données montre que la co-expression de l'IgD avec l'IgM semble avoir un rôle de régulateur, modulant finement la signalisation par les BCR. Les analyses de génome par séquençage ont démontré que, chez la plupart des vertébrés, l'IgD est un ancien isotype conservé au cours de l'évolution. La double expression IgM/IgD est présente chez ces organismes grâce à un mécanisme d'épissage alternatif (Zhu et al., 2014). Une étude récente a montré que cet épissage alternatif est assuré grâce à une protéine nucléaire nommée Zfp318 (Zfp318 pour *Zinc Finger Protein 318*) (Enders et al., 2014). Elle est très conservée durant l'évolution et sa cinétique d'expression est identique à celle de l'IgD. Non exprimée au stade pro-B et pré-B, elle apparaît dès le stade B immature (Enders et al., 2014; Pioli et al., 2014). Une délétion de la Zfp318 entraîne une disparition quasi-totale de l'IgD avec une surexpression de l'IgM. L'ensemble de ces données confirme l'importance de la double expression régulée d'un BCR IgM et IgD.

Malgré la description depuis plusieurs années de myélomes à IgD avec la délétion de C μ (Arpin et al., 1998), le paradigme a longtemps été : absence de région S δ devant C δ , donc pas de recombinaison isotypique vers les IgD. Cependant, sa mise en évidence vers les IgD est récente. Plusieurs études ont décrit une sous population particulière de LB, exprimant une IgD mais pas une IgM. Cette population a été observée dans les voies aériennes, digestives et péritonéales (Chen et al., 2009a; Choi et al., 2017; Koelsch et al., 2007; Rouaud et al., 2014). La régulation et la mécanistique de ce « *switch* » reste toujours à clarifier. Choi et coll suggèrent qu'il dépendrait du microbiote intestinal et d'une signalisation TLR. Une relation mutualiste semble être établie entre l'IgD et les bactéries commensales, comme celle observée avec l'IgA (Choi et al., 2017).

Durant ma thèse, j'ai participé à des travaux sur la mécanistique du « *switch* » vers IgD. Ces travaux ont donné lieu à deux publications et une brève revue que je présente en annexe (**Annexe 1, 2 et 3**).

b) LB matures et la formation du centre germinatif (GC)

Les LB matures naïfs (avant leur rencontre avec l'Ag) peuvent être divisés en deux grandes populations qui diffèrent par leurs origines, leurs fonctions, leurs distributions tissulaires et leurs marqueurs de surface. On distingue :

- Les LB-1 qui sont d'origine fœtale et associés à l'immunité innée (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012; Reynolds et al., 2015). Ils sont caractérisés par la production des NIg.
- Les LB-2 qui sont produits à partir de précurseurs de la MO et plutôt associés à l'immunité adaptative (Pillai and Cariappa, 2009). Ces cellules sont subdivisées en deux sous-populations B matures : les cellules B de la zone marginale (MZ) et les cellules B de la zone folliculaire (FO).

i. Les cellules B2 de la zone marginale

Les cellules B MZ représentent 5 à 10% des cellules B de la rate. Comme leur nom l'indique, les cellules MZ sont localisées dans la zone marginale de la rate, à l'interface des pulpes blanches et rouges (Cerutti et al., 2013; Mebius and Kraal, 2005). Ces cellules expriment fortement le CD21 et faiblement le CD23. Elles partagent avec les LB-1 des fonctions similaires malgré leur différence d'origine, de localisation et de marqueurs de surface (Martin et al., 2001). En effet, les cellules MZ participent aussi à la réponse immunitaire précoce qui est majoritairement T indépendante (qui ne nécessite pas une interaction avec les LT). Elles possèdent un BCR fréquemment polyréactif et/ou faiblement auto-réactif capable de reconnaître à la fois les PAMPs ou des débris de cellules apoptotiques (DAMPs pour *Damage-Associated Molecular Patterns*) (Martin and Kearney, 2002; Pillai et al., 2005). En plus du BCR, ces cellules sont caractérisées par une forte expression de récepteurs de type TLR (TLR pour *Toll Like Receptor*) capables de reconnaître des molécules bactériennes telles que les lipopolysaccharides (LPS) (Genestier et al., 2007). Lors de la rencontre avec l'Ag, ces cellules vont s'activer et se différencier en plasmocytes, producteurs d'Ac principalement de type IgM de courte durée de vie (Martin et al., 2001) et de faible affinité pour former ainsi la première ligne de défense contre l'Ag. Des études ont démontré que les MZ sont capables de produire des Ac de type IgG et des IgA suite à une CSR (Cerutti et al., 2013; MacLennan et al., 2003).

ii. Les cellules B2 folliculaires et GC

Les cellules FO constituent la majorité des cellules B de la rate. A l'inverse des MZ, elles expriment fortement le CD23 et faiblement le CD21. Elles sont localisées dans la pulpe

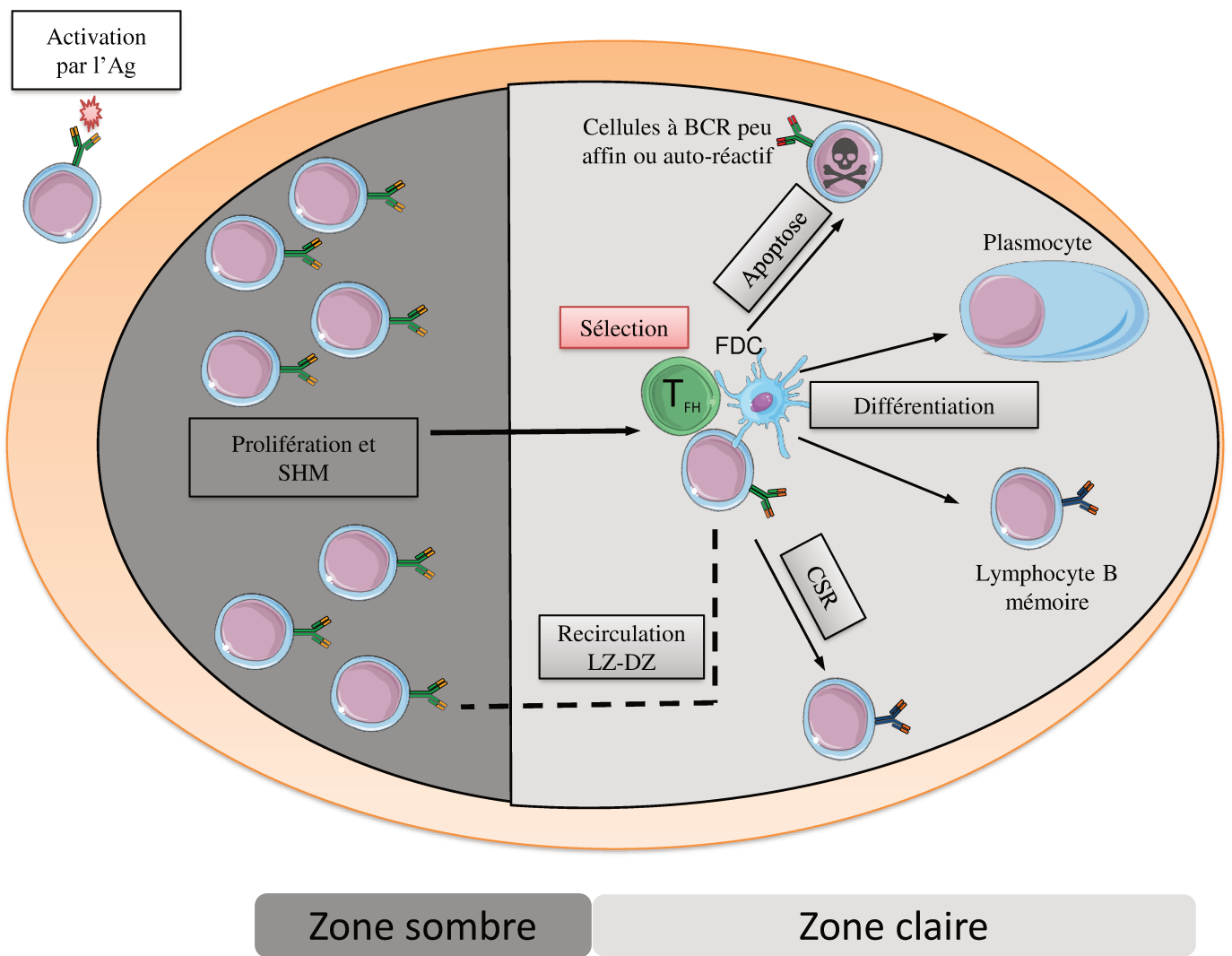


Figure 10 – Structure schématique d'un centre germinatif.

Après leur activation par l'antigène, les LB migrent vers la zone sombre (DZ pour *Dark Zone*) du centre germinatif (représentée en gris foncé sur la figure) où ils subissent une prolifération rapide et une SHM. Les cellules passent ensuite dans la zone claire (LZ pour *Light Zone*, représentée en gris clair sur la figure) où elles sont sélectionnées sur la base de l'affinité du BCR vis-à-vis de l'Ag. Cette sélection repose sur des interactions avec les cellules T_{FH} (LT auxiliaires folliculaires) et les FDC (cellules dendritiques folliculaires). Ces cellules peuvent re-circuler dans la DZ pour subir un nouveau cycle de SHM et augmenter l'affinité de leur BCR. Les cellules les plus affines pour l'Ag pourront enfin subir une CSR ou se différencier en plasmocytes ou en B mémoires. Adapté d'après *De silva et Klein, 2015*.

blanche de la rate ; plus précisément dans les follicules primaires d'où leur nom. Les cellules FO répondent essentiellement à une stimulation T-dépendante (qui nécessite une interaction avec les LT) conduisant à la formation des cellules B mémoires et des plasmocytes (Heesters et al., 2014; MacLennan, 1994; Victora and Nussenzweig, 2012).

Les cellules FO naïves migrent vers les follicules primaires, zones occupées par un réseau de cellules dendritiques dites folliculaires (FDC pour *Follicular Dendritic Cells*), qui vont jouer le rôle de cellules présentatrices d'Ag (CPA). Ces follicules primaires sont séparés par une région inter-folliculaire (zone d'interaction entre LB et LT) et sont bordés par des zones riches en LT (appelées zones T). Une fois les cellules FO naïves et les LT activés par leur Ag, dans les follicules primaires et les zones T respectivement, ils vont ensuite migrer vers la région inter-folliculaire et interagir ensemble aboutissant à la formation du centre germinatif (ou GC pour *Germinal center*) également appelé follicule secondaire (**Figure 10**) (De Silva and Klein, 2015; Ma et al., 2012; Victora and Nussenzweig, 2012).

Au niveau du GC, Les LB subiront une étape de prolifération rapide et une étape de sélection couplées à deux autres phénomènes de réarrangements géniques secondaires (SHM et CSR) dans le but d'assurer le développement de cellules exprimant des Ig de plus haute affinité pour l'Ag. La prolifération et la sélection ont lieu dans deux zones distinctes : la zone sombre (DZ pour *Dark Zone*) et la zone claire (LZ pour *Light Zone*). Dans la DZ, les LB entre en prolifération rapide et subissent d'intenses mutations somatiques dans les gènes codant la partie variable des Ig. Ce sont les SHM (ou maturation d'affinité) qui permettent l'introduction de mutations ponctuelles dans les régions variables des chaînes lourdes (VDJ) et légères (VJ) d'Ig afin d'améliorer leur affinité pour l'Ag (Di Noia and Neuberger, 2007). Les LB vont ensuite passer dans la LZ, où ils vont entrer en compétition pour une sélection clonale, par interaction avec les FDC et les T_{FH}. Ainsi, les LB ayant un BCR peu affiné pour l'Ag ou auto-réactif, et qui ne reçoivent pas d'une façon correcte les signaux de prolifération et de différenciation nécessaires à leur survie, meurent par apoptose. Par contre, les cellules possédant un BCR de forte affinité pour leur Ag sont sélectionnées positivement, peuvent re-circuler dans la DZ et subir à nouveau une prolifération et une SHM afin d'augmenter encore plus leur affinité. Enfin, ces derniers peuvent, soit subir une CSR qui permettra d'obtenir un autre isotype d'Ig afin d'acquies de nouvelles fonctions effectrices, soit se différencier en plasmocytes ou cellules B mémoires (Chaudhuri and Alt, 2004; De Silva and Klein, 2015).

c) Sortie des GC : plasmocytes et B mémoires

La différenciation finale dans le GC, aboutit à la génération de deux populations lymphocytaires B : les plasmocytes et les cellules B mémoires (Shlomchik and Weisel, 2012).

i. Plasmocytes

Les plasmocytes sont les cellules productrices et sécrétrices d'Ac. Ce stade est marqué par l'expression du marqueur CD138 et la perte des marqueurs de la lignée B que sont B220 et CD19. On distingue deux catégories de plasmocytes. Ceux à courte durée de vie proviennent principalement des cellules B MZ ou de LB-1 après une stimulation T-indépendante. Ils produisent majoritairement des IgM, sont faiblement hypermutés, ont une affinité limitée pour l'Ag et sont actifs lors des phases précoces de la réponse immunitaire. Ceux à longue durée de vie sont issus principalement des B FO après une stimulation T-dépendante. Ils expriment divers isotypes d'Ig, ont subi la sélection dans le GC et expriment des Ac de forte affinité pour l'Ag (Calame, 2001; Nutt et al., 2015).

ii. LB mémoires

Les LB mémoires sont des cellules produites lors d'une réponse immunitaire primaire (1^{ère} rencontre avec l'Ag) et qui joueront un rôle important pendant la réponse secondaire (2^{ème} rencontre avec le même Ag). Ces cellules sont quiescentes et ont une longue durée de vie. Elles peuvent être générées suite à une réponse T-dépendante après le passage par le GC. Ainsi, ces cellules sont hyper-mutées dans les régions variables des chaînes lourdes et légères des Ig et expriment divers isotypes d'Ig de surface issus de la CSR. En revanche, les cellules B mémoires générées à partir d'une réponse T-indépendante proviendraient des cellules B1b sans hypermutation somatique dans la région variable d'Ig (Alugupalli et al., 2004; Good-Jacobson and Tarlinton, 2012; Tarlinton, 2006). En effet, les LB mémoires possèdent un faible seuil d'activation par un Ag et peuvent entrer rapidement en cycle. Lors de la deuxième rencontre avec l'Ag, les cellules vont soit se différencier en plasmocytes, soit repasser par le GC et subir de nouveaux remaniements secondaires afin d'améliorer leur affinité antigénique. Ceci permettra une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une nouvelle rencontre avec l'Ag (Dogan et al., 2009; Kurosaki et al., 2015).

d) Les LB-1

Les LB-1 représentent 5% des LB totaux chez la souris et sont associés à l'immunité innée. Ils sont localisés majoritairement dans la cavité péritonéale et sont très rarement rencontrés dans la rate et d'autres organes hématopoïétiques. Ils sont les premiers lymphocytes

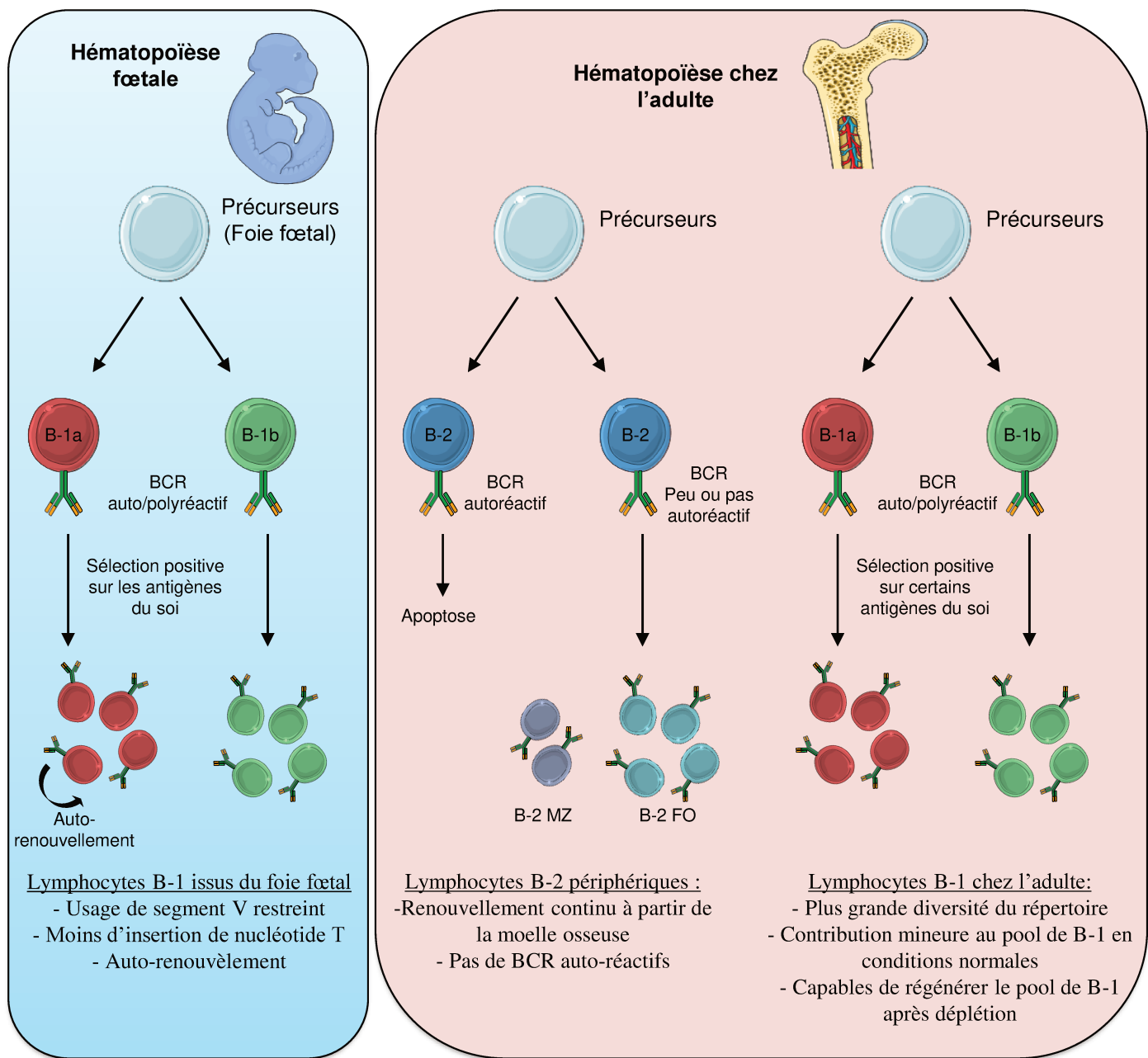


Figure 11 – Représentation schématique du développement des lymphocytes B-1.

Durant la vie fœtale (encadré bleu) et la vie adulte (encadré rose), les LB-1 sont produits essentiellement à partir de leurs précurseurs spécifiques présents dans le foie fœtal et dans la MO adulte. Le foie fœtal représente la source principale des LB-1. La contribution de la MO dans leur production est très mineure. Les LB-1 sont caractérisés par leur auto-renouvellement. Malgré leur génération à partir de leurs précurseurs spécifiques, les LB-1 doivent subir une sélection positive par les Ag de soi et recevoir les signaux nécessaires pour leur expansion. En revanche, les LB-2 sont produits de façon continue par leurs précurseurs spécifiques présents dans la MO adulte. Les LB-2 avec un BCR auto-réactif sont éliminés par apoptose. Adapté d'après *Baumgarth, 2011*.

à apparaître d'où leur nom de B1. Ils proviennent principalement du foie fœtal et sont caractérisés par leur auto-renouvellement. Selon l'expression du marqueur de surface CD5 (ly-1) on distingue deux sous-populations : les B1a (CD5⁺) et les B1b (CD5⁻) (**Figure 11**). Les LB-1 diffèrent des LB-2 par leur origine, fonction, marqueurs de surface, distribution tissulaire, spécificité et diversité antigénique. L'origine des cellules B1 a toujours été controversée. Deux modèles ont été émis pour expliquer le développement des LB-1 (Baumgarth, 2011; Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2006; Prieto and Felipe, 2017).

Le modèle de sélection ou « *induced differentiation model of development* » suggère que les LB-1 et les LB-2 proviennent du même précurseur mais que la différenciation, en LB-1 ou LB-2, dépend du signal reçu durant le développement, essentiellement de la nature de l'Ag reconnu par le BCR et la force du signal (Berland and Wortis, 2002; Casola et al., 2004). Ce modèle explique que la différence entre les précurseurs du foie fœtal et ceux de la MO adulte à repeupler des LB-1 et LB-2, est due à la spécificité de leur BCR : le répertoire antigénique fœtal est réactif à des réponses T-indépendantes, particulièrement aux Ag du soi abondants dans la vie fœtale. Par contre, cette spécificité est rarement incluse dans le répertoire adulte. La signalisation par un BCR auto-réactif est, de façon surprenante, un prérequis à la différenciation en LB-1.

Le modèle en couche ou « *the layered immune system* » qui propose que les LB-1 et les LB-2 se différencient à partir de précurseurs différents et distincts grâce à des expériences de transfert de cellules B plus ou moins matures. En effet, le transfert de CLP purifiés de MO adulte dans des souris irradiées reconstitue les deux populations B1 et B2 tandis que le transfert de cellules pro-B ne reconstitue que les LB-2 (Esplin et al., 2009). L'équipe de Barber a démontré, en utilisant des cultures *in vitro*, que chaque clone de CLP ne donnera que des LB-1 ou des LB-2, mais jamais les deux, montrant que la séparation des deux lignées est déjà faite au stade de développement CLP (Barber et al., 2011). Cette même étude a montré que le transfert de CLP de nouveaux-nés donne plus fréquemment des LB-1 que des CLP d'adultes montrant que la production des LB-1 par les précurseurs diminue avec l'âge, expliquant l'origine majoritairement fœtale des LB-1 (Dorshkind and Montecino-Rodriguez, 2007).

Pour supporter ce modèle, Montecino Rodriguez et coll ont identifié un nouveau précurseur Lin⁻ CD45^{-low} CD19⁺ dans le foie fœtal et la MO fœtale (Montecino-Rodriguez et al., 2006). Ces précurseurs possèdent le potentiel de se différencier préférentiellement en LB-1. Des expériences de transplantation *in vivo* ont confirmé que ces précurseurs se différencient en LB-1 dans la cavité péritonéale de la souris hôte. Leur existence a été ensuite confirmée par différents laboratoires (Esplin et al., 2009; Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012; Tung

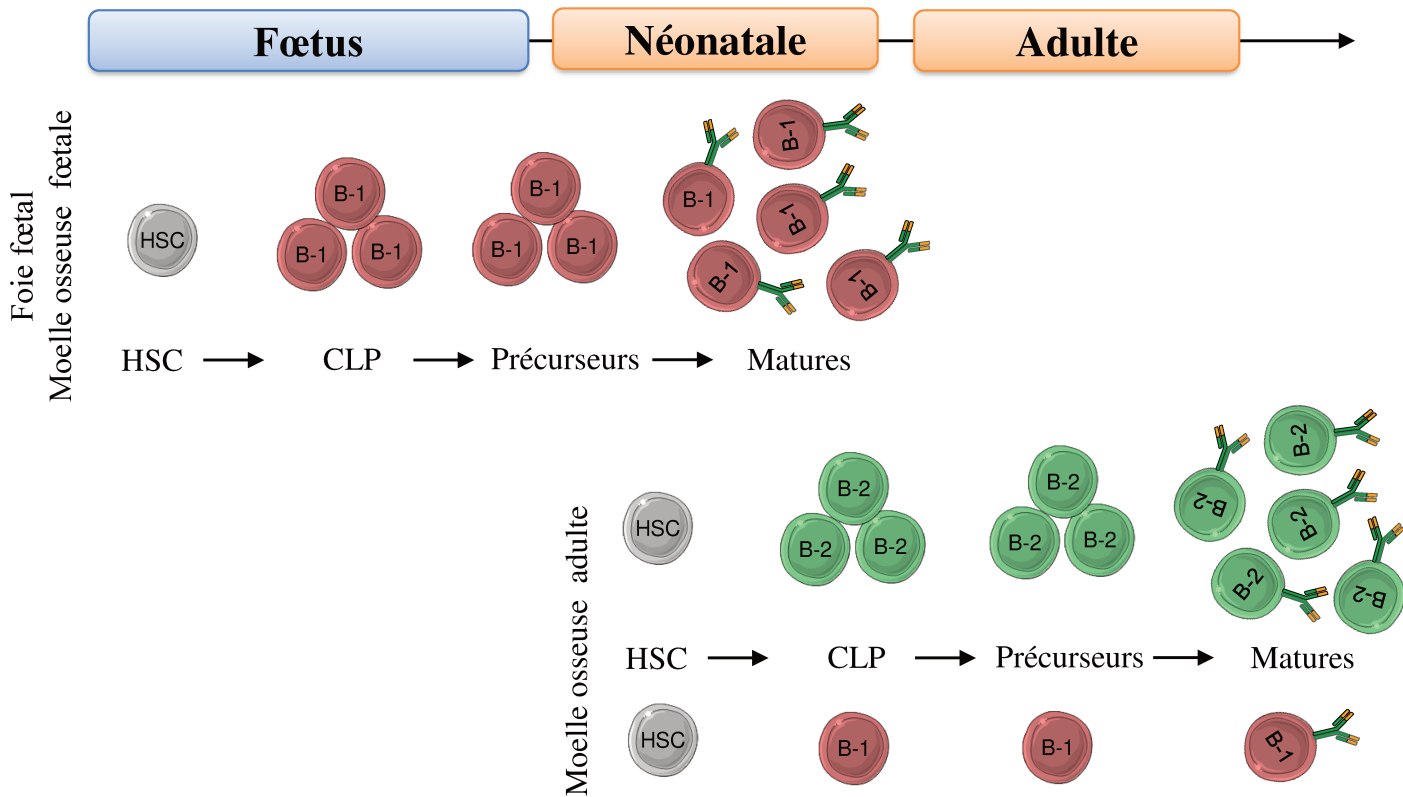


Figure 12 – Représentation schématique du « switch développemental » des lymphocytes B. D’après le modèle de développement en couche, la génération des LB-1 et des LB-2 se fait durant deux couches chevauchantes. Durant la première, qui débute dans le foie fœtal et la MO fœtale, les HSC génèrent les précurseurs des LB-1 desquels dérivent les LB-1 matures. Le nombre de précurseurs des LB-1 atteint son pic maximal vers le 17^{ème} jour de gestation puis diminue après la naissance. Durant la seconde couche, qui prend place dans la MO adulte, les précurseurs des LB-2 commencent à apparaître après la naissance et augmentent en nombre formant ainsi les LB-2 matures. La génération des LB-1 peut avoir lieu dans cette couche, mais son efficacité est très réduite par rapport à celle de la première couche. Adapté d’après *Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012*.

et al., 2006). L'apparition des précurseurs $\text{Lin}^- \text{CD45}^{\text{-low}} \text{CD19}^+$ des LB-1 débute dans le foie fœtal et la MO fœtale. Ils sont présents en grand nombre vers le 17^{ème} jour de gestation. Leur nombre diminue dans la MO post-natale. En revanche, les précurseurs $\text{Lin}^- \text{CD45}^+ \text{CD19}^-$ des LB-2 commencent à apparaître après la naissance et augmentent en nombre dans la MO post-natale (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2006, 2012) (**Figure 12**). Il a été proposé que la génération séquentielle tout d'abord des LB-1 suivie de celle des LB-2 est due à un « switch développemental » du stade fœtal au stade adulte (Hardy and Hayakawa, 1991).

Toutefois, ces deux modèles ne sont pas exclusifs. Les laboratoires de Baumgarth, Richardy et Hayawaka ont suggéré un troisième modèle de sélection nommé « *the two pathway model* » qui regroupe les deux modèles en couche et de sélection. Il suggère que les LB-1 qui se développent initialement à partir de précurseurs distincts, doivent toujours subir une sélection positive par les Ag du soi pour survivre et proliférer (Baumgarth, 2011; Hardy and Hayakawa, 2015).

Les LB-1 possèdent un répertoire antigénique plus restreint que celui des LB-2, et particulièrement marqué par l'utilisation de certains segments V_H tels que les segments V_{H11} et V_{H12} . Ceci est accompagné d'un faible taux d'insertion de nucléotides T durant les recombinaisons $V_H D J_H$ (Kantor, 1996; Kantor et al., 1997; Prohaska et al., 2018). Il est admis que les LB-1 représentent la source primaire de NIg, particulièrement de type M. Ces Ig, qui sont secrétées en absence d'une stimulation antigénique exogène, sont poly-réactives et faiblement auto-réactives. Elles forment la première ligne de défense contre les différentes infections. Ces Ig sont capables, malgré leur faible affinité, de neutraliser directement le virus ou la bactérie, de former des complexes immuns pour faciliter la phagocytose, ou bien de ralentir la réplication et la sévérité du pathogène jusqu'à la mise en place de la réponse adaptative (Baumgarth, 2011; Baumgarth et al., 2000; Ehrenstein and Notley, 2010). Les NIg jouent un rôle important dans la limitation de la disposition d'athérosclérose en reconnaissant et éliminant les lipoprotéines de basse densité oxydées responsables de cette pathologie (Shaw et al., 2000). D'autre part, et grâce à leur faible auto-réactivité, les NIg sont capables de se fixer sur les DAMPs favorisant leur élimination et assurant une prévention contre une réponse auto-immunitaire. La suppression des LB-1, dans des modèles de souris susceptibles de déclencher des maladies auto-immunes, aboutit à une aggravation des pathologies (Boes et al., 2000). Enfin, les LB-1 subissent une CSR préférentiellement vers l'isotype α dans le tube digestif. Les NIgA semblent jouer un rôle important dans la maintenance et la régulation de la flore commensale (Kaminski and Stavnezer, 2006; Kroese et al., 1996; Tarlinton et al., 1995).

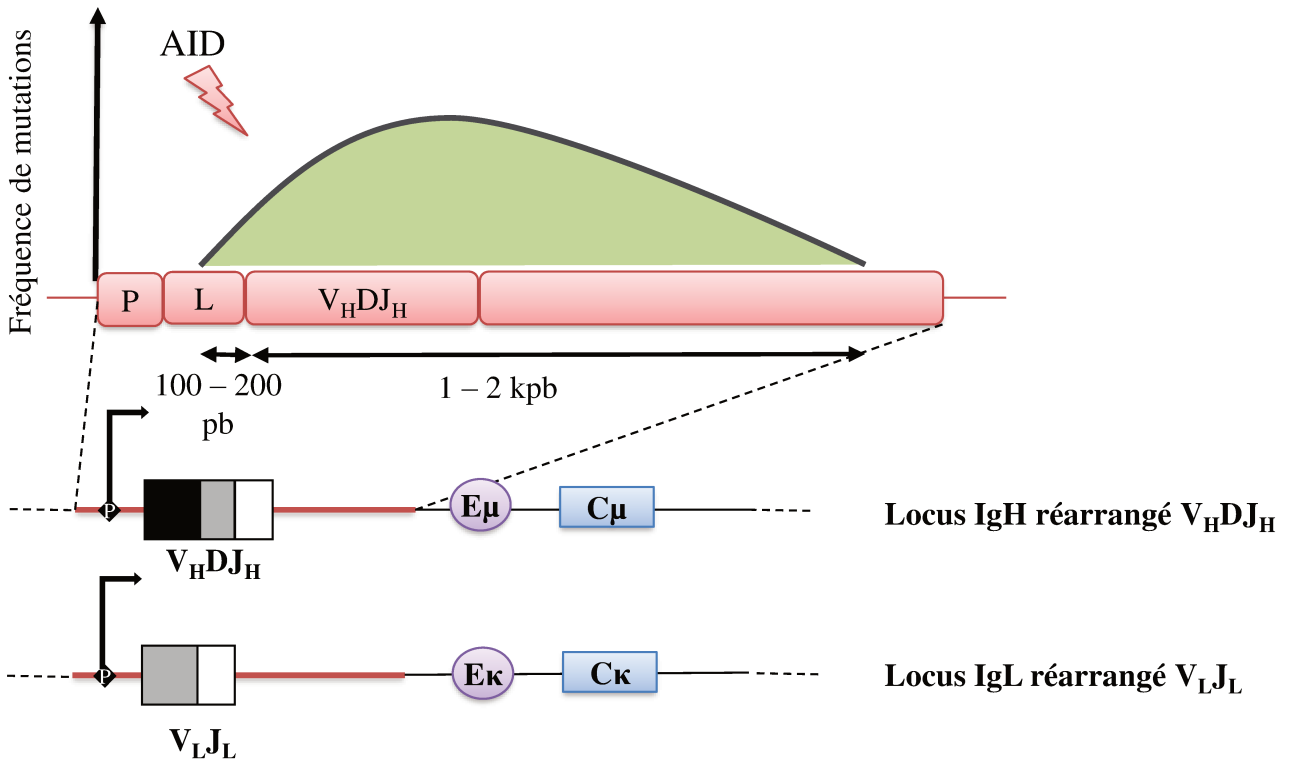


Figure 13 – Profil d’hypermutation induit par AID aux loci d’Ig.

Le profil et la fréquence de mutation au locus IgH et IgL sont indiqués sur ce schéma en vert. Ces mutations s’accumulent de 100 à 200 pb en amont du site d’initiation de la transcription et peuvent s’étendre jusqu’à environ 2 kb en aval de ce site. Les traits rouges représentent la zone de ciblage d’AID au locus IgH et IgL, sur l’exon VDJ et VJ respectivement. 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: Leader. Adapté d’après *Peled et al., 2008*.

Les LB-1 peuvent être placés à l'interface de l'immunité innée et adaptative. Leur rôle est important, d'une part en assurant une première ligne de défense contre les différents pathogènes avant la mise en place de la réponse adaptative, et d'autre part en contrôlant l'homéostasie tissulaire pour minimiser les risques de pathologies auto-immunes (Baumgarth, 2011). Au cours de ma thèse, j'ai principalement réalisé des études sur le rôle des activateurs transcriptionnels en 3' du locus IgH sur la maturation des LB-1. Ces travaux ont fait l'objet de 3 publications que je présenterai dans la partie **Résultats**.

I.2.3. Réarrangements secondaires : SHM et CSR

Les LB activés par l'Ag vont subir, durant leur maturation au sein du GC, deux mécanismes de réarrangements géniques dits secondaires : [1] la SHM qui consiste à introduire des mutations dans les régions variables codantes des chaînes lourdes et légères d'Ig afin d'augmenter leur affinité pour l'Ag ; [2] la CSR qui permet d'obtenir un autre isotype d'Ig que μ , en remplaçant le gène $C\mu$ par un des autres gènes constants, sans modification de la région variable. Bien que ces deux mécanismes ont des fonctions différentes, ils nécessitent tous les deux l'intervention de l'enzyme AID (AID pour *Activation Induced cytidine Deaminase*) (Larijani and Martin, 2012; Wang, 2013).

a) AID

La découverte de l'enzyme AID et son implication dans la SHM et la CSR a été réalisée par l'équipe d'Honjo en 1999. C'est une protéine de 26 kDa qui est codée par le gène *Aicda* (Muramatsu et al., 1999). Elle fait partie de la famille APOBEC (APOBEC pour *Apolipoprotein B RNA-Editing catalytic Component*), une famille d'enzymes d'édition d'ARN. Son expression est restreinte aux cellules B du GC. Sa délétion chez la souris ne perturbe pas le développement B mais bloque la CSR et la SHM (Muramatsu et al., 2000). Une inactivation du gène *Aicda*, chez l'homme, entraîne : une apparition du syndrome d'hyper IgM qui est marqué par une augmentation du taux d'IgM, l'absence de SHM dans les régions variables d'Ig, aucun isotype issu de la CSR, une déstructuration des GC et une forte susceptibilité aux infections bactériennes (Revy et al., 2000). Si AID est localisée principalement dans le cytoplasme, elle exerce son activité dans le noyau des cellules B activées.

En raison de son homologie avec la famille des APOBEC, il a été d'abord suggéré qu'AID agisse sur l'ARN: c'était le modèle d'édition de l'ARN (Chaudhuri et al., 2003; Muramatsu et al., 2000). Cependant, cette hypothèse s'est révélée inexacte. L'induction des DSB par AID est expliquée par le modèle de la désamination de l'ADN (Chaudhuri et al., 2003;

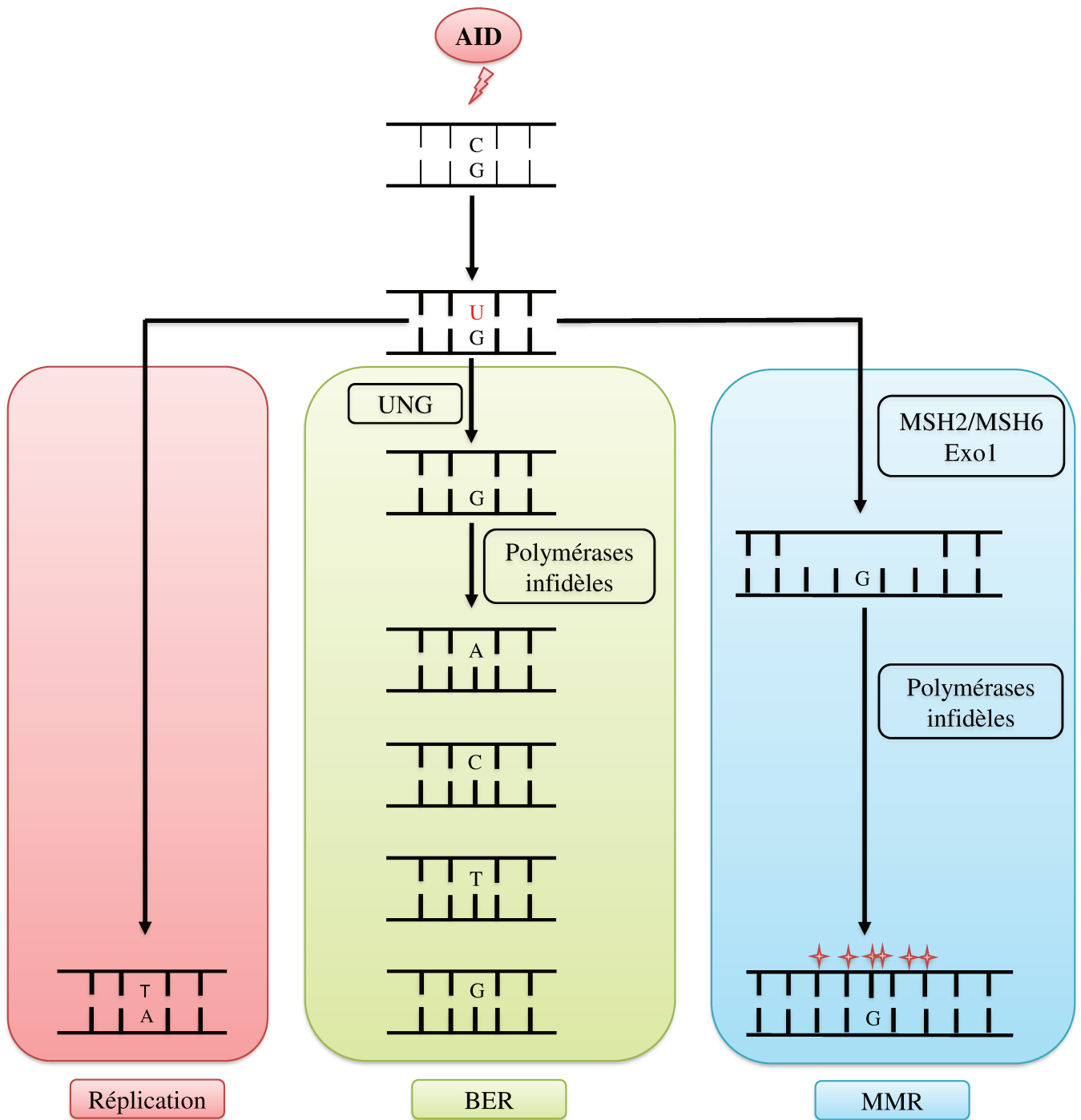


Figure 14 – Prise en charge des mésappariements générés lors de l’hypermutation somatique (SHM).

AID initie les SHM en déaminant des cytidines sur un brin d’ADN. Le mésappariement dU/dG créé par AID peut être ensuite pris en charge par des voies différentes. L’ADN peut être répliqué sans tenir compte du mésappariement (encadré rouge). L’uracile peut être excisé par UNG et le site abasique généré est réparé par des polymérase infidèle de la voie BER (BER pour *Base Excision Repair*), qui vont insérer aléatoirement une des quatre bases à la place du dU (encadré vert). Enfin, le mésappariement peut être pris en charge par la voie MMR (MMR pour *MisMatch Repair*), qui va l’exciser ainsi que les bases environnantes. Le brin excisé sera resynthétisé par des polymérase infidèle en insérant des nucléotides aléatoires (encadré bleu). Adapté d’après Peled et al., 2008.

Dickerson et al., 2003; Pham et al., 2003). D'un point de vue mécanistique, AID induit une désamination d'une Cytosine (C) en Uracile (U) sur des sites particuliers dans l'ADN appelés « points chauds » ou « *hotspots* » (Pham et al., 2003). Ces sites possèdent le WRCY (W = weak = dA/dT, R = purine = dA/dG et Y = pyrimidine = dT/dC). Le mésappariement dU:dG issu de l'action d'AID forme la première étape commune entre la SHM et la CSR. Ce mésappariement est ensuite pris en charge par différentes voies de réparation de l'ADN dont la conséquence va être la génération de mutations ponctuelles dans les régions variables d'Ig (SHM) ou des DSB dans les régions répétitives « *switches* » au locus IgH (CSR) (Alt et al., 2013; Di Noia and Neuberger, 2007). Une étude biochimique a démontré que la préférence d'AID pour l'ADN plutôt que l'ARN est due à la présence du groupement hydroxyle en position β' sur le sucre du désoxy-ribonucléotide qui est nécessaire pour la désamination (Nabel et al., 2013).

b) SHM

La SHM consiste en l'introduction de mutations ponctuelles (de l'ordre de 10 mutations pour 1000 pb), dans la région variable des chaînes lourdes et légères d'Ig afin d'accroître l'affinité du BCR à l'Ag. Elle se produit lors de l'activation du BCR par l'Ag et les mutations s'accumulent dans les régions hypervariables (CDRs) (**Figure 13**) (Di Noia and Neuberger, 2007; Peled et al., 2008).

Sur le plan mécanistique, la SHM est initiée par une augmentation de la transcription dans les cellules B activées, ce qui rend la région d'ADN cible accessible en formant des petites boucles de transcription avec l'ADN simple brin (ADNsb) (Chaudhuri et al., 2003; Pham et al., 2003; Ramiro et al., 2003; Ronai et al., 2007). En effet, lorsque les deux brins d'ADN sont dissociés, la protéine RPA (RPA pour *Replication Associated Protein A*) va se fixer sur l'ADNsb et stabiliser les structures formées. Une fois AID phosphorylée par la protéine PKA (PKA pour *c-AMP dependent Protein Kinase A*), sa sérine 38 va interagir avec la RPA et remplir son rôle de désamination (Basu et al., 2005; Chaudhuri et al., 2004). Il a été démontré que la phosphorylation d'AID est indispensable pour le processus de SHM (McBride et al., 2008). Après avoir désaminé, AID va se détacher et RPA va rester liée à l'ADNsb pendant la mise en place de la machinerie de réparation de l'ADN (Chaudhuri et al., 2004).

Le mésappariement de base induit par AID peut être pris en charge par différentes voies de réparation (**Figure 14**) (Peled et al., 2008) :

1. L'ADN contenant le mésappariement peut être simplement répliqué ; le dU étant ignoré par la polymérase et considéré comme un dT. Il y a ainsi une mutation de type transition dC vers dT sur le brin désaminé et donc dG vers dA sur le brin complémentaire.

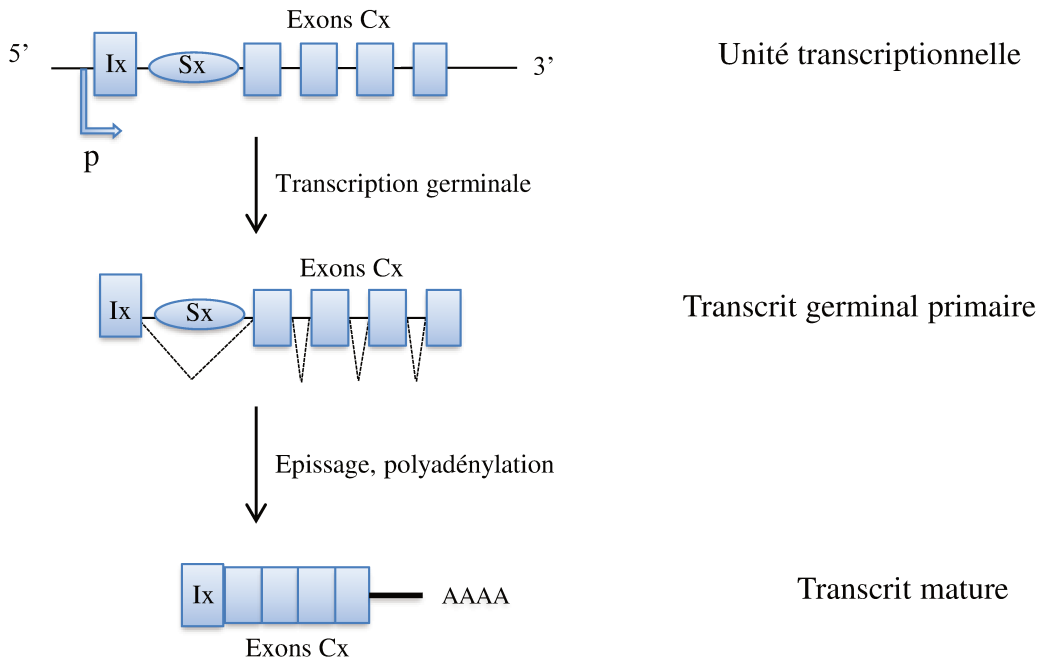


Figure 15 – Génération des transcrits germinaux dans les régions constantes.

Chacun des gènes constants forme une unité transcriptionnelle indépendante qui est constituée d'un promoteur p, d'une séquence I, d'une région S et des exons C_x . Le transcrit mature non codant est obtenu après épissage et polyadénylation du transcrit primaire. Adapté d'après *Chaudhuri and Alt, 2004*.

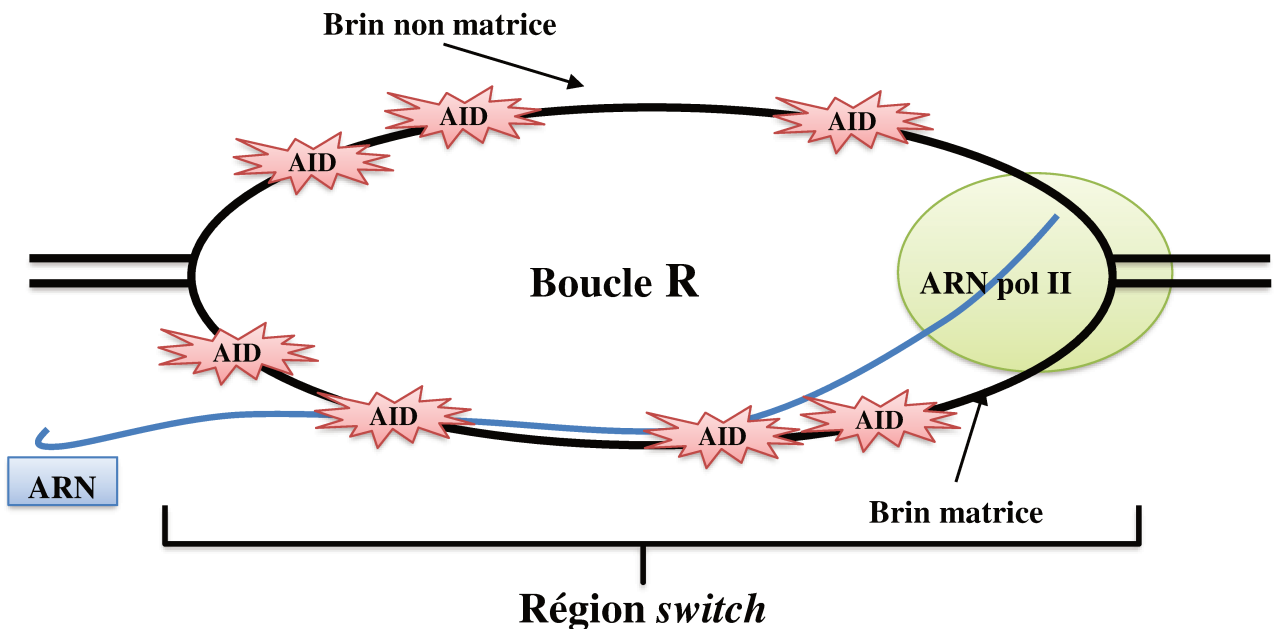


Figure 16 – Représentation schématique d'une R-Loop.

L'ARN pol II est représentée en vert, l'ARN néo synthétisé est représenté en bleu et les sites d'attaque d'AID sont représentés par des étoiles rouges. La transcription germinale des régions S entraîne la formation de la boucle R (ou R-loop). Dans cette structure, l'ARN néo-synthétisé s'hybride avec le brin d'ADN matrice laissant le brin opposé non apparié exposé sous forme simple brin afin de faciliter l'activité d'AID. Adapté d'après *Pavri, 2017*.

2. Le dU induit par AID peut être excisé par l'Uracile Glycosylase (UNG pour *Uracil DNA-Glycosylase*), créant ainsi un site abasique. Ce dernier est ensuite pris en charge par la voie BER (BER pour *Base Excision Repair*) qui met en place une machinerie de polymérases infidèles, qui vont introduire, d'une manière aléatoire, une base à la place du dU, entraînant alors des mutations de type transversion ou transition (Pérez-Durán et al., 2012).
3. Le mésappariement peut être reconnu par la voie MMR (MMR pour *MisMatch Repair*), qui fait intervenir l'hétérodimère MSH2/MSH6 (MSH pour *MutS Homologue 2 et 6*), puis le complexe protéique MLH1/PMS2 (MLH1 pour *MutL Homologue 1*; PMS2 pour *Post Meiotic Segregation 2*) qui vont recruter l'exonucléase Exo1. Cette dernière va exciser le mésappariement et potentiellement les bases environnantes sur une longueur allant d'une dizaine de bases (*short patch MMR*) à plusieurs kilobases (*long patch MMR*) (Iyer et al., 2006). Des polymérases infidèles, notamment Pol η , vont ensuite intervenir et synthétiser le brin excisé, aboutissant à des mutations de type transition ou transversion (Delbos et al., 2007).

c) CSR

La recombinaison isotypique est un mécanisme qui permet d'exprimer un isotype d'Ig autre que μ , modifiant ainsi la fonction effectrice du BCR tout en gardant sa spécificité antigénique (Chaudhuri et al., 2007). Ce processus se déroule dans des régions spécifiques, nommées régions « *switches* » (S) (une région donneuse qui est le plus souvent S μ et une région S x dite acceptrice ; x correspondant aux autres isotypes), situées en amont de chaque gène constant à l'exception de C δ . Elles sont caractérisées par leurs séquences riches en G/C, dont la taille varie entre 1kb et 10kb. Elles sont la cible des mutations à l'origine des DSB de la CSR (Dunnick et al., 1993).

Tout comme pour la SHM, la transcription dans les régions S est un prérequis essentiel à la CSR. Il s'agit de la transcription germinale qui n'aboutit pas à la production d'une protéine mais qui a pour but de rendre la région accessible (Chaudhuri and Alt, 2004; Manis et al., 2002; Nambu et al., 2003). En effet, chacun des gènes codant les différents isotypes constitue une unité transcriptionnelle indépendante possédant, dans l'ordre, un promoteur, un exon « I » (I pour *Intervening*), une région S et les exons C H (Chaudhuri and Alt, 2004). Les transcrits primaires ainsi générés seront épissés pour donner des transcrits germinaux de type IxCx (**Figure 15**) (Chaudhuri and Alt, 2004). La transcription de l'exon I μ se produit d'une façon constitutive. Par contre, celle des exons I x nécessite une stimulation adéquate (Li et al., 1994; Matthews et al., 2014). Ainsi, le choix de l'isotype synthétisé dépend de l'environnement

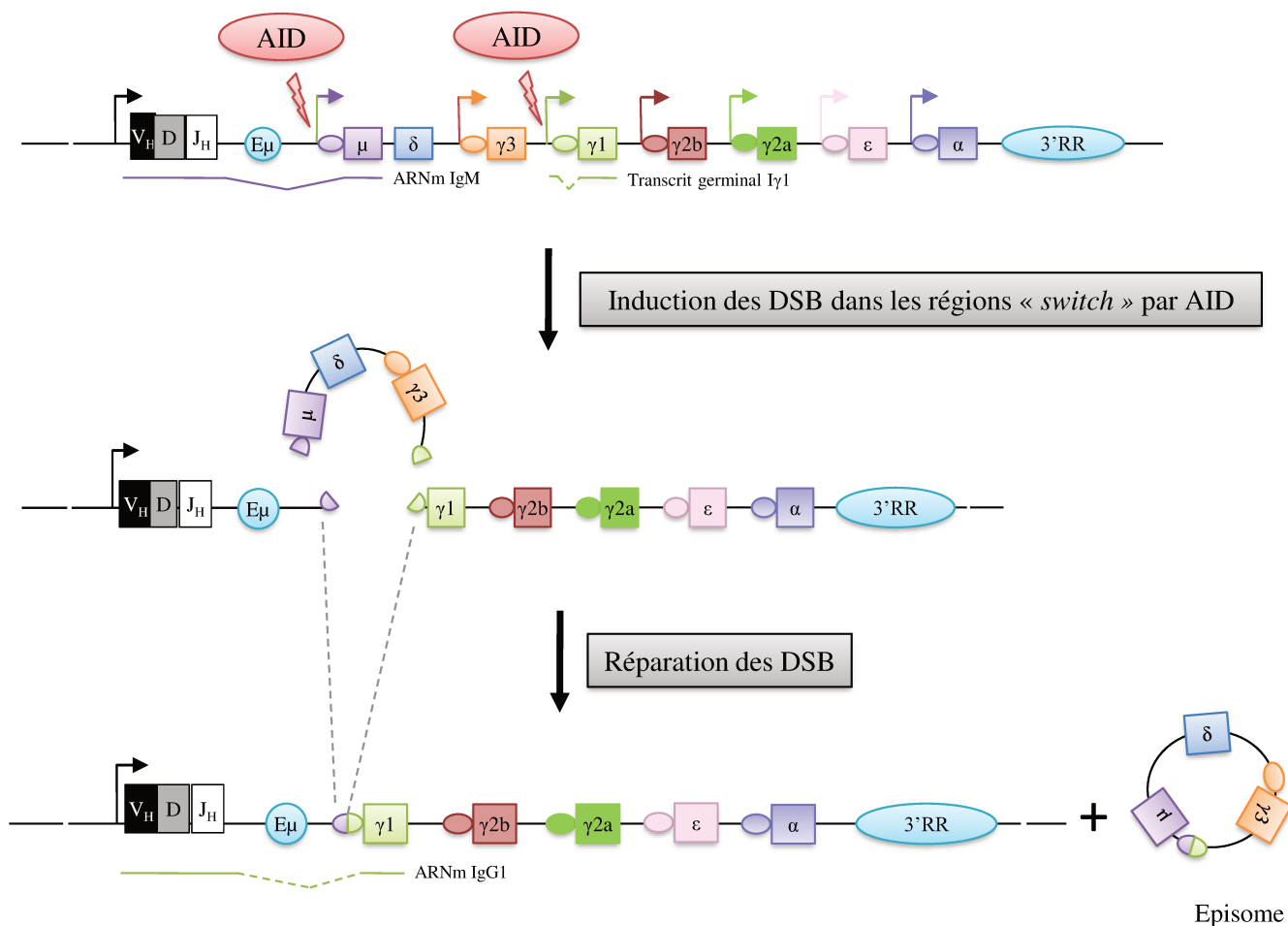


Figure 17 – Représentation schématique du mécanisme de CSR.

Les rectangles représentent les gènes codant les parties variables et constantes du locus IgH, les ovales les régions S et les cercles bleus clairs les « enhancers » du locus. L'enzyme AID va induire des DSB dans la région S donneuse (S_μ) et acceptrice (ici S_{γ1}). Les deux régions S sont ensuite ligaturées. L'ADN entre les deux est circularisé puis éliminé sous forme d'épisome. Après la CSR, un ARNm est initié à partir du promoteur V (ARNm IgG1), permettant la production d'une IgG1. Adapté d'après *Chaudhuri and Alt, 2004*.

cytokinique où les cellules B sont exposées. Par exemple, la stimulation des cellules avec du LPS va activer la transcription d'I γ 3 et I γ 2b et par suite la CSR vers IgG3 et IgG2b. Une stimulation combinée de LPS et d'interleukine 4 (IL-4) favorise la transcription d'I γ 1 et d'I ϵ et donc la CSR vers IgG1 et IgE. Enfin, la stimulation des LB par du LPS et du TGF- β (TGF- β pour *Transforming Growth Factor*) activera la transcription d'I α et donc la CSR vers IgA. L'importance de la transcription pour l'efficacité du « *switch* » a été démontrée par plusieurs études. La délétion de l'exon I x (autres que I μ) chez les souris, aboutit à une perte des transcrits germinaux du gène constant x, suivi d'un arrêt de la CSR vers l'isotype x (Bottaro et al., 1994; Zhang et al., 1993).

La transcription germinale des régions « *switch* » va aboutir à la formation d'une structure particulière de l'ADN. C'est la boucle R (ou *R-loop*). Elle a été démontrée *in vitro* par l'équipe de Lieber (Yu et al., 2003). Dans celle-ci, l'ARN néo-synthétisé s'hybride avec le brin d'ADN matrice laissant le brin opposé non apparié exposé sous forme simple brin afin d'améliorer l'activité d'AID (**Figure 16**) (Chaudhuri and Alt, 2004; Pavri, 2017). Des études ont démontré que l'efficacité d'une région S à induire le « *switch* » dépend de sa capacité à former des R-Loops. Ces structures constituent donc un élément important dans la régulation de la machinerie de la CSR (Zhang et al., 2014). D'un point de vue moléculaire, la CSR peut être divisée en deux étapes : [1] l'induction des DSB suite à l'action d'AID dans les régions S; [2] la réparation des DSB par la ligation des deux régions S d'intérêts entre elles permettant de remplacer l'exon C μ par les exons C x et donc l'expression d'un autre isotype d'Ig. L'ADN situé entre ces deux régions sera excisé et circularisé sous forme d'épisome afin d'être éliminé (**Figure 17**) (Xu et al., 2012).

L'enzyme AID va induire la désamination des cytosines dans les deux régions S donneuse et acceptrice. D'une façon similaire à la SHM, le mésappariement de base dU:dG sera excisé par UNG. Le site abasique créé sera ensuite pris en charge par les voies du BER et MMR, ce qui conduira à l'induction de cassures simples brins (SSB pour *Single Strand Break*). Du fait de la grande densité en GC (cibles d'AID) présente dans les régions S, de multiples SSB peuvent avoir lieu simultanément sur les deux brins d'ADN, pour engendrer à des DSB (Hackney et al., 2009; Meng et al., 2015). Les DSB sont ensuite prises en charge par la voie de réponse aux dommages de l'ADN (DDR pour *DNA Damage Repair pathway*) (**Figure 18**). Ainsi, le complexe protéique MRN (MRE11-RAD50-NBS1) va se fixer sur les DSB et recruter la protéine kinase ATM (ATM pour *Ataxia-Telangiectasia Mutated*). Cette dernière va phosphoryler NBS1 dans le complexe MRN et recruter d'autres protéines (facilitant la stabilisation des DSB) dont notamment 53BP1 (53BP1 pour *p53 Binding Protein 1*) et l'histone

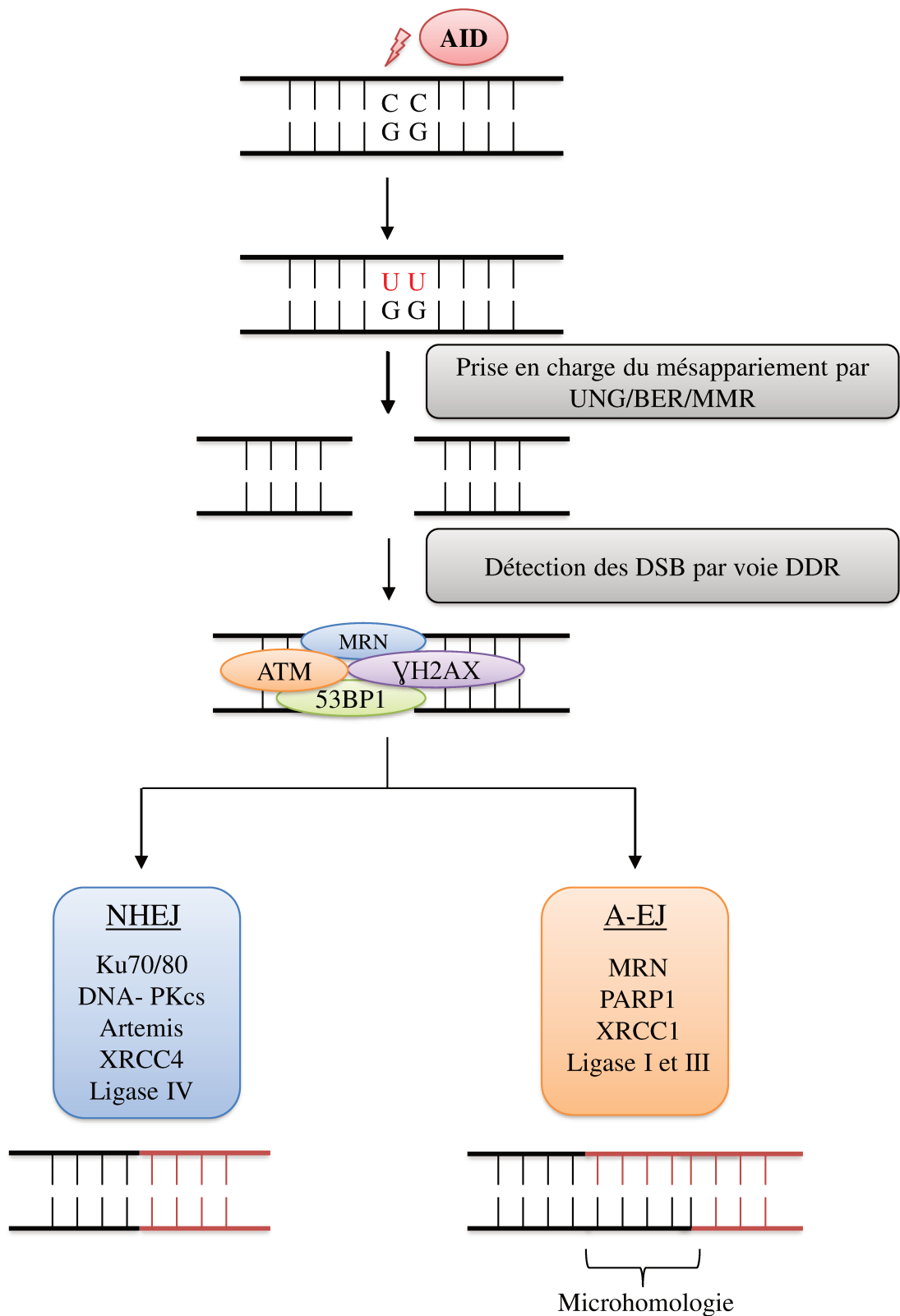


Figure 18 – Voies de réparation de l’ADN impliquées dans la CSR.

Le mésappariement induit par AID est pris en charge par les voies BER et MMR générant ainsi des DSB. Ces dernières sont reconnues et stabilisées par la voie du DDR afin de permettre le recrutement des voies de réparation du NHEJ (encadré bleu) ou de l’A-EJ (encadré orange). Lors du NHEJ, les extrémités sont prises en charge par Ku70, Ku80 et DNA-PKcs et ligaturées ensuite par XRCC4 et la DNA ligase IV. La voie de l’A-EJ fait intervenir les protéines XRCC1 et PARP1. La ligature est assurée par les DNA ligases I ou III.

H2AX (Dinkelmann et al., 2009; Hwang et al., 2015; Petersen et al., 2001). La délétion des protéines H2AX ou 53BP1 entraîne une baisse de la CSR, une augmentation de la fréquence des DSB et des translocations génomiques (Franco et al., 2006; Manis et al., 2004; Xu et al., 2012).

Enfin, la réparation des DSB est assurée par les facteurs de la voie NHEJ (*cf* chapitre I, I.2.1.1, les réarrangements $V_H D J_H$) (Boboila et al., 2012). Cependant, si la déficience pour l'un des facteurs impliqués dans cette voie diminue l'efficacité de la CSR, elle ne l'abolit pas complètement. L'existence d'une CSR résiduelle (20 à 40% du taux normal) suggère que la voie NHEJ peut être suppléée par une seconde voie alternative nommée A-EJ (A-EJ pour *Alternative End Joining*) (Matthews et al., 2014; Vaidyanathan et al., 2014; Yan et al., 2007). Les protéines présentes dans la voie l'A-EJ sont encore mal connues. Il semblerait que le complexe MRN, PARP-1 (PARP-1 pour *poly ADP-ribose polymerase 1*), XRCC1 ainsi que les ligases I et III sont impliquées dans cette voie (Boboila et al., 2012; Hwang et al., 2015). La voie A-EJ utilise principalement des microhomologies de séquences entre les régions S afin de les recombiner. Ainsi, l'analyse des jonctions S_μ - S_x permet dans une certaine mesure, d'identifier la voie de réparation utilisée. Les jonctions générées par la voie NHEJ sont principalement des jonctions directes (une liaison franche des deux régions S) ou des jonctions à courtes microhomologies (présence de quelques bases (≤ 5 pb) homologues aux deux régions S). En revanche, l'implication de la voie A-EJ se traduit par la présence majoritaire de jonctions à longues microhomologies (présence de plusieurs bases (>5 pb) homologues aux deux régions S) (Stavnezer and Schrader, 2014; Stavnezer et al., 2010; Yan et al., 2007).

L'induction des cassures dans l'ADN, et leur réparation par des voies plus ou moins fidèles, sont des points communs à l'ensemble des événements géniques qui se déroulent tout au long du développement B (réarrangements $V_H D J_H$ au stade précoce ou CSR et SHM au stade tardif). La conséquence de toutes ces cassures est de transformer le locus IgH en « *hot-spot* » pour différentes translocations potentiellement oncogéniques. Afin de les éviter, une régulation fine et stricte de ces événements est assurée par plusieurs éléments *cis*-régulateurs du locus. Je vais les détailler dans le chapitre suivant.

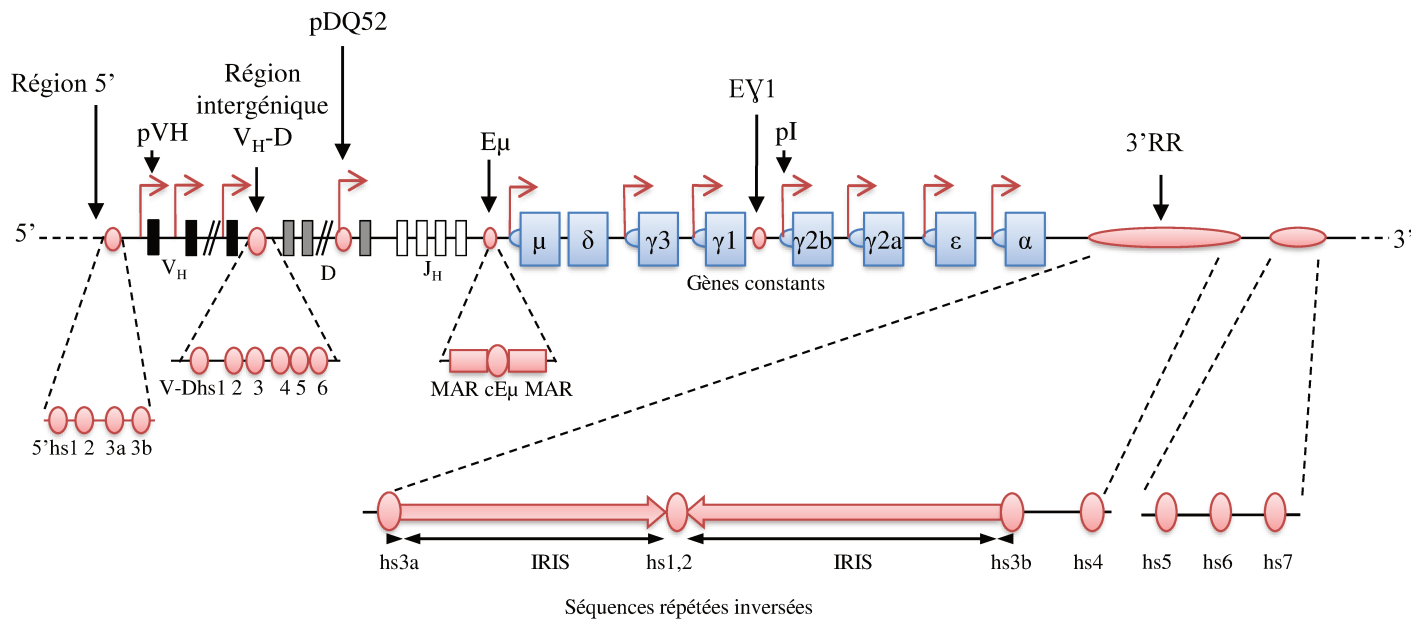


Figure 19 – Représentation schématique du locus IgH et de ses éléments *cis*-régulateurs. La configuration germinale du locus IgH est représentée sur la ligne supérieure. Les éléments *cis*-régulateurs sont représentés en rouge sur la ligne supérieure, et détaillés sur la ligne inférieure. Les sites hs sont représentés par des cercles, les MARs par des rectangles et les séquences répétées inversées (IRIS) par des flèches. Le schéma n'est pas à l'échelle.

Chapitre II. La régulation des événements géniques au locus IgH

Eléments *cis*-régulateurs et accessibilité du locus

Durant la lymphopoïèse B, les différentes recombinaisons géniques sont soumises à une régulation délicate, à la fois dans l'espace et dans le temps. Elle fait intervenir divers éléments *cis*-régulateurs répartis tout au long des loci d'Ig et en particulier au locus IgH (**Figure 19**) (Perlot and Alt, 2008). Ces éléments vont assurer la coordination de différents mécanismes (tels que la régulation de la transcription, la condensation de la chromatine, la localisation des loci au sein du noyau), permettant de modifier l'accessibilité des différentes régions cibles des recombinaisons. Dans ce chapitre, je décrirai les éléments *cis*-régulateurs du locus IgH en me focalisant particulièrement sur la 3'RR qui constitue le cœur de mon sujet de thèse.

II.1. Les promoteurs

Le locus IgH comprend différents promoteurs : les promoteurs des régions V_H (pV_H), le promoteur DQ52 (PDQ52) et les promoteurs des régions constantes (pI) (**Figure 19**). Bien que la synthèse d'une Ig réarrangée ne nécessite qu'un seul promoteur localisé en amont du segment V_H , ces différents promoteurs sont activés séquentiellement au cours du développement lymphocytaire B et produisent des transcrits ne codant aucune protéine, nommés transcrits germinaux stériles. Ces derniers sont associés au déclenchement des différents événements de recombinaisons géniques.

II.1.1. Le promoteur DQ52

A l'exception du segment DQ52, les segments D du locus IgH sont tous précédés d'un promoteur bidirectionnel inactif en conformation germinale qui n'est activé qu'après les réarrangements D- J_H pour générer des transcrits sens et anti-sens (Alessandrini and Desiderio, 1991; Chakraborty et al., 2007; Li et al., 1996). DQ52 est le segment D préférentiellement utilisé lors des réarrangements D- J_H (Tsukada et al., 1990). C'est le segment le plus proximal par rapport aux gènes J_H et le seul à avoir un promoteur (PDQ52) actif bien avant la survenue des premiers réarrangements D- J_H . Il assure ainsi la production des transcrits germinaux sens nommés μ_0 , allant du segment DQ52 au gène $C\mu$. Ils sont nécessaires pour l'accessibilité des recombinaisons aux régions D et J_H (Thompson et al., 1995). Cette activation est également un indicateur précoce de l'engagement dans la lignée B. Suite à la recombinaison des segments D-

J_H , une transcription dans les deux sens est initiée à partir du promoteur du segment D réarrangé permettant la synthèse d'un transcrit DJ_H (Alessandrini and Desiderio, 1991; Chakraborty et al., 2007).

Il s'agit d'un promoteur-activateur synergique de $E\mu$ (Kottmann et al., 1994). Sa délétion entraîne une altération de l'utilisation de certains segments J_H mais n'a pas d'effet sur le réarrangement DJ_H et la transcription $\mu 0$. Une présence de transcrits $\mu 0$ -like suggère l'activité d'un élément *cis*-régulateur redondant (Nitschke et al., 2001).

II.1.2. Les promoteurs V_H

Chacun des segments V_H est transcrit à partir de son propre promoteur. Ces derniers sont localisés dans une région d'environ 250 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Ils possèdent une TATA box, un élément initiateur (Inr) et une séquence octamérique très conservée en amont de la TATA box : ATGCAAAT (cor et al., 1997; Parslow et al., 1984). Ces séquences sont reconnues par les facteurs de transcription Oct-1 (ubiquitaire) et Oct-2 (spécifique de la lignée lymphocytaire B) et sont essentielles à l'activation de la transcription des segments V_H (Pfisterer et al., 1994; Pierani et al., 1990).

Contrairement à l'octamère présent dans tous les promoteurs V_H , une séquence appelée DICE (DICE pour *Downstream Immunoglobulin Control Elements*) a été également identifiée. Elle a été associée le plus souvent aux promoteurs des segments V_H de la famille J558, qui correspondent aux promoteurs les plus actifs (Roy et al., 2011; Tantin et al., 2004). De nouveaux éléments nommés PAIR (PAIR pour *Pax-5 Activated Intergenic Repeat*) ont été identifiés dans les promoteurs des segments V_H distaux. Ils peuvent lier plusieurs facteurs tels que Pax-5, E2A et CTCF et participent à la régulation des réarrangements de V_H vers DJ_H (Ebert et al., 2011). Après le réarrangement D- J_H , ces promoteurs seront activés. Ils joueront un rôle important dans la production des transcrits germinaux sens et anti-sens V_H afin de faciliter leur accessibilité et les réarrangements V_H - DJ_H . Ils participent également dans la transcription de l'exon V_HDJ_H précédemment réarrangé pour assurer l'expression de la chaîne lourde tout au long du développement B (Yancopoulos and Alt, 1985).

II.1.3. Les promoteurs I

A l'exception de $C\delta$, les promoteurs I sont localisés en amont de chaque gène des régions constantes des chaînes lourdes d'Ig (**Figure 19**) (*cf* chapitre I, I.2.3.c, CSR). Leur transcription est indispensable à la CSR afin de rendre les régions d'intérêts accessibles pour l'action d'AID et l'induction des DSB.

II.2. Les activateurs transcriptionnels

Un activateur transcriptionnel, aussi appelé « *enhancer* », est 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. On distingue deux activateurs transcriptionnels majeurs au sein du locus IgH (**Figure 19**) : l'activateur intronique $E\mu$, localisé entre les segments J_H et le gène $C\mu$, et la 3'RR localisée en aval de $C\alpha$ et qui a fait l'objet des études effectuées durant ma thèse.

II.2.1. La région intronique $E\mu$

L'activateur intronique $E\mu$ fut le premier « *enhancer* » découvert au locus IgH (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983). Il est situé dans l'intron entre le dernier segment J_H (J_{H4}) et le gène constant $C\mu$. Il est composé d'un élément central de 220 pb appelé « core $E\mu$ » ($cE\mu$) et flanqué par 2 régions d'attachement à la matrice nucléaire appelées « $MARsE\mu$ » (MAR pour *matrix attachment regions*) de 310 et 350 pb.

Le $cE\mu$ comporte de nombreux sites de fixation pour des protéines activatrices ou inhibitrices de transcription. En partant de 5' en 3', on distingue un site C/EBP (C/EBP pour *Ccaat-Enhancer Binding Proteins*), $\mu E1$, $\mu E5$, $\mu E2$, μA , $\mu E3$, $\mu E4$ et une séquence octamérique similaire à celle située dans les segments V_H (Ernst and Smale, 1995). Les éléments $\mu E4$ et $\mu E5$ confèrent à $E\mu$ sa spécificité cellulaire vis-à-vis des protéines activatrices ou inhibitrices se fixant dessus. En effet, l'activation d' $E\mu$ au sein des lignées lymphoïdes, est assurée par la fixation des protéines activatrices de la famille E2A au cours des réarrangements V_HDJ_H . En revanche, dans les lignées non lymphoïdes, la fixation de la protéine inhibitrice ZEB sur ces mêmes sites entraîne la répression de l'activité d' $E\mu$ (Genetta et al., 1994).

Les MARs sont de courtes séquences d'ADN riches en bases A/T ou G/C. Leur rôle exact demeure mal défini. On distingue deux types de MARs : les MARs dites constitutives, liées de façon permanente à la matrice nucléaire et les MARs dites facultatives, telles que celles encadrant $cE\mu$ ($MARsE\mu$), associées de façon réversible à la matrice nucléaire en réponse à des facteurs tissus spécifiques. Dans les tissus non B, les MARs sont liés à des facteurs répresseurs. Par contre, dans les LB, elles s'activent par la fixation du facteur de transcription BRIGHT (BRIGHT pour *B-cell Regulator of IgH Transcription*) (Lin et al., 2007).

L'activité d' $E\mu$ semble être spécifique du stade pro-B. L'insertion d' $E\mu$ au locus κ aboutit à des réarrangements $V\kappa J\kappa$ prématurés au stade pro-B (alors que ces réarrangements se produisent normalement au stade pré-B) (Inlay et al., 2006). $E\mu$ serait donc impliqué dans le déroulement séquentiel des recombinaisons V_HDJ_H (locus IgH avant IgL) en régulant

l'accessibilité du locus aux recombinaisons. La délétion totale ou partielle d' $E\mu$ et de ses MARs, dans des lignées cellulaires ou dans des souris *knock-out* (KO), dont certaines ont été générées au laboratoire, ont permis d'élucider le rôle d' $E\mu$ (Afshar et al., 2006; Chen et al., 1993; Marquet et al., 2014; Perlot et al., 2005; Serwe and Sablitzky, 1993). Sa délétion entraîne une diminution des réarrangements précoces D-J_H et, par conséquent, une forte perturbation des recombinaisons V_H-DJ_H. Ceci est dû à une inhibition des transcrits germinaux $\mu 0$ et de la transcription anti-sens des régions D et J_H précédant les réarrangements D-J_H. En revanche, cette délétion n'a pas d'effet notable sur les transcrits germinaux V_H sens et anti-sens (Afshar et al., 2006; Bolland et al., 2007; Perlot et al., 2005). Un modèle de souris KO avec une délétion de la totalité de la région $E\mu$ (modèle $E\mu$ *Full Length* ou $E\mu$ FL KO) a été élaboré au laboratoire (Marquet et al., 2014). Les expériences réalisées sur ces souris montrent (en accord avec la littérature) une perturbation des recombinaisons V_HDJ_H, un blocage incomplet du développement B au stade pro-B accompagné d'une baisse du nombre de LB matures avec une altération de la répartition des sous populations lymphocytaires B. Aux stades suivants, B immature et transitionnel, la diminution de l'expression du BCR modifie le destin des populations périphériques. Ceci pourrait s'expliquer par la diminution de l'expression de la chaîne lourde au stade pré-B suite à la délétion de la région $E\mu$. Aux stades B immatures et transitionnels, la diminution de l'expression du BCR modifie la force de signal reçu et donc le destin des populations périphériques. Cependant, au stade B mature, la délétion d' $E\mu$ n'a aucun effet ni sur l'expression du BCR, ni sur les mécanismes de SHM et CSR (Li et al., 2010; Perlot et al., 2005).

L'ensemble de ces études suggère qu' $E\mu$ est l'élément *cis*-régulateur indispensable au bon déroulement des étapes du développement B précoce, par sa régulation des réarrangements V_HDJ_H ainsi que par l'expression des chaînes lourdes d'Ig, depuis le stade pro-B jusqu'aux stades B immatures et transitionnels (Marquet et al., 2014; Peng and Eckhardt, 2013).

II.2.2. La région régulatrice en 3'

La région présentée dans cette partie constitue le cœur des études menées lors de mes trois années de thèse. Je détaillerai les caractéristiques essentielles de cette région et ses fonctions (Pinaud et al., 2011).

a. Découverte

L'« *enhancer* » intronique $E\mu$ a longtemps été considéré comme le régulateur majeur au locus IgH. Cependant, des études réalisées sur des lignées cellulaires ayant la délétion d' $E\mu$ ont montré que celles-ci étaient toujours capables d'exprimer des Ig (Wabl and Burrows, 1984;

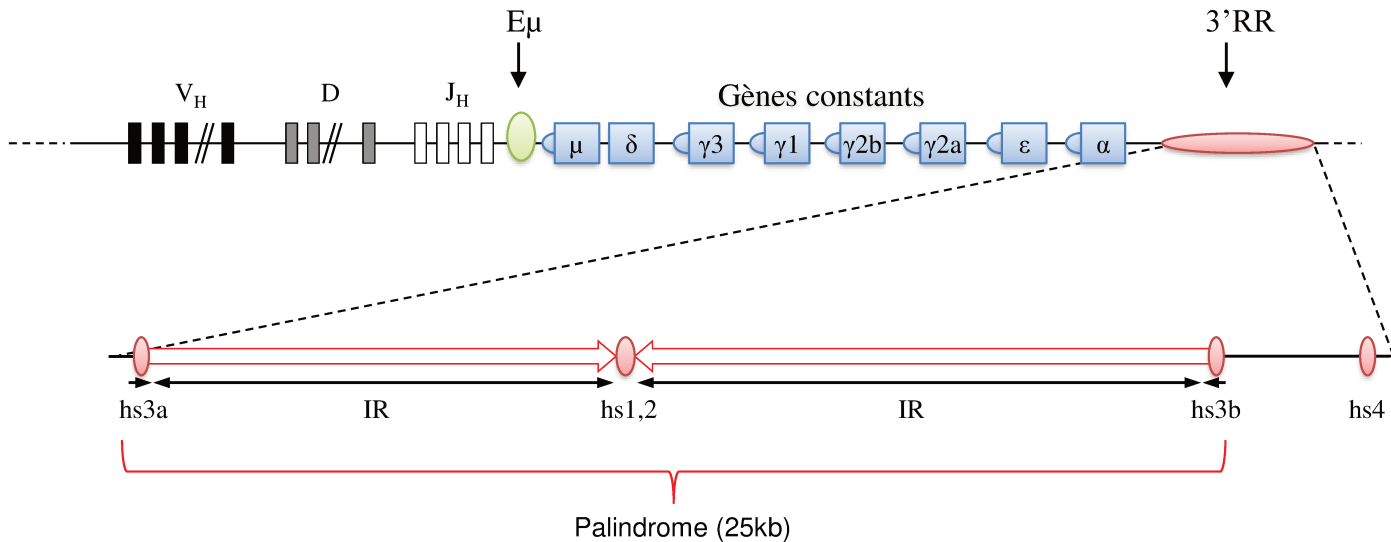


Figure 20 – Représentation schématique de la structure de la 3'RR.

Les 3 premiers activateurs transcriptionnels (hs3a, hs1,2 et hs3b) avec les séquences répétées inversées (IR) constituent le palindrome. hs1,2 est son centre de symétrie. hs3a et hs3b ont 97% d'homologie mais sont en orientation inverse. hs4 est en dehors du palindrome et forme la limite de cette structure.

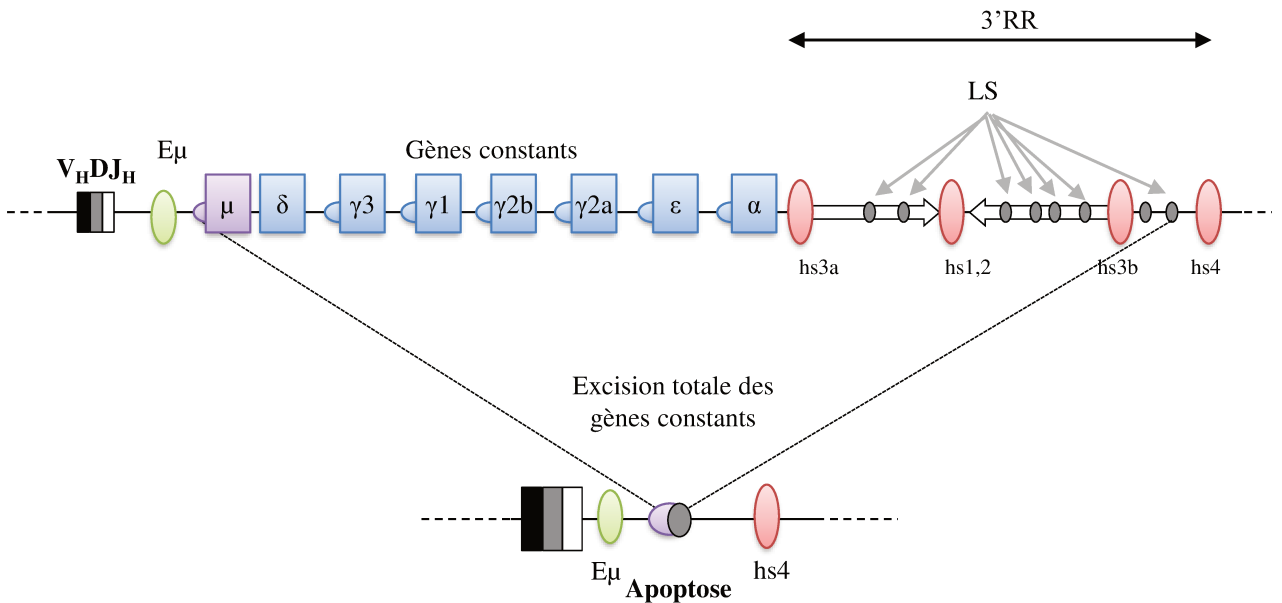


Figure 21 – Représentation schématique de la LSR.

Les « enhancers » 3' sont flanqués de séquences répétitives comparables à celles des régions S et appelées LS (LS pour *Like-Switch*, représentées par des cercles gris). Ces régions peuvent être transcrites et ciblées par AID, conduisant à une recombinaison similaire à la CSR dite LSR (LSR pour *Locus Suicide Recombination*). L'intégralité des gènes constants est déléetée entraînant l'apoptose des cellules B matures dont le BCR est indispensable pour leur survie.

Zaller and Eckhardt, 1985). Une étude menée par l'équipe de Neuberger (chez le rat) a permis la découverte d'une séquence, localisée 25kb en aval de $C\alpha$, possédant un rôle d'activateur transcriptionnel et spécifique de cellules B (Pettersson et al., 1990). Son homologue murin a été ensuite identifié et nommé d'abord 3' α E, puis hs1,2 au vue de la présence de deux sites hypersensibles à la DNase I au sein de cet « *enhancer* » (Dariavach et al., 1991; Lieberon et al., 1991).

Suite à cette découverte, diverses expériences ont été réalisées dans le but d'identifier d'autres séquences possédant une activité d'activateur transcriptionnel dans le locus (expériences de sensibilité à la DNase I et de systèmes rapporteurs). Trois nouveaux « *enhancers* » ont été identifiés dans la 3'RR : $C\alpha$ 3'E et hs3, localisés de part et d'autre d'hs1,2, et 3' α -hs4, situé en 3' de hs3 (Giannini et al., 1993; Madisen and Groudine, 1994; Matthias and Baltimore, 1993; Michaelson et al., 1995). Chez l'homme, l'identification de ces différents activateurs transcriptionnels a été réalisée de la même façon (Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997).

En conclusion, quatre activateurs transcriptionnels, répartis sur environ 30kb, ont été identifiés. Le nom 3'RR a été adopté pour cette région et les « *enhancers* » ont été notés, de 5' en 3' : hs3a (anciennement $C\alpha$ 3'E), hs1.2 (anciennement 3' α E), hs3b (anciennement hs3) et hs4 (anciennement 3' α -hs4) (Saleque et al., 1997).

b. Structure

Chez la souris, le séquençage de la 3'RR a permis de mettre en évidence une structure unique. Cette dernière est caractérisée par une architecture palindromique, d'environ 25 kb, couvrant les 3 premiers « *enhancers* » (hs3a, hs1,2, hs3b). L'activateur hs1,2 se situe au centre et il est flanqué, de part et d'autre, par deux séquences répétées inversées (IR pour *Inverted Repeat*), dont certaines sont en tandem (TR pour *Tandem Repeat*). Les activateurs hs3a et hs3b, possédant 97% d'homologie de séquence, constituent la limite de cette structure mais sont en orientation inverse. L'activateur hs4 se trouve en dehors du palindrome et forme la limite de la 3'RR (**Figure 20**) (Chauveau and Cogné, 1996; Saleque et al., 1997).

Une étude réalisée dans notre laboratoire a révélé une autre particularité de la 3'RR. Ses « *enhancers* » sont flanqués de séquences répétitives comparables à celles des régions S et appelées LS (LS pour *Like-Switch*) (**Figure 21**). Elles peuvent être transcrites et ciblées par AID après activation des LB, permettant ainsi une recombinaison $S\mu$ -3'RR similaire à la CSR. Ce réarrangement a été nommé LSR (LSR pour *Locus Suicide Recombination*). Il conduit à la délétion de l'ensemble des gènes constants et donc à la mort des cellules B qui sont incapables

d'exprimer un BCR (Péron et al., 2012). L'importance physiologique et la régulation de ce mécanisme sont en cours d'étude.

Chez l'homme, les gènes constants sont dupliqués et forment deux blocs distincts séparés d'environ 35 kb. Chaque bloc possède sa propre 3'RR, localisée en aval des gènes *Ca1* et *Ca2*. Ces 3'RR ne sont constituées que de trois « *enhancers* » (*hs1,2*, *hs3* et *hs4*), mais possèdent comme chez la souris, la même structure palindromique, avec *hs1,2* flanqué de régions IR (Mills et al., 1997; Sepulveda et al., 2005).

c. La cinétique d'activation des « *enhancers* » 3' et leur synergie durant l'ontogénie B

L'activité des « *enhancers* » 3' a été principalement étudiée *in vitro* par des techniques de transfections transitoires avec des gènes rapporteurs. *hs1,2* a montré son rôle d'activateur transcriptionnel, agissant essentiellement aux phases tardives de l'ontogénie B, avec une activité maximale au stade plasmocytaire (Dariavach et al., 1991; Lieberson et al., 1991). De même, la transfection d'un gène rapporteur sous le contrôle d'*hs3a* ou *hs3b* a montré leur activité aux stades B mature et plasmocytaire. *hs4* lui est actif dès le stade pro-B jusqu'au stade plasmocytaire (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995).

Les profils d'activité des « *enhancers* » 3' sont corrélés aux marques épigénétiques (méthylation et acétylation) de cette région. Durant la différenciation lymphocytaire B, la 3'RR va subir des changements épigénétiques progressifs afin de modifier son accessibilité et donc son activité (Giannini et al., 1993). Une étude réalisée par le groupe de Birshstein a montré une acétylation progressive de la région 3' tout au long du développement B (Garrett et al., 2005). Cette étude a été complétée, quelques années plus tard, par une autre montrant qu'*hs4* est non méthylé tout au long du développement B alors qu'*hs3a*, *hs1,2* et *hs3b* subissent une déméthylation progressive (Giambra et al., 2008).

Pris individuellement, les activateurs 3' du locus IgH possèdent une activité transcriptionnelle faible. Cependant, leur combinaison révèle des effets synergiques importants. L'hypothèse d'une synergie entre les différents éléments 3' provient d'études réalisées sur des cellules plasmocytaires transfectées avec un vecteur contenant un gène μ réarrangé, placé sous le contrôle d'un promoteur pV_H en présence d' $E\mu$. L'ajout d'*hs1,2* à cette construction double la transcription (Dariavach et al., 1991). L'équipe de Mocikat a pu montrer que cet effet est dépendant de la position et de la distance d'*hs1,2*. En utilisant les mêmes approches, il a été démontré que la transcription n'est augmentée que lorsque *hs1,2* est placé en aval de l'exon constant. Cet effet est amplifié lorsque la distance entre $E\mu$ et *hs1,2* croît (Mocikat et al., 1993,

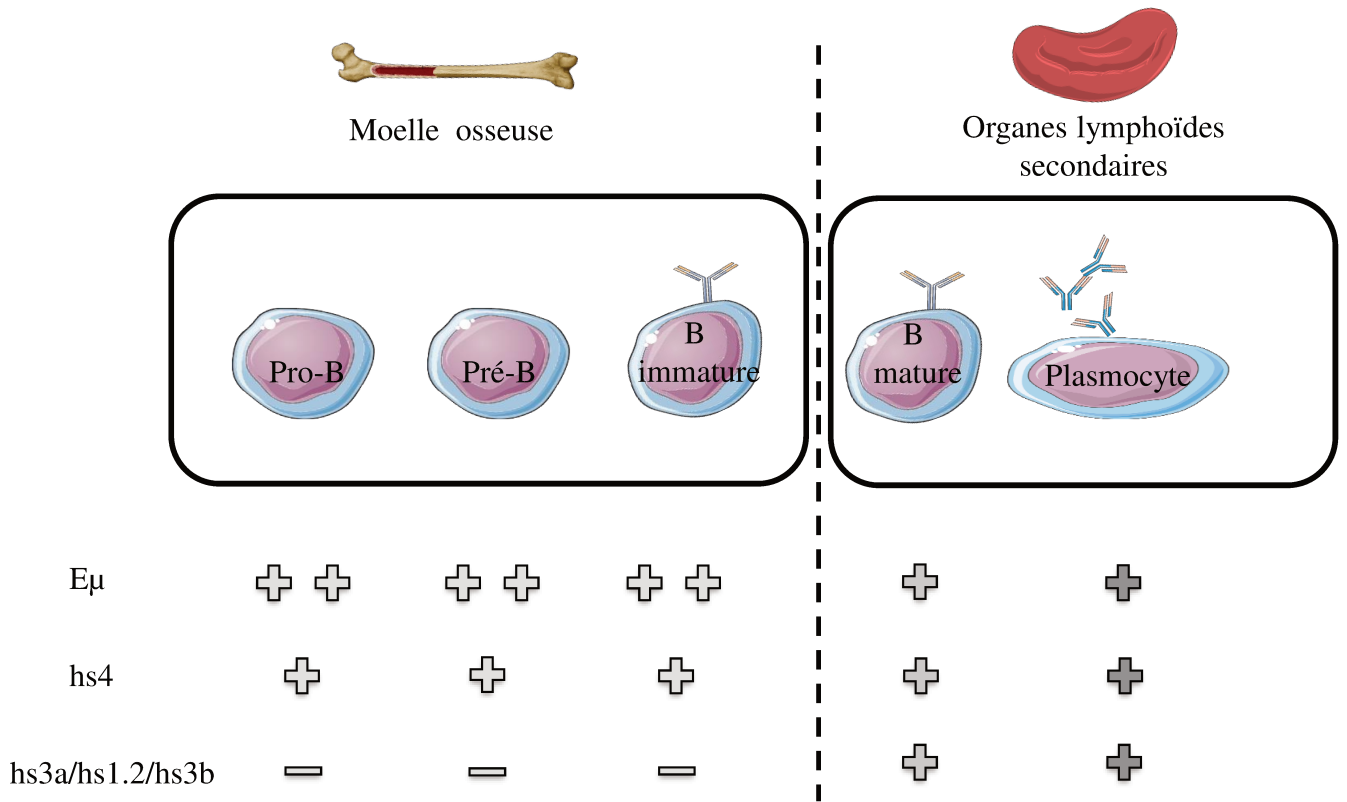


Figure 22 – Activité et synergie des « enhancers » du locus IgH au cours de l'ontogénie B.

L'activateur intronique Eμ est actif pendant tout le développement B mais son activité est maximale aux stades B précoces, d'où sa forte implication dans les recombinaisons V_HDJ_H. Séparément, les « enhancers » 3' possèdent une activité plus faible qu'Eμ. hs4 est le seul « enhancer » 3' à être actif tout au long du développement B. Le palindrome est, quant à lui, actif uniquement aux stades B tardifs de la maturation. L'intensité de coloration des croix représente la synergie d'activité entre les « enhancers » du locus IgH. Aux stades précoces, Eμ et hs4 ne synergisent pas alors qu'aux stades tardifs Eμ et les « enhancers » 3' ont un effet synergique avec une activité maximale chez le plasmocyte.

1995). Suite à la découverte d'hs3b et hs4, l'effet d'une combinaison des différents activateurs 3' sur la transcription d'un gène rapporteur a été étudié par Madisen et Groudine. Pris séparément, ces éléments activent faiblement la transcription. En revanche, leurs différentes combinaisons l'augmentent, avec une activité optimale lorsqu'ils sont tous présents (Madisen and Groudine, 1994).

Les éléments de la région 3' peuvent également agir *in vitro* en synergie avec E μ . L'activité transcriptionnelle de ce dernier n'est pas amplifiée significativement lorsque les activateurs 3' sont pris séparément. En revanche, une augmentation de la transcription d'E μ est observée en réalisant plusieurs combinaisons, particulièrement quand la structure de la région 3' est respectée. Cet effet est dépendant du stade de développement B. En effet, la région 3'RR, très peu active au stade pré-B, y est incapable de synergiser avec E μ . Par contre, au stade B mature, la 3'RR s'active et le palindrome en association avec E μ stimule efficacement la transcription (Chauveau et al., 1998; Ong et al., 1998).

En résumé, ces études suggèrent qu'aux stades précoces de la lymphopoïèse B, seuls E μ et hs4 sont actifs sans synergiser. En arrivant au stade B mature, hs3a, hs3b et hs1,2 deviennent prépondérant. Enfin, au stade plasmocytaire, une combinaison des quatre « *enhancers* » 3' (en respectant la conformation palindromique) avec E μ est requise pour une transcription optimale (Figure 22).

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

La 3'RR possède de nombreux sites de fixation, répartis tout au long de sa séquence, pour des facteurs de transcription (activateurs ou répresseurs), à la fois spécifiques ou non de la lignée B. Au cours du développement B, ces facteurs de transcription vont agir en *trans* afin de contrôler l'activation séquentielle des différents « *enhancers* » (Pinaud et al., 2011). Je présenterai ici les principaux sites retrouvés dans la 3'RR et les facteurs *trans* s'y fixant.

Vue leur homologie de séquences, hs3a et hs3b possèdent des sites de liaisons similaires : Trois sites Oct ont été identifiés permettant la fixation d'Oct1 et Oct2 (Matthias and Baltimore, 1993). Ils contiennent également des sites MARE (MARE pour *MAf Recognition Element*) permettant la liaison des protéines inhibitrices Maf, SMRT et Bach2. Au stade B précoce, ces dernières sont indispensables pour empêcher la transcription prématurée du locus (Muto et al., 1998). On distingue aussi des sites μ E2 et μ E5, capables de fixer les protéines de la famille E2A (Chauveau and Cogné, 1996; Greenbaum and Zhuang, 2002). hs3a et hs3b possèdent également des sites de fixation pour le facteur de transcription Ying Yang 1 (YY1). YY1 est connu par son implication dans des interactions à longues distances lors des

recombinaisons V_HDJ_H et la CSR. Il assure la formation de boucles chromatinienne permettant de rapprocher les différents éléments impliqués dans ces processus (Atchison, 2014).

L'élément $hs_{1,2}$ possède également plusieurs sites μE_2 et μE_5 capables de fixer les protéines E_{12} et E_{47} , essentiels à l'engagement dans la lignée lymphocytaire B. Afin de limiter l'activité d' $hs_{1,2}$ aux stades précoces ou dans les cellules B matures au repos (n'ayant pas rencontrées l'Ag), la fixation des protéines E_{12} et E_{47} est, elle-même, régulée par la protéine inhibitrice Id_3 (Meyer et al., 1995; O'Riordan and Grosschedl, 1999). $hs_{1,2}$ contient aussi une séquence octamérique qui permet la fixation simultanée d' $Oct-2$ et $OCA-B$ pour assurer son activation (Tang and Sharp, 1999). De plus, un site κB a été identifié dans $hs_{1,2}$ qui permet la fixation du facteur $NF-\kappa B$ ($NF-\kappa B$ pour *Nuclear Factor Kappa B pathway*). Ce dernier joue le rôle de répresseur aux stades précoces mais stimule $hs_{1,2}$ lors de l'activation des LB aux stades tardifs (Michaelson et al., 1996). Deux sites de fixation pour la protéine $Pax-5$, nommée aussi $BSAP$ ($BSAP$ pour *B-cell Specific Activating Factor*) ont été identifiés au sein d' $hs_{1,2}$. Au stade B mature, $Pax-5$ va se fixer sur ces sites où il va s'associer physiquement avec les facteurs Oct et $NF-\kappa B$ entraînant la répression de l'activité d' $hs_{1,2}$. Cette interaction disparaît chez les plasmocytes après l'inhibition de l'expression de $Pax-5$. Ceci permettra alors aux facteurs Oct et $NF-\kappa B$ de favoriser l'activité transcriptionnelle d' $hs_{1,2}$ (Neurath et al., 1994, 1995; Singh and Birshstein, 1996). Au stade plasmocytaire, l'activité d' $hs_{1,2}$ est amplifiée de plus par la fixation de $PU.1$ et d'autres facteurs appartenant à la famille ETS (ETS pour *E26 transformation-specific*) pour augmenter la transcription et la synthèse optimale des chaînes lourdes d'Ig (Neurath et al., 1995).

En raison de son activité dès les stades précoces de la lymphopoïèse B, l'élément hs_4 est régulé différemment des autres « *enhancers* » 3', tout en ayant des sites de fixation identiques à ces derniers, notamment des sites Oct , κB et $Pax-5$. Le site κB est actif tout au long du développement B. $Oct-1$ active hs_4 du stade pré-B à B mature tandis qu' $Oct-2$ et $OCA-B$ le stimule au stade B mature. $Pax-5$ possède un double rôle selon le stade de développement B : si précocement il interagit avec des complexes inhibiteurs, il stimule hs_4 dans des LB activés (Michaelson et al., 1996; Tang and Sharp, 1999; Wakatsuki et al., 1994).

En parallèle avec ces régulations, il a été démontré qu'*in vitro*, des agents chimiques peuvent réguler l'activité transcriptionnelle de la 3'RR (Henseler et al., 2009). Une étude réalisée par Lu et coll a démontré, grâce à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP pour *Chromatine ImmunoPrecipitation*) que la 3'RR peut recruter l'histone déacétylase 1 ($HDAC1$). Des expériences de gènes rapporteurs ont également montré une augmentation de l'activité de la 3'RR après une surexpression transitoire d' $HDAC1$. En

revanche, cette activité (et donc la transcription du locus IgH) est réprimée après un traitement par des inhibiteurs d'HDAC (HDACi), dont certains sont déjà utilisés en thérapeutique (Lu et al., 2005; Waibel et al., 2015).

e. Fonctions

La revue ci-dessous résume les dernières avancées sur la 3'RR. Une série de modèles *KO* a permis de clarifier la fonction de la 3'RR ainsi que sa cinétique. Au stade B immature, elle possède 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, la SHM et la CSR.

► 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).

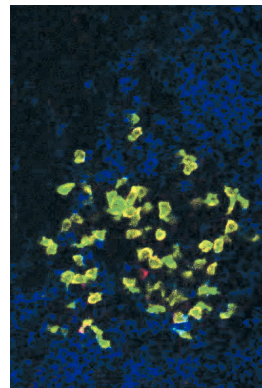
¹ Quatre régions géniques interviennent pour la formation des immunoglobulines (Ig) : la région V pour variable, la région D pour diversité (uniquement pour IgH), la région J pour jonction et la région constante C qui varie selon la classe d'Ig (C μ , C γ , C ϵ , etc.).

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 μ , et la région régulatrice située en 3' du locus (3'RR) en aval du gène C α . 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 α 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

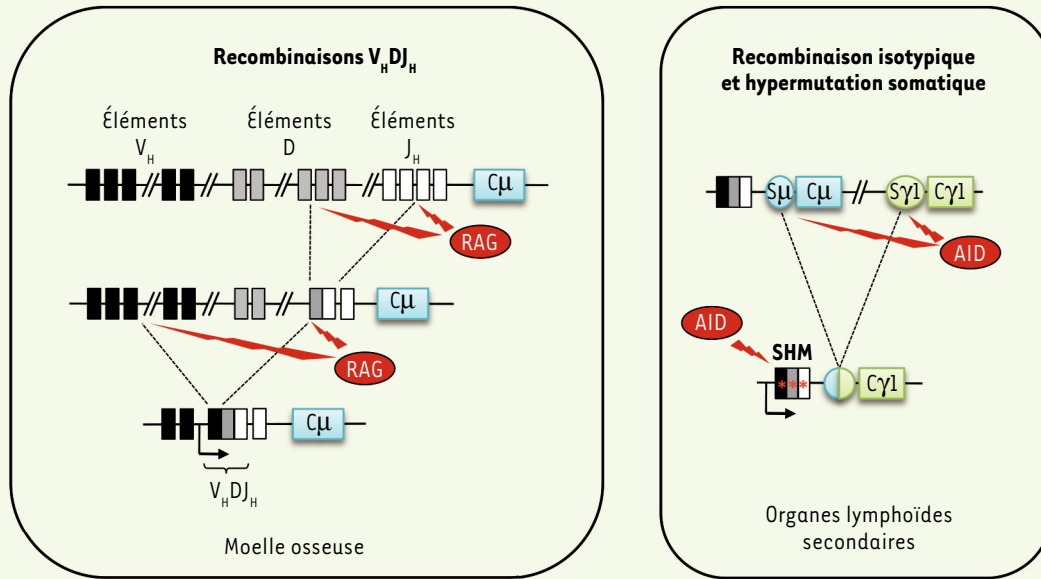


Figure 1. Représentation schématique des événements de recombinaison au locus IgH lors de la lymphopoïèse B. Lors des phases précoces qui précèdent la rencontre avec l'antigène, les réarrangements $V_H D J_H$ permettent, avec les réarrangements des chaînes légères, l'expression d'une immunoglobuline (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 γ 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.

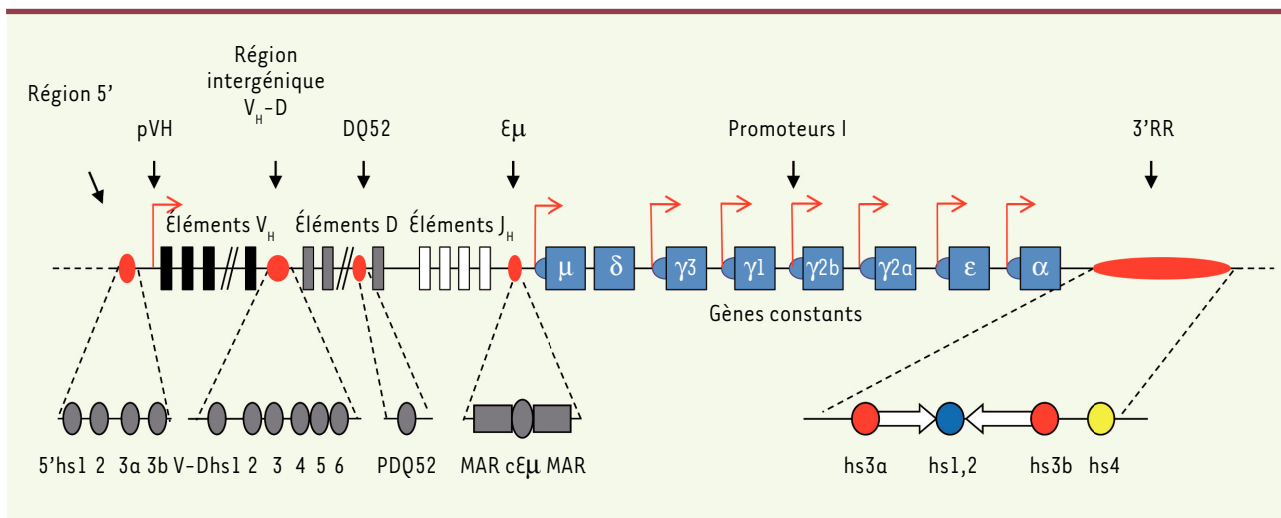


Figure 2. Représentation schématique du locus IgH et de ses éléments cis-régulateurs chez la souris. La ligne supérieure représente le locus IgH murin en conformation germinale. Les éléments régulateurs sont représentés en rouge et sont détaillés sur la ligne inférieure. Les sites hs (pour hypersensibilité 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

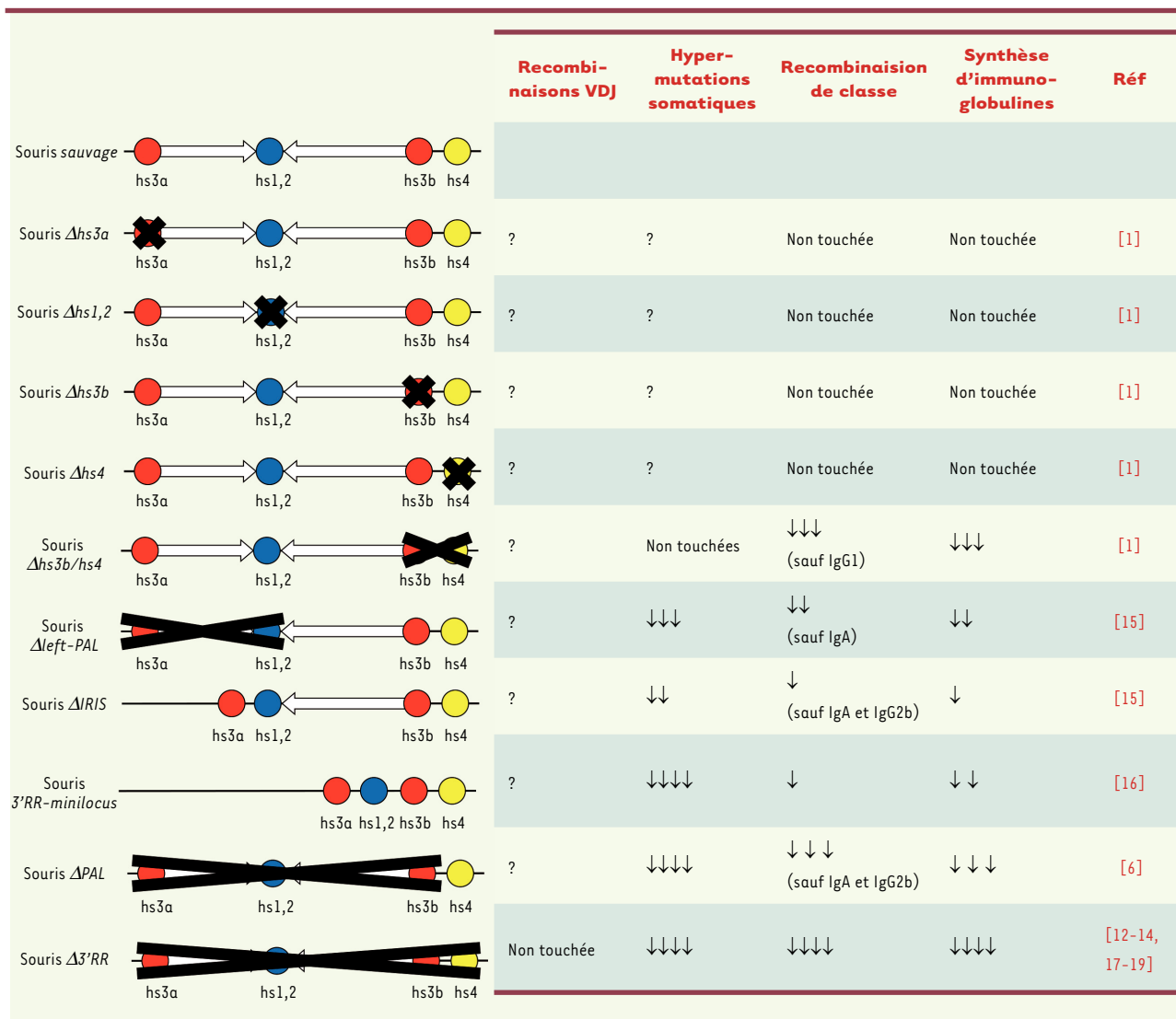


Figure 3. Modèles murins de délétion de la région 3'RR. Différents modèles murins de délétions de la région 3'RR ont été générés et analysés. La délétion d'un seul activateur transcriptionnel n'a que peu ou pas d'effet, confirmant la redondance et la synergie d'activité entre les différents éléments 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.

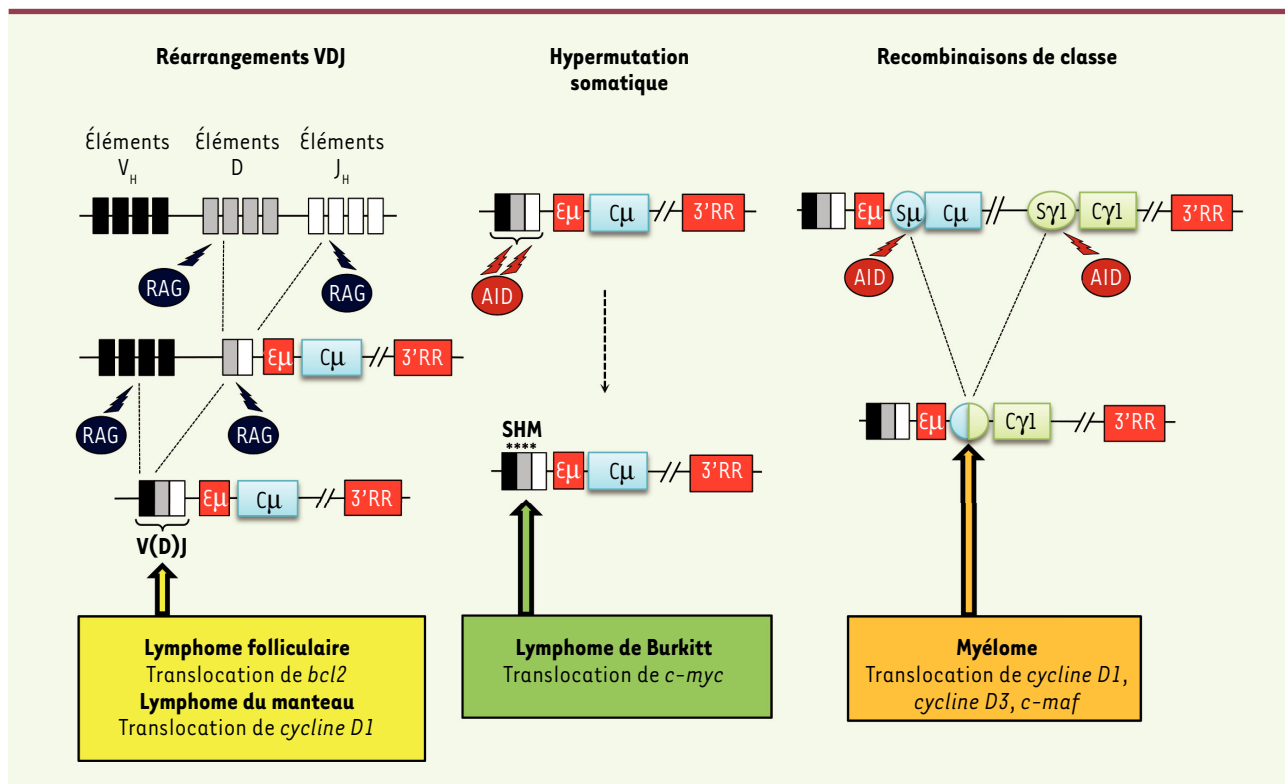


Figure 4. Translocations récurrentes au sein du locus IgH liées aux mécanismes de diversification des immunoglobulines. Les différents remaniements géniques qui ont lieu sur le locus IgH au cours du développement B en font un « point chaud » de translocation. Selon le mécanisme et les enzymes impliqués (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, les 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 Ghazzaoui est financée par l'Association de spécialisation et d'orientation scientifique et la municipalité de Kham (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. Birshtein 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, Birshtein 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 VD 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 : 1895-8.
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. Ghazzaoui 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 vL6 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

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

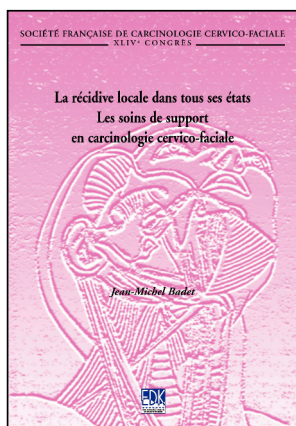
Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

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

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

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



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

II.2.3. La région intergénique $\Upsilon 1$ - $\Upsilon 2b$: un troisième « *enhancer* » du locus IgH ?

Très récemment, une étude a démontré le rôle d'activateur transcriptionnel d'une région présente en aval du gène constant $\Upsilon 1$. Elle a été nommée $\Upsilon 1E$ ($\Upsilon 1E$ pour *gamma 1 Enhancer*) (Amoretti-Villa et al., 2019).

Cette région a été tout d'abord mise en évidence, lors de l'étude des interactions à longues distances dans le locus IgH, en utilisant les techniques 3C et 4C (C pour capture de conformation chromosomique). Ces études ont permis de démontrer des interactions entre différentes régions d'ADN lors des recombinaisons $V_H D J_H$ (cf chapitre II, II.4.b, la structure tridimensionnelle du locus IgH). Ainsi, des interactions dynamiques en 3D ont été mises en évidence entre les régions IGCR1, E_μ , 3'RR, la région isolatrice en 3' et cette nouvelle région $\Upsilon 1E$ comprise entre les segments constants $\Upsilon 1$ et $\Upsilon 2b$ (**Figure 19**). Cette dernière comprend deux sites hypersensibles à la DNaseI : $\Upsilon 1$ - $\Upsilon 2b$ hs1 et $\Upsilon 1$ - $\Upsilon 2b$ hs2, permettant la fixation de plusieurs facteurs de transcription tels que Pax-5, E2A et PU.1 (Medvedovic et al., 2013). Quelques années plus tard, des interactions entre $\Upsilon 1E$ et d'autres éléments *cis*-régulateurs du locus IgH, ont été aussi confirmées lors de l'étude du rôle du médiateur dans le processus de CSR (Thomas-Claudepierre et al., 2016). La délétion de $\Upsilon 1E$ entraîne une baisse de la CSR chez la souris, spécifiquement vers les isotypes IgG3, IgG2a et IgG2b. De façon surprenante, cette délétion n'a aucun effet sur la CSR vers IgG1 (Amoretti-Villa et al., 2019).

II.3. Les isolateurs

Les régions isolatrices (ou isolateurs) sont des séquences d'ADN formant une barrière dans la chromatine. Il existe deux types d'isolateurs : ceux qui séparent les activateurs transcriptionnels des promoteurs afin de bloquer leurs éventuelles interactions et ceux qui forment une « barrière » entre l'euchromatine et l'hétérochromatine. Ces régions sont caractérisées par la présence d'un site CCCTC ou CBE (CBE pour *CTCF binding element*), permettant la fixation des protéines CTCF (CTCF pour *CCCTC Binding Factor*). Elles sont capables d'interagir avec d'autres protéines telles que les cohésines et de participer à la contraction du locus et à la formation des boucles chromatiniennes nécessaires aux interactions à longues distances. Le locus IgH possède plusieurs isolateurs qui sont impliqués dans la régulation du développement B (Gaszner and Felsenfeld, 2006; Gerasimova et al., 2015; Guo et al., 2011a).

II.3.1. La région 5'

Plusieurs études ont suggéré l'existence d'éléments en 5' du locus IgH contrôlant les étapes précoces du développement B. Cette région contient quatre sites hypersensibles à la

DNaseI, localisés en amont du segment V_H le plus distal (VHJ558.55) : 5'hs1, 5'hs2, 5'hs3a et 5'hs3b (**Figure 19**). Plusieurs sites de liaison de plusieurs facteurs de transcription essentiels au développement B et aux recombinaisons du locus IgH ont été identifiés dans cette région. Par exemple, 5'hs1 peut fixer les facteurs de transcription Pax-5, PU.1 et E2A et 5'hs2 possède des sites CBE (Pawlitzy et al., 2006). Cependant, la délétion de cette région n'a mis en évidence aucun défaut lors du développement B. L'hypothèse retenue aujourd'hui est que cette région n'agit pas comme un élément *cis*-régulateur mais formerait plutôt une limite chromatinienne (Perlot et al., 2010).

II.3.2. La région intergénique V_H -D

Cette région, de plus de 90 Kb, s'étend entre les segments V_H et D du locus IgH. Elle contient six sites hypersensibles à la DNaseI (hs1 à hs6) (**Figure 19**). Seuls les sites hs4 et hs5 possèdent des sites de fixation pour des facteurs transcriptionnels essentiels au développement B tel que PU.1 et Pax-5 et deux sites CBE (Featherstone et al., 2010). Cette région est indispensable au déroulement séquentiel des réarrangements V_HDJ_H en jouant le rôle d'isolateur entre les segments V_H et D. En effet, les sites CBE vont réprimer la transcription anti-sens des segments D et l'empêcher de s'étendre aux segments V_H afin de bloquer leur accessibilité tant que le réarrangement D- J_H n'a pas eu lieu (Featherstone et al., 2010). Une autre étude, réalisée par le groupe d'Alt, a démontré que les deux sites CBE ainsi que les potentiels éléments *cis* adjacents forment une région de 4,1 kb qui a ensuite été renommée IGCR1 (IGRC1 pour *Intergenic Control Region 1*). La délétion d'IGCR1 (grâce à des modèles murins et des mutations ciblées) a montré qu'il est essentiel pour la régulation de la transcription germinale des segments variables ainsi que pour la diversité du répertoire en favorisant les réarrangements des segments V_H les plus distaux par la formation de boucles chromatinienne grâce à ses sites CBE (Giallourakis et al., 2010; Guo et al., 2011a).

II.3.3. hs5,6 et 7

Trois sites d'hypersensibilité à la DNaseI ont été identifiés à l'extrémité 3' du locus IgH: 3'hs5, 3'hs6 et 3'hs7 (**Figure 19**) (Garrett et al., 2005). L'analyse de cette région a mis en évidence plusieurs sites CBE lui conférant une fonction isolatrice. Ceci a été confirmé par l'analyse des souris déficientes pour cette région qui présentent une augmentation de la transcription des gènes situés en aval de l'extrémité 3' du locus IgH. Les résultats ont également montré un biais de réarrangement V_HDJ_H (avec une utilisation accrue des segments V_H proximaux, de DQ52 et de JH3) (Volpi et al., 2012). Cette région ne semble donc pas jouer un

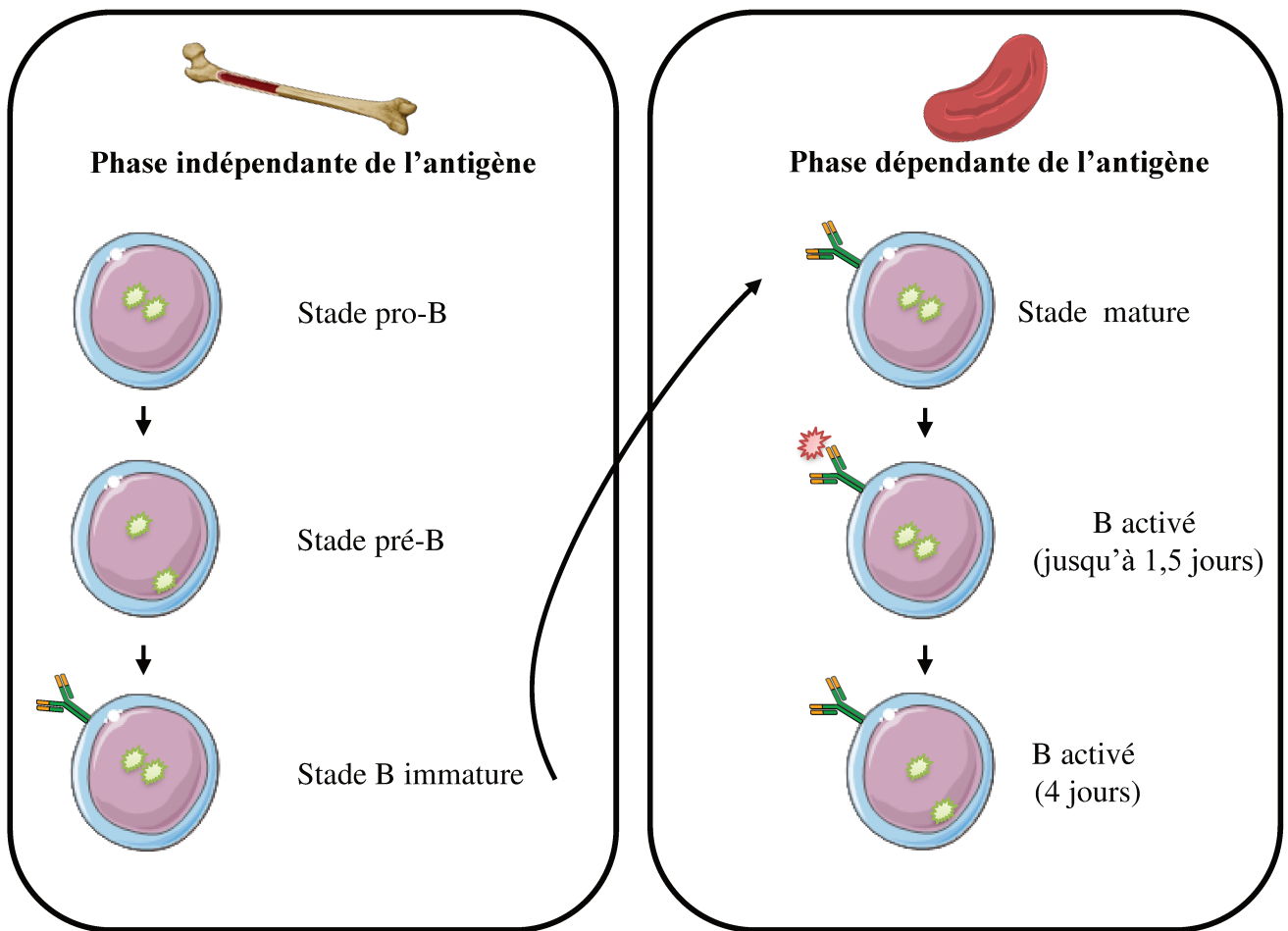


Figure 23 – Localisation nucléaire des allèles IgH au cours du développement B.

Les deux allèles du locus IgH sont représentés par des étoiles vertes. Les allèles seront localisés au centre du noyau (euchromatine) ou en périphérie (hétérochromatine) selon le stade de développement. Au stade pro-B, les réarrangements D-J_H sont bi-alléliques donc les allèles sont positionnés dans l'euchromatine. Au stade pré-B, les réarrangements V_H-DJ_H ont lieu sur un seul allèle. Le deuxième allèle est localisé dans l'hétérochromatine étant inaccessible aux machineries de recombinaison. Cette répartition contribue au phénomène d'exclusion allélique. Les deux allèles sont à nouveau positionnés dans l'euchromatine du stade B immature jusqu'à 1,5 jours après activation

rôle *cis*-régulateur mais plutôt constituerait une frontière 3' du locus IgH et interviendrait plutôt dans la régulation des interactions à longues distances lors des événements de recombinaisons (Birshtein, 2012).

II.4. Régulation spatiale du locus IgH

Le locus IgH possède de nombreux gènes et promoteurs qui s'étendent sur plus de 3MB. En plus de leur régulation hautement ordonnée dans le temps, l'ensemble des événements géniques et leur déroulement séquentiel nécessitent également une régulation dans l'espace nucléaire afin d'optimiser leur efficacité. Ainsi, le locus IgH va modifier sa position dans le noyau et s'organiser en formant des boucles chromatiniennes qui vont rapprocher des gènes parfois distants de plusieurs centaines de kb en vue des recombinaisons (Hewitt et al., 2010).

a) La localisation du locus IgH au cours du développement

Dans le noyau des cellules, l'ADN s'associe avec les protéines histones pour former la chromatine. Cette dernière n'est pas répartie de façon aléatoire mais selon le niveau de compaction. Elle est divisée en deux compartiments : l'hétérochromatine (ou HC) et l'euchromatine (ou EC). L'HC représente la chromatine sous forme condensée et dite transcriptionnellement inactive. En revanche, l'EC constitue la chromatine sous forme peu condensée et dite transcriptionnellement active. Ainsi, le positionnement d'un locus dans l'HC, à la périphérie du noyau, va réprimer son expression tandis que son positionnement dans l'EC, au centre du noyau, va favoriser sa transcription. Si la plupart des loci ont une localisation stable dans le noyau, certains peuvent avoir une localisation dynamique après une activation transcriptionnelle. C'est le cas du locus IgH dont le positionnement dynamique dans le noyau est indispensable au déroulement des réarrangements géniques lors du développement (Fedorova and Zink, 2008; Schneider and Grosschedl, 2007).

Grâce à la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence et 3 dimensions (FISH-3D), différentes études ont permis de suivre la localisation nucléaire du locus IgH à différents stades de développement B (Fuxa et al., 2004; Kosak et al., 2002; Skok et al., 2001) (**Figure 23**). Aux stades précoces (pré-pro et pro-B), les deux allèles vont quitter la périphérie du noyau vers le compartiment d'EC central. Ainsi, l'activation de la transcription va permettre le déroulement des réarrangements D-J_H sur les deux allèles. Au stade pré-B, les deux allèles vont ensuite se positionner de façon asymétrique. Un allèle sera localisé au centre du noyau où il subira le réarrangement V_H-DJ_H, tandis que le deuxième est maintenu inactif en périphérie. Cette

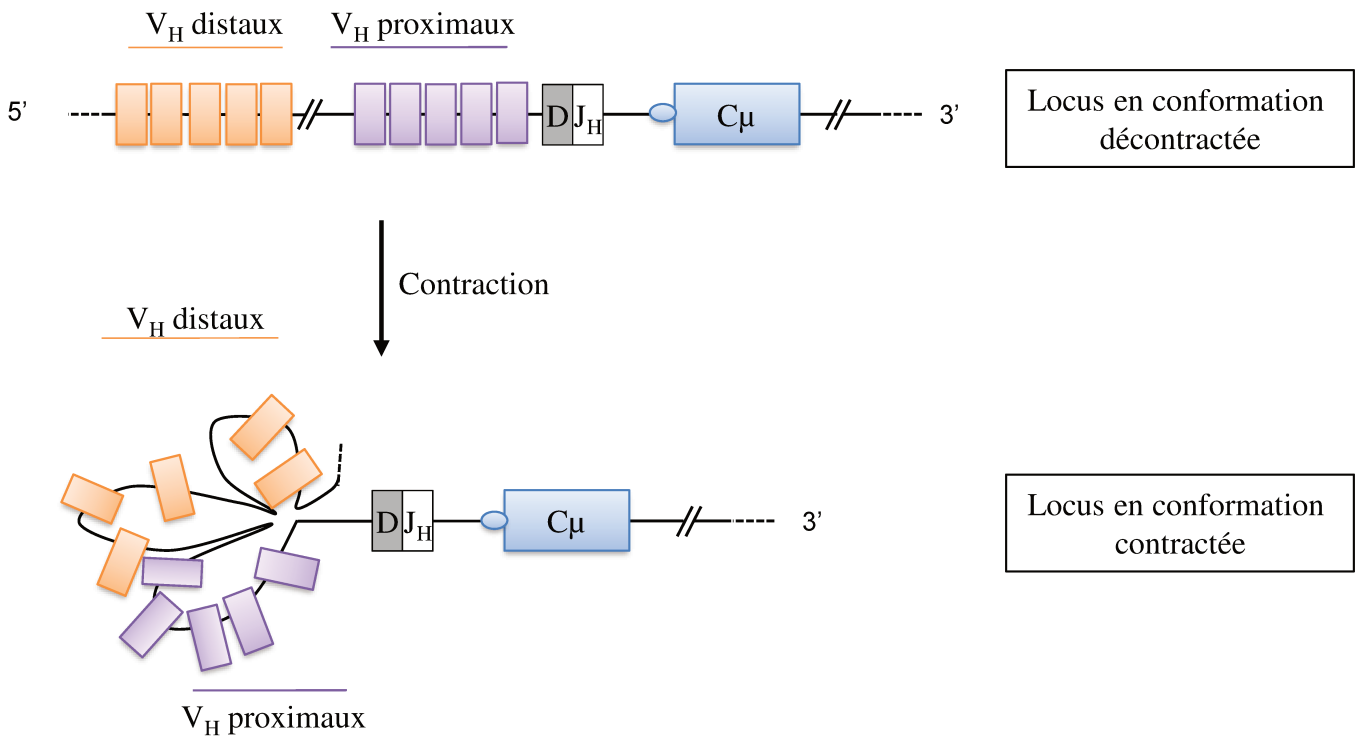


Figure 24 – Représentation schématique de la contraction du locus IgH au cours des recombinaisons V_H-DJ_H.

Suite à la recombinaison DJ_H, le locus se contracte et forme des boucles chromatiniennes, afin de favoriser les recombinaisons longues distances, en rapprochant les segments V_H distaux du DJ_H réarrangé .

localisation contribue au phénomène d'exclusion allélique et est maintenue lors des réarrangements de chaînes légères (Fuxa et al., 2004; Kosak et al., 2002; Roldán et al., 2005).

Dès le stade B-immature, les deux allèles se trouvent positionnés au centre du noyau. En effet, la CSR et la SHM ont lieu simultanément sur les deux allèles qui doivent être transcrits et accessibles à AID. Après une activation de cellules B *in vitro*, les deux allèles sont maintenus dans l'EC au moins 1,5 jours. Par contre, 4 jours après la stimulation, l'allèle fonctionnel sera maintenu au centre du noyau, alors que l'allèle réprimé sera localisé dans l'HC en périphérie (Skok et al., 2001).

b) La structure tridimensionnelle du locus IgH

Les recombinaisons géniques au locus IgH ont lieu sur un locus étendu sur 3MB suggérant qu'il existe, en plus de la régulation de localisation dans le noyau, un niveau de régulation de la structure tridimensionnelle du locus permettant des interactions à longues distances capables de rapprocher les régions à recombinaison.

Une telle régulation a été mise en évidence tout d'abord par la technique de FISH. Ces expériences ont démontré, qu'au cours de l'ontogénie B, le locus IgH subit des modifications de topologie par un phénomène de contraction par la formation de boucles chromatinienne. Ainsi, ces dernières vont rapprocher les régions d'ADN à recombinaison dans une même boucle tout en isolant les régions non impliquées dans la recombinaison dans des boucles différentes (Fuxa et al., 2004; Guo et al., 2011b; Jhunjhunwala et al., 2008; Kosak et al., 2002; Roldán et al., 2005). Quelques années plus tard, le développement des techniques 3C et 4C a permis d'affiner ces résultats et d'établir une cartographie détaillée et précise des interactions entre les différentes régions d'ADN (Choi and Feeney, 2014; Medvedovic et al., 2013; Nicolás and Chaudhuri, 2013). Dans les progéniteurs lymphoïdes, et lors des réarrangements D-J_H, le locus va se contracter et les régions D, J_H et E_μ sont incluses dans une même boucle alors que les segments V_H sont maintenus à l'écart (Degner et al., 2011; Guo et al., 2011b). Lors des réarrangements V_H-DJ_H le locus se contracte à nouveau, afin de rapprocher les segments V_H au segment DJ_H réarrangé. Cette contraction permet de favoriser les interactions à longues distances avec les segments V_H distaux (les plus éloignés et situés en 5' du locus) (**Figure 24**) (Guo et al., 2011a, 2011b; Medvedovic et al., 2013). Suite à un réarrangement V_HDJ_H productif, la signalisation induite par le pré-BCR va entraîner une décontraction du locus, permettant d'empêcher de futurs réarrangements et participer donc à l'exclusion allélique (Roldán et al., 2005). Le locus IgH subit également une autre modification de sa topologie lors de la CSR. Des repliements du locus IgH vont avoir lieu afin de rapprocher les régions S donneuses et

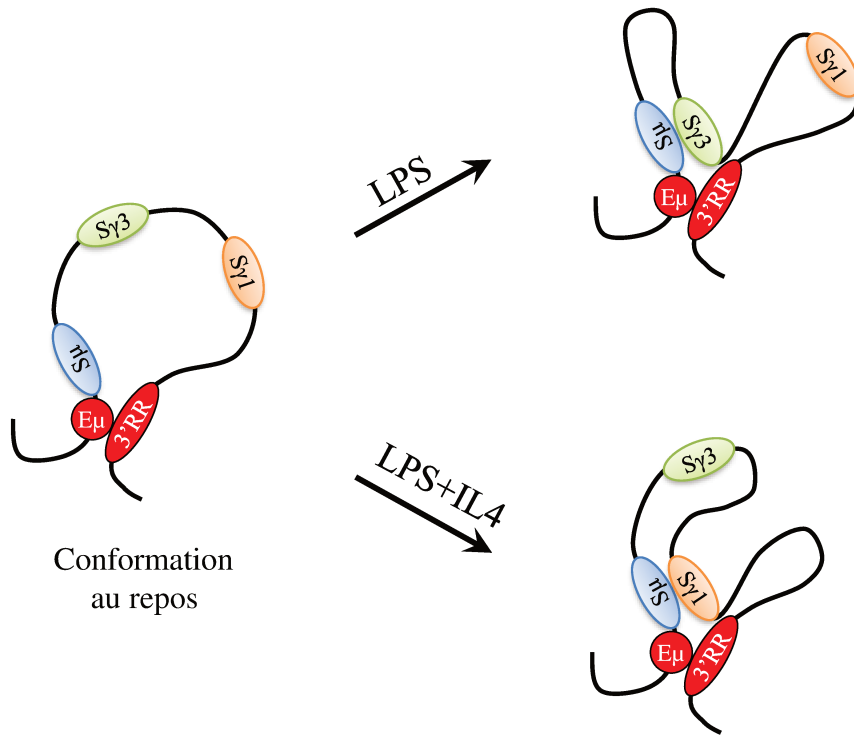


Figure 25 – Représentation schématique de la conformation 3D du locus IgH lors de la CSR.

Dans les cellules B au repos, Eμ, la 3'RR et la région Sμ sont maintenus à proximité. Après une stimulation appropriée, la région S activée sera rapprochée pour favoriser les recombinaisons avec Sμ. Adapté d'après *Wuerffel et al., 2007*.

acceptrices ainsi que les régions régulatrices E μ et 3'RR (Feldman et al., 2015; Kenter et al., 2012; Wuerffel et al., 2007) (**Figure 25**).

Les changements de la structure tridimensionnelle du locus IgH sont régulés par un ensemble d'éléments qui agissent en synergie particulièrement CTCF, YY1 et Pax-5, qui possèdent des sites de fixation repartis tout au long du locus ainsi que les différents éléments régulateurs décrits précédemment (Gerasimova et al., 2015).

Problématiques et objectifs

Lors du développement lymphocytaire B, le locus IgH subit trois évènements majeurs de réarrangements géniques : les recombinaisons V_HDJ_H , la SHM et la CSR. Tous ces évènements sont finement régulés par les différents éléments *cis*-régulateurs du locus IgH intervenant dans l'accessibilité du locus, particulièrement la 3'RR.

L'objectif principal de ma thèse a été de compléter nos connaissances sur le rôle de la région 3'RR dans le développement normal des LB, plus précisément celui des LB-1, grâce à un modèle murin déficient pour la 3'RR, préalablement créé au laboratoire (Vincent-Fabert et al., 2010). Les LB-1 diffèrent des LB-2 par plusieurs critères tels que leur origine, développement, fonction et marqueurs de surface. Ainsi, si la 3'RR régule la transcription de la chaîne μ , la SHM et la CSR dans les LB-2 (Rouaud et al., 2012, 2013; Saintamand et al., 2015a; Vincent-Fabert et al., 2010), rien n'est connu sur son rôle dans les LB-1.

Dans ce contexte, nous avons tout d'abord étudié l'impact de la délétion de la 3'RR sur la diversification du répertoire antigénique des LB-1 pour analyser son implication aux stades précoces de l'ontogénie B (**Article 1**). La 3'RR est impliquée dans le processus de la SHM dans les LB-2. Nous avons donc ensuite analysé son rôle sur la SHM dans les LB-1 (**Article 2**). Ces derniers sont caractérisés par un « *switch* » préférentiel vers l'isotype α . La 3'RR a un rôle lors de cette CSR dans les LB-2. Nous avons donc analysé si la 3'RR en avait un similaire dans les LB-1 (**Article 3**). Une petite revue a résumé notre travail de comparaison entre les LB-1 et les LB-2 concernant leur régulation par la 3'RR (**Article 4**).

Par la suite, nous nous sommes également intéressés à l'étude du rôle des deux activateurs transcriptionnels 3'RR et $E\mu$ sur la signature moléculaire des jonctions lors de la CSR, en utilisant un nouvel outil d'analyse de données de séquençage haut débit développé dans notre laboratoire (**Articles 5**).

En parallèle à ces travaux, j'ai également participé, au cours de ma thèse, à différentes études : [1] sur le rôle de la 3'RR lors d'un phénomène rare et encore malconnu, la CSR vers IgD ; et [2] son implication, avec l'activateur $E\mu$, lors de la lymphomagenèse B. Les publications issues de ces travaux seront présentées dans la partie **Annexes**.

Résultats

Article 1

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

Ghazzaoui N*, **Issaoui H***, Saintamand A, Oblet C, Carrion C, Denizot Y.

* Contribution équivalente

Blood advances, 2018

Différentes études ont démontré que l'activateur $E\mu$ est l'élément essentiel pour le déroulement des réarrangements V_HDJ_H chez les LB-2 (Marquet et al., 2014; Perlot et al., 2005). Malgré les interactions à longues distances mises en évidence entre $E\mu$ et la 3'RR dans les cellules pro-B (Guo et al., 2011b; Medvedovic et al., 2013), des expériences réalisées au sein de notre laboratoire ont démontré que la 3'RR est dispensable aux réarrangements V_HDJ_H (Rouaud et al., 2012).

Afin de voir un éventuel effet de la 3'RR sur l'élaboration du répertoire antigénique des LB-1, nous avons tout d'abord étudié la conséquence de sa délétion sur leur développement. Nos expériences ont été réalisées sur des souris hétérozygotes ($a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$) issues d'un croisement entre des souris de fond génétique sv/129 exprimant une IgM d'allotype « a » (IgM^a) et de fond génétique C57BL6 exprimant une IgM d'allotype « b » (IgM^b). La délétion de la 3'RR a été réalisée sur des cellules embryonnaires de souris sv/129. L'allèle exprimé par les cellules B d'une souris hétérozygote peut être identifié grâce à des Ac spécifiques des deux allotypes. Les souris hétérozygotes (a^{wt}/b^{wt}) ont été utilisées comme contrôle. Les réarrangements V_HDJ_H se font d'une manière aléatoire sur les deux allèles du locus IgH. Donc, théoriquement les LB ont autant de chance d'exprimer une IgM^a qu'une IgM^b . Une expression moins fréquente de l'allèle $a^{\Delta 3'RR}$ suggérerait que la délétion de la 3'RR altérerait le développement B.

L'analyse, par cytométrie en flux, des LB-1 ($B220^{low}IgD^{low}IgM^{high}CD11b^+CD23^-$) chez les souris hétérozygotes $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$, c'est-à-dire portant un allèle « a » délété pour la 3'RR et un allèle « b » sauvage, montre un fort désavantage pour l'utilisation de l'allèle $a^{\Delta 3'RR}$ par rapport à l'allèle b^{wt} . Ceci est observé à la fois dans la rate, le péritoine et le foie fœtal. Pour rappel, le foie fœtal est à l'origine des LB-1 chez la souris, le péritoine est le siège d'une grande population de LB-1 (environ 50% des cellules B) à l'âge adulte alors que la rate n'en contient qu'une très faible quantité (environ 1 % des cellules B). Dans ces souris, on observe une baisse

significative du pourcentage de cellules IgM^a par rapport aux cellules IgM^b. Aucune différence dans l'utilisation des deux allèles n'a été révélée chez les souris a^{wt}/b^{wt}. La présence d'une 3'RR semble donc être importante pour le développement des LB-1.

Bien que la 3'RR n'a pas d'effet sur le répertoire antigénique des LB-2 (Rouaud et al., 2012), sa délétion modifie le « *B cell fate* » des cellules MZ (Saintamand et al., 2015a). Cette population, comme les LB-1, fait partie de l'immunité innée. Afin d'analyser le rôle de la 3'RR sur leur répertoire, nous avons trié les LB-1 et LB-2 à partir du péritoine de souris 3'RR déficientes et *wt*. Les régions V(D)J ont été amplifiées puis analysées par séquençage à haut débit (GS junior, Roche). L'analyse du répertoire antigénique montre que la délétion de la 3'RR affecte la diversité du répertoire antigénique des LB-1 avec un usage préférentiel des segments V_{H1} et V_{H11}; segments souvent associés aux Ac auto-réactifs. Par contre, et en accord avec les résultats précédents du laboratoire, elle n'a aucun effet sur le répertoire antigénique des LB-2.

Chez les souris a^{Δ3'RR}/b^{wt}, l'expression de l'IgM^a membranaire est diminuée à la surface des LB. Cette baisse d'expression est corrélée à celle de la transcription de la chaîne μ dans les LB-1 chez les souris déficientes pour la 3'RR. Ces résultats suggèrent que la baisse d'expression de la chaîne μ pourrait diminuer celle du BCR à la surface des LB-1. Ceci conduirait, par la suite, à une baisse de la signalisation induite, entraînant une mauvaise sélection clonale des LB-1 auto-réactifs lors de leur rencontre avec l'Ag et aux modifications du répertoire antigénique observées.

Les LB-1 représentent une source primaire des NIgM. Ces dernières sont à la fois polyréactives et faiblement auto-réactives. Nous avons analysé le sérum de souris déficientes pour la 3'RR, par des techniques d'immunofluorescence et d'ELISA, afin de détecter la présence d'IgM auto-réactives. Ces expériences ont montré une augmentation de la quantité des IgM auto-réactives dans le sérum des souris 3'RR déficientes par rapport aux souris sauvages. Cette observation pourrait être corrélée au biais de répertoire antigénique où nous observons un usage accru de certains segments V associés aux Ac auto-réactifs.

En conclusion, ce travail a démontré que:

- La 3'RR contrôle la transcription de la chaîne μ et l'expression du BCR à la surface des LB-1.
- La délétion de la 3'RR affecte le « *B cell fate* » des LB-1.
- La 3'RR contrôle indirectement la diversité du répertoire des LB-1 par son action sur la transcription de la chaîne μ et l'expression du BCR de membrane.

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'Ethique 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 : 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

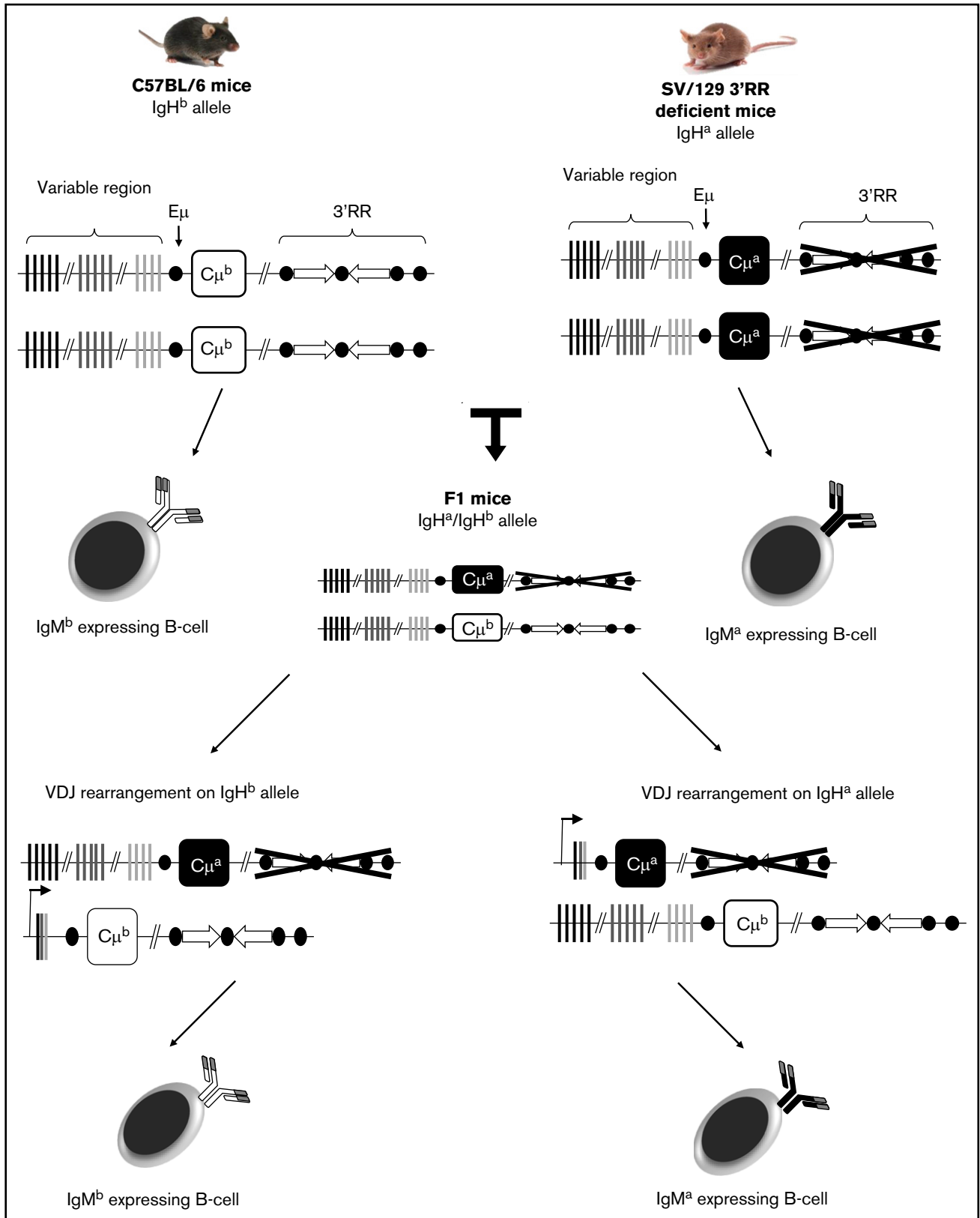


Figure 1. Backcross for $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice, and membrane expression of IgM^a or IgM^b allele by B cells. The equilibrium between IgM^a- or IgM^b-expressing B cells will be disrupted if the expression of the 3'RR-deleted allele impedes B-cell development. Lowered number of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

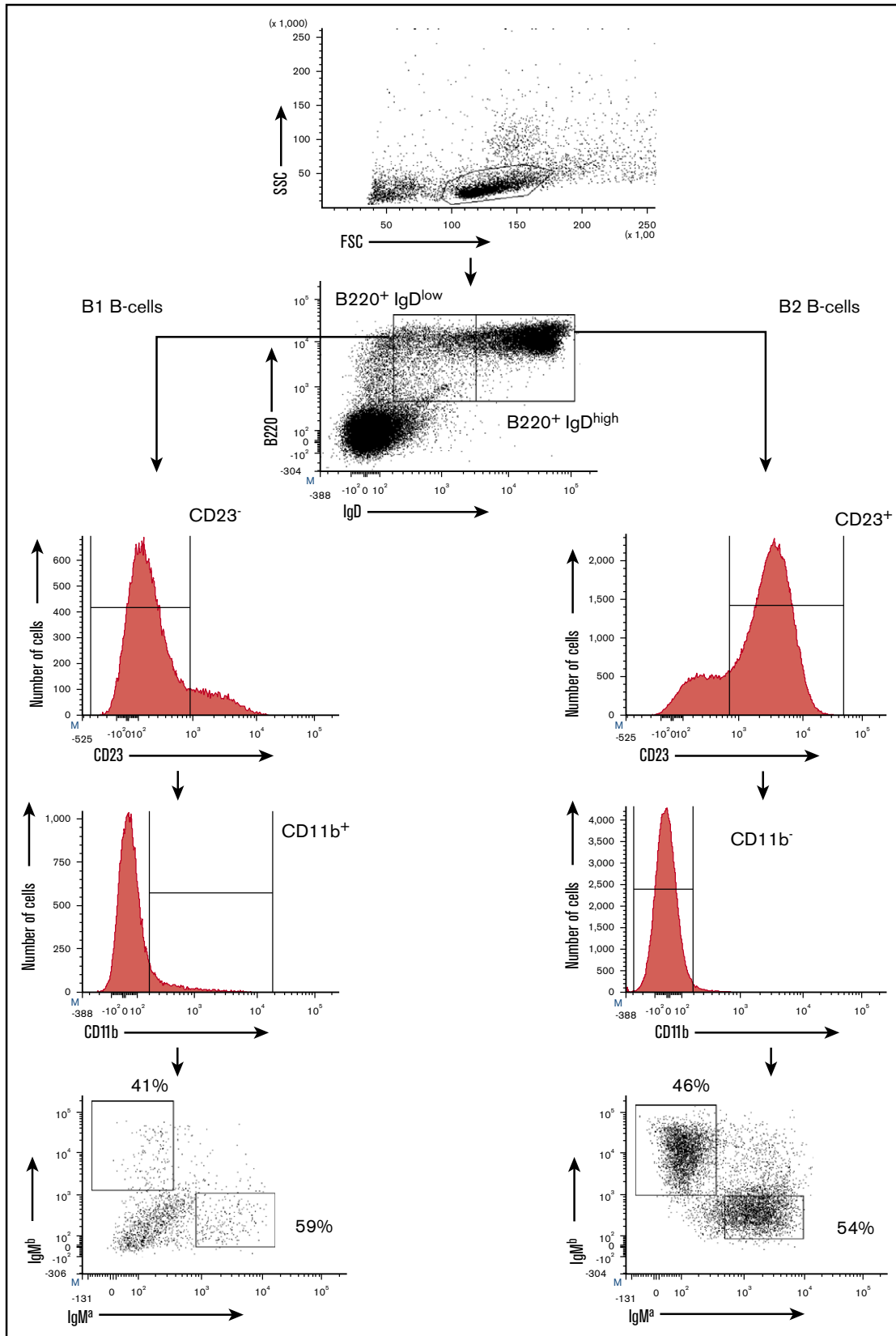


Figure 2. Flow cytometry for mouse B1 and B2 B cells. B1 and B2 B cells are distinguished on the basis of membrane cell surface markers. B1 B cells are B220^{low}IgM^{high}IgD^{low}CD23⁻CD11b^{+/low}, whereas B2 B cells are B220^{high}IgM^{high}IgD^{high}CD23⁺CD11b⁻.^{2,4,20}

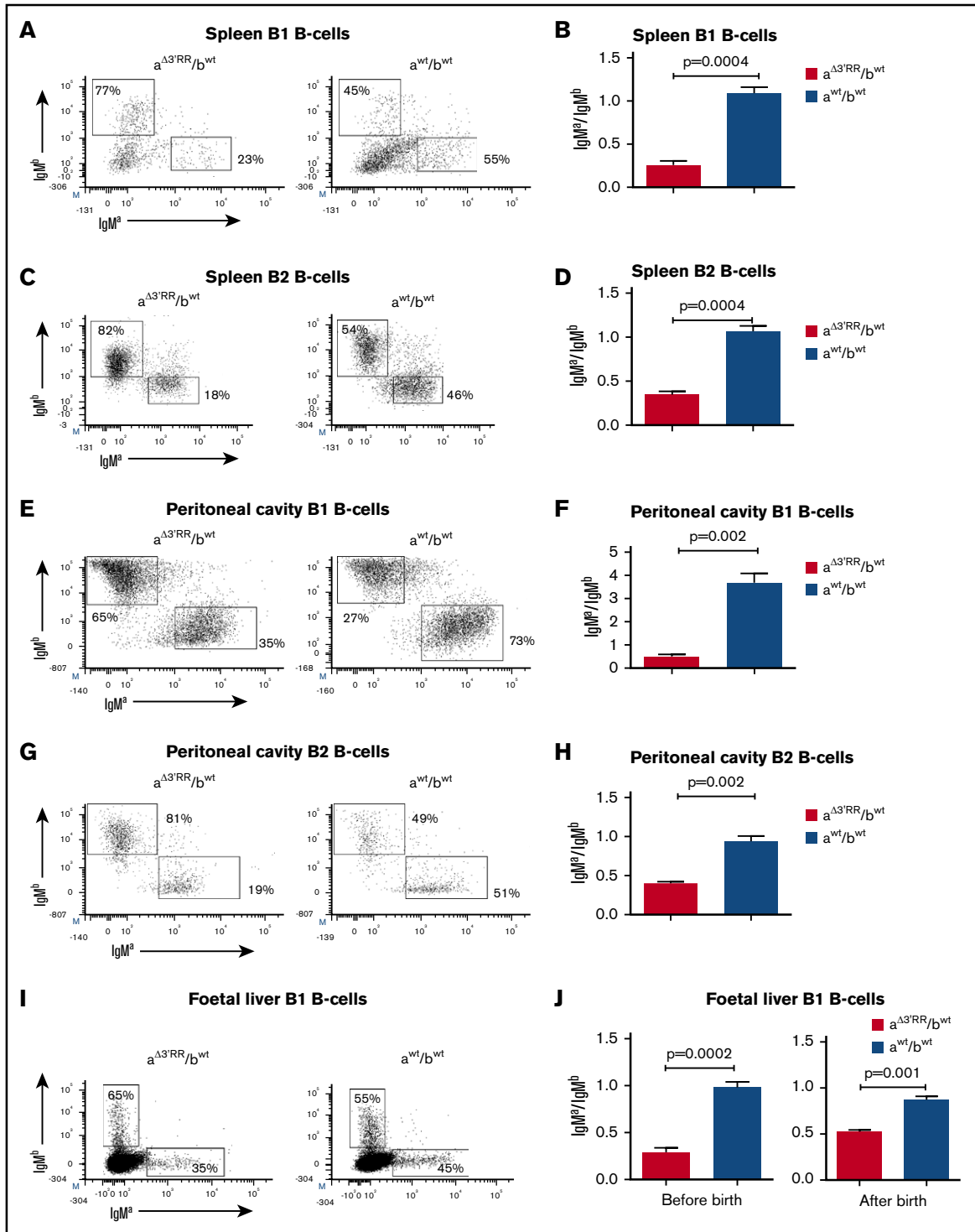
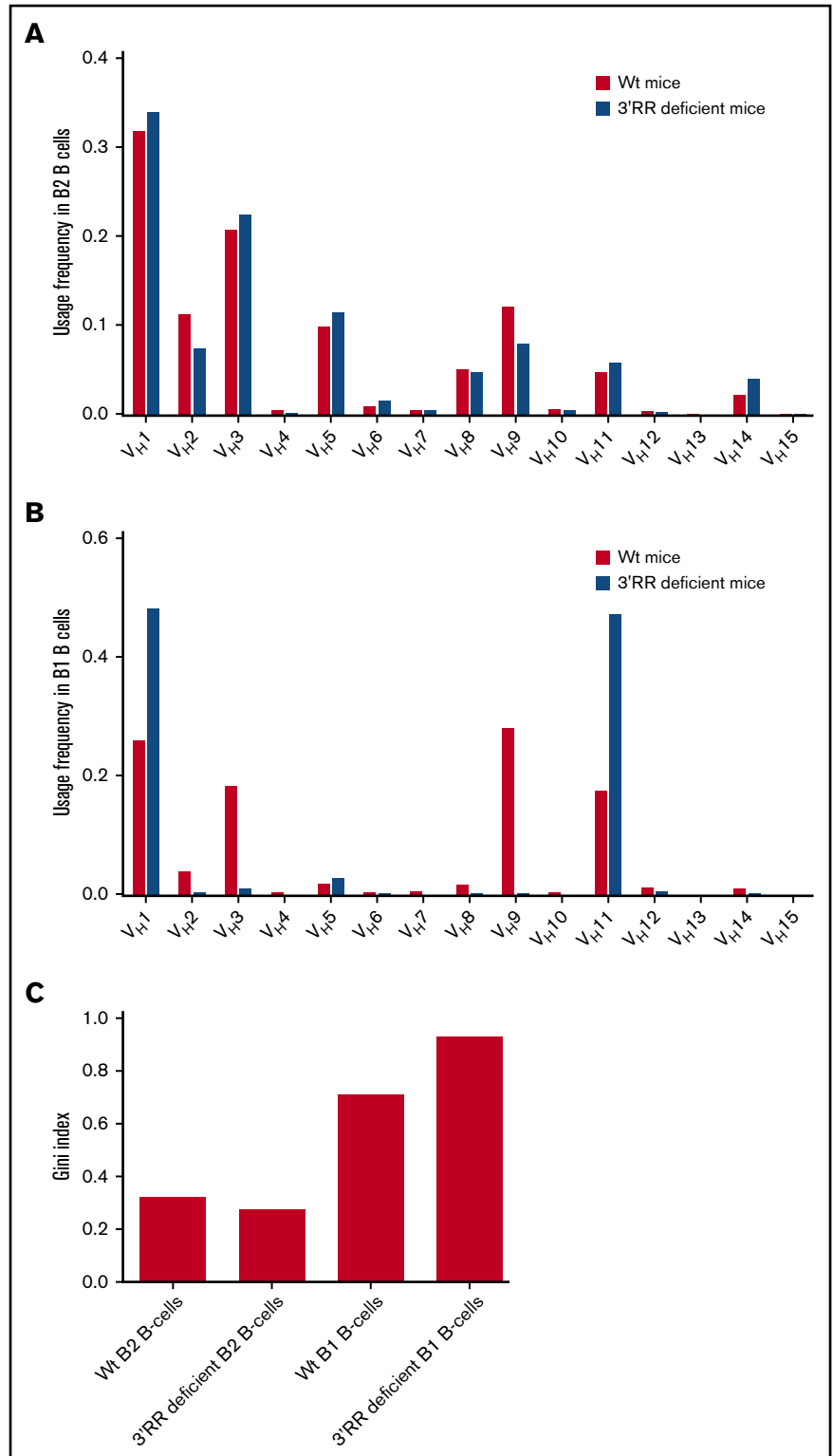


Figure 3. Expression of a 3'RR-deleted allele in B1 B cells of the spleen, peritoneal cavity, and fetal liver. (A) Flow cytometry analysis of IgM^a and IgM^b on spleen B1 B cells of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment is shown. (B) IgM^a/IgM^b ratios for spleen 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.

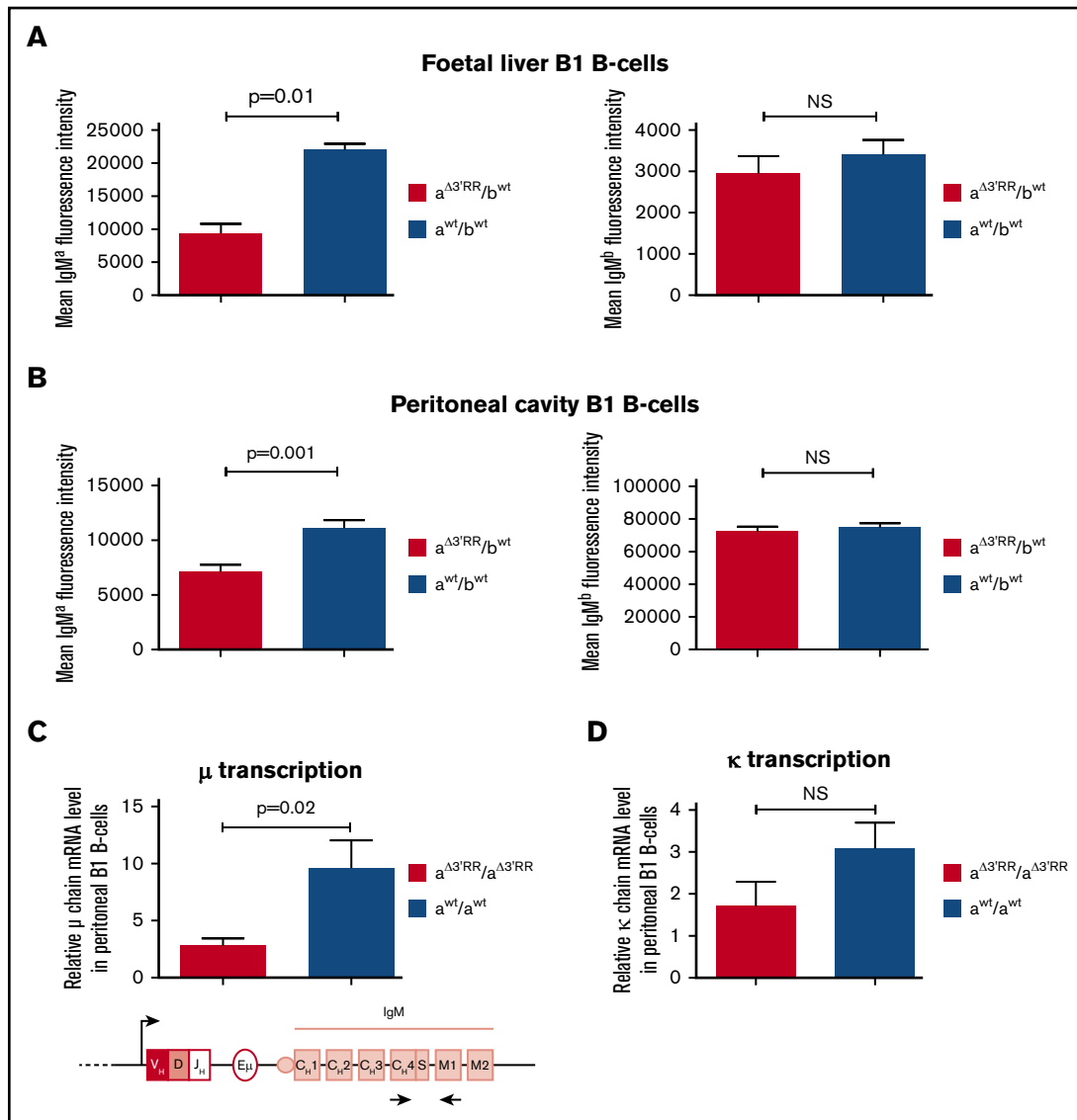


Figure 5. Effect of the 3'RR on BCR intensity and μ transcription in B1 B cells. (A) IgM^a and IgM^b intensities on the membrane of fetal liver B1 B cells. Results are reported as means \pm SEM. Mann-Whitney *U* test for significance. Four $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and five a^{wt}/b^{wt} mice were investigated. 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.

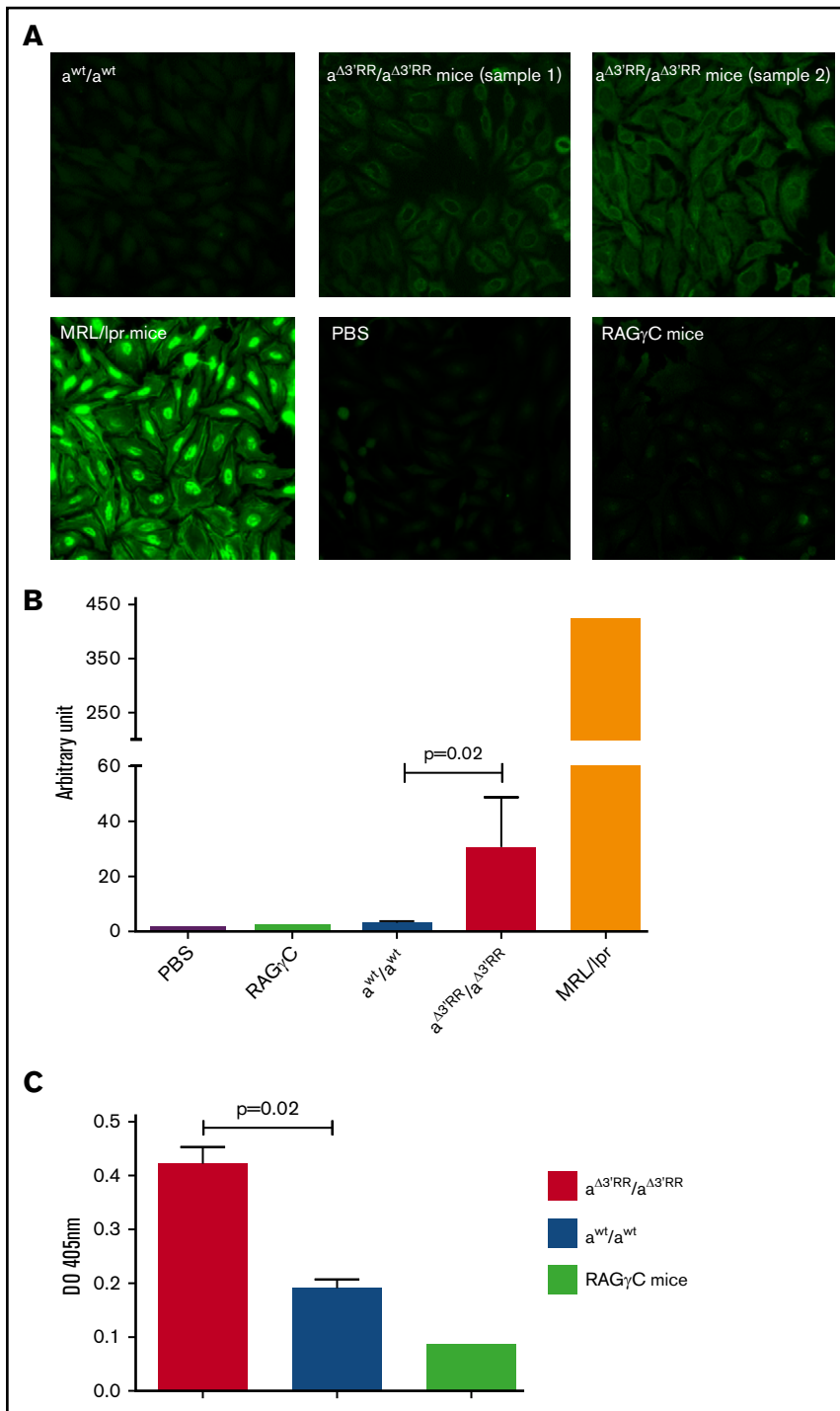
3'RR and B1 B-cell repertoire diversity

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 Ig κ 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.

Article 2

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

Issaoui H*, Ghazzaoui N*, Boyer F, Denizot Y, Saintamand A.

* Contribution équivalente

Cellular and Molecular Immunology, 2019

De nombreuses études ont démontré qu'aux stades précoces du développement B, les réarrangements V_HDJ_H sont régulés par des éléments *cis*-régulateurs localisés en 5' du locus IgH (Featherstone et al., 2010; Giallourakis et al., 2010; Guo et al., 2011b; Perlot et al., 2005), alors que la CSR et la SHM le sont par la 3'RR qui est active lors des stades tardifs du développement B (Rouaud et al., 2013; Vincent-Fabert et al., 2010). Ainsi, la délétion de la 3'RR diminue drastiquement les SHM dans les LB-2.

Pour élucider le rôle de la 3'RR dans la SHM des LB-1, nous les avons triés à partir du péritoine de souris AID déficientes, *wt* et 3'RR déficientes. Ces souris avaient été préalablement immunisées par voie orale avec des globules rouges de mouton pendant quinze jours et par voie intra-péritonéale avec 10 μ g de LPS pendant trois jours. Les régions V(D)J ont été amplifiées puis analysées par séquençage à haut débit (Miseq system, Illumina).

L'analyse de la SHM dans la région variable des LB-1 de péritoine montre une diminution significative de la fréquence de mutations chez les souris déficientes pour la 3'RR par rapport aux souris *wt*. Les souris AID ont été utilisées comme contrôle négatif pour obtenir le bruit de fond en SHM dans ces échantillons. En revanche, aucune différence n'a été observée dans les LB-1 du foie fœtal.

De façon intéressante, nous avons observé une augmentation de l'insertion de N nucléotides lors des réarrangements V_HDJ_H chez les souris 3'RR déficientes ou AID déficientes. Elle est inversement corrélée à la fréquence de mutation ce qui reflèterait un mécanisme de compensation pour la baisse de diversité causée par diminution de mutations induites par AID lors de la SHM.

En résumé, l'ensemble de ces résultats montre que :

- La délétion de la 3'RR affecte la SHM non seulement des LB-2 mais également des LB-1.
- Cet effet n'est observé que dans les LB-1 matures (pas dans les LB-1 du foie fœtal) confirmant l'action de la 3'RR lors des phases tardives du développement B.



CORRESPONDENCE

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

Issaoui Hussein¹, Ghazzoui 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

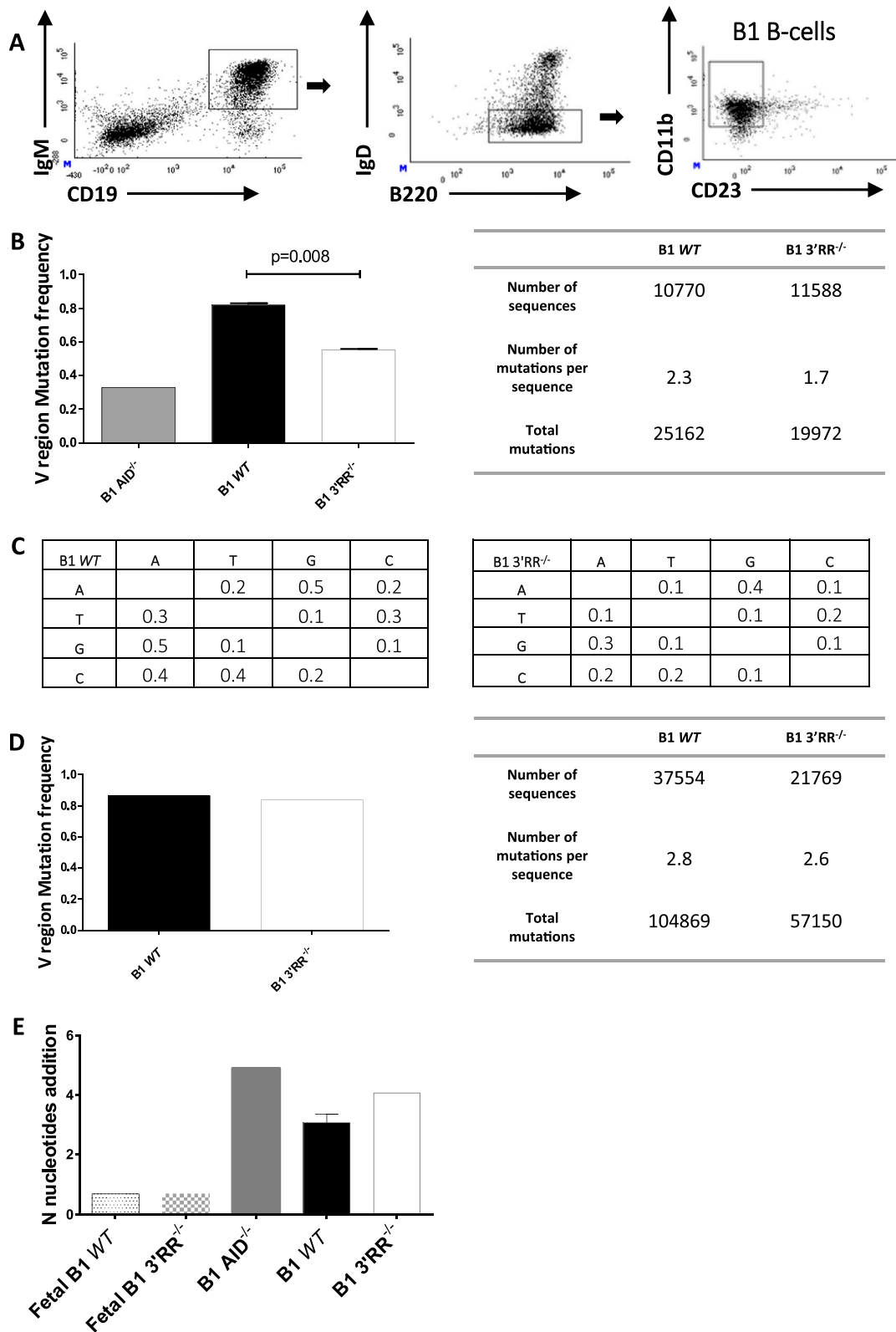
Correspondence: Denizot Yves (yves.denizot@unilim.fr) or Saintamand Alexis (alexis.saintamand@live.fr)

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

These authors contributed equally: Issaoui Hussein, Ghazzoui 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).
- Ghazzoui, 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).
- 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).
- 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., Ghazzoui, 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).

Article 3

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

Issaoui H*, Ghazzaoui N*, Saintamand A, Carrion C, Oblet C, Denizot Y.

* Contribution équivalente

Cellular and Molecular Immunology, 2018

L'implication de la 3'RR lors de la CSR chez les LB-2 a été démontrée dans notre laboratoire, par l'analyse de souris 3'RR déficientes. Les LB-1 font une CSR préférentiellement vers l'isotype α (Baumgarth, 2011). Dans le but de compléter nos connaissances sur la 3'RR, nous avons étudié son rôle sur CSR vers IgA dans les LB-1.

Nous avons tout d'abord analysé, *in vivo*, des LB-1 issus du péritoine de souris déficientes pour la 3'RR, préalablement injectées avec du pristane afin d'induire une réaction inflammatoire. L'analyse, par cytométrie en flux, a démontré un pourcentage similaire de cellules B1 IgA⁺ chez les souris déficientes pour la 3'RR et *wt*. Nous avons ensuite testé la capacité des LB-1 à « switcher » *in vitro*. Pour cela, nous avons stimulé des LB-1 issus du péritoine pendant 4 jours, avec un cocktail LPS + BAFF (BAFF pour *B-cell Activating Factor*) +TGF- β , pour induire la CSR vers IgA. L'analyse, par cytométrie en flux, a confirmé que le pourcentage des cellules B1 IgA⁺ chez les souris 3'RR déficientes est similaire à celui trouvé chez les souris *wt*. Malgré la similarité de CSR vers IgA trouvée *in vivo* et *in vitro*, nous avons démontré, par la technique ELISA, une baisse de la sécrétion d'IgA dans le liquide d'ascite (*in vivo*) ainsi que dans le surnageant de culture (*in vitro*) chez les souris déficientes pour la 3'RR par rapport aux souris *wt*. Cette baisse de sécrétion est confirmée par une baisse des transcrits « *post-switch* » $I\mu-C\alpha$ chez les souris 3'RR déficientes par rapport aux souris *wt*. Ces résultats montrent que la délétion de la 3'RR n'affecte pas la CSR vers IgA mais diminue la transcription de la région $C\alpha$ après le « *switch* » et donc la synthèse d'IgA.

Pour confirmer ces résultats, nous avons analysé la production naturelle d'IgA dans le tractus intestinal de ces souris, en testant la présence d'IgA dans la matière fécale par la technique ELISA. Les résultats ont démontré une baisse des IgA secrétées chez les souris 3'RR déficientes par rapport aux souris *wt*. Une analyse par immunohistochimie de leur tractus intestinal montre une fluorescence IgA⁺ CD138⁺ similaire chez les souris 3'RR déficientes et *wt*. Ces résultats confirment que l'absence de production d'IgA n'est pas liée à un défaut de

« *switch* » ou de maturation plasmocytaire mais plutôt à un défaut de transcription du VDJ-C α formé.

En résumé ce travail a démontré que :

- Contrairement aux LB-2, la délétion de la 3'RR chez les LB-1 n'a aucun effet sur le « *switch* » vers IgA et la maturation plasmocytaire.
- La délétion de la 3'RR chez les LB-1, entraîne une diminution de la transcription « *post-switch* » et donc la synthèse d'IgA par les plasmocytes.

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_H-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

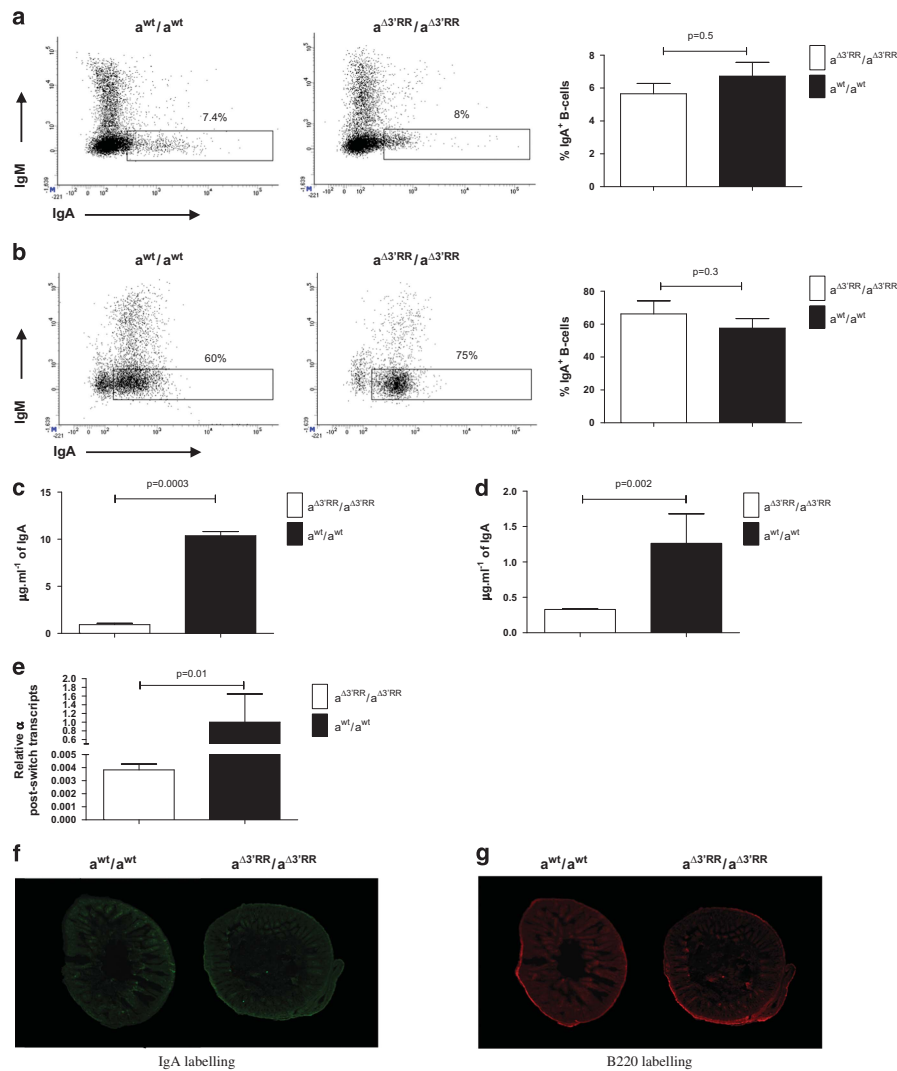


Figure 1 3'RR and B1 B-cell IgA CSR. **(a)** Flow cytometry analysis of IgA⁺ B1 B-cells in the peritoneal cavities of 3'RR-deficient mice and *wt* mice in response to pristane. Mice were treated with 1 ml of pristane for 2 months prior to experiments. Cells were washed and counted and 2×10^6 cells were 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.

- Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol* 2010; **20**: 253–300.
- Tung JW, Herzenberg LA. Unraveling B-1 progenitors. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**: 150–155.
- 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.
- Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 34–46.
- Azir M, Holodick NE, Rothstein TL, Wang P. The role of B-1 cells in inflammation. *Immunol Res* 2015; **63**: 153–166.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B-cells: a focus on cytokines. *Nature Rev* 2015; **15**: 441–451.
- 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.
- Bao S, Beagley KW, Murray AM, Caristo V, Matthaël KI, Young IG *et al*. Intestinal IgA plasma cells of the B1 lineage are IL-5 dependent. *Immunology* 1998; **94**: 181–188.
- 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.
- Arnold LW, Grdina TA, Whitmore AC, Haughton 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.
- 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.
- Saintamand A, Vincent-Fanbert C, Marquet M, Ghazzaoui N, Magnone V, Pinaud E *et al*. E μ and 3'RR IgH enhancers show hierarchic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci Rep* 2017; **7**: 442.

Article 4

Cis-regulatory elements of the IgH locus and B1 and B2 B-cell maturation

Issaoui H*, Ghazzaoui N*, Ferrad M, Lecardeur S, Denizot Y.

* Contribution équivalente

Medecine/Sciences, 2019

Dans cet article, nous présentons une petite synthèse de nos travaux sur le rôle de la 3'RR lors du développement des LB-1 et LB-2.



NOUVELLE

**Éléments *cis*-régulateurs
du locus IgH et maturation
des lymphocytes B1 et B2**

Hussein Issaoui, Nour Ghazzaoui, Mélissa Ferrad,
Sandrine Lecardeur, Yves Denizot

UMR CNRS 7276, Inserm U1262, Équipe labellisée Ligue 2018,
Université de Limoges, CBRS, Rue Professeur Descottes,
87025 Limoges, France.
yves.denizot@unilim.fr

> La fonction d'un lymphocyte B est de produire une immunoglobuline (Ig) spécifique d'un antigène. Pendant bien longtemps rien ne ressemblait plus à un lymphocyte B qu'un autre lymphocyte B alors que le lymphocyte T se déclinait, entre autres, en T4, T8 ou T $\gamma\delta$. En fait, de nombreuses études ont mis en évidence l'hétérogénéité lymphocytaire B avec l'existence des lymphocytes B1 et

B2, compliquée par la description de sous-populations particulières telles les B1a, B1b, B2 folliculaires ou marginaux et B régulateurs. Les lymphocytes B1 participent au système immunitaire inné. Très schématiquement, ils sont produits dans le foie fœtal, vont occuper des niches géographiques précises (entre autres, les muqueuses aériennes et digestives) où ils vont s'y renouveler

et produire des IgM et des IgA poly-réactives assurant la première ligne de défense contre les pathogènes. Les lymphocytes B2, quant à eux, font partie de l'immunité acquise. Ils sont produits à partir de la moelle osseuse, vont terminer leur maturation dans les organes hématopoïétiques secondaires, produisent des Ig de haute affinité (grâce au processus d'hypermutation soma-

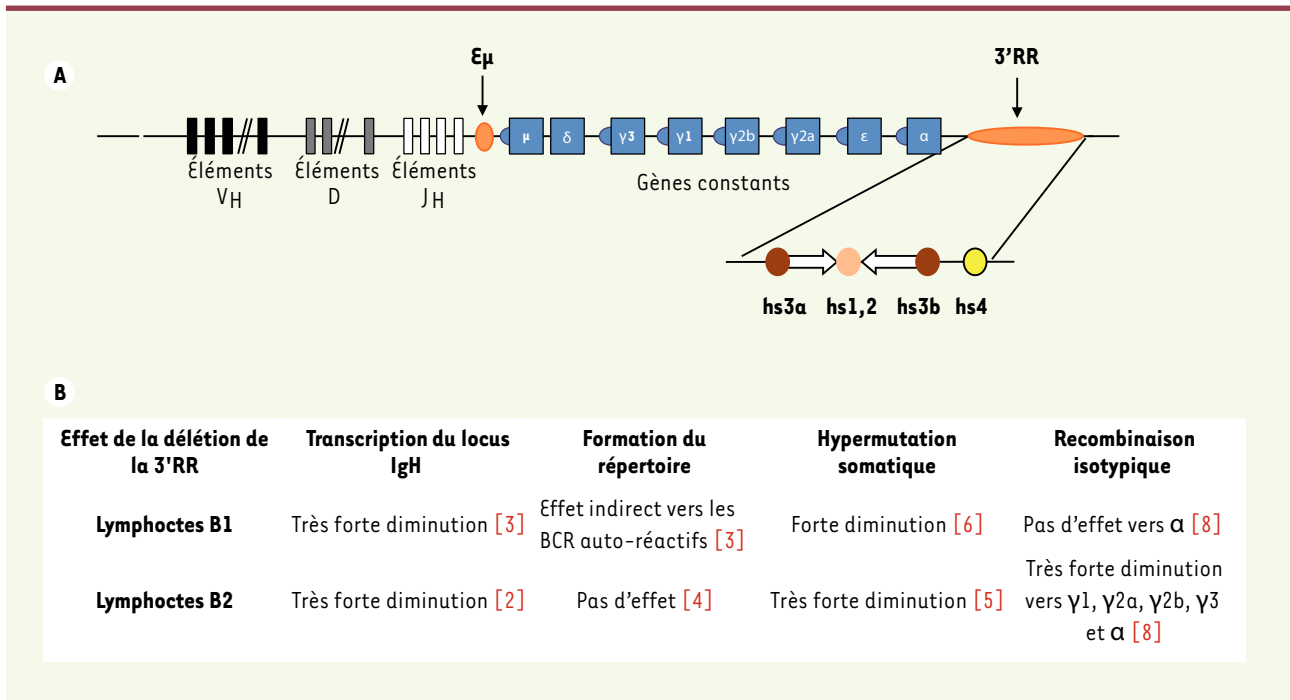


Figure 1. Lymphocytes B1-B2 et activateurs transcriptionnels du locus IgH. **A.** Schéma simplifié et non à l'échelle du locus des chaînes lourdes d'Ig (IgH) (immunoglobuline H) murin. Les deux activateurs transcriptionnels $\epsilon\mu$ et 3'RR (région régulatrice en 3') sont mis en évidence. La région 3'RR est constituée de quatre activateurs transcriptionnels (représentés par des ronds de couleur); les trois premiers étant inclus dans un quasi-palindrome (flèches blanches) de 25 kb. **B.** Comparaison des effets de la délétion de la région 3'RR sur la transcription du locus IgH, le répertoire antigénique, le processus d'hypermutation somatique et la recombinaison isotypique dans les lymphocytes B1 et B2. Les références bibliographiques pertinentes sont indiquées.

tique, ou SHM) et d'isotypes variés (correspondant à différentes classes et sous-classes d'Ig : IgG1, 2, ..., IgA1 ..., IgE), grâce au mécanisme de commutation isotypique, ou CSR. Les lymphocytes B1 diffèrent donc des B2, entre autres par leur origine, leur fonction, leur spécificité antigénique, la diversité de leur répertoire, leurs marqueurs de surface et même leur distribution tissulaire. Les lymphocytes B1 et B2 partagent néanmoins la même fonction de base : produire des Ig.

Les différents événements géniques qui ont lieu lors de la lymphopoïèse B (recombinaisons V(D))¹ pour l'établissement du répertoire antigénique, maturation d'affi-

nité par le SHM, modification des fonctions effectrices des Ig par la CSR, synthèse des Ig) requièrent des régulations à la fois spatiales et temporelles au niveau du locus des chaînes lourdes d'Ig (IgH). Leurs déroulements nécessitent l'intervention d'activateurs *cis*-transcriptionnels (ou *enhancers*). Le locus IgH murin en a deux principaux : l'activateur intronique $\epsilon\mu$ (localisé entre les segments J_H et le gène C_μ) et la région régulatrice en 3' (3'RR) localisée en aval de $C\alpha$ (Figure 1). $\epsilon\mu$ est important pour les recombinaisons V(D) J et l'établissement du répertoire antigénique. La région 3'RR contrôle, aux stades B matures, la transcription du locus IgH, la synthèse d'Ig, la SHM et la CSR [1] (→).

De récentes études ont montré que la région 3'RR n'est pas impliquée de la

même façon dans la maturation des lymphocytes B1 et B2 dévoilant, pour la première fois, un rôle différent d'éléments *cis*-régulateurs du locus IgH dans leur maturation fonctionnelle (Figure 1).

La région 3'RR gouverne le devenir des lymphocytes B1 et B2 par son effet activateur transcriptionnel pour la synthèse de la chaîne μ et donc l'expression d'un BCR (*B-cell receptor*) de membrane. Ainsi, si un lymphocyte B1 ou B2 utilise indifféremment un allèle IgH porteur ou non d'une région 3'RR fonctionnelle pour la création du répertoire antigénique, cette dernière est importante dès les stades au cours desquels la production d'une Ig est nécessaire pour exprimer un BCR de surface et passer les étapes de sélection qui en dépendent [2, 3]. L'analyse des souris déficientes pour la région 3'RR montre qu'elle n'est pas impliquée dans les phases précoces de la lympho-

(→) Voir la Synthèse d'A. Saintamand et al., *m/s* n° 11, novembre 2017, page 963

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 (C_μ , C_γ , C_ϵ , etc.).



poïèse B2 lors des recombinaisons V(D) J pour l'élaboration du répertoire antigénique (supporté par le BCR) [4]. Il en est de même pour les lymphocytes B1. Toutefois, un répertoire B1 biaisé vers des BCR plus auto-réactifs est retrouvé chez les souris déficientes pour la région 3'RR en relation avec son rôle sur la transcription de la chaîne μ dès les stades précoces [3]. Un retard ou une plus faible expression du BCR membranaire conduit, chez les lymphocytes B1, et à la différence des lymphocytes B2, à la sélection des clones les plus auto-réactifs, les lymphocytes B1 nécessitant une forte signalisation induite par le BCR pour survivre. La présence d'une région 3'RR fonctionnelle est nécessaire au processus de SHM à la fois pour les lymphocytes B2 [5] et les lymphocytes B1 [6], même si ces derniers hypermutent moins fréquemment que les B2. En revanche, si la région 3'RR est absolument nécessaire à la CSR pour le lymphocyte B2 [7], tel n'est pas le cas pour le lymphocyte B1 [8]. La capacité naturelle du B1 à la recombinaison isotypique vers α (pour produire une IgA) se déroule nor-

malement en absence de la région 3'RR. En revanche, de par son effet indispensable sur la transcription du locus IgH, ces lymphocytes B1 exprimant un BCR IgA présentent une importante diminution de leur sécrétion d'IgA.

En conclusion, les activateurs transcriptionnels du locus IgH, et en particulier ceux de la région 3'RR, n'influencent pas de façon similaire la maturation/fonction des lymphocytes B1 et B2, montrant, pour la première fois, un rôle différent des éléments *cis*-régulateurs IgH dans leur devenir. \diamond

Cis-regulatory elements of the IgH locus and B1 and B2 B-cell maturation

REMERCIEMENTS

Ce travail a été financé par l'ANR (projet EpiSwitch-3'RR 2016) et la Ligue Contre le Cancer (équipe labellisée Ligue 2018). Nour Ghazzaoui bénéficie d'une bourse de la Société Française d'Hématologie. Hussein Issaoui et Mélissa Ferrad ont des contrats doctoraux soutenus par l'université de Limoges et la région Nouvelle Aquitaine.

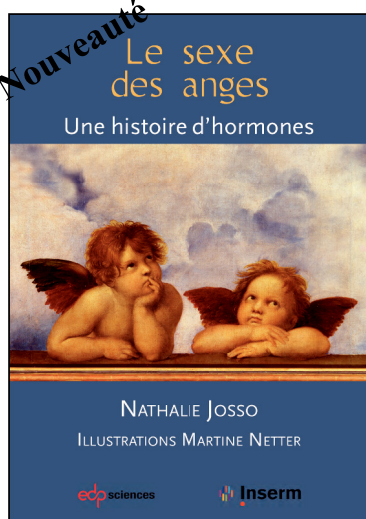
LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Saintamand A, Ghazzaoui N, Issaoui H, et al. 3'RR - Doctor Jekyll et Mister Hyde de la lymphopoïèse/lymphogénèse B. *Med Sci (Paris)* 2017 ; 33 : 963-70.
2. 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.
3. Ghazzaoui N, Issaoui H, Saintamand A, et al. The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer controls mouse B1 B-cell fate and late V(D)J repertoire diversity. *Blood Adv* 2018 ; 2 : 252-62.
4. 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.
5. 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.
6. Issaoui H, Ghazzaoui N, Boyer F et al. Deletion of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer affects somatic hypermutation in B1 B cells. *Cell Mol Immunol* 2018 ; 16 : 195-7.
7. 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.
8. Issaoui H, Ghazzaoui N, Saintamand A, et al. The immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer does not control IgA class switch recombination in B1 lineage. *Cell Mol Immunol* 2018 ; 15 : 289-91.

Bon de commande à retourner à EDP Sciences, 17 avenue du Hoggar, 91944 Les Ulis 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

Le sexe des anges : 20 € + 3 € de port = **23 € 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 : | | | | |

Article 5

Class switch recombination junctions are not affected by the absence of the immunoglobulin heavy chain E μ enhancer

Issaoui H*, Ghazzaoui N*, Ferrad M, Boyer F, Denizot Y.

* Contribution équivalente

Cellular and Molecular Immunology, 2019

Différentes études ont démontré la présence d'interactions intra-chromosomiques entre les deux activateurs E μ et 3'RR lors de la CSR (Feldman et al., 2015; Stavnezer and Schrader, 2014; Wuerffel et al., 2007). Le locus IgH subit une modification 3D de sa topologie en formant une boucle chromatinienne. Cette dernière semble être importante pour rapprocher l'ensemble des « *enhancers* », promoteurs et régions S afin de faciliter le déroulement de ce processus. La réparation des DSB induites par AID est ensuite prise en charge par deux voies de réparation. La voie NHEJ génère principalement des jonctions directes ou à courtes microhomologies. La voie A-EJ conduit majoritairement à des jonctions à longues microhomologies. Une analyse des jonctions S μ -S x permet ainsi d'avoir une idée sur la voie de réparation majoritairement utilisée.

La délétion d'E μ n'a qu'un effet modeste sur la CSR (Li et al., 2010; Marquet et al., 2014; Perlot et al., 2005). Il était cependant possible que ses interactions au sein de la boucle chromatinienne pouvaient être importantes pour les processus de réparation des jonctions. Pour tester cette hypothèse nous avons étudié l'effet de la délétion d'E μ sur la signature moléculaire des jonctions lors de la CSR, en utilisant un nouvel outil d'analyse de données de séquençage haut débit développé dans notre laboratoire (Boyer et al., 2017).

Nous avons stimulé des splénocytes *in vitro* pendant 4 jours avec du LPS seul (pour induire la CSR vers IgG3), un cocktail LPS+IL4 (pour induire la CSR vers IgG1) et un cocktail LPS+TGF- β (pour induire la CSR vers IgA). L'analyse par cytométrie en flux montre que la délétion d'E μ n'a qu'un effet modeste sur la CSR vers IgG1 (8,5% de cellules IgG1⁺ dans les souris E μ *KO* versus 19,3% chez les *wt*), et pas d'effet sur celle vers IgG3 (5% de cellules IgG3⁺ dans les souris E μ *KO* versus 5,6% chez les *wt*) et IgA (1,7% de cellules IgA⁺ dans les souris E μ *KO* versus 3,5% chez les *wt*).

Nous avons amplifié puis séquencé des jonctions S μ -S γ 1, S μ -S γ 3 et S μ -S α à partir de l'ADN des splénocytes stimulés. L'analyse du type de jonctions (directes, avec insertions, courtes et longues microhomologie) n'a révélé aucune différence significative entre les souris E μ déficientes et *wt*, suggérant que la délétion d'E μ ne perturbe pas le choix de la voie de réparation utilisée.

En résumé, notre étude a permis de démontrer que :

- La délétion d'E μ n'a pas d'effet significatif sur la CSR.
- La délétion d'E μ ne modifie pas le choix de la voie de réparation.



CORRESPONDENCE

Class switch recombination junctions are not affected by the absence of the immunoglobulin heavy chain E_{μ} enhancer

Hussein Issaoui¹, Nour Ghazzaoui¹, Mélissa Ferrad¹, François Boyer¹ and Yves Denizot¹

Cellular & Molecular Immunology _#####_ ; <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0229-x>

After encountering antigen, B-cells undergo class switch recombination (CSR) that substitutes the constant (C_{μ}) gene with C_{γ} , C_{ϵ} , or C_{α} , thereby generating IgG, IgE, and IgA antibodies with new effector functions but the same antigenic specificity.¹ The DNA-editing enzyme activation-induced deaminase (AID) is required for CSR by targeting specific DNA switch (S) regions preceding the C region, except C_{δ} .² S_{μ} is the donor region, while $S_{\gamma,\epsilon,\alpha}$ are the acceptor regions. CSR is controlled in *cis* by the immunoglobulin heavy chain (IgH) 3' regulatory region (3'RR).³ The 3'RR is essential to poise AID on the S acceptor region. During CSR IgH, intrachromosomal interactions (schematized in Fig. 1a) are found between the 3'RR and the intronic E_{μ} enhancer.^{1,4} Looping allows transcriptional binding activators to enhancers to facilitate CSR. However, CSR is only modestly influenced by E_{μ} deletion.^{5–7} During CSR, two different DNA repair pathways take place: the classical nonhomologous end joining (c-NHEJ) and the alternative end joining (A-EJ) pathways. The c-NHEJ pathway (which uses components such as 53BP1, Ku70, ku80, XRCC4, and ligase 4) is preferentially implicated for blunt and microhomology structure junctions and the A-EJ pathway (which uses components such as CtIP, MRN, PARP1, DNA Pol θ) favors junctions with large homology.^{8,9} Data have reported that when an element of the DNA damage response pathway is defective, the molecular signature of CSR junctions is affected, suggesting that junctions are repaired through a different DNA repair pathway.¹⁰ We recently reported a new computational tool (CSRreport) for the automatic analysis of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing,¹¹ and used it to analyze the rare S_{μ} - S_{δ} junctions during IgD CSR,^{12,13} S_{μ} - $S_{\gamma,\alpha}$ junctions in wild-type (wt) mice¹⁴ and UNG-deficient mice.¹⁵ Even if E_{μ} -deficient mice exhibited a modest defect in IgH CSR, it is conceivable that its participation in CSR 3D loop interactions would be important for the DNA repair process. We used the CSRreport 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 E_{μ} -deficient mice to perform a more in depth search for a putative difference in their DNA repair pathways compared to those in wt mice.

The mice were housed and the procedures were conducted in agreement with European Directive 2010/63/EU on animals used for scientific purposes applied in France as the « Décret n°2012–118 du 1^{er} février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ». Accordingly, the present project (APAFIS#13855) was authorized by the « Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement

Supérieur et de la Recherche ». E_{μ} -deficient and wt mice (housed in a conventional animal facility) were used. Single-cell suspensions of B-splenocytes were cultured for 4 days at 1×10^6 cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum and 5 μ g/ml LPS, with (CSR toward IgG₁) or without (CSR toward IgG₃) the addition of 20 ng/ml IL-4 or 2 ng/ml TGF β (PeproTech, Rocky Hill, NJ) (CSR toward IgA).^{14,16} Splenocytes were washed in PBS and stained with various antibodies: anti-B220-BV510 (BioLegends), anti-CD138-APC (Becton Dickinson Biosciences), anti-IgM PEcy7 (ebiosciences), anti-IgG₃-FITC (Becton Dickinson Biosciences), anti-IgG₁-PE (Becton Dickinson Biosciences), and anti-IgA-FITC (Southern Biotech). The cells were analyzed on a Fortessa LSR2 (Beckman Coulter). In parallel experiments, stimulated B-cell splenocyte DNA was extracted for the investigation of S_{μ} - S_{γ_3} , S_{μ} - S_{γ_1} , and S_{μ} - S_{α} junctions. As previously described in detail,¹¹ the junctions were PCR amplified. Libraries of 200 bp were prepared from the 1–2 kb PCR products of S_{μ} - S_{γ_3} , S_{μ} - S_{γ_1} , and S_{μ} - S_{α} amplification for Ion Proton sequencing ("GénoLim platform" of the Limoges University, France). The sequenced reads were then mapped to S_{μ} , S_{γ_1} , S_{γ_3} , and S_{α} regions using the BLAST algorithm. As previously reported,¹¹ 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, microhomology, large homology or insertion junctions) and outputs a statistical summary of the identified junctions.

Confirming previous studies,^{5–7} flow cytometry experiments indicated that compared to wt mice, the deletion of the E_{μ} enhancer had only a minor impact on CSR toward IgG₃ (mean 5.0 vs 5.6%), IgG₁ (mean 8.5 vs 19.3%), and IgA (mean 1.7 vs 3.5%) (Fig. 1b). We then extracted stimulated B-cell DNA to investigate the molecular signatures of these S_{μ} - S_{γ_3} (IgG₃ CSR), S_{μ} - S_{γ_1} (IgG₁ CSR), and S_{μ} - S_{α} (IgA CSR) junctions. When a few dozen CSR junctions are reported after cloning and subsequent Sanger sequencing, several hundred or thousand junctions can be documented using our computational tool of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing. The structural profiles (blunt, microhomology, large homology or junction with insertions) of 2443 S_{μ} - S_{γ_3} , 8982 S_{μ} - S_{γ_1} , and 617 S_{μ} - S_{α} E_{μ} -deficient junctions and 7209 S_{μ} - S_{γ_3} , 14,700 S_{μ} - S_{γ_1} , and 2639 S_{μ} - S_{α} wt junctions are reported in Fig. 1c. No significant difference (Mann–Whitney *U*-test) was found between E_{μ} -deficient mice and wt mice. In addition to the type of junctions, the distribution of IgG₃, IgG₁, and IgA junctions in terms of distance from the forward PCR primer in S_{μ} and from one of the reverse primers in

¹UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Equipe Labellisée LIGUE 2018, University of Limoges, CBRS, rue Pr. Descottes, 87025 Limoges, France

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

These authors contributed equally: Hussein Issaoui, Nour Ghazzaoui

Received: 14 March 2019 Accepted: 16 March 2019

Published online: 09 April 2019

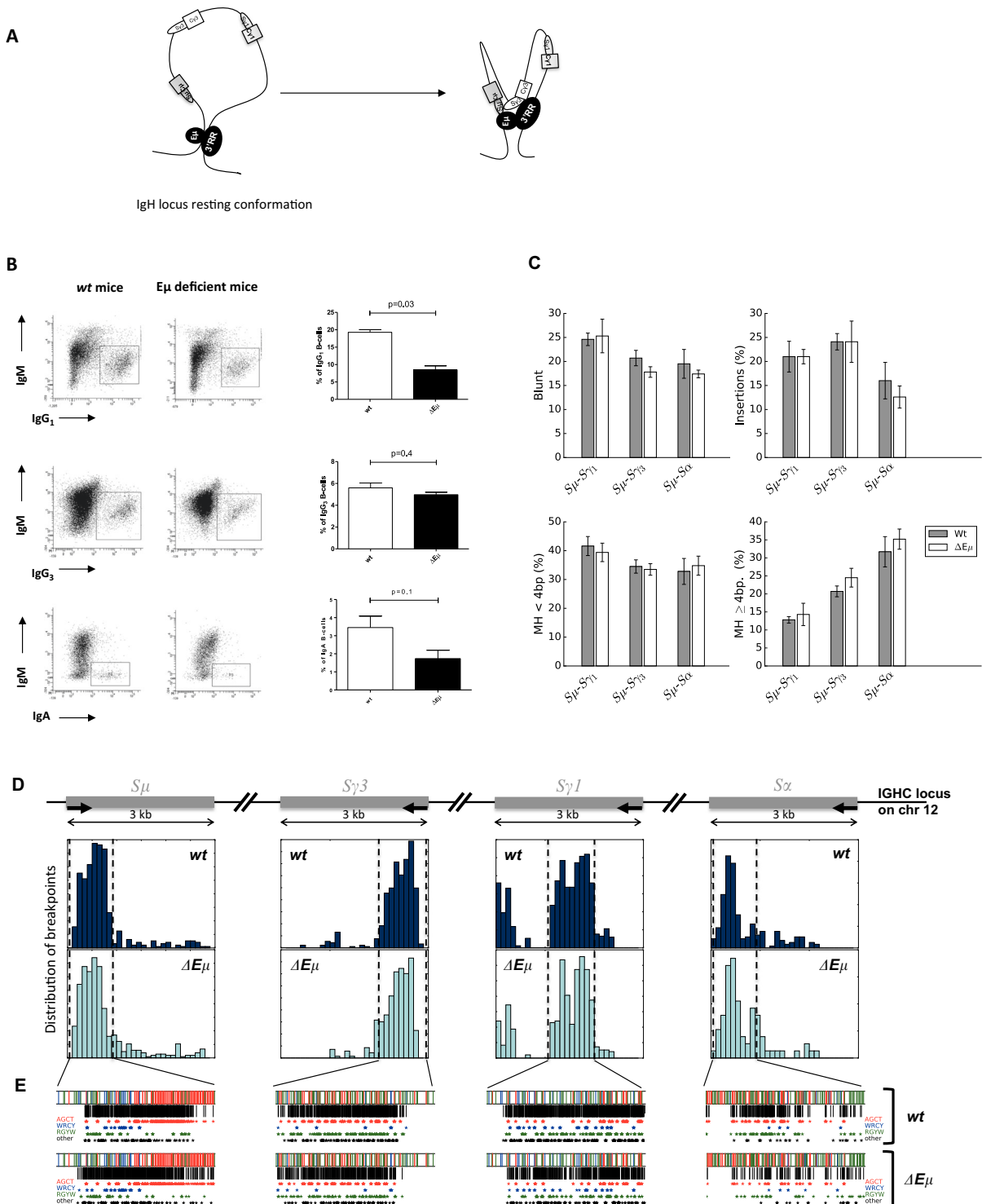


Fig. 1 Class switch recombination in $E\mu$ -deficient mice. **a** Schematic representation of IgH intrachromosomal interactions between $E\mu$ and 3'RR transcriptional enhancers with the S acceptor and S donor regions during CSR (according to references 1 and 4). **b** IgG₁, IgG₃, and IgA CSR in $E\mu$ -deficient and wt mice. B-splenocytes were LPS-cultured for 4 days with (CSR toward IgG₁) or without (CSR toward IgG₃) the addition of IL-4 or TGF β (CSR toward IgA). Cells gated on B220⁺ and/or CD138⁺ cells were investigated with anti-IgM, anti-IgG₃, anti-IgG₁, and anti-IgA antibodies. One representative experiment out of a total of 3–5 experiments for each isotype is shown. Mean \pm SEM of three to five experiments for each isotype is reported. Significances were investigated using the Mann–Whitney U-test. **c** Structure profiles of $S\mu$ - $S\gamma_1$, $S\mu$ - $S\gamma_3$, and $S\mu$ - $S\alpha$ junctions in $E\mu$ -deficient and wt mice. Junctions are classified in terms of junction with insertion, blunt junction, junction with microhomology (<4 bp) or large homology (\geq 4 bp). The junction profile was not significantly different in wt and $E\mu$ -deficient mice. The results are pooled from three to seven mice. **d** Breakpoint localization in $S\mu$ - $S\gamma_1$, $S\mu$ - $S\gamma_3$, and $S\mu$ - $S\alpha$ junctions in wt and $E\mu$ -deficient mice (same junctions as in Fig. 1c). **e** Motif targeting in $S\mu$ - $S\gamma_1$, $S\mu$ - $S\gamma_3$, and $S\mu$ - $S\alpha$ junctions. The stars identify breakpoint positions in AGCT, WRCY, and RGYW AID hotspots (same junctions as shown in Fig. 1c)

$S_{\gamma 3}$, $S_{\gamma 1}$, and S_{α} was similar in E_{μ} -deficient and *wt* mice (Fig. 1d). The same results were found for the localization of the breakpoints within AID hotspots (AGCT, WRCY, RGYW) and other motifs (Fig. 1e) (displayed along specifically targeted segments within S regions).

As previously reported by others,^{5–7} the efficacy of CSR is, at most, modestly reduced by the deletion of the E_{μ} enhancer. Until recently, the transcriptional enhancers located in the IgH 3'RR are the sole *cis*-regulatory elements reported to affect conventional CSR.^{2,3,17} Compared with *wt* mice, the type and location of the CSR junctions in the absence of E_{μ} are unaffected. This observation is highlighted with three different isotypes ($\gamma 1$, $\gamma 3$, and α) by the analysis of a thousand independent junctions using our computational tool of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing. The E_{μ} enhancer is dispensable to poise AID to S donor/acceptor regions and for the generation of double strand breaks.¹⁸ E_{μ} IgH intrachromosomal interactions with S donor/acceptor regions and the 3'RR do not seem important to recruit/stabilize DNA repair factors and, thus, for the choice of the DNA repair pathway. In fact, do these E_{μ} IgH intrachromosomal interactions have a real relevance? Are these interactions only mechanical due to the IgH location of E_{μ} and to the 3D folding that brings S regions into contact with each other? These questions remain open. Deletion of the *cis*-regulatory IgH 3'RR affects CSR to all isotypes (except IgD).^{3,17} We currently investigate the molecular signature of the remaining CSR junctions in 3'RR-deficient mice to search for a potential role in the recruitment of specific DNA repair factors.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors are "Equipe Labellisée LIGUE 2018". This work was supported by ANR (projet EpiSwitch-3'RR 2016). N.G. was supported by a grant from the "Société Française d'Hématologie". H.I. and M.F. are supported by the University of Limoges and the "Région Nouvelle Aquitaine". F.B. is supported by the Fondation Partenariale de l'Université de Limoges and ALURAD.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

ADDITIONAL INFORMATION

Competing interests: The authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. Stavnezer, J. & Schrader, C. E. IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J. Immunol.* **193**, 5370–5378 (2014).
2. Rouaud, P. et al. Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region. *J. Exp. Med.* **211**, 975–985 (2014).
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. Wuerrffel, 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. Marquet, M. et al. The E_{μ} enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgV_H repertoire and immune response in vivo. *J. Immunol.* **193**, 1171–1183 (2014).
6. 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).
7. 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* **102**, 14362–14367 (2005).
8. Chaudhuri, J. & Alt, F. W. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 541–552 (2004).
9. Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N. & Lieber, M. R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 495506 (2017).
10. 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).
11. 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).
12. Ghazzaui, N., Issaoui, H., Saintamand, A., Boyer, F. & Denizot, Y. Analysis of IgD CSR junctions by high-throughput sequencing. *Immunol. Lett.* **188**, 86–88 (2017).
13. Issaoui, H., Ghazzaui, 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).
14. Issaoui, H., Ghazzaui, 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.* **16**, 90–92 (2019).
15. Ghazzaui, N., Issaoui, H., Saintamand, A., Denizot, Y. & Boyer, F. Uracil-DNA glycosylase is not implicated in the choice of the DNA repair pathway during B-cell class switch recombination. *Cell. Mol. Immunol.* **16**, 93–95 (2019).
16. 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).
17. 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).
18. Saintamand, A. et al. E_{μ} and 3'RR IgH enhancers show hierarchic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci. Rep* **7**, 442 (2017).

Discussion et perspectives

Durant ma thèse, mon objectif principal a consisté à étudier le rôle de la 3'RR lors de la maturation des LB, particulièrement les LB-1. Ces derniers diffèrent des LB-2 par différents critères tels que leur origine, fonction, distribution et marqueurs de surface. Ils sont les premiers lymphocytes à apparaître, dans le foie fœtal, lors du développement. Ils sont caractérisés par leur sécrétion spontanée de NIgM et représentent la première ligne de défense contre les invasions des pathogènes. Les LB-1 sont donc à l'interface entre les immunités innées et adaptatives.

Afin d'étudier ce rôle, notre stratégie d'étude a reposé sur l'utilisation d'un modèle de souris *KO* pour la 3'RR, préalablement créé dans notre laboratoire (Vincent-Fabert et al., 2010). Notre travail a démontré que des similarités et des différences existent dans la régulation du développement des LB-1 et LB-2 par la 3'RR.

a) B1, 3'RR et réarrangements V_HDJ_H

L'analyse des LB-1 d'animaux hétérozygotes $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ a montré un désavantage de l'utilisation de l'allèle $a^{\Delta 3'RR}$ par rapport à l'allèle b^{wt} dès le stade du foie fœtal. Ce résultat suggère que la 3'RR intervient dans le développement des LB-1 et leur future accumulation dans les différents organes. Nous avons également observé une baisse importante de la transcription μ dans les LB-1 issus de souris déficientes pour la 3'RR. Comme pour les LB-2 (Saintamand et al., 2015a), la 3'RR contrôle donc le « *cell fate* » et la transcription de la chaîne μ dans les LB-1.

Contrairement aux LB-2, le répertoire V_HDJ_H des LB-1 est affecté par la délétion de la 3'RR. On note une augmentation du pourcentage de clones auto-réactifs. Cette modification de répertoire ne semblerait pas être liée à un défaut du processus de réarrangement V_HDJ_H , mais serait probablement liée à un défaut de sélection lors des « *checkpoints* » qui ponctuent le développement B. Une baisse de la transcription de la chaîne μ est accompagnée par une baisse de l'expression du BCR à la surface des cellules B1. Cette dernière pourrait se traduire par une baisse de l'intensité de signalisation par le BCR induite par la fixation d'un auto-Ag, lui permettant de passer sous le seuil de détection nécessaire à l'induction de l'apoptose. Plusieurs études ont démontré l'importance de la signalisation induite par le BCR pour un bon développement des LB-1 (Berland and Wortis, 2002). Des mutations qui inhibent la signalisation du BCR, réduisent le développement des LB-1, tandis que, des mutations qui la renforcent l'améliorent. Le contrôle de la transcription par la 3'RR (et donc l'expression du BCR) est donc indirectement important pour la génération d'un répertoire antigénique de LB-

1 circulants en limitant la présence de clones auto-réactifs ; un effet qui n'est pas observé dans les LB-2.

Afin de confirmer nos résultats, il serait intéressant d'effectuer, dans les LB-1, des expériences permettant d'analyser la signalisation du BCR (phosphorylation de *syk*; phosphorylation d'*Akt*...) chez les souris 3'RR déficientes. Ceci nous permettrait de valider notre hypothèse, en prouvant que la baisse d'expression de BCR causée par la délétion de la 3'RR, entraînerait une baisse de la signalisation induite. Cependant, ces expériences sont difficilement réalisables compte tenu du très faible nombre de LB-1 susceptibles d'être récupérés et du grand nombre de cellules nécessaires à ces expériences de Western Blot.

i. Coopération $E\mu$ 3'RR ?

La régulation des recombinaisons V_HDJ_H , lors des stades précoces de développement, serait assurée par l'élément *cis*-régulateur $E\mu$ (Guo et al., 2011b; Marquet et al., 2014; Medvedovic et al., 2013; Perlot et al., 2005). Cependant, la délétion d' $E\mu$ n'abolit pas totalement les recombinaisons V_HDJ_H . La présence d'une activité résiduelle de recombinaison V_HDJ_H dans des modèles déficients pour $E\mu$ suggère l'implication d'un autre(s) élément(s) « *enhancer(s)* ».

Un des candidats potentiels est PDQ52. Ce dernier a été exclu parce que sa délétion conjointe avec $E\mu$ n'aggrave pas le phénotype engendré par la simple délétion d' $E\mu$ (Afshar et al., 2006). Un autre candidat potentiel pour une possible coopération avec $E\mu$ serait la 3'RR. En effet, d'après différentes études, et par analogie au locus IgH , une simple délétion de l'« *enhancer* » intronique E_{ik} entraîne une diminution des réarrangements $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ (Xu et al., 1996), tandis que sa délétion conjointe avec les « *enhancers* » 3' $Ig\kappa$ bloque complètement les recombinaisons $V_{\kappa}-J_{\kappa}$ (Inlay et al., 2002). En outre, différentes expériences utilisant les techniques de FISH et de 3C ont démontré l'existence d'une interaction physique entre $E\mu$ et la 3'RR lors des réarrangements V_HDJ_H (Guo et al., 2011b; Jhunjhunwala et al., 2008). Cependant, nos résultats en accord avec ceux obtenus précédemment dans notre laboratoire, démontrent que la 3'RR est dispensable aux réarrangements V_HDJ_H remettant en cause cette interaction physique $E\mu$ -3'RR. Le rôle et la cinétique d'activation des « *enhancers* » au cours du développement B ont été mis en évidence par plusieurs études. Aux stades précoces, les recombinaisons V_HDJ_H sont régulées par $E\mu$ (Marquet et al., 2014; Perlot et al., 2005). Ce dernier est dispensable pour les phénomènes de SHM et de CSR aux stades matures (Li et al., 2010). A l'inverse, la 3'RR contrôle la SHM et la CSR aux stades matures (Rouaud et al., 2013;

Saintamand et al., 2015a; Vincent-Fabert et al., 2010), mais est dispensable pour les recombinaisons $V_H D J_H$ (Rouaud et al., 2012).

Afin de clarifier ce potentiel « *cross-talk* » entre E_μ et la 3'RR, nous avons utilisé la technique RNAseq pour analyser les cellules pro-B et B matures de souris déficientes pour E_μ ou la 3'RR. Ces expériences ont donné lieu aux deux publications que je présente en annexe (**Annexes 4 et 5**).

Au stade mature, la délétion d' E_μ n'a aucun effet sur la transcription sens/anti-sens essentielle pour la CSR, l'expression des eRNA (eRNA pour *enhancer* RNA) de la 3'RR et les marques épigénétiques d'activation qui lui sont associées. Par contre, la délétion de la 3'RR diminue la transcription d' E_μ et de ses marques épigénétiques d'activation (H3K9ac). Ces résultats suggèrent un « *cross-talk* » unidirectionnel au stade B mature (Saintamand et al., 2017). La conformation en boucle adoptée par le locus IgH lors de la CSR semble être essentielle pour rapprocher l'ensemble des « *enhancers* », promoteurs et régions S. La structure $E_\mu/S_\mu/S_x/3'RR$ permettrait de mettre la région S acceptrice à proximité de la 3'RR pour assurer sa transcription d'une manière efficace et ainsi augmenter son ciblage par AID (Saintamand et al., 2015b). Elle supporterait les interactions physiques/fonctionnelles et la synergie entre les différents « *enhancers* » formant la 3'RR (Pinaud et al., 2011). Elle faciliterait la formation de la synapse S_μ/S_x en augmentant la probabilité d'une jonction légitime entre ces dernières tout en réduisant le risque de translocation oncogénique (**Annexe 6**). Les phénotypes précédemment décrits suggèrent un autre objectif pour cette structure, qui est celui de situer E_μ sous l'autorité de la 3'RR.

Au stade pro-B, nous avons démontré (en utilisant des modèles déficients pour l'enzyme Rag et la technique RNAseq) que les eRNA de la 3'RR ne sont pas exprimés (**Annexe 4**). Ceci confirme que la 3'RR n'a aucun effet évident lors des recombinaisons $V_H D J_H$ (Medvedovic et al., 2013; Rouaud et al., 2012). Nous avons observé, suite à la délétion d' E_μ , une baisse de la transcription sens/anti-sens autour de son emplacement ainsi que celui de C_μ . D'une façon surprenante, nous avons mis en évidence une activité de « *silencer* » de transcription par la 3'RR au stade pro-B. Une augmentation de la transcription (particulièrement anti-sens) des segments D, J_H , E_μ et de C_μ (ainsi qu'une augmentation des transcrits I_μ partant de E_μ et $\mu 0$ partant de PDQ52), a été observée lors de la délétion de la 3'RR. L'ensemble de ces données confirme celles obtenues lors d'une étude récente réalisée par Braikia et coll (Braikia et al., 2015) avec des PCR multiplex.

Les analyses de nos données de RNAseq ont permis, pour la première fois, de révéler un autre effet intéressant de la 3'RR : son effet *silencer* en *trans* sur la transcription du locus

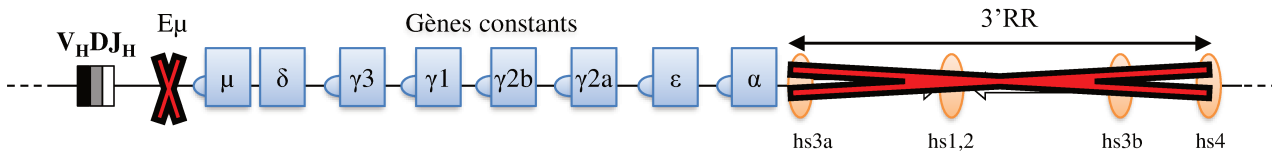


Figure 26 – Représentation schématique du modèle de double KO.

Ig κ (**Annexe 5**). Au stade pré-B, des interactions physiques entre les chromosomes portant les loci IgH et Ig κ ont été mises en évidence. L'exclusion allélique d'un des deux chromosomes IgH est régulée par un effet *silencer* des activateurs du locus κ (Hewitt et al., 2008; Vettermann and Schlissel, 2010). Au stade pro-B, la 3'RR exercerait son effet *silencer* sur le locus κ afin d'inhiber temporairement son activation jusqu'au stade pré-B. Cet effet permettrait d'empêcher une expression d'une chaîne légère avant celle d'une chaîne lourde fonctionnelle et d'assurer ainsi le bon déroulement séquentiel des différents événements de recombinaison.

L'ensemble de nos données confirme l'hypothèse du rôle séquentiel des « *enhancers* » E μ et 3'RR. Malgré leurs interactions physiques, ou plutôt leurs localisations spatio-temporelles, les deux activateurs se comportent d'une façon autonome en ce qui concerne l'expression des eRNA, les marques chromatiniennes et l'accessibilité. Aux stades précoces, seul E μ contrôle les réarrangements géniques. Aux stades matures, la 3'RR est suffisante pour le déroulement des événements tardifs tout en plaçant E μ sous son contrôle.

Actuellement, et afin de mimer le modèle murin ciblant les deux activateurs du locus Ig κ (Inlay et al., 2002), nous générons, au locus IgH, des souris double *KO* pour E μ et la 3'RR (**Figure 26**). Ce modèle nous permettra de clarifier cette éventuelle coopération E μ -3'RR. La persistance de recombinaisons V_HDJ_H résiduelle suggérerait la présence d'un autre activateur impliqué lors de ces réarrangements et agissant en coopération avec E μ . Après sa mise en évidence, l'E Υ 1 pourrait être un candidat potentiel pour une coopération avec E μ et la 3'RR.

b) B1, 3'RR, SHM et CSR

Une étude réalisée au sein de notre laboratoire, a mis en évidence un rôle prépondérant de la 3'RR lors de la SHM dans les LB-2 (Rouaud et al., 2013). Afin d'étudier l'existence d'un éventuel rôle de la 3'RR dans les LB-1, nous avons analysé la SHM dans notre modèle murin déficient pour la 3'RR. Ainsi, la délétion de la 3'RR provoque une diminution de la fréquence de mutations dans la région V_H de cellules B-1 issues du péritoine par comparaison aux B1 de souris *wt*. En revanche, aucune différence significative n'a été observée dans les LB-1 issus du foie foetal (avant leur rencontre avec l'Ag). Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle la 3'RR régule l'activité du locus IgH (ici les SHM) lors des stades tardifs du développement B.

D'une manière surprenante, et bien que la CSR et la SHM soient initiées par la même protéine AID, la délétion de la 3'RR n'a aucun effet sur la CSR vers IgA des LB-1. Plusieurs études ont démontré que le « *switch* » des LB-1 vers IgA est particulièrement unique. En effet, une activation des LB-1 dans des conditions minimales de stimulation favorise leur « *switch* »

vers l'IgA. L'utilisation d'une stimulation optimale pour le « *switch* » vers IgA dans les LB-2 entraîne sa suppression dans les LB-1 (Kaminski and Stavnezer, 2006; Roy et al., 2013). Une étude réalisée par Kim et coll a démontré la présence d'un « *switch* » normal, en absence de la 3'RR, dans une lignée lymphocytaire B nommée CH12F3 (Kim et al., 2016). Cette lignée est unique pour sa capacité à effectuer une recombinaison isotypique vers IgA et possède un phénotype de LB-1 (Arnold et al., 1988; Won and Kearney, 2002). L'ensemble de ces données confirme nos résultats montrant un « *switch* » vers IgA indépendant de la 3'RR.

Bien qu'une différence de régulation de la CSR entre les LB-1 et les LB-2 ait été mise en évidence d'un point de vue cytokinique, les différences moléculaires pour cette CSR entre les deux populations lymphocytaires B1 et B2 ne sont pas claires et reste toujours à élucider.

Très récemment, un nouvel « *enhancer* », nommé l'« *enhancer* » $\Upsilon 1$ (E $\Upsilon 1$), a été mis en évidence au locus IgH (Amoretti-Villa et al., 2019). Sa délétion entraîne une baisse significative du « *switch* » vers IgA *in vitro* dans la lignée CH12F3. Cependant, sa délétion n'a pas d'effet significatif *in vivo* sur le « *switch* » vers IgA des cellules B2 de la rate. E $\Upsilon 1$ pourrait être un candidat potentiel pour la régulation du « *switch* » vers IgA des LB-1. Il serait intéressant d'étudier l'effet de sa délétion sur le « *switch* » vers IgA des LB-1 issus du péritoine afin de clarifier la régulation de ce « *switch* » unique.

c) Les LB-1 chez l'homme

L'existence des LB-1 chez la souris est bien démontrée. Il existe un homologue des cellules B-1 murines chez l'homme. Les premières études effectuées chez l'homme ont démontré que les cellules B de la leucémie lymphoïde chronique expriment le CD5, un marqueur exprimé par les LB-1 murins. Suite à cette découverte, différents travaux ont été lancés afin d'identifier l'homologue de ces cellules chez des individus sains. Une population CD5⁺ a été identifiée dans différents tissus. Elle peut subir une expansion dans certaines maladies auto-immunes (Antin et al., 1986; Bhat et al., 1992; Bofill et al., 1985; Caligaris-Cappio et al., 1982; Casali et al., 1987; Dauphinée et al., 1988). Cependant, la fréquence élevée des cellules B CD5⁺ chez l'homme par rapport à la souris, et le fait que les cellules B-1 murines n'expriment pas toutes le CD5, rend ce marqueur insuffisant pour discriminer les LB-1 humains. En effet, le CD5 est aussi exprimé chez l'homme par les cellules pré-naïves, transitionnelles et les LB-2 activés, expliquant le grand nombre de cellules B CD5⁺ circulantes identifiées lors des toutes premières études. Ce problème a été résolu récemment par l'équipe du Dr. Rothstein qui a pu identifier une sous population B possédant les mêmes caractéristiques que les LB-1 murins (Griffin et al., 2011; Rothstein et al., 2013). Elle a suivi une stratégie

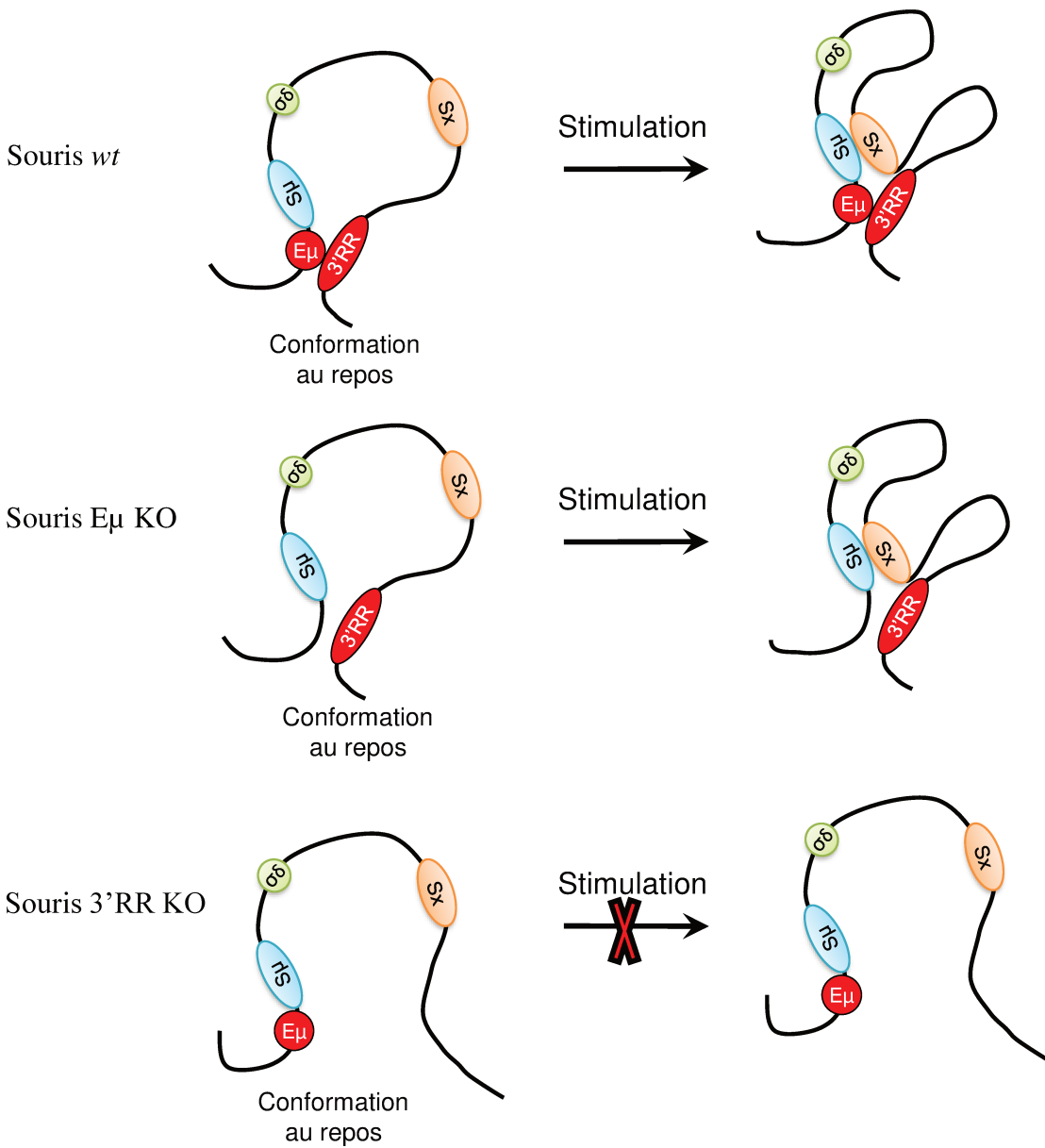


Figure 27 – Représentation schématique des interactions chromosomiques lors de la CSR chez les souris E μ et 3'RR déficientes.

Pour faciliter le déroulement de la CSR, le locus IgH subit une modification de sa topologie. Il se contracte en formant une boucle chromatinienne 3D pour rapprocher l'ensemble des « *enhancers* », promoteurs et régions S. La délétion d'E μ n'a aucun effet sur la formation du complexe E μ /S μ /Sx/3'RR. En revanche, la délétion de la 3'RR entraîne une absence de ce dernier.

d'ingénierie inverse fonctionnelle (*Functionnal reverse-engineering strategy*). Dans celle-ci, plusieurs caractéristiques fonctionnelles distinctives des LB-1 murins devaient être remplies par des LB-1 humains afin d'authentifier leur phénotype. Les fonctions majeures caractérisant les LB-1 sont : [1] la sécrétion spontanée des NIgM; [2] la stimulation efficace des LT ; [3] une signalisation intracellulaire constante. Une population ayant le phénotype CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻ qui remplissait l'ensemble de ces fonctions a été identifiée comme des LB-1 humains dans le cordon ombilical et le sang périphérique.

Cette découverte représente un grand pas en avant pour le transfert, de ce qui est connu sur la physiologie et la pathologie des LB-1 dans les modèles animaux vers l'homme. Les LB-1, chez l'homme, baissent d'une façon significative avec l'âge ce qui pourrait influencer la qualité de vie des personnes âgées en augmentant leur susceptibilité à différentes maladies (Rodriguez-Zhurbenko et al., 2019).

Chez l'homme, comme chez la souris, différentes études ont démontré l'importance des NIg et leur implication dans la protection contre les infections, l'athérosclérose, les maladies neurodégénératives et le cancer (Binder, 2010; Britschgi et al., 2009; Chen et al., 2009b; Kyaw et al., 2011; Nguyen et al., 2015). Différentes stratégies ont été décrites pour augmenter le taux des NIgM. L'administration d'IL-18 permet de rétablir leur production chez la souris et de renforcer la défense contre les infections (Kinoshita et al., 2006). De la même façon pour l'administration de CpG qui active les LB par le TLR (Capolunghi et al., 2008). L'injection intraveineuse des NIg semble avoir des effets prometteurs dans le traitement de certaines maladies auto-immunes et inflammatoires (Hurez et al., 1997; Istrin et al., 2006; Kaveri et al., 2012; Sapir and Shoenfeld, 2005). La génération des Ac monoclonaux humains à partir de cellules individuelles en utilisant la technique « *single cell PCR* » a été décrite (Tiller et al., 2008). Elle permettrait la production d'Ac à partir d'une petite population telles que les LB-1. La génération d'Ac complètement humains à partir de cellules B1 humaines permettrait de contourner le problème associé à l'humanisation des Ac produits par d'autres espèces. En outre, les avancées dans la compréhension du développement des cellules B1 humaines pourraient rendre possible la régulation du nombre des cellules B1 lorsque les individus vieillissent et de maintenir de jeunes Ac protecteurs naturels.

Les premières études réalisées sur les LB-1 chez la souris, et plus récemment chez l'homme, pourraient impacter d'une façon favorable, la prévention et le traitement de certaines maladies. Les cellules B-1 humaines présentent une source riche d'Ac permettant la protection contre une vaste gamme de pathogènes microbiens et de maladies auto-immunes ou dégénératives. Par contre, par leur production d'auto-Ac et par leur effet sur les cellules T, les

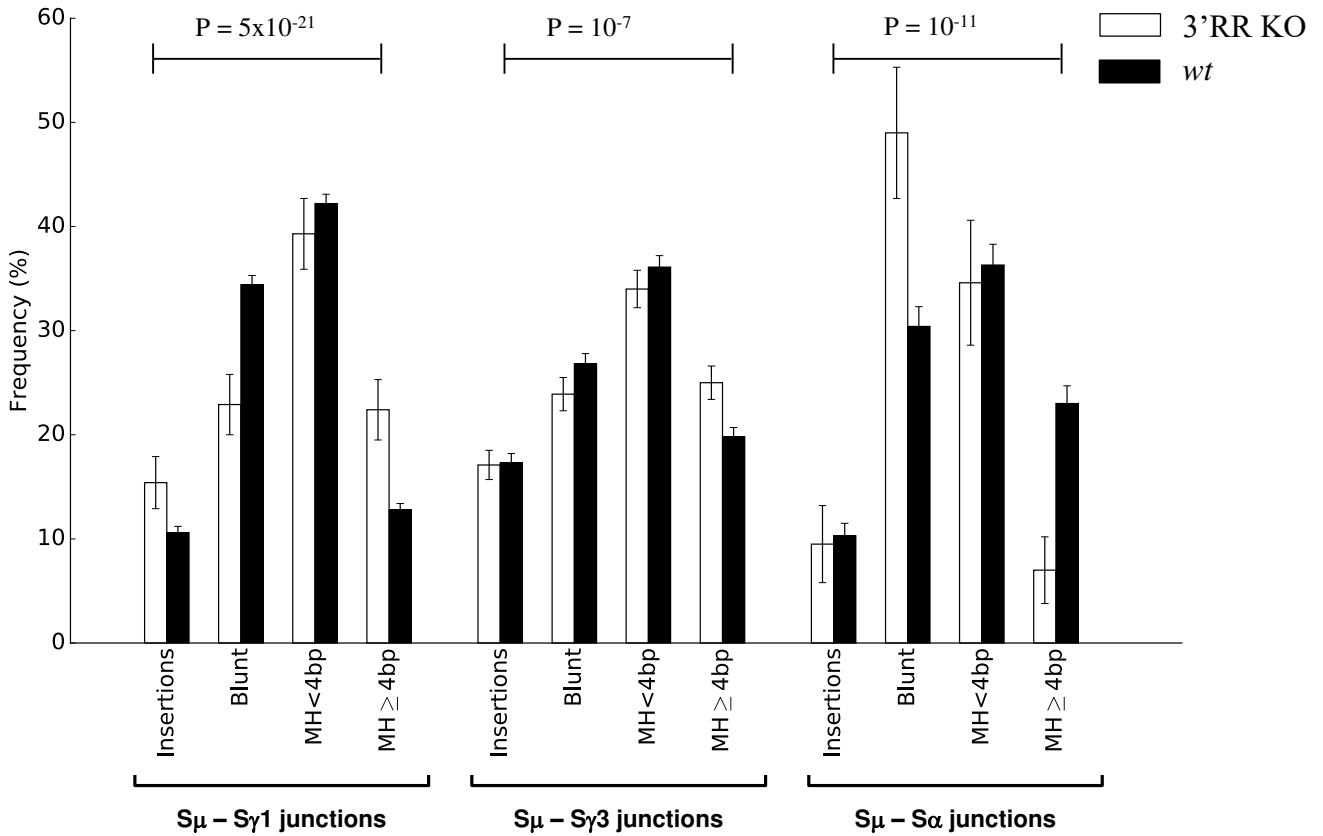


Figure 28 – La structure des jonctions S μ -S α chez les souris 3'RR déficientes.

Les séquences des jonctions S μ -S γ 1, S μ -S γ 3 et S μ -S α sont classées par types: directes, avec insertions, avec de courtes micro-homologies (<4 pb) ou avec de grandes micro-homologies (> 4 pb). Les fréquences relatives sont estimées pour les souris *wt* et 3'RR déficientes. Chaque jeu de données de jonctions est obtenu à partir d'un pool de bibliothèques IonProton (S μ -S γ 1: 10 3'RR *versus* 7 *wt*; S μ -S γ 3: 12 3'RR *versus* 7 *wt*; S μ -S α : 7 3'RR *versus* 6 *wt*). Les tests du « chi carré » sont utilisés pour comparer les fréquences.

cellules B-1 humaines pourraient les induire ou exacerber. Ainsi, seule une compréhension complète de la physiologie des cellules B-1 permettrait de contribuer au développement de nouvelles voies pour le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires.

d) $E\mu$ et CSR

Afin de compléter nos connaissances sur le rôle des activateurs transcriptionnels $E\mu$ et 3'RR lors de la CSR, nous avons étudié l'effet de la délétion d' $E\mu$ sur la nature des jonctions générées après le « *switch* » en utilisant les techniques de séquençage haut débit actuelles. En accord avec des anciennes expériences (Li et al., 2010; Perlot et al., 2005; Wuerffel et al., 2007), la CSR est légèrement perturbée dans les modèles $E\mu$ *KO*. Par contre, le type de jonction et la localisation des DSB chez les souris $E\mu$ *KO* sont similaires à ceux trouvés chez les souris *wt*. En utilisant la technique 3C, Wuerffel et coll avaient démontré lors de la CSR, que le rapprochement $E\mu/S\mu/Sx/3'RR$ au sein d'une boucle chromatinienne était dépendant de la 3'RR et non pas d' $E\mu$ (Wuerffel et al., 2007). Nos données montrent qu' $E\mu$ et ses interactions chromosomiques avec la 3'RR et les régions S, ne semblent pas important pour le « *switch* » et le recrutement des voies de réparation (**Figure 27**).

Actuellement, nous réalisons les mêmes expériences sur des souris déficientes pour la 3'RR. Nos résultats préliminaires, sur les jonctions résiduelles, montrent que la délétion de la 3'RR entraîne une modification significative de leur type, particulièrement lors de la CSR vers IgG1 et IgA (**Figure 28**). Deux hypothèses ont été suggérées pour expliquer ces résultats : [1] soit la boucle chromatinienne est nécessaire au recrutement des facteurs de la voie NHEJ. En absence de cette boucle les jonctions résiduelles se font à la fois avec les voies NHEJ et A-EJ. [2] soit nos résultats sont dus à un biais expérimental ; les souris 3'RR déficientes ayant une baisse significative de la population MZ de la rate (Saintamand et al., 2015a).

Pour confirmer nos résultats, nous étudions et comparons actuellement la capacité des deux sous-populations MZ et FO à « *switcher* » après une stimulation *in vitro* avec différents cocktails cytokiniques. Les jonctions $S\mu-S\gamma1$, $S\mu-S\gamma3$ et $S\mu-S\alpha$ seront ensuite amplifiées et séquencées pour déterminer s'il existe une signature jonctionnelle propre à chaque population.

e) Conclusion générale

En conclusion, cette thèse nous a permis de compléter nos connaissances actuelles sur le rôle de la 3'RR lors du développement B normal particulièrement celui du LB-1.

Nous avons montré que, d'une façon similaire à celle des LB-2, la 3'RR contrôle chez les LB-1, la transcription μ du locus IgH, le « *B cell fate* » et la SHM. Un effet sur la diversité antigénique des LB-1 circulant est observé en absence de la 3'RR. Ces résultats ne montrent

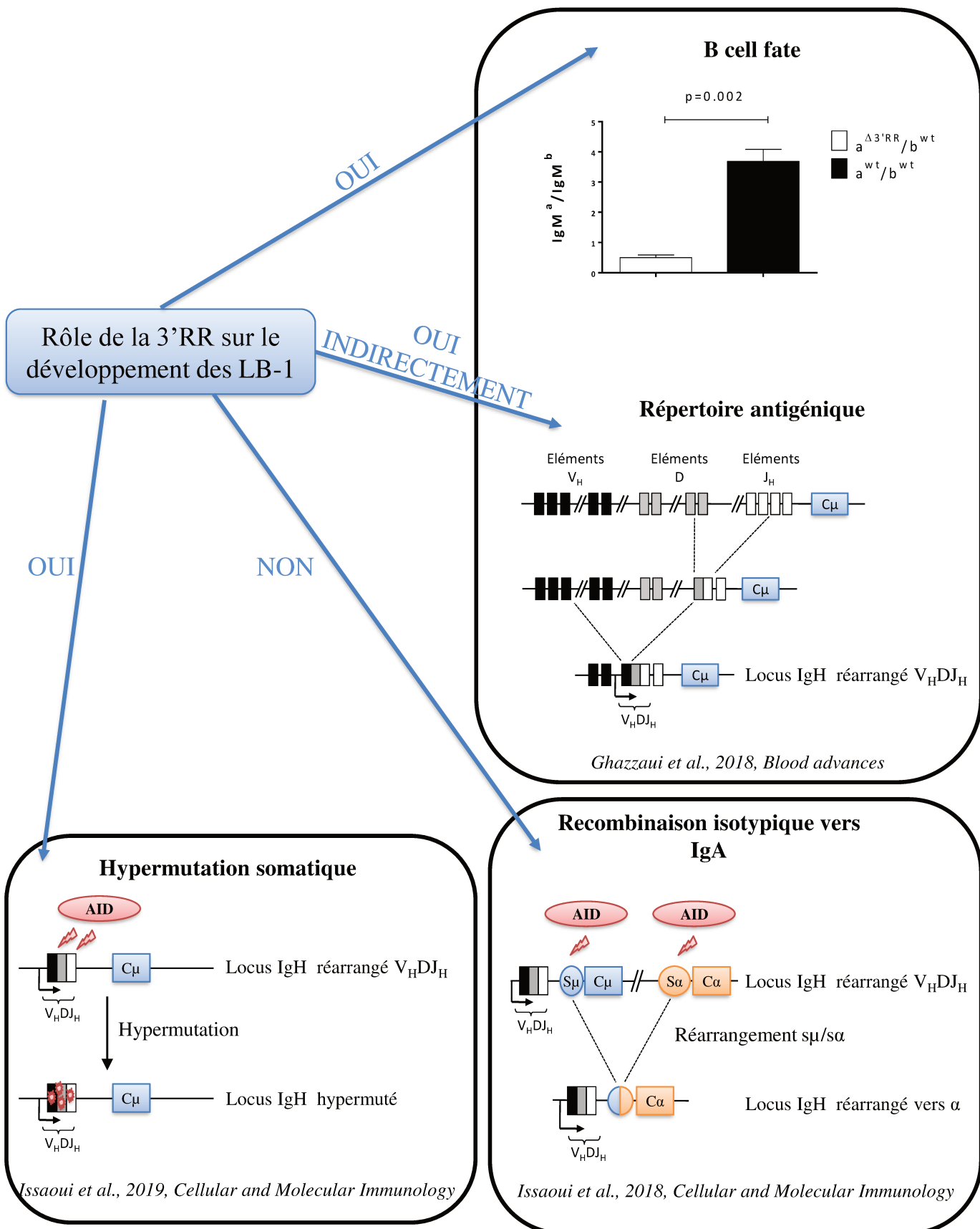


Figure 29 – Représentation schématique des conclusions générales de ma thèse.

Lors de ma thèse, j'ai démontré chez les LB-1 que la délétion de la 3'RR affecte le « B cell fate », la diversité du répertoire antigénique et la SHM. En revanche, la 3'RR n'a pas d'effet sur le « switch » vers IgA.

pas un effet direct sur les recombinaisons V_HDJ_H (où elle n'a également pas d'effet sur les LB-2) mais plutôt la conséquence indirecte de son action sur la chaîne μ et donc l'expression nécessaire d'un BCR fort pour l'apoptose des LB-1 auto-réactifs. Ces résultats renforcent le concept selon lequel la 3'RR régule l'activité du locus IgH durant les stades tardifs du développement B. A l'inverse des LB-2, la 3'RR ne contrôle pas le « *switch* » vers IgA chez les LB-1 (**Figure 29**). Ces résultats confirment le caractère particulier du « *switch* » vers IgA. Celui-ci s'effectue très aisément chez les LB1 pour la synthèse de NIgA. Parallèlement, nous avons montré que l'« *enhancer* » E_μ et ses interactions chromosomiques ne sont pas nécessaires pour la stabilisation des DSB et le choix des voies de réparation de l'ADN lors de la CSR. La 3'RR semble par contre avoir un effet important, mais de futures études sont nécessaires pour étayer nos résultats préliminaires. Enfin, j'ai également participé au cours de ma thèse à certaines études sur le rôle de la 3'RR lors de la lymphomagenèse. Les résultats de ces travaux sont présentés en annexe (**Annexe 6 et 7**).

Références bibliographiques

Afshar, R., Pierce, S., Bolland, D.J., Corcoran, A., and Oltz, E.M. (2006). Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J. Immunol.* *176*, 2439–2447.

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

Allman, D., Lindsley, R.C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., and Hardy, R.R. (2001). Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol.* *167*, 6834–6840.

Allman, D., Srivastava, B., and 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., and 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.* *149*, 2533–2540.

Alt, F.W., and Baltimore, D. (1982). Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 4118–4122.

Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., and 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., and Schwer, B. (2013). Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. *Cell* *152*, 417–429.

Alugupalli, K.R., Leong, J.M., Woodland, R.T., Muramatsu, M., Honjo, T., and Gerstein, R.M. (2004). B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* *21*, 379–390.

Amoretti-Villa, R., Rogier, M., Robert, I., Heyer, V., and Reina-San-Martin, B. (2019). A novel regulatory region controls IgH locus transcription and switch recombination to a subset of isotypes. *Cell. Mol. Immunol.*

Antin, J.H., Emerson, S.G., Martin, P., Gadol, N., and Ault, K.A. (1986). Leu-1+ (CD5+) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies. *J. Immunol.* *136*, 505–510.

Arnold, L.W., Grdina, T.A., Whitmore, A.C., and Houghton, G. (1988). Ig isotype switching in B lymphocytes. Isolation and characterization of clonal variants of the murine Ly-1+ B cell lymphoma, CH12, expressing isotypes other than IgM. *J. Immunol.* *140*, 4355–4363.

Arpin, C., de Bouteiller, O., Razanajaona, D., Fugier-Vivier, I., Brière, F., Banchereau, J., Lebecque, S., and 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.

Atchison, M.L. (2014). Function of YY1 in Long-Distance DNA Interactions. *Front Immunol* *5*, 45.

- Banerji, J., Olson, L., and Schaffner, W. (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* *33*, 729–740.
- Barber, C.L., Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2011). Reduced production of B-1-specified common lymphoid progenitors results in diminished potential of adult marrow to generate B-1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 13700–13704.
- Barneda-Zahonero, B., Roman-Gonzalez, L., Collazo, O., Mahmoudi, T., and Parra, M. (2012). Epigenetic Regulation of B Lymphocyte Differentiation, Transdifferentiation, and Reprogramming.
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., and Alt, F.W. (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* *438*, 508–511.
- Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 34–46.
- Baumgarth, N., Herman, O.C., Jager, G.C., Brown, L.E., Herzenberg, L.A., and Chen, J. (2000). B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J. Exp. Med.* *192*, 271–280.
- Berland, R., and Wortis, H.H. (2002). Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 253–300.
- Bhat, N.M., Kantor, A.B., Bieber, M.M., Stall, A.M., Herzenberg, L.A., and Teng, N.N. (1992). The ontogeny and functional characteristics of human B-1 (CD5+ B) cells. *Int. Immunol.* *4*, 243–252.
- Binder, C.J. (2010). Natural IgM antibodies against oxidation-specific epitopes. *J. Clin. Immunol.* *30 Suppl 1*, S56-60.
- Birshtein, B.K. (2012). The role of CTCF binding sites in the 3' immunoglobulin heavy chain regulatory region. *Front Genet* *3*, 251.
- Boboila, C., Alt, F.W., and 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.
- Boes, M., Schmidt, T., Linkemann, K., Beaudette, B.C., Marshak-Rothstein, A., and 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.
- Bofill, M., Janossy, G., Janossa, M., Burford, G.D., Seymour, G.J., Wernet, P., and Kelemen, E. (1985). Human B cell development. II. Subpopulations in the human fetus. *J. Immunol.* *134*, 1531–1538.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Afshar, R., Featherstone, K., Oltz, E.M., and 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.
- Bottaro, A., Lansford, R., Xu, L., Zhang, J., Rothman, P., and Alt, F.W. (1994). S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J.* *13*, 665–674.

- Boyer, F., Boutouil, H., Dalloul, I., Dalloul, Z., Cook-Moreau, J., Aldigier, J.-C., Carrion, C., Herve, B., Scaon, E., Cogné, M., et al. (2017). CSReport: A New Computational Tool Designed for Automatic Analysis of Class Switch Recombination Junctions Sequenced by High-Throughput Sequencing. *J. Immunol.* *198*, 4148–4155.
- Braikia, F.-Z., Conte, C., Moutahir, M., Denizot, Y., Cogné, M., and Khamlichi, A.A. (2015). Developmental Switch in the Transcriptional Activity of a Long-Range Regulatory Element. *Mol Cell Biol* *35*, 3370–3380.
- Britschgi, M., Olin, C.E., Johns, H.T., Takeda-Uchimura, Y., LeMieux, M.C., Rufibach, K., Rajadas, J., Zhang, H., Tomooka, B., Robinson, W.H., et al. (2009). Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 12145–12150.
- Buchanan, K.L., Smith, E.A., Dou, S., Corcoran, L.M., and Webb, C.F. (1997). Family-specific differences in transcription efficiency of Ig heavy chain promoters. *J. Immunol.* *159*, 1247–1254.
- Busslinger, M. (2004). Transcriptional control of early B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* *22*, 55–79.
- Calame, K.L. (2001). Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat. Immunol.* *2*, 1103–1108.
- Caligaris-Cappio, F., Gobbi, M., Bofill, M., and Janossy, G. (1982). Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* *155*, 623–628.
- Capolunghi, F., Cascioli, S., Giorda, E., Rosado, M.M., Plebani, A., Auriti, C., Seganti, G., Zuntini, R., Ferrari, S., Cagliuso, M., et al. (2008). CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J. Immunol.* *180*, 800–808.
- Casali, P., Burastero, S.E., Nakamura, M., Inghirami, G., and Notkins, A.L. (1987). Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B-cell subset. *Science* *236*, 77–81.
- Casola, S., Otipoby, K.L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J.L., Carroll, M.C., and Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat. Immunol.* *5*, 317–327.
- Cerutti, A., Cols, M., and Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innatelike antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol* *13*, 118–132.
- Chakraborty, T., Chowdhury, D., Keyes, A., Jani, A., Subrahmanyam, R., Ivanova, I., and 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.
- Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 541–552.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* *422*, 726–730.
- Chaudhuri, J., Khuong, C., and Alt, F.W. (2004). Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* *430*, 992–998.

- Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., et al. (2007). Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv. Immunol.* *94*, 157–214.
- Chauveau, C., and Cogné, M. (1996). Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat. Genet.* *14*, 15–16.
- Chauveau, C., Pinaud, E., and 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.
- Chen, K., and Cerutti, A. (2011). The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr. Opin. Immunol.* *23*, 345–352.
- Chen, J., Young, F., Bottaro, A., Stewart, V., Smith, R.K., and 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., Xu, W., Wilson, M., He, B., Miller, N.W., Bengten, E., Edholm, E.-S., Santini, P.A., Rath, P., Chiu, A., et al. (2009a). Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, pro-inflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol* *10*, 889–898.
- Chen, Y., Khanna, S., Goodyear, C.S., Park, Y.B., Raz, E., Thiel, S., Grönwall, C., Vas, J., Boyle, D.L., Corr, M., et al. (2009b). Regulation of dendritic cells and macrophages by an anti-apoptotic cell natural antibody that suppresses TLR responses and inhibits inflammatory arthritis. *J. Immunol.* *183*, 1346–1359.
- Choi, N.M., and Feeney, A.J. (2014). CTCF and ncRNA Regulate the Three-Dimensional Structure of Antigen Receptor Loci to Facilitate V(D)J Recombination. *Front Immunol* *5*, 49.
- Choi, J.H., Wang, K.-W., Zhang, D., Zhan, X., Wang, T., Bu, C.-H., Behrendt, C.L., Zeng, M., Wang, Y., Misawa, T., et al. (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.
- Chung, J.B., Silverman, M., and Monroe, J.G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* *24*, 343–349.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* *8*, 463–470.
- Corcoran, A.E. (2005). Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin. Immunol.* *17*, 141–154.
- Corfe, S.A., and 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.
- Dariavach, P., Williams, G.T., Campbell, K., Pettersson, S., and Neuberger, M.S. (1991). The mouse IgH 3'-enhancer. *Eur. J. Immunol.* *21*, 1499–1504.
- Dauphinée, M., Tovar, Z., and Talal, N. (1988). B cells expressing CD5 are increased in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* *31*, 642–647.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 137–148.

- Degner, S.C., Verma-Gaur, J., Wong, T.P., Bossen, C., Iverson, G.M., Torkamani, A., Vettermann, C., Lin, Y.C., Ju, Z., Schulz, D., et al. (2011). CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin influence the genomic architecture of the Igh locus and antisense transcription in pro-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 9566–9571.
- Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2007). DNA polymerase η is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J Exp Med* *204*, 17–23.
- Desiderio, S.V., Yancopoulos, G.D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M.A., Landau, N., Alt, F.W., and Baltimore, D. (1984). Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells. *Nature* *311*, 752–755.
- Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007a). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 1–22.
- Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007b). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 1–22.
- Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., and Papavasiliou, F.N. (2003). AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J. Exp. Med.* *197*, 1291–1296.
- Dinkelmann, M., Spehalski, E., Stoneham, T., Buis, J., Wu, Y., Sekiguchi, J.M., and Ferguson, D.O. (2009). Multiple functions of MRN in end-joining pathways during isotype class switching. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 808–813.
- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmont, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., and Weill, J.-C. (2009). Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* *10*, 1292–1299.
- Dorshkind, K., and Montecino-Rodriguez, E. (2007). Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 213–219.
- Dunnick, W., Hertz, G.Z., Scappino, L., and Gritzmacher, C. (1993). DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res* *21*, 365–372.
- Duty, J.A., Szodoray, P., Zheng, N.-Y., Koelsch, K.A., Zhang, Q., Swiatkowski, M., Mathias, M., Garman, L., Helms, C., Nakken, B., et al. (2009). Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J Exp Med* *206*, 139–151.
- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., and 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., and 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.
- Ehrenstein, M.R., and Notley, C.A. (2010). The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 778–786.
- Enders, A., Short, A., Miosge, L.A., Bergmann, H., Sontani, Y., Bertram, E.M., Whittle, B., Balakishnan, B., Yoshida, K., Sjollem, G., et al. (2014). Zinc-finger protein ZFP318 is essential for expression of IgD, the alternatively spliced Igh product made by mature B

lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 4513.

Ernst, P., and Smale, S.T. (1995). Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* *2*, 427–438.

Esplin, B.L., Welner, R.S., Zhang, Q., Borghesi, L.A., and Kincade, P.W. (2009). A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 5773–5778.

Featherstone, K., Wood, A.L., Bowen, A.J., and Corcoran, A.E. (2010). The Mouse Immunoglobulin Heavy Chain V-D Intergenic Sequence Contains Insulators That May Regulate Ordered V(D)J Recombination. *J Biol Chem* *285*, 9327–9338.

Fedorova, E., and Zink, D. (2008). Nuclear architecture and gene regulation. *Biochim. Biophys. Acta* *1783*, 2174–2184.

Feldman, S., Achour, I., Wuerffel, R., Kumar, S., Gerasimova, T., Sen, R., and Kenter, A.L. (2015). Constraints contributed by chromatin looping limit recombination targeting during immunoglobulin class switch recombination. *J Immunol* *194*, 2380–2389.

Franco, S., Gostissa, M., Zha, S., Lombard, D.B., Murphy, M.M., Zarrin, A.A., Yan, C., Tepsuporn, S., Morales, J.C., Adams, M.M., et al. (2006). H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations. *Mol. Cell* *21*, 201–214.

Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E., and Busslinger, M. (2004). Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev* *18*, 411–422.

Garrett, F.E., Emelyanov, A.V., Sepulveda, M.A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L.A., Lobanenkov, V.V., and Birshstein, 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.

Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 703–713.

Geisberger, R., Lamers, M., and Achatz, G. (2006). The riddle of the dual expression of IgM and IgD. *Immunology* *0*, 060526021554006-???

Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., and Defrance, T. (2007). TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. *J. Immunol.* *178*, 7779–7786.

Genetta, T., Ruezinsky, D., and 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., and Sen, R. (2015). A structural hierarchy mediated by multiple nuclear factors establishes IgH locus conformation. *Genes Dev* *29*, 1683–1695.

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., et al. (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.

- Giambra, V., Volpi, S., Emelyanov, A.V., Pflugh, D., Bothwell, A.L.M., Norio, P., Fan, Y., Ju, Z., Skoultchi, A.I., Hardy, R.R., et al. (2008). Pax5 and linker histone H1 coordinate DNA methylation and histone modifications in the 3' regulatory region of the immunoglobulin heavy chain locus. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 6123–6133.
- Giannini, S.L., Singh, M., Calvo, C.F., Ding, G., and Birshtein, B.K. (1993). DNA regions flanking the mouse Ig 3' alpha enhancer are differentially methylated and DNAase I hypersensitive during B cell differentiation. *J. Immunol.* *150*, 1772–1780.
- Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T., and 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.
- Giudicelli, V., Chaume, D., and Lefranc, M.-P. (2005). IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic Acids Res.* *33*, D256-261.
- Good-Jacobson, K.L., and Tarlinton, D.M. (2012). Multiple routes to B-cell memory. *Int. Immunol.* *24*, 403–408.
- Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., and Raphael, K. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* *334*, 676–682.
- Greenbaum, S., and 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.
- Griffin, D.O., Holodick, N.E., and Rothstein, T.L. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *J. Exp. Med.* *208*, 67–80.
- Guo, C., Yoon, H.S., Franklin, A., Jain, S., Ebert, A., Cheng, H.-L., Hansen, E., Despo, O., Bossen, C., Vettermann, C., et al. (2011a). CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* *477*, 424–430.
- Guo, C., Gerasimova, T., Hao, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Selimyan, R., Oltz, E.M., and Sen, R. (2011b). Two forms of loops generate the chromatin conformation of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Cell* *147*, 332–343.
- Guo, L., Zhang, X., Zheng, B., and Han, S. (2008). IgM-mediated signaling is required for the development of a normal B cell memory response. *Molecular Immunology* *45*, 1071.
- Guo, L., Tian, J., Guo, Z., Zheng, B., and Han, S. (2011c). 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.
- Hackney, J.A., Misaghi, S., Senger, K., Garris, C., Sun, Y., Lorenzo, M.N., and Zarrin, A.A. (2009). DNA targets of AID evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv. Immunol.* *101*, 163–189.
- Halverson, R., Torres, R.M., and Pelanda, R. (2004). Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat. Immunol.* *5*, 645–650.

- Han, S., Zhang, X., Xu, R., Finkelman, F.D., Brombacher, F., and Zheng, B. (2004). IgD⁺ IgM⁻ B cells mount immune responses that exhibit altered antibody repertoire. *Eur. J. Immunol.* *34*, 661–668.
- Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (1991). A developmental switch in B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 11550–11554.
- Hardy, R.R., and Hayakawa, K. (2015). Perspectives on fetal derived CD5⁺ B1 B cells. *Eur. J. Immunol.* *45*, 2978–2984.
- Hardy, R.R., Kincade, P.W., and Dorshkind, K. (2007). The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage. *Immunity* *26*, 703–714.
- Heesters, B.A., Myers, R.C., and Carroll, M.C. (2014). Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 495–504.
- Henseler, R.A., Romer, E.J., and 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.
- Hertz, M., and Nemazee, D. (1997). BCR ligation induces receptor editing in IgM⁺IgD⁻ bone marrow B cells in vitro. *Immunity* *6*, 429–436.
- Herzog, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 195–205.
- Hewitt, S.L., Farmer, D., Marszalek, K., Cadera, E., Liang, H.-E., Xu, Y., Schlissel, M.S., and Skok, J.A. (2008). Association between the Igk and Igh immunoglobulin loci mediated by the 3' Igk enhancer induces “decontraction” of the Igh locus in pre-B cells. *Nat. Immunol.* *9*, 396–404.
- Hewitt, S.L., Chaumeil, J., and Skok, J.A. (2010). Chromosome dynamics and the regulation of V(D)J recombination. *Immunol. Rev.* *237*, 43–54.
- Hurez, V., Kazatchkine, M.D., Vassilev, T., Ramanathan, S., Pashov, A., Basuyaux, B., de Kozak, Y., Bellon, B., and Kaveri, S.V. (1997). Pooled normal human polyspecific IgM contains neutralizing anti-idiotypes to IgG autoantibodies of autoimmune patients and protects from experimental autoimmune disease. *Blood* *90*, 4004–4013.
- Hwang, J.K., Alt, F.W., and Yeap, L.-S. (2015). Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol Spectr* *3*, MDNA3-0037–2014.
- Inlay, M., Alt, F.W., Baltimore, D., and 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.
- Inlay, M.A., Lin, T., Gao, H.H., and 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.
- Istrin, G., Bosis, E., and Solomon, B. (2006). Intravenous immunoglobulin enhances the clearance of fibrillar amyloid-beta peptide. *J. Neurosci. Res.* *84*, 434–443.
- Iyer, R.R., Pluciennik, A., Burdett, V., and Modrich, P.L. (2006). DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem. Rev.* *106*, 302–323.

Jhunjunwala, S., van Zelm, M.C., Peak, M.M., Cutchin, S., Riblet, R., van Dongen, J.J.M., Grosveld, F.G., Knoch, T.A., and Murre, C. (2008). The 3D structure of the immunoglobulin heavy-chain locus: implications for long-range genomic interactions. *Cell* 133, 265–279.

Johnston, C.M., Wood, A.L., Bolland, D.J., and Corcoran, A.E. (2006). Complete sequence assembly and characterization of the C57BL/6 mouse Ig heavy chain V region. *J. Immunol.* 176, 4221–4234.

Jones, J.M., and 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., and Alt, F.W. (2006). Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 541–570.

Kaminski, D.A., and Stavnezer, J. (2006). Enhanced IgA class switching in marginal zone and B1 B cells relative to follicular/B2 B cells. *J. Immunol.* 177, 6025–6029.

Kantor, A.B. (1996). V-Gene usage and N-region insertions in B-1a, B-1b and conventional B cells. *Seminars in Immunology* 8, 29–35.

Kantor, A.B., Merrill, C.E., Herzenberg, L.A., and 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.* 158, 1175–1186.

Kaveri, S.V., Silverman, G.J., and Bayry, J. (2012). Natural IgM in immune equilibrium and harnessing their therapeutic potential. *J Immunol* 188, 939–945.

Keenan, R.A., De Riva, A., Corleis, B., Hepburn, L., Licence, S., Winkler, T.H., and Mårtensson, I.-L. (2008). Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. *Science* 321, 696–699.

Kenter, A.L., Feldman, S., Wuerffel, R., Achour, I., Wang, L., and Kumar, S. (2012). Three-dimensional architecture of the IgH locus facilitates class switch recombination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1267, 86–94.

Kim, A., Han, L., Santiago, G.E., Verdun, R.E., and Yu, K. (2016). Class-Switch Recombination in the Absence of the IgH 3' Regulatory Region. *J. Immunol.* 197, 2930–2935.

Kinoshita, M., Shinomiya, N., Ono, S., Tsujimoto, H., Kawabata, T., Matsumoto, A., Hiraide, H., and Seki, S. (2006). Restoration of natural IgM production from liver B cells by exogenous IL-18 improves the survival of burn-injured mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immunol.* 177, 4627–4635.

Koelsch, K., Zheng, N.-Y., Zhang, Q., Duty, A., Helms, C., Mathias, M.D., Jared, M., Smith, K., Capra, J.D., and Wilson, P.C. (2007). Mature B cells class switched to IgD are autoreactive in healthy individuals. *J Clin Invest* 117, 1558–1565.

Kosak, S.T., Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Le Beau, M.M., Fisher, A.G., and Singh, H. (2002). Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* 296, 158–162.

Kottmann, A.H., Zevnik, B., Welte, M., Nielsen, P.J., and Köhler, G. (1994). A second promoter and enhancer element within the immunoglobulin heavy chain locus. *Eur. J. Immunol.* 24, 817–821.

- Kroese, F.G., de Waard, R., and Bos, N.A. (1996). B-1 cells and their reactivity with the murine intestinal microflora. *Semin. Immunol.* *8*, 11–18.
- Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 149–159.
- Kyaw, T., Tay, C., Krishnamurthi, S., Kanellakis, P., Agrotis, A., Tipping, P., Bobik, A., and Toh, B.-H. (2011). B1a B lymphocytes are atheroprotective by secreting natural IgM that increases IgM deposits and reduces necrotic cores in atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* *109*, 830–840.
- Larijani, M., and Martin, A. (2012). The biochemistry of activation-induced deaminase and its physiological functions. *Semin. Immunol.* *24*, 255–263.
- Lefranc, M.-P. (2009). Bases de données anticorps IMGT®, : Une plate-forme française d'intérêt mondial. *Antibody databases: IMGT®, a French platform of world-wide interest.*
- Li, F., Yan, Y., Pieretti, J., Feldman, D.A., and 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* *185*, 6049–6057.
- Li, S.C., Rothman, P.B., Zhang, J., Chan, C., Hirsh, D., and Alt, F.W. (1994). Expression of I μ -C gamma hybrid germline transcripts subsequent to immunoglobulin heavy chain class switching. *Int. Immunol.* *6*, 491–497.
- Li, Y.S., Wasserman, R., Hayakawa, K., and Hardy, R.R. (1996). Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* *5*, 527–535.
- Lieberson, R., Giannini, S.L., Birshtein, B.K., and Eckhardt, L.A. (1991). An enhancer at the 3' end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucleic Acids Res* *19*, 933–937.
- Lin, D., Ippolito, G.C., Zong, R.-T., Bryant, J., Koslovsky, J., and Tucker, P. (2007). Bright/ARID3A contributes to chromatin accessibility of the immunoglobulin heavy chain enhancer. *Mol. Cancer* *6*, 23.
- Liubchenko, G.A., Appleberry, H.C., Holers, V.M., Banda, N.K., Willis, V.C., and Lyubchenko, T. (2012). Potentially autoreactive naturally occurring transitional T3 B lymphocytes exhibit a unique signaling profile. *J. Autoimmun.* *38*, 293–303.
- Lu, Z.-P., Ju, Z.-L., Shi, G.-Y., Zhang, J.-W., and Sun, J. (2005). Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *330*, 204–209.
- Lutz, C., Ledermann, B., Kosco-Vilbois, M.H., Ochsenbein, A.F., Zinkernagel, R.M., Köhler, G., and Brombacher, F. (1998). IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells. *Nature* *393*, 797–801.
- Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., and Tangye, S.G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J. Exp. Med.* *209*, 1241–1253.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and 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.

- MacLennan, I.C.M., Toellner, K.-M., Cunningham, A.F., Serre, K., Sze, D.M.-Y., Zúñiga, E., Cook, M.C., and Vinuesa, C.G. (2003). Extrafollicular antibody responses. *Immunol. Rev.* *194*, 8–18.
- Madisen, L., and Groudine, M. (1994). Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates c-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev.* *8*, 2212–2226.
- Manis, J.P., Tian, M., and Alt, F.W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* *23*, 31–39.
- Manis, J.P., Morales, J.C., Xia, Z., Kutok, J.L., Alt, F.W., and Carpenter, P.B. (2004). 53BP1 links DNA damage-response pathways to immunoglobulin heavy chain class-switch recombination. *Nat. Immunol.* *5*, 481–487.
- Marquet, M., Garot, A., Bender, S., Carrion, C., Rouaud, P., Lecardeur, S., Denizot, Y., Cogné, M., and Pinaud, E. (2014). The $\epsilon\mu$ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response in vivo. *J. Immunol.* *193*, 1171–1183.
- Mårtensson, I.-L., Keenan, R.A., and Licence, S. (2007). The pre-B-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 137–142.
- Mårtensson, I.-L., Almqvist, N., Grimsholm, O., and Bernardi, A.I. (2010). The pre-B cell receptor checkpoint. *FEBS Lett.* *584*, 2572–2579.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2002). Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 323–335.
- Martin, F., Oliver, A.M., and 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.
- Matthews, A.J., Zheng, S., DiMenna, L.J., and 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.
- Matthias, P., and 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.
- McBride, K.M., Gazumyan, A., Woo, E.M., Schwickert, T.A., Chait, B.T., and Nussenzweig, M.C. (2008). Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *J. Exp. Med.* *205*, 2585–2594.
- Mebius, R.E., and Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 606–616.
- 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., et al. (2013). Flexible long-range loops in the VH gene region of the Igh locus facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity* *39*, 229–244.
- Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B., and Rolink, A. (1993). The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol. Today* *14*, 60–68.

- Meng, F.-L., Alt, F.W., and Tian, M. (2015). Chapter 19 - The Mechanism of IgH Class Switch Recombination. In *Molecular Biology of B Cells (Second Edition)*, F.W. Alt, T. Honjo, A. Radbruch, and M. Reth, eds. (London: Academic Press), pp. 345–362.
- Merrell, K.T., Benschop, R.J., Gauld, S.B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wysocki, L.J., and Cambier, J.C. (2006). Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* *25*, 953–962.
- Meyer, K.B., Skogberg, M., Margenfeld, C., Ireland, J., and 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.
- Michaelson, J.S., Giannini, S.L., and Birshtein, B.K. (1995). Identification of 3' alpha-hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic Acids Res* *23*, 975–981.
- Michaelson, J.S., Singh, M., Snapper, C.M., Sha, W.C., Baltimore, D., and Birshtein, 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., and Busslinger, M. (2002). Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science* *297*, 110–113.
- Mills, F.C., Harindranath, N., Mitchell, M., and Max, E.E. (1997). Enhancer Complexes Located Downstream of Both Human Immunoglobulin C α Genes. *J Exp Med* *186*, 845–858.
- Miyazaki, K., Miyazaki, M., and Murre, C. (2014). The establishment of B versus T cell identity. *Trends Immunol.* *35*, 205–210.
- Mocikat, R., Harloff, C., and Kütemeier, G. (1993). The effect of the rat immunoglobulin heavy-chain 3' enhancer is position dependent. *Gene* *136*, 349–353.
- Mocikat, R., Kardinal, C., and Klobeck, H.G. (1995). Differential interactions between the immunoglobulin heavy chain mu intron and 3' enhancer. *Eur. J. Immunol.* *25*, 3195–3198.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869–877.
- Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2006). New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol.* *27*, 428–433.
- Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2012). B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity* *36*, 13–21.
- Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., and Dorshkind, K. (2006). Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat. Immunol.* *7*, 293–301.
- Motea, E.A., and Berdis, A.J. (2010). Terminal deoxynucleotidyl transferase: the story of a misguided DNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta* *1804*, 1151–1166.
- Mundy, C.L., Patenge, N., Matthews, A.G.W., and Oettinger, M.A. (2002). Assembly of the RAG1/RAG2 Synaptic Complex. *Mol Cell Biol* *22*, 69–77.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel

member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* *274*, 18470–18476.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* *102*, 553–563.

Muto, A., Hoshino, H., Madisen, L., Yanai, N., Obinata, M., Karasuyama, H., Hayashi, N., Nakauchi, H., Yamamoto, M., Groudine, M., et al. (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.

Nabel, C.S., Lee, J.W., Wang, L.C., and Kohli, R.M. (2013). Nucleic acid determinants for selective deamination of DNA over RNA by activation-induced deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 14225–14230.

Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.-G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* *302*, 2137–2140.

Nemazee, D.A., and Bürki, K. (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* *337*, 562–566.

Neurath, M.F., Strober, W., and 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.* *153*, 730–742.

Neurath, M.F., Max, E.E., and 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. U.S.A.* *92*, 5336–5340.

Nguyen, T.T.T., Elsner, R.A., and Baumgarth, N. (2015). Natural IgM prevents autoimmunity by enforcing B cell central tolerance induction. *J. Immunol.* *194*, 1489–1502.

Nicolás, L., and Chaudhuri, J. (2013). 4C-ing the Igh Landscape. *Immunity* *39*, 199–201.

Nihiro, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 945–956.

Nishana, M., and Raghavan, S.C. (2012). Role of recombination activating genes in the generation of antigen receptor diversity and beyond. *Immunology* *137*, 271–281.

Nitschke, L., Kosco, M.H., Köhler, G., and Lamers, M.C. (1993). Immunoglobulin D-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and -dependent antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *90*, 1887.

Nitschke, L., Kestler, J., Tallone, T., Pelkonen, S., and Pelkonen, J. (2001). Deletion of the DQ52 element within the Ig heavy chain locus leads to a selective reduction in VDJ recombination and altered D gene usage. *J. Immunol.* *166*, 2540–2552.

Nutt, S.L., Hodgkin, P.D., Tarlinton, D.M., and Corcoran, L.M. (2015). The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 160–171.

Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., and Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* *248*, 1517–1523.

- Ong, J., Stevens, S., Roeder, R.G., and Eckhardt, L.A. (1998). 3' IgH enhancer elements shift synergistic interactions during B cell development. *J. Immunol.* *160*, 4896–4903.
- O’Riordan, M., and Grosschedl, R. (1999). Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* *11*, 21–31.
- Parslow, T.G., Blair, D.L., Murphy, W.J., and Granner, D.K. (1984). Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 2650–2654.
- Pavri, R. (2017). R Loops in the Regulation of Antibody Gene Diversification. *Genes (Basel)* *8*.
- Pawlitzky, I., Angeles, C.V., Siegel, A.M., Stanton, M.L., Riblet, R., and Brodeur, P.H. (2006). Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse Igh locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A. *J. Immunol.* *176*, 6839–6851.
- Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F., and Scharff, M.D. (2008). The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 481–511.
- Peng, C., and 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* *191*.
- Pérez-Durán, P., Belver, L., de Yébenes, V.G., Delgado, P., Pisano, D.G., and Ramiro, A.R. (2012). UNG shapes the specificity of AID-induced somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* *209*, 1379–1389.
- Perlot, T., and Alt, F.W. (2008). Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. *Adv. Immunol.* *99*, 1–32.
- Perlot, T., Alt, F.W., Bassing, C.H., Suh, H., and Pinaud, E. (2005). Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 14362–14367.
- Perlot, T., Pawlitzky, I., Manis, J.P., Zarrin, A.A., Brodeur, P.H., and Alt, F.W. (2010). Analysis of mice lacking DNaseI hypersensitive sites at the 5' end of the IgH locus. *PLoS ONE* *5*, e13992.
- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., and Cogné, M. (2012). AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* *336*, 931–934.
- Petersen, S., Casellas, R., Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Difilippantonio, M.J., Wilson, P.C., Hanitsch, L., Celeste, A., Muramatsuk, M., Pilch, D.R., et al. (2001). AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* *414*, 660–665.
- Petro, J.B., Gerstein, R.M., Lowe, J., Carter, R.S., Shinnars, N., and Khan, W.N. (2002). Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* *277*, 48009–48019.
- Pettersson, S., Cook, G.P., Brüggemann, M., Williams, G.T., and Neuberger, M.S. (1990). A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* *344*, 165–168.

Pfisterer, P., Annweiler, A., Ullmer, C., Corcoran, L.M., and Wirth, T. (1994). Differential transactivation potential of Oct1 and Oct2 is determined by additional B cell-specific activities. *EMBO J* 13, 1654–1663.

Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., and Goodman, M.F. (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* 424, 103–107.

Pieper, K., Grimbacher, B., and Eibel, H. (2013). B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 959–971.

Pierani, A., Heguy, A., Fujii, H., and Roeder, R.G. (1990). Activation of octamer-containing promoters by either octamer-binding transcription factor 1 (OTF-1) or OTF-2 and requirement of an additional B-cell-specific component for optimal transcription of immunoglobulin promoters. *Mol. Cell. Biol.* 10, 6204–6215.

Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 767–777.

Pillai, S., Cariappa, A., and Moran, S.T. (2005). Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 161–196.

Pinaud, E., Aupetit, C., Chauveau, C., and Cogné, M. (1997). Identification of a homolog of the Cα3′/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3′IgH/hs1,2 enhancer downstream the human immunoglobulin α1 gene. *European Journal of Immunology* 27, 2981–2985.

Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., and Cogné, M. (2011). The IgH locus 3′ regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110, 27–70.

Pioli, P.D., Debnath, I., Weis, J.J., and Weis, J.H. (2014). Zfp318 regulates IgD expression by abrogating transcription termination within the Ighm/Ighd locus. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193, 2546.

Porter, R.R. (1973). Structural studies of immunoglobulins. *Science* 180, 713–716.

Prieto, J.M.B., and Felipe, M.J.B. (2017). Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 54, 38–44.

Prohaska, T.A., Que, X., Diehl, C.J., Hendriks, S., Chang, M.W., Jepsen, K., Glass, C.K., Benner, C., and Witzum, J.L. (2018). Massively Parallel Sequencing of Peritoneal and Splenic B Cell Repertoires Highlights Unique Properties of B-1 Cell Antibodies. *J. Immunol.* 200, 1702–1717.

Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., Jankovic, M., and Nussenzweig, M.C. (2003). Transcription enhances AID-mediated cytosine deamination by exposing single-stranded DNA on the nontemplate strand. *Nat. Immunol.* 4, 452–456.

Rauta, P.R., Nayak, B., and 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.

Reth, M., and Nielsen, P. (2014). Chapter Four - Signaling Circuits in Early B-Cell Development. In *Advances in Immunology*, F.W. Alt, ed. (Academic Press), pp. 129–175.

- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., et al. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* *102*, 565–575.
- Reynolds, A.E., Kuraoka, M., and Kelsoe, G. (2015). Natural IgM is produced by CD5- plasma cells that occupy a distinct survival niche in bone marrow. *J. Immunol.* *194*, 231–242.
- Rodriguez-Zhurbenko, N., Quach, T.D., Hopkins, T.J., Rothstein, T.L., and Hernandez, A.M. (2019). Human B-1 Cells and B-1 Cell Antibodies Change With Advancing Age. *Front Immunol* *10*.
- Roes, J. (1993). Immunoglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells. *Journal of Experimental Medicine* *177*, 45–55.
- Roldán, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Buslinger, M., and Skok, J.A. (2005). Locus “decontraction” and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat. Immunol.* *6*, 31–41.
- Rolink, A., ten Boekel, E., Melchers, F., Fearon, D.T., Krop, I., and Andersson, J. (1996). A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J. Exp. Med.* *183*, 187–194.
- Ronai, D., Iglesias-Ussel, M.D., Fan, M., Li, Z., Martin, A., and Scharff, M.D. (2007). Detection of chromatin-associated single-stranded DNA in regions targeted for somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* *204*, 181–190.
- Rothstein, T.L., Griffin, D.O., Holodick, N.E., Quach, T.D., and Kaku, H. (2013). Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci* *1285*, 97–114.
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogné, M., Pinaud, E., and Denizot, Y. (2012). Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* *287*, 8356–8360.
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Saintamand, A., Fiancette, R., Marquet, M., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Pinaud, E., Cogné, M., and Denizot, Y. (2013). The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* *210*, 1501–1507.
- Rouaud, P., Saintamand, A., Saad, F., Carrion, C., Lecardeur, S., Cogné, M., and Denizot, Y. (2014). Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region. *J. Exp. Med.* *211*, 975–985.
- Roy, A.L., Sen, R., and Roeder, R.G. (2011). Enhancer-promoter communication and transcriptional regulation of Igh. *Trends Immunol.* *32*, 532–539.
- Roy, B., Brennecke, A.-M., Agarwal, S., Krey, M., Düber, S., and Weiss, S. (2013). An intrinsic propensity of murine peritoneal B1b cells to switch to IgA in presence of TGF- β and retinoic acid. *PLoS ONE* *8*, e82121.
- Russell, D.M., Dembić, Z., Morahan, G., Miller, J.F., Bürki, K., and Nemazee, D. (1991). Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature* *354*, 308–311.
- Saintamand, A., Rouaud, P., Garot, A., Saad, F., Carrion, C., Oblet, C., Cogné, M., Pinaud, E., and 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.

- Saintamand, A., Rouaud, P., Saad, F., Rios, G., Cogné, M., and Denizot, Y. (2015b). Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat Commun* 6, 7084.
- Saintamand, A., Vincent-Fabert, C., Marquet, M., Ghazzoui, N., Magnone, V., Pinaud, E., Cogné, M., and Denizot, Y. (2017). E μ and 3'RR IgH enhancers show hierarchic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci Rep* 7.
- Saleque, S., Singh, M., Little, R.D., Giannini, S.L., Michaelson, J.S., and Birshstein, B.K. (1997). Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3'E and hs3). *J. Immunol.* 158, 4780–4787.
- Sapir, T., and Shoenfeld, Y. (2005). Uncovering the hidden potential of intravenous immunoglobulin as an anticancer therapy. *Clin Rev Allergy Immunol* 29, 307–310.
- Sawchuk, D.J., Weis-Garcia, F., Malik, S., Besmer, E., Bustin, M., Nussenzweig, M.C., and Cortes, P. (1997). V(D)J Recombination: Modulation of RAG1 and RAG2 Cleavage Activity on 12/23 Substrates by Whole Cell Extract and DNA-bending Proteins. *J Exp Med* 185, 2025–2032.
- Schatz, D.G., and Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 251–263.
- Schatz, D.G., and Swanson, P.C. (2011). V(D)J recombination: mechanisms of initiation. *Annu. Rev. Genet.* 45, 167–202.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035–1048.
- Schlissel, M.S. (2003). Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 890–899.
- Schneider, R., and Grosschedl, R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev.* 21, 3027–3043.
- Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41-52.
- Sepulveda, M.A., Garrett, F.E., Price-Whelan, A., and Birshstein, B.K. (2005). Comparative analysis of human and mouse 3' Igh regulatory regions identifies distinctive structural features. *Mol. Immunol.* 42, 605–615.
- Serwe, M., and 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.
- Shaw, P.X., Hörkkö, S., Chang, M.K., Curtiss, L.K., Palinski, W., Silverman, G.J., and 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.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855–867.
- Shlomchik, M.J., and Weisel, F. (2012). Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.* 247, 52–63.

- Singh, M., and 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., et al. (2001). Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat. Immunol.* *2*, 848–854.
- Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2014). IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J. Immunol.* *193*, 5370–5378.
- Stavnezer, J., Björkman, A., Du, L., Cagigi, A., and Pan-Hammarström, Q. (2010). Mapping of switch recombination junctions, a tool for studying DNA repair pathways during immunoglobulin class switching. *Adv. Immunol.* *108*, 45–109.
- Su, T.T., and Rawlings, D.J. (2002). Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J. Immunol.* *168*, 2101–2110.
- Tang, H., and 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., and Sharp, P.A. (2004). Regulation of immunoglobulin promoter activity by TFII-I class transcription factors. *J. Biol. Chem.* *279*, 5460–5469.
- Tarlinton, D. (2006). B-cell memory: are subsets necessary? *Nat. Rev. Immunol.* *6*, 785–790.
- Tarlinton, D.M., McLean, M., and Nossal, G.J. (1995). B1 and B2 cells differ in their potential to switch immunoglobulin isotype. *Eur. J. Immunol.* *25*, 3388–3393.
- Teague, B.N., Pan, Y., Mudd, P.A., Nakken, B., Zhang, Q., Szodoray, P., Kim-Howard, X., Wilson, P.C., and 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.* *178*, 7511–7515.
- Thomas-Claudepierre, A.-S., Robert, I., Rocha, P.P., Raviram, R., Schiavo, E., Heyer, V., Bonneau, R., Luo, V.M., Reddy, J.K., Borggreffe, T., et al. (2016). Mediator facilitates transcriptional activation and dynamic long-range contacts at the IgH locus during class switch recombination. *J Exp Med* *213*, 303–312.
- Thompson, A., Timmers, E., Schuurman, R.K.B., and Hendriks, R.W. (1995). Immunoglobulin heavy chain germ-line JH-C μ transcription in human precursor B lymphocytes initiates in a unique region upstream of DQ52. *Eur. J. Immunol.* *25*, 257–261.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* *177*, 1009–1020.
- Tiller, T., Meffre, E., Yurasov, S., Tsuiji, M., Nussenzweig, M.C., and Wardemann, H. (2008). Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J. Immunol. Methods* *329*, 112–124.
- Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* *302*, 575–581.
- Tsukada, S., Sugiyama, H., Oka, Y., and Kishimoto, S. (1990). Estimation of D segment usage in initial D to JH joinings in a murine immature B cell line. Preferential usage of DFL16.1, the most 5' D segment and DQ52, the most JH-proximal D segment. *J. Immunol.* *144*, 4053–4059.

- Tsuneto, M., Kajikhina, E., Seiler, K., Reimer, A., Tornack, J., Bouquet, C., Simmons, S., Knoll, M., Wolf, I., Tokoyoda, K., et al. (2014). Environments of B cell development. *Immunol. Lett.* *157*, 60–63.
- Tung, J.W., Mrazek, M.D., Yang, Y., Herzenberg, L.A., and Herzenberg, L.A. (2006). Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 6293–6298.
- Vaidyanathan, B., Yen, W.-F., Pucella, J.N., and Chaudhuri, J. (2014). AIDing Chromatin and Transcription-Coupled Orchestration of Immunoglobulin Class-Switch Recombination. *Front Immunol* *5*, 120.
- Vettermann, C., and Schlissel, M.S. (2010). Allelic exclusion of immunoglobulin genes: models and mechanisms. *Immunol. Rev.* *237*, 22–42.
- Victoria, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 429–457.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2010). Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* *116*, 1895–1898.
- Volpi, S.A., Verma-Gaur, J., Hassan, R., Ju, Z., Roa, S., Chatterjee, S., Werling, U., Hou, H., Will, B., Steidl, U., et al. (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* *188*, 2556–2566.
- Wabl, M.R., and Burrows, P.D. (1984). Expression of immunoglobulin heavy chain at a high level in the absence of a proposed immunoglobulin enhancer element in cis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 2452–2455.
- 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., et al. (2015). Manipulation of B-cell responses with histone deacetylase inhibitors. *Nat Commun* *6*, 6838.
- Wakatsuki, Y., Neurath, M.F., Max, E.E., and Strober, W. (1994). The B cell-specific transcription factor BSAP regulates B cell proliferation. *J. Exp. Med.* *179*, 1099–1108.
- Wang, J.H. (2013). The role of activation-induced deaminase in antibody diversification and genomic instability. *Immunol. Res.* *55*, 287–297.
- Won, W.-J., and Kearney, J.F. (2002). CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice. *J. Immunol.* *168*, 5605–5611.
- Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F.W., Cogne, M., Pinaud, E., and 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.
- Xu, Y., Davidson, L., Alt, F.W., and 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.
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 517–531.

- 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., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature* *449*, 478–482.
- Yancopoulos, G.D., and Alt, F.W. (1985). Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* *40*, 271–281.
- Ye, M., and Graf, T. (2007). Early decisions in lymphoid development. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 123–128.
- Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.-L., Wilson, T.E., and Lieber, M.R. (2003). R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.* *4*, 442–451.
- Zaller, D.M., and 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.
- Zandi, S., Ahsberg, J., Tsapogas, P., Stjernberg, J., Qian, H., and Sigvardsson, M. (2012). Single-cell analysis of early B-lymphocyte development suggests independent regulation of lineage specification and commitment in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 15871–15876.
- Zhang, J., Bottaro, A., Li, S., Stewart, V., and Alt, F.W. (1993). A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *EMBO J* *12*, 3529–3537.
- Zhang, Z.Z., Pannunzio, N.R., Han, L., Hsieh, C.-L., Yu, K., and Lieber, M.R. (2014). The strength of an Ig switch region is determined by its ability to drive R loop formation and its number of WGCW sites. *Cell Rep* *8*, 557–569.
- Zheng, N.-Y., Wilson, K., Wang, X., Boston, A., Kolar, G., Jackson, S.M., Liu, Y.-J., Pascual, V., Capra, J.D., and 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.
- Zhu, L., Yan, Z., Feng, M., Peng, D., Guo, Y., Hu, X., Ren, L., and Sun, Y. (2014). Identification of sturgeon IgD bridges the evolutionary gap between elasmobranchs and teleosts. *Developmental & Comparative Immunology* *42*, 138–147.

Annexes

Annexe 1

Analysis of IgD CSR junctions by high-throughput sequencing

Ghazzaoui N*, **Issaoui H***, Saintamand A, Boyer F, Denizot Y.

* Contribution équivalente

Immunology Letters, 2017



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 $S\mu$ - $\sigma\delta$ 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 $S\mu$ - $\sigma\delta$ junction sequences in these huge amounts of data would be like searching needles in haystacks. We recently reported a new computational tool (CSReport) for automatic analysis of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing [4] that we used to analyze IgD CSR more in depth.

PCR for $S\mu$ - $\sigma\delta$ 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 $S\mu$ - $\sigma\delta$ 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 $S\mu$ - $\sigma\delta$ junctions was documented. As $S\mu$ - $\sigma\delta$ 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 $S\mu$ or $\sigma\delta$). From these figures, we estimate that only 5–10% of sequenced reads can be mapped to a $S\mu$ - $\sigma\delta$ junction with BLAST/CSReport. This is therefore in agreement with our finding of 185,683 out of 2,522,418 reads (7%) are identified as a $S\mu$ - $\sigma\delta$ 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 $S\mu$ and $\sigma\delta$) 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 $S\mu$ and $\sigma\delta$) are reported in Fig. 1E.

Summarization of these 222 independent junctions provided descriptions of $S\mu$ - $\sigma\delta$ 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 $S\mu$ and $\sigma\delta$), 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 $S\mu$ with WRCY/RGYW motifs was found as for conventional AID-induced CSR [6], it was not the case in $\sigma\delta$ 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 $\sigma\delta$ region during the enigmatic IgD CSR deserves to be investigated. If mutation frequencies in $S\mu$ for $S\mu$ - $\sigma\delta$ junctions were of the order of magnitude of those for $S\mu$ - $S\gamma_1$ and $S\mu$ - $S\gamma_3$ junctions, it was not the case for mutation frequencies in the $\sigma\delta$ acceptor regions compared to $S\gamma_1$ and $S\gamma_3$ [5]. These results reinforce the hypothesis that $\sigma\delta$ is differently targeted than $S\mu$ 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 $\sigma\delta$ 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.

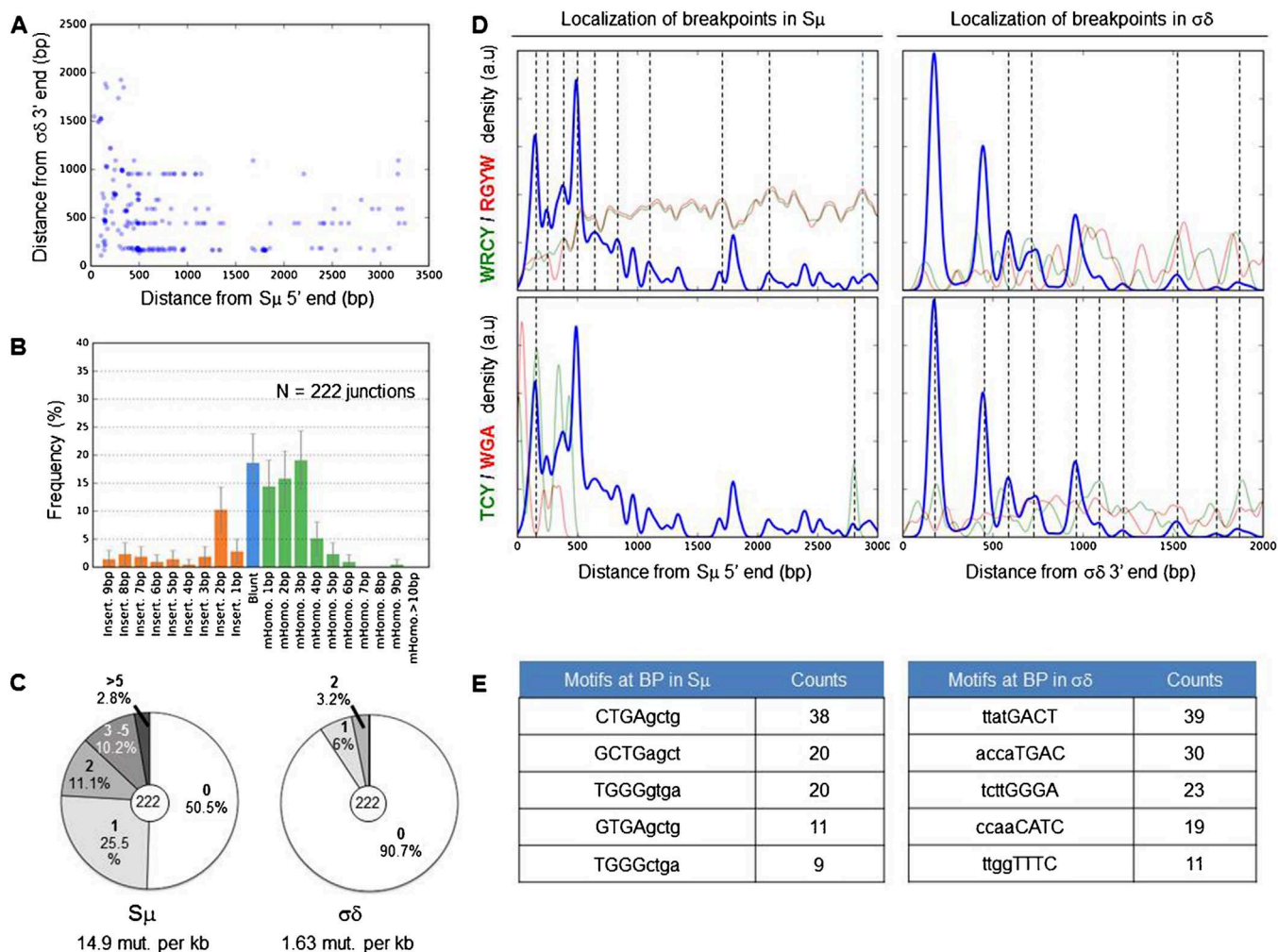


Fig. 1. CSReport provides valuable $S\mu$ - $\sigma\delta$ DNA break/repair information on larges data set. Structural and positional results obtained from analysis of $S\mu$ - $\sigma\delta$ junctions in IgD^+IgM^- sorted peritoneal B-cells (pool of 19 mice). A: Positions of junction breakpoint expressed 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 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.

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.

Annexe 2

IgD class switch recombination is not controlled through the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer

Issaoui H*, Ghazzaoui N*, Saintamand A, Denizot Y, Boyer F.

* Contribution équivalente

Cellular and Molecular Immunology, 2017

LETTER TO THE EDITOR

IgD class switch recombination is not controlled through the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer

Hussein Issaoui¹, Nour Ghazzaoui¹, 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_e 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_e and C_α genes (namely, the $S_{\gamma,e,\alpha}$ 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.

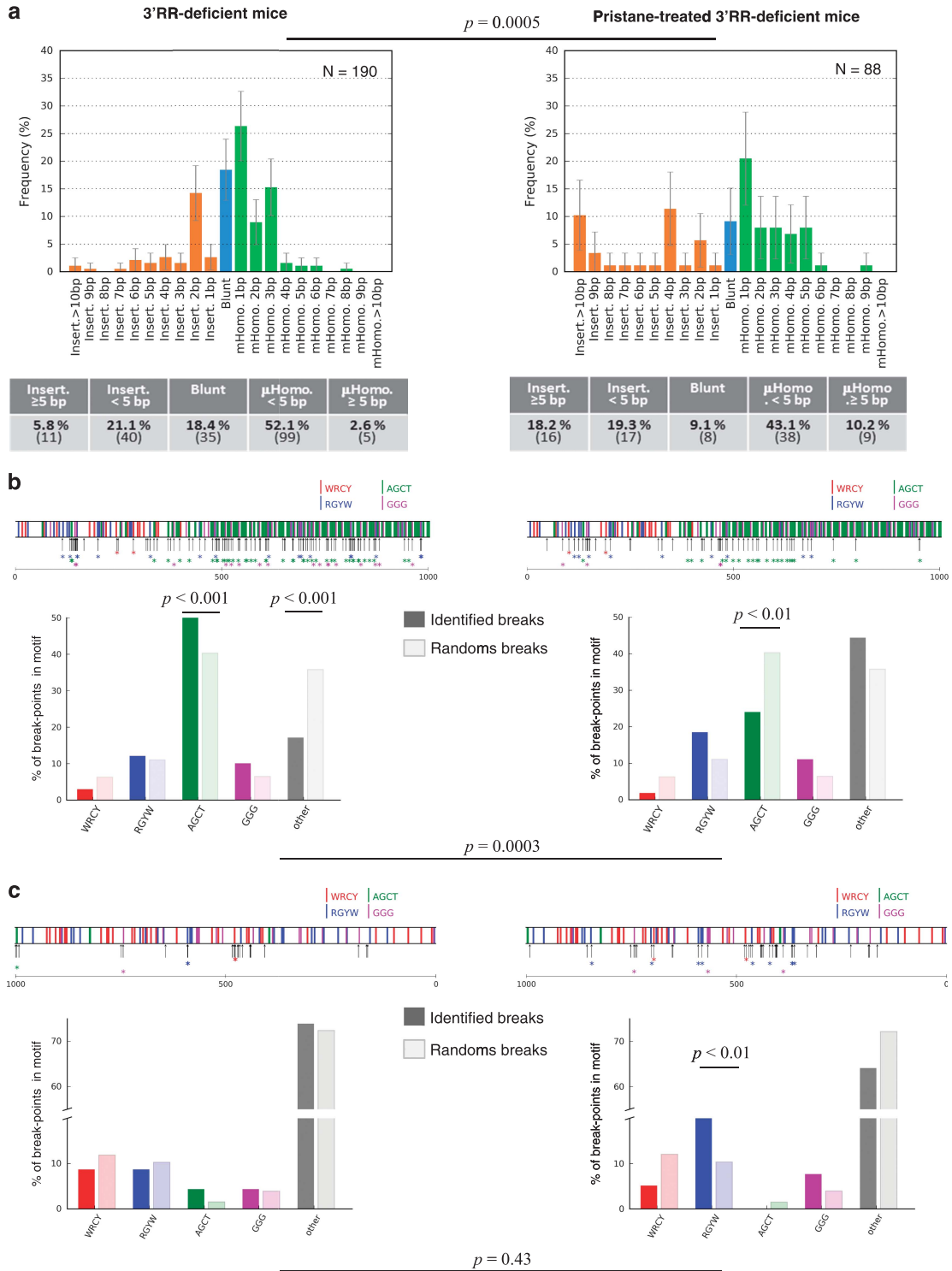
²Present address: INSERM U1236, Université Rennes 1, Rennes, France.

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 $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$ 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 $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$ 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 $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$ 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 $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$ 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 $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$ junctions along the σ_{δ} region (up to 1 kb from the 3' primer). Breaks detected in the σ_{δ} 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_{δ} 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 $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$ 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_{δ} (Figure 1c, right panel) in pristane-treated mice compared with untreated mice.

A summary of these 190 independent junctions provided a description of the $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$ CSR sequences in 3'RR-deficient mice at an unprecedented level. Until recently, only a few $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$ 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_{δ}) 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 $S_{\mu}-\sigma_{\delta}$ 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.

Annexe 3

The enigmatic IgD class switch recombination

Issaoui H*, Ghazzaoui N*, Denizot Y.

* Contribution équivalente

Medecine/Sciences, 2018

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]. La *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.

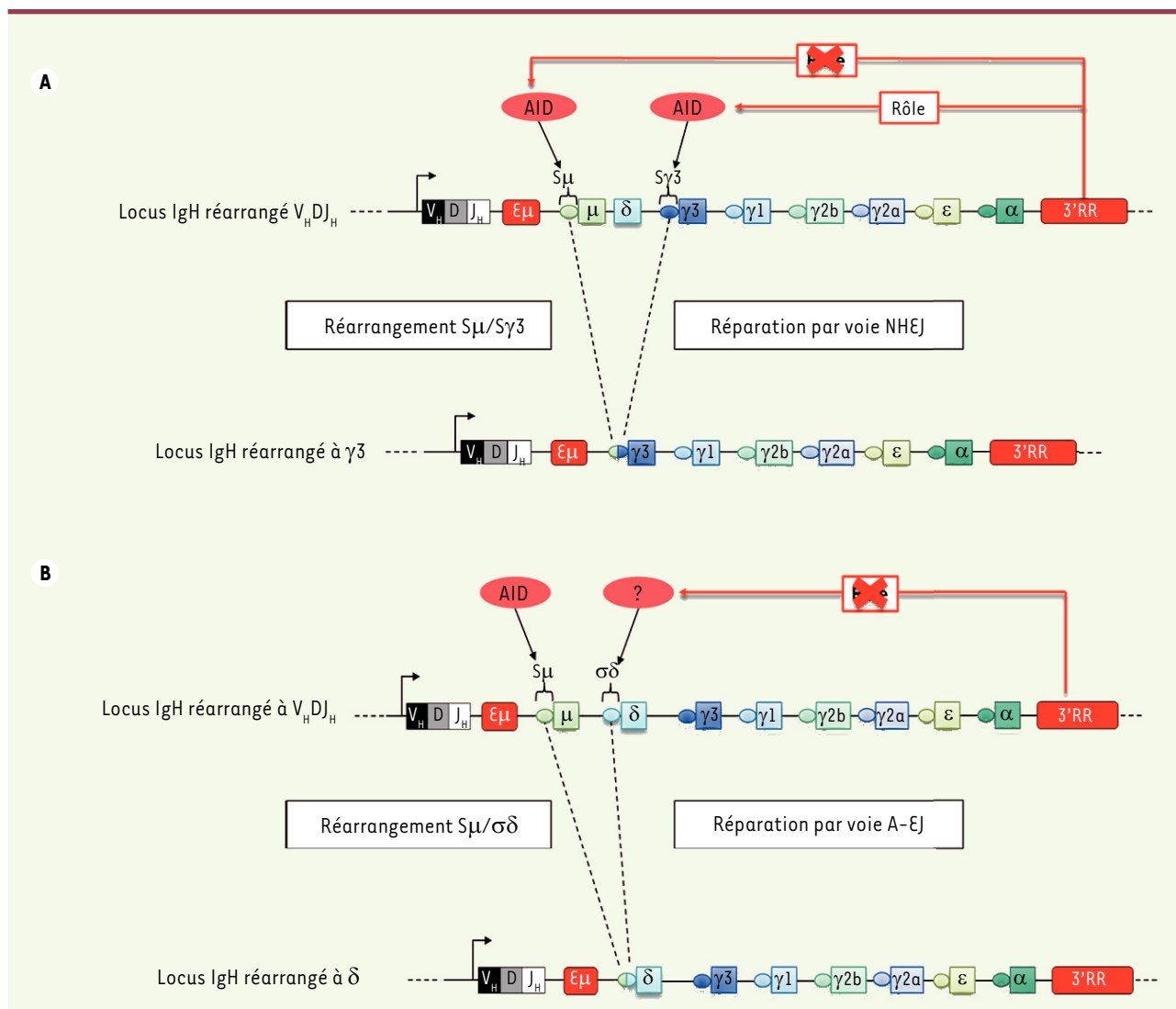


Figure 1. La recombinaison isotypique (ou commutation de classe). **A.** Recombinaison isotypique vers IgG3 (immunoglobuline d'isotype G3). Attaque de l'enzyme AID (*activation-induced cytidine deaminase*) sur $S\mu$ et $S\gamma3$ pour générer des cassures de l'ADN. Il existe une contribution importante de la région régulatrice en 3' ($3'RR$) du locus IgH pour le ciblage d'AID sur la région switch receveuse (ici $S\gamma3$). La ligature $S\mu$ - $S\gamma3$ fait appel principalement à la voie de réparation NHEJ (*non-homologous end-joining*). **B.** Recombinaison isotypique vers IgD. Attaque de l'enzyme AID sur $S\mu$. Pas de contribution de la $3'RR$ pour le ciblage d'AID sur la région $\sigma\delta$. La ligature $S\mu$ - $\sigma\delta$ fait appel principalement à la voie de réparation A-EJ (*alternative end-joining*).

et le $TGF\beta$ (*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 $S\mu$ - $\sigma\delta$ 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 $S\mu$ - $\sigma\delta$ décrit des stigmates AID en 5' de $S\mu$, mais pas en 3' de $\sigma\delta$ [8]. Cette contribution d'AID sur $S\mu$ est cohérente

avec son action lors de la recombinaison de classe vers les IgG, IgA et IgE ainsi qu'avec l'absence de jonctions $S\mu$ - $\sigma\delta$ 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 $S\gamma$, $S\epsilon$ et $S\alpha$ 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). Nous remercions Ghazzaoui N. pour son soutien financier et son aide précieuse lors de la réalisation de ce travail.

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] (\rightarrow).

(\rightarrow) 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.

Annexe 4

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

Ghazzaoui N*, **Issaoui H***, Boyer F, Martin OA, Saintamand A, Denizot Y.

* Contribution équivalente

Cellular and Molecular Immunology, 2019



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 μ_o 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 μ_o 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

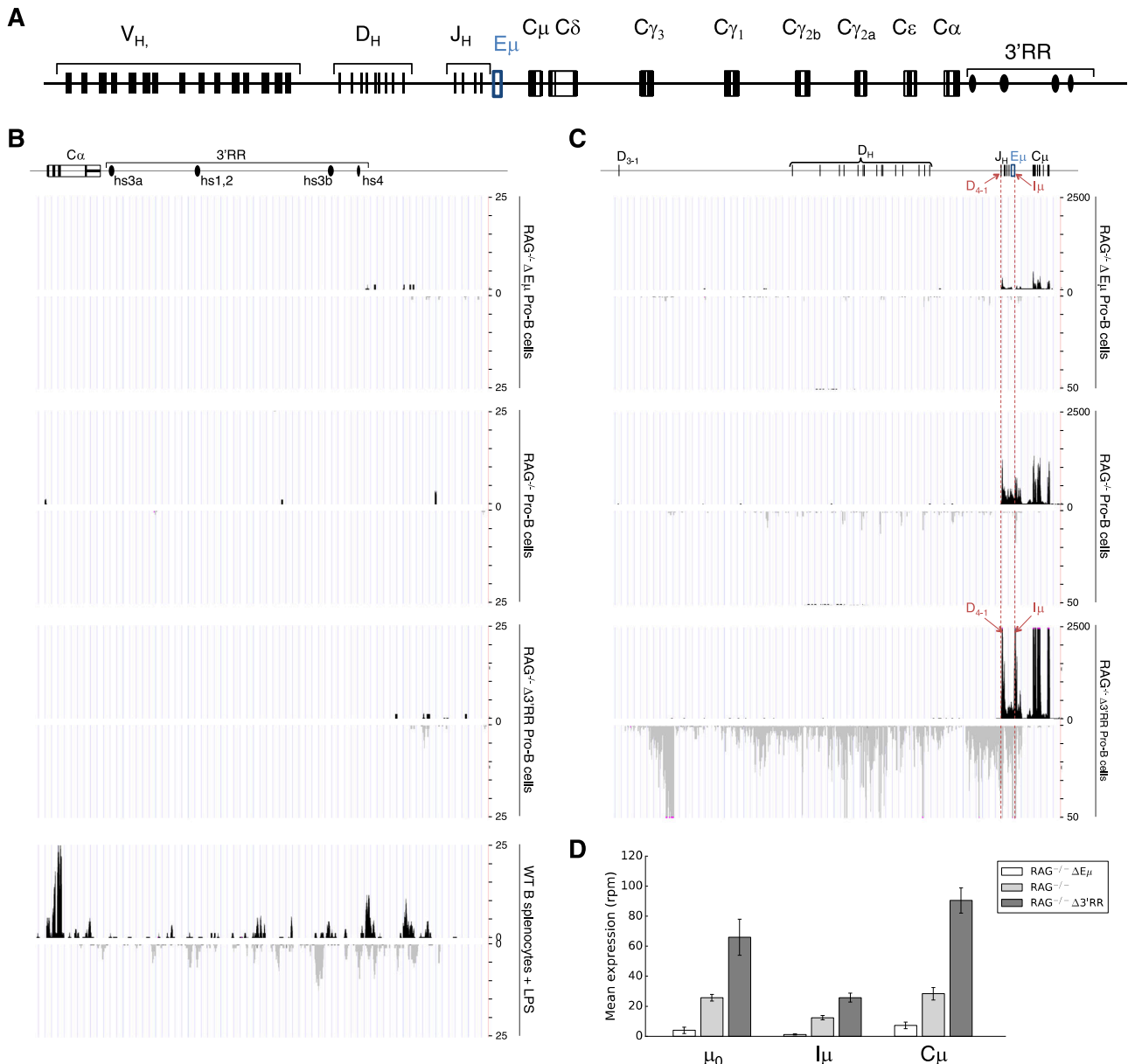


Fig. 1 Influence of the E μ and 3'RR enhancers on IgH transcription in pro-B cells. **a** Schematic representation of the IgH locus (not to scale). V (variable), D (diversity), J (junctional), and C (constant) segments are shown as well as the E μ enhancers and the 3'RR. The 3'RR contains four transcriptional 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. **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 μ ₀, 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 Khiam (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. 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).
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., Ghazzaoui, 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., Ghazzaoui 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).

Annexe 5

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

Ghazzaoui N*, **Issaoui H***, Martin OA, Saintamand A, Cook-Moreau J, Denizot Y, Boyer F.

* Contribution équivalente

Cellular and Molecular Immunology, 2019



CORRESPONDENCE

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

Nour Ghazzaoui¹, 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 (1×10^6 cells per ml in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum) with 5 μ g/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 Ghazzaoui, Hussein Issaoui.

Received: 6 November 2018 Accepted: 7 November 2018
Published online: 06 December 2018

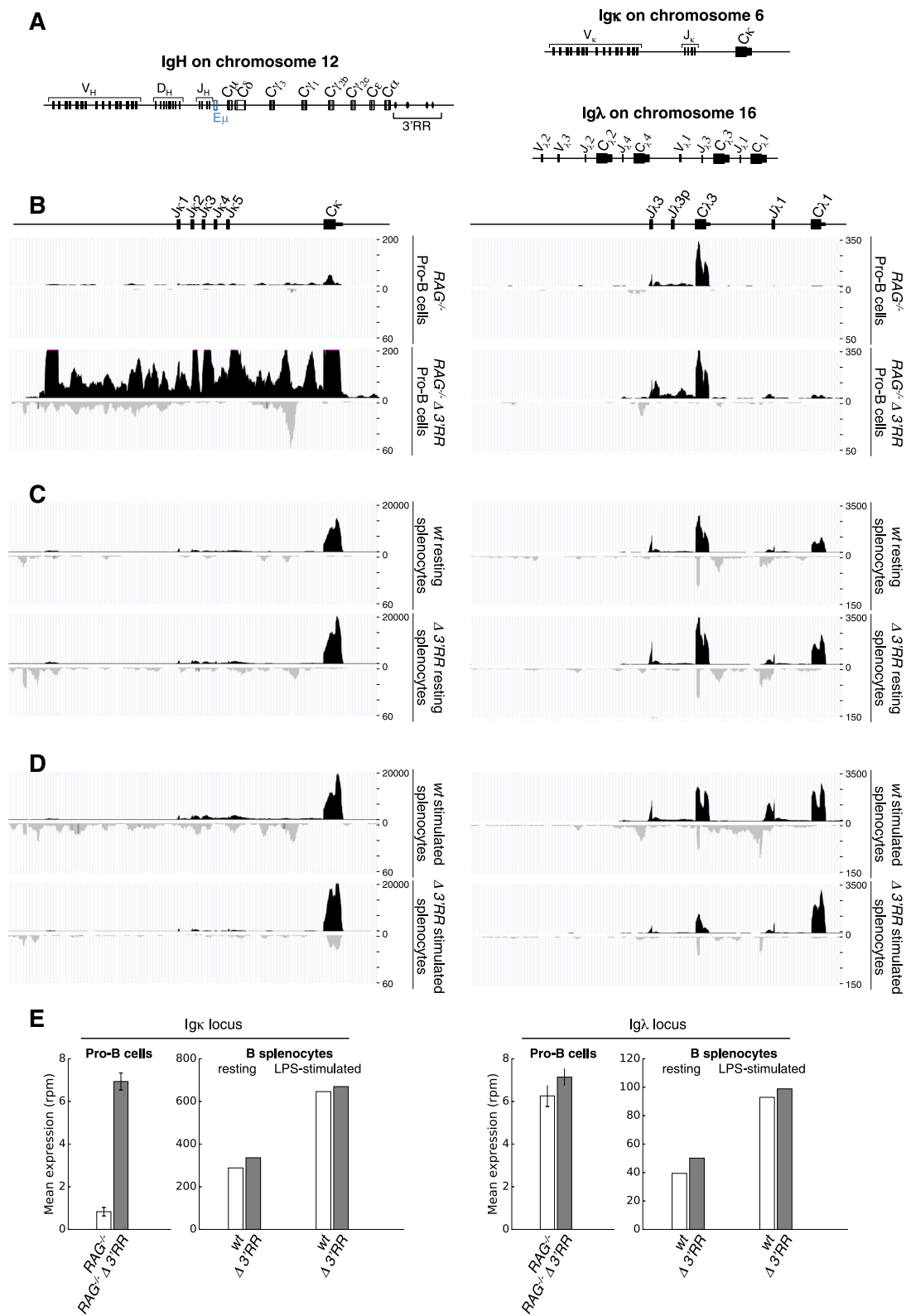


Fig. 1 Influence of the 3'RR enhancer on Igκ transcription in pro-B cells. **a** Schematic representation of the IgH, Igκ, and Igλ loci (not to scale). **b** Igκ and Igλ sense (top) and antisense (bottom) transcription in pro-B cells of $RAG^{-/-}$ and $RAG^{-/-} \Delta 3'RR$ mice. **c** Igκ and Igλ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

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 Khiam (Lebanon), and the Société Française d'Hématologie. H.I. is supported by a fellowship of the University of Limoges. F.B. is supported by the Fondation Partenariale de l'Université de Limoges and ALURAD. We thank the Nice Sophia Antipolis genomic platform for the RNAseq experiments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H.I., N.G., A.S., F.B., O.A.M., J.C.M., and Y.D. designed and performed the experiments and wrote the manuscript. Y.D. obtained the 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. 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).
4. 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).
5. Issaoui, H., Ghazzaoui, 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>
6. 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).
7. Saintamand, A. et al. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat. Commun.* **6**, 7084 (2015).
8. Saintamand, A. et al. Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy-chain 3' regulatory region. *Nat. Commun.* **7**, 10730 (2016).
9. Issaoui, H., Ghazzaoui, 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).
10. 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).
11. Péron, S. et al. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* **336**, 931–934 (2012).
12. 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).
13. 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).
14. Xiang, Y., Zhou, X., Hewitt, S. L., Skok, J. A. & Garrard, W. T. A multifunctional element in the mouse Igk locus that specifies repertoire and Ig loci subnuclear location. *J. Immunol.* **186**, 5356–5366 (2011).
15. Hewitt, S. L. et al. Association between the Igk and Igh immunoglobulin loci mediated by the 3' Igk enhancer induces "decontraction" of the Igh locus in pre-B cells. *Nat. Immunol.* **9**, 396–404 (2008).
16. Braikia, F. Z. et al. Developmental switch in the transcriptional activity of a long range regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 3370–3380 (2015).
17. Ghazzaoui, N. et al. 3'RR and 5'E μ immunoglobulin heavy chain enhancers are independent engines of locus remodelling. *Cell. Mol. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0171-3> (2018).

Annexe 6

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

Ghazzaoui N, Saintamand A, **Issaoui H**, Vincent-Fabert C, Denizot Y.

Oncotarget, 2017

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}/

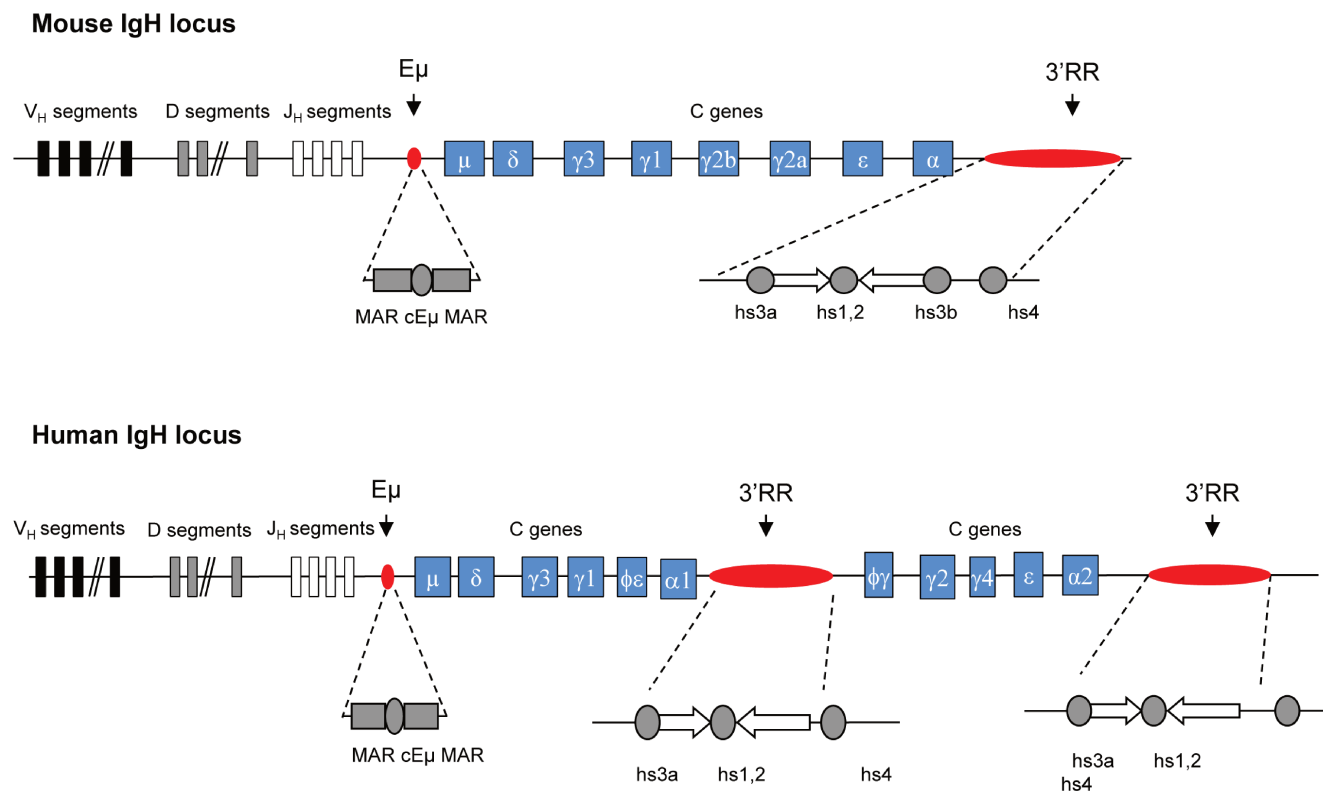


Figure 1: Murine and human IgH locus. Upper panel: Schematic diagrams of the murine IgH locus. Locations of E μ (with its flanking matrix attachment regions, MARs) and 3'RR (encompassing four transcriptional enhancers with flanking inverted repeats) are highlighted. Lower panel: Schematic diagrams of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

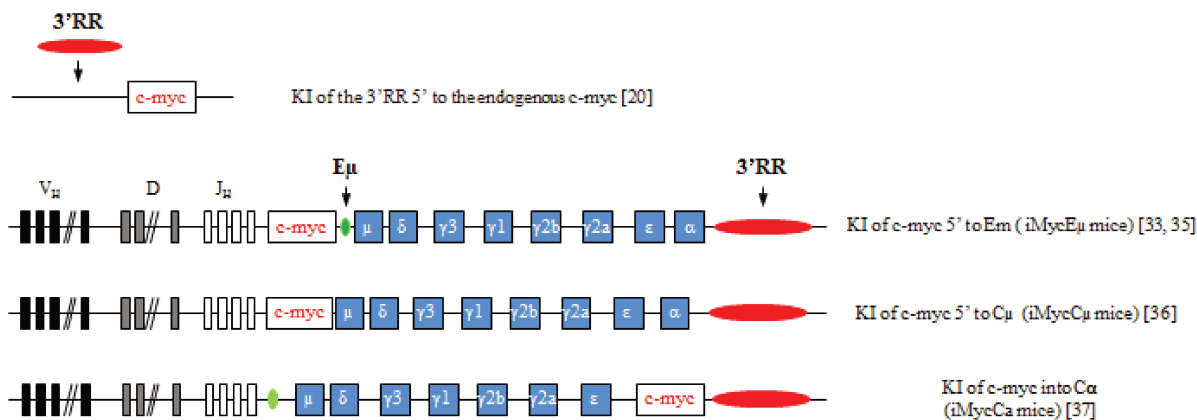
^{neg} phenotype. In these mice, 3'RR stimulated endogenous c-myc transcription triggering both cell proliferation and apoptosis in pre-malignant spleen B-cells. Lymphoma development required multiple "hits" in addition to c-myc deregulation. Mutations in the p53-ARF-Mdm2 apoptotic pathways occurred 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 Khiam (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 \pm 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. Ghazzai 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.

Annexe 7

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

Ghazzaoui N, Saintamand A, **Issaoui H**, Denizot Y.

Oncotarget, 2016

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 $a^{A3'RR}/b^{wt}$ 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 $a^{A3'RR}/b^{wt}$ mice were generated by

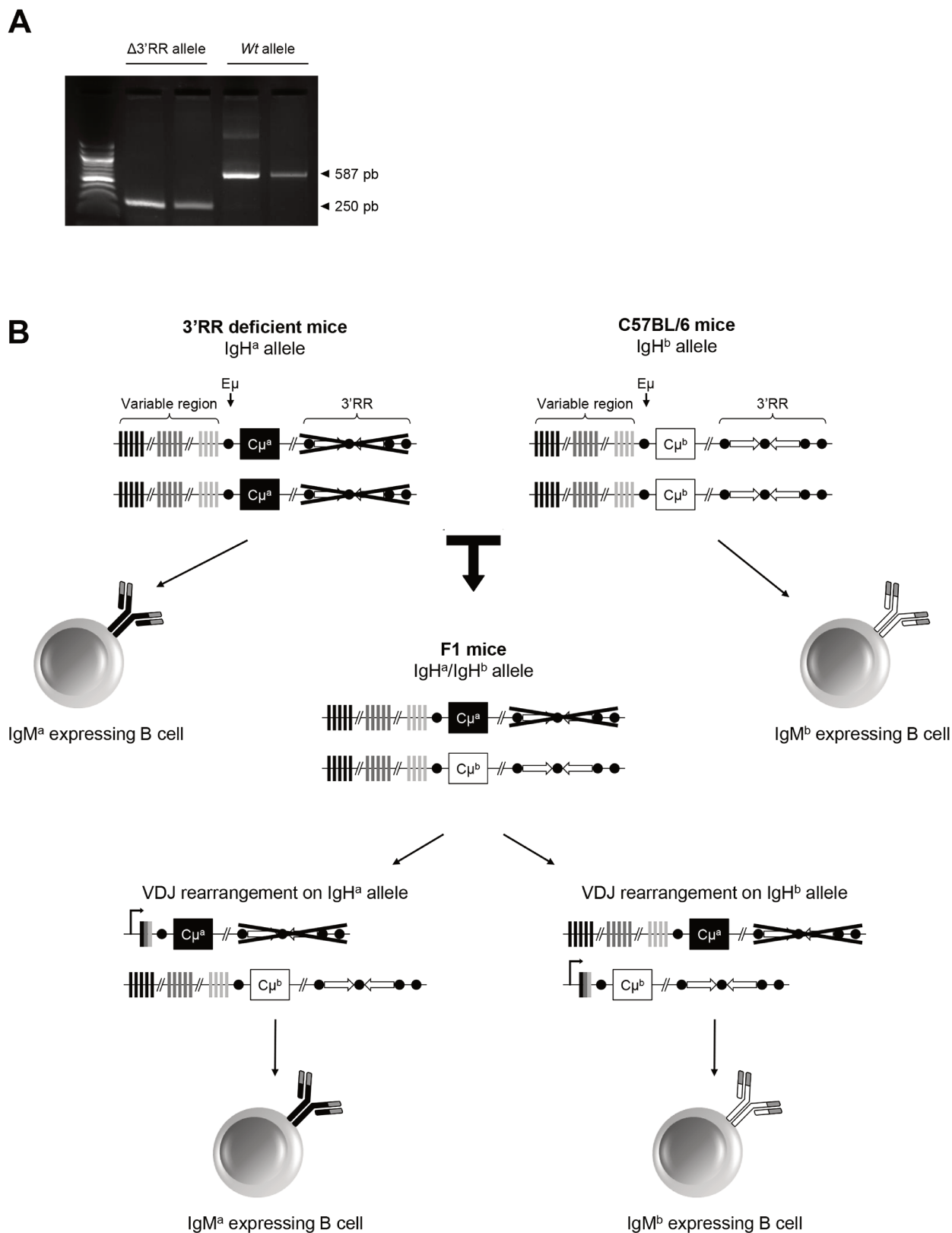


Figure 1: Generation of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. **A.** PCR profile for a 3'RR-deficient and a *wt* IgH allele. **B.** Backcross for generation of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice, and expression of either IgM^a or IgM^b allele by B-cells from F1 mice. B-cells are 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

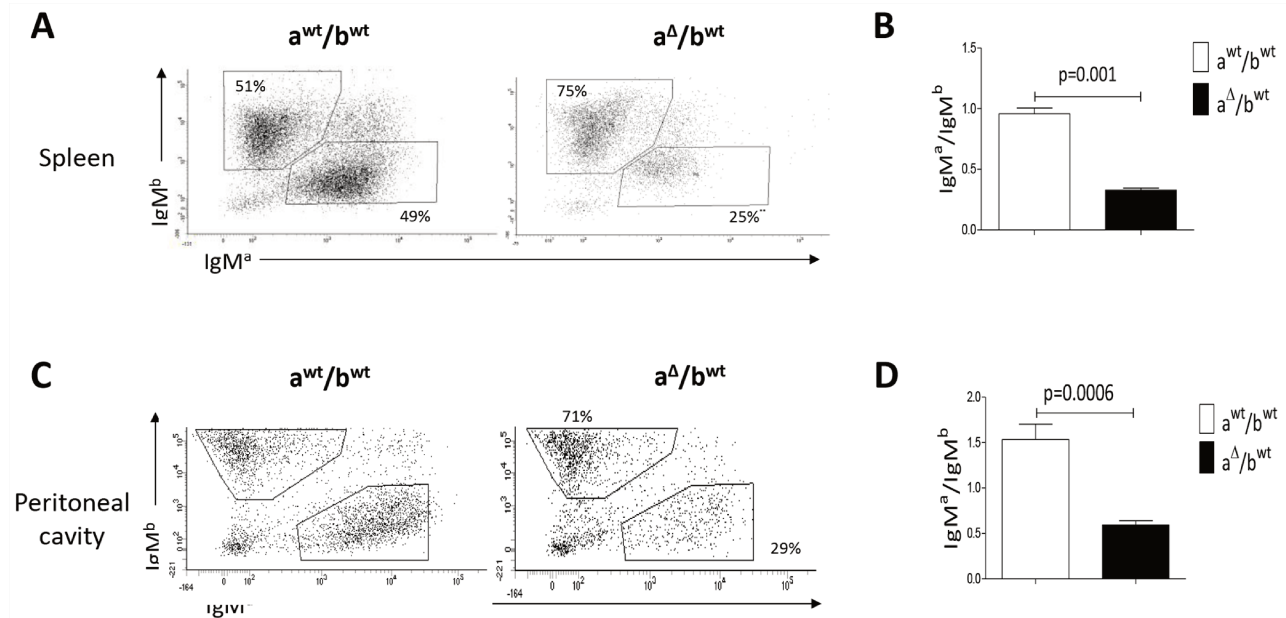


Figure 2: IgM^a and IgM^b in spleen and peritoneal cavity of heterozygous IgH $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. **A.** Flow cytometry analysis of the percentages of IgM^a and IgM^b in spleen of $a^{\Delta 3'RR}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. Cells were gated on B220⁺ cells. One representative 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^{Δ3'RR}/a^{Δ3'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^{Δ3'RR}/b^{wt} mice we demonstrated that B-cells expressing a 3'RR-deficient

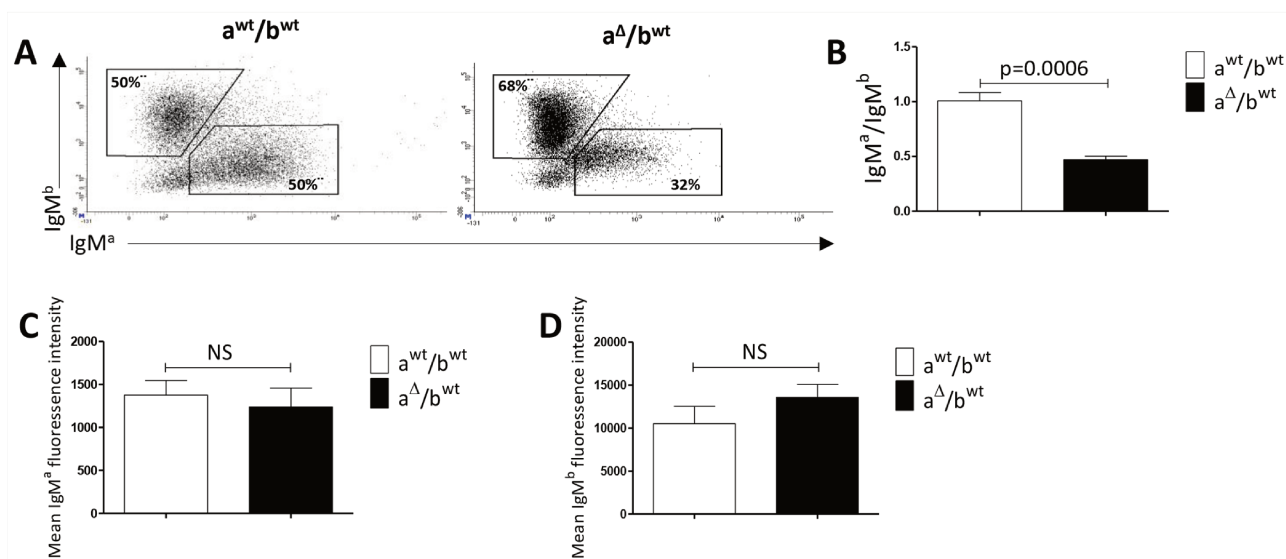


Figure 3: IgM^a and IgM^b in oil granulomas of heterozygous IgH a^{Δ3'RR}/b^{wt} and a^{wt}/b^{wt} mice. **A.** Flow cytometry analysis of the percentages of IgM^a and IgM^b in granulomas of a^{Δ3'RR}/b^{wt} and a^{wt}/b^{wt} mice. Cells were gated on B220⁺ cells. One representative experiment out of eight a^{Δ3'RR}/b^{wt} mice and nine a^{wt}/b^{wt} mice is shown. **B.** IgM^a/IgM^b ratio in granulomas of a^{Δ3'RR}/b^{wt} and a^{wt}/b^{wt} mice. Mean \pm SEM of eight a^{Δ3'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^{Δ3'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^{Δ3'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

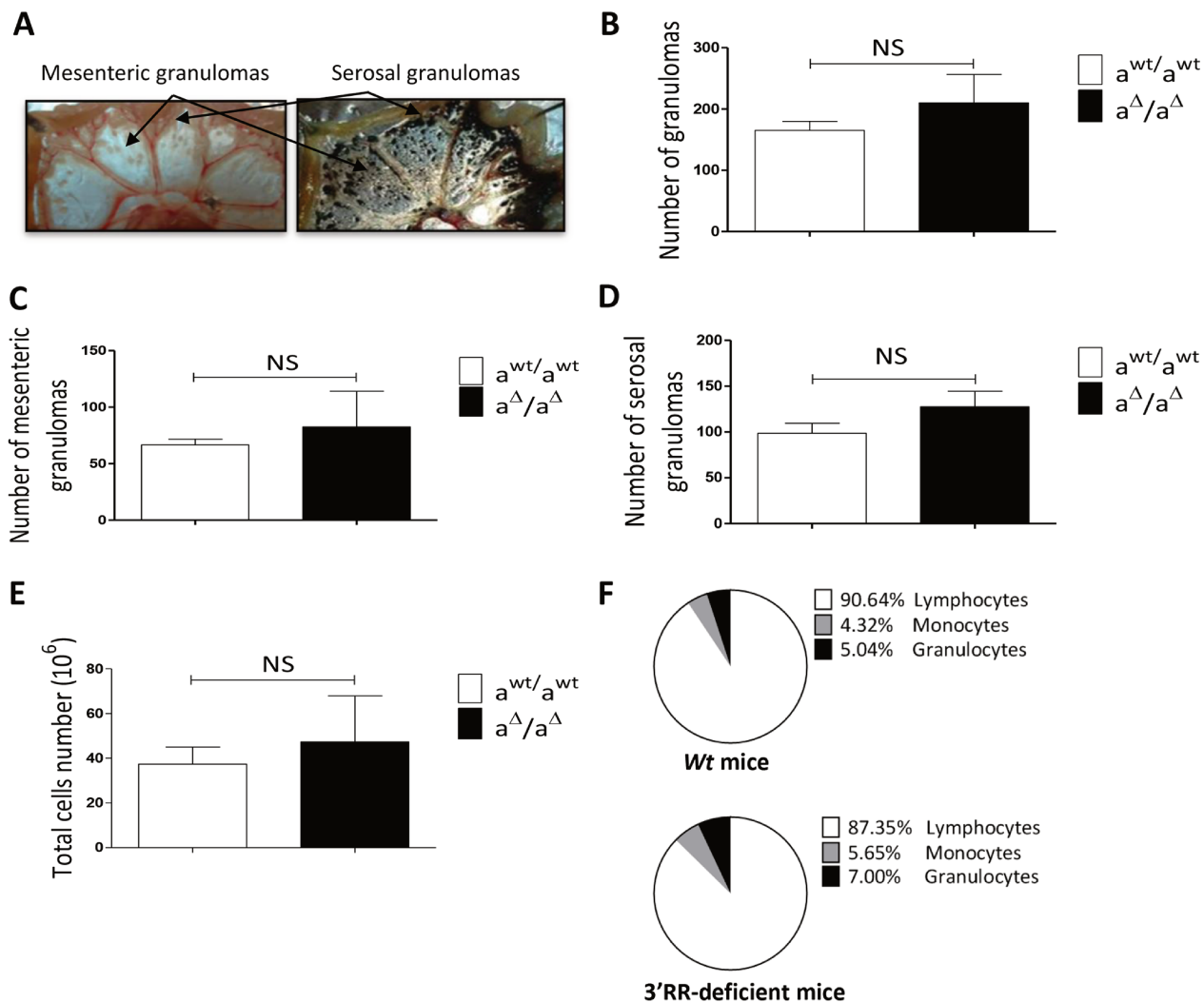


Figure 4: Oil granulomas in homozygous 3'RR-deficient mice. A. Response to the mesentery to pristine in 3'RR-deficient mice. After *i.p.* injection of 1ml of pristine, mice were sacrificed at week 3. The gut associated whole mesenteric tissue was photographed (right part). In another set of experiment 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^{Δ3RR/a^{Δ3RR}}*) and *wt* 129 mice (IgH *a^{wt/a^{wt}}*) were investigated. Heterozygous IgH *a^{Δ3RR/b^{wt}}* mice were generated by crossing homozygous 3'RR-deficient mice (IgH *a^{Δ3RR/a^{Δ3RR}}*) 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 plasmacytoma 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 \pm 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 pristane. *J Immunol*. 1991; 147:3632-3637.
23. Chen H, Liao D, Holl TM, Snowden P, Ueda Y and Kelsoe G. Genetic regulation of pristane-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 pristane. *Int J Exp Path*. 2010; 91:460-471.
25. Brand C, de Costa TP, Bernardes ES, Machado CML, Andrade LR, Chammas R, de Oliveira FL and El-Cheikh MC. Differential development of oil granulomas induced by pristane injection in galectin-3 deficient mice. *BMC Immunol*. 2015; 16:68.
26. Verkoczy L, Moody MA, Holl TM, Bouton-Verville H, Scearce 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 (pristane). *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.

Le rôle de la région régulatrice en 3' du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines dans le développement des lymphocytes B1

Durant l'ontogénie B, le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines (IgH) subit trois processus majeurs de réarrangements géniques. Lors de la phase précoce du développement B, indépendamment de la rencontre avec un antigène (Ag), les recombinaisons V_HDJ_H donnent le répertoire diversifié des Ig fonctionnelles. Durant la phase tardive, suite à une activation par l'Ag, l'hypermutation somatique (SHM) permet l'augmentation de l'affinité de l'Ig à son Ag et la recombinaison isotypique (CSR) va modifier ses fonctions effectrices. Tous ces processus sont strictement régulés par différents éléments *cis*-régulateurs repartis tout au long du locus IgH. La région régulatrice en 3' (3'RR) en est un. Elle s'étend sur environ 30 Kb et est constituée de quatre activateurs transcriptionnels, dont les trois premiers forment une structure palindromique. La 3'RR contrôle, chez le lymphocyte B-2 (LB-2), la transcription du locus IgH, le devenir de la cellule B, la SHM et la CSR mais elle n'a aucun effet sur les recombinaisons V_HDJ_H et la diversité du répertoire antigénique. Les LB-1 représentent un petit pourcentage des LB totaux. Ils diffèrent des LB-2 par leur origine, développement, fonctions, marqueurs de surface et distribution tissulaire. Les LB-1 maintiennent l'homéostasie dans l'organisme et sont la source principale des Ig naturelles (NIgM et NIgA) au cours des premières phases d'une réponse immunitaire. Lors de ma thèse, nous avons étudié le rôle de la 3'RR sur le développement des LB-1. D'une façon identique aux LB-2, la 3'RR contrôle la transcription du locus IgH, le devenir des cellules B et la SHM dans les LB-1. A l'inverse des LB-2, la 3'RR joue un rôle indirect sur la diversité du répertoire antigénique dans les LB-1 et n'a aucun effet sur la CSR vers IgA. Ces résultats mettent en évidence, pour la première fois, la contribution de la 3'RR dans le développement d'une population cellulaire B à l'interface entre l'immunité innée et acquise. Ils renforcent nos connaissances sur le rôle des éléments *cis*-régulateurs du locus IgH dans le développement de ces deux immunités.

Mots-clés : 3'RR/ LB-1/ LB-2/ Recombinaisons V_HDJ_H / Hypermutation somatique/ Recombinaison isotypique.

Abstract

During B-cell development, the immunoglobulin heavy chain locus (IgH) undergoes three major genic rearrangements. During the early stages, before encountering the antigen (Ag), V_HDJ_H rearrangements allow the generation of the Ig repertoire. During the late stages, after encountering the Ag, somatic hypermutation (SHM) increases the affinity of the Ig for its Ag, while class switch recombination (CSR) modifies its effector functions. All these genetic events are strictly regulated by *cis*-regulatory elements spread along the IgH locus, including the 3' regulatory region (3'RR). The 3'RR extends over more than 30kb and contains four transcriptional enhancers, the first three displaying a palindromic conformation. The 3'RR controls B2 B-cell IgH transcription, cell fate, SHM and CSR but not 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, surface markers and tissue distribution. B1 B-cells act at the steady state to maintain homeostasis and during the earliest phases of an immune response by secreting natural Ig (NIgM and NIgA). During my PhD, we investigated the role of the 3'RR on B1 B-cells. Similarly to B2 B-cells, the 3'RR controls IgH transcription, cell fate and SHM in B1 B-cells. In contrast to B2 B-cells, 3'RR deletion indirectly affects B1 B-cell repertoire diversity and has no effect on their CSR towards IgA. These results highlight, for the first time, the contribution of the 3'RR in the development of a B-cell population at the interface between innate and acquired immunity. Moreover, these results strengthen our knowledge of the role of the *cis*-regulatory elements of the IgH locus in the development of these two immune responses.

Keywords: 3'RR/ B1 B-cell/ B2 B-cell/ V_HDJ_H recombination / Somatic hypermutation/ Class switch recombination.

