



# Super enhancers du locus IgH et lymphomagenèse

Melissa Ferrad

## ► To cite this version:

Melissa Ferrad. Super enhancers du locus IgH et lymphomagenèse. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2021. Français. NNT : 2021LIMO0071 . tel-03560883

HAL Id: tel-03560883

<https://theses.hal.science/tel-03560883v1>

Submitted on 7 Feb 2022

**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.

# Thèse de doctorat



**Université de Limoges**  
ED 615 - Sciences Biologiques et Santé

**UMR CNRS 7276 – INSERM U1262 – CRIBL**  
Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

**Thèse pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Limoges**  
Discipline : Science Biologie Santé  
Spécialité : Immunologie, Oncologie, Inflammation et Infectiologie

Présentée et soutenue publiquement  
**le 14 décembre 2021**  
Par **MELISSA FERRAD**  
Thèse dirigée par le Dr. Yves DENIZOT

## "Super-enhancers" du locus IgH et lymphomagenèse

### JURY :

**Présidente du jury**  
**Marie-Odile Jauberteau**, Professeur des Universités, HDR, Université de Limoges

**Rapporteurs**  
**Pierre Dubus**, Professeur des Universités, HDR, Université de Bordeaux  
**Edith Chevret**, Professeur des Universités, HDR, Université de Bordeaux

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





Université de Limoges  
ED 615 - Sciences Biologiques et Santé

# "Super-enhancers" du locus IgH et lymphomagenèse



Mélissa FERRAD

*Encadrant : Dr.Yves DENIZOT*

Thèse en vue de l'obtention  
du grade de Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Biologie santé

Spécialité : Immunogénétique, Oncologie, Inflammation et Infectiologie

Présentée et soutenue publiquement le 14 Décembre 2021

## JURY :

*Présidente du jury :*

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

*Rapporteurs :*

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

*Examinateur :*

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



## Résumé

De nombreux lymphomes B matures sont caractérisés par une translocation oncogénique au locus des chaines lourdes des immunoglobulines (IgH). Elles surviennent, le plus souvent, lors des différents remaniements géniques du locus IgH qui ponctuent la vie du lymphocyte B. L'oncogène transloqué est alors dérégulé sous l'action des deux principaux activateurs transcriptionnels qui y résident :  $E\mu$  et 3'RR. Il a précédemment été montré que la 3'RR est l'acteur majeur régulant les commutations de classes (CSR) notamment en participant au recrutement de l'enzyme AID et donc des cassures doubles brins (DSBs). Au cours de ma thèse, l'analyse de lymphomes B développés par trois modèles murins portant des KI de c-myc en différentes positions du locus IgH a permis de montrer une coopération des deux éléments  $E\mu$  et 3'RR afin de promouvoir la lymphomagenèse B bien que la 3'RR suffit, à elle seule, à induire le développement de lymphomes B matures. Nous montrons que son absence perturbe le bon recrutement des facteurs de réparation lors de la résolution des DSBs suite à la CSR, suggérant que sa défaillance pourrait représenter un risque de translocation oncogénique au locus IgH. L'étude du mécanisme d'action de la 3'RR a montré une différence entre les cellules B normales dans lesquelles HDAC1 est recrutée par son élément central hs1.2 et les cellules B lymphomateuses issues de nos lignées murines où c'est l'HAT CBP qui est recrutée sur les éléments hs3a et hs3b de la 3'RR. L'utilisation de l'HDACi SAHA impacte significativement la prolifération B, ainsi que les processus de CSR et de synthèse d'Ig dans les cellules B normales mais a un effet inconsistant sur la prolifération *in-vitro* de nos lymphomes B murins. Enfin, le développement de souris KI CmycC $\alpha$  homozygotes a permis la mise en évidence d'un nouveau modèle murin développant des lymphomes B présentant un profil cellulaire et moléculaire myélome-like, faisant de ces souris un modèle intéressant pour la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement de myélomes humains.

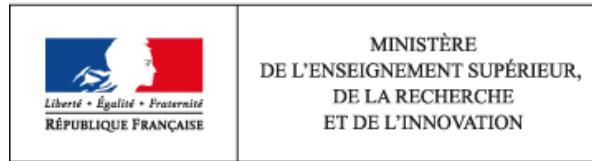
**Mots clés :** Locus IgH, 3'RR, Translocation oncogénique, C-myc, Lymphomes B matures, HDAC, HDACi, Myélomes.



## Abstract

Numerous mature B cell lymphomas are characterized by oncogenic translocation to the immunoglobulin heavy chain locus (IgH). Most of these translocations occur during the different IgH gene rearrangements punctuating the B cell life. The translocated oncogene appears deregulated by the two main IgH locus transcriptional activators : E $\mu$  and 3'RR. It has been previously shown that the 3'RR is the major player regulating class switch recombination (CSR), through AID recruitment and the induction of DNA double strand breaks (DSBs). During my thesis, the analysis of lymphomas developed by three mouse models bearing c-myc insertion at different positions of the IgH locus showed a transcriptional cooperation of E $\mu$  and 3'RR to promote B cell lymphomagenesis although 3'RR alone is sufficient to induce the development of mature B cell lymphomas. We also showed that 3'RR absence disrupted the proper recruitment of repair factors when resolving CSR breakouts suggesting that 3'RR failure could represent a risk of oncogenic translocation to the IgH locus. The study of the 3'RR mechanism of action showed a difference between normal B cells in which HDAC1 is recruited by the hs1.2 3'RR central element and murin B cell lymphomas where it is the HAT CBP which was recruited by the hs3a and hs3b 3'RR elements. The use of the HDACi SAHA significantly impacted normal B cell proliferation, CSR and Ig synthesis. Only an inconsistent effect was observed during *in-vitro* murin B cell lymphoma growth. Finally, generation of homozygous kI CmycC $\alpha$  mice lead to the development of an interesting model of mature CD138 $^+$  B cell lymphomas that can be used for investigations of therapeutics strategies against human myelomas.

**Key words :** IgH locus, 3'RR, Oncogenic translocation, C-myc, Mature B-cell lymphoma, HDAC, HDACi, Myelomas.



Durant mes trois ans de thèse j'ai été financée par une bourse de l'école doctorale Sciences Biologiques et Santé de l'Université de Limoges et de la région Nouvelle-Aquitaine



## Remerciements

Je tiens d'abord à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude à mon directeur de thèse Yves DENIZOT, pour sa disponibilité, ses conseils et son soutien sans faille durant ces trois années. Merci pour nos échanges enrichissants, pour votre bonne humeur au quotidien et surtout vos blagues...

Je tiens à remercier les membres de mon jury. Merci au Pr Marie Odile JAUBERT-TEAU de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Merci aux Pr Pierre DUBUS et Pr Edith CHEVRET de m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Karine DURAND, pour son soutien et son aide durant la rédaction de ma thèse. Merci d'avoir été là.

Je remercie tout particulièrement la Denizot team, Hussein et Nour pour leur aide et leur sympathie. Un très grand merci à Iman DALLOUL pour son aide. Merci de m'avoir accompagné durant mes débuts. J'ai également une sympathique pensée pour Zineb.

Je remercie également tous les membres du CRIBL. Merci à tous les membres de l'équipe Michel COGNÉ, Merci à Jeane, Eric, Jean-Claud et Sandrine. Un grand merci à Christelle Vincent-Fabert pour sa précieuse aide grâce à laquelle les KI n'ont plus de secret pour moi. Merci à Christelle Oblet pour son aide en Western. Merci à Sandrine Lecardeur, Claire et Tiffany. Une pensée à tous les doctorants du CRIBL. Je vous souhaite à tous une bonne continuation.

Je remercie tout particulièrement Marine Cahen. Merci d'avoir toujours été là. Merci pour ton soutien et pour nos discussions sans fin. Ton amitié m'est précieuse. Je te souhaite bonne chance pour la fin de ta thèse.

Merci aussi à kerthe. Les quelques mois passés ensemble ont été remplis de joie de vivre et de bonne humeur.

Mes remerciements vont aussi à toutes les personnes qui m'ont soutenue et cru en moi durant ces trois dernières années. Je ne remercierai jamais assez ma tatie de cœur, tatie Vénérande, pour sa grande bonté, sa gentillesse et son dévouement pour les autres. Ne change rien, tu es la meilleure. Merci à mes chères et tendres amies Larissa et Meriem. Une mention particulière à JR (je te vois sourire en lisant ces remerciements). Je n'oublierai pas mon ami et compagnon de longue date Farid. Tu as été là pour moi avant même le début de l'histoire.

Merci à mes parents. Ma très chère maman pour sa présence, ses sacrifices et sa force qu'elle a su me transmettre et qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Mon papa pour son soutien infaillible. Ma tendre sœur vanessa (aucun mot ne saura exprimer ma gratitude et mon amour pour toi) et mon frère Mohamed. Merci à ma grande famille, mes grands parents, Faiza, Nadir, Yasmine et Nesrine. Merci à mes très chères tantes et oncles. Je suis très chanceuse d'avoir autant de personnes qui me soutiennent et qui croient en moi.

Enfin, je remercie mon conjoint Djaber pour son soutien, ses encouragements, sa foi en moi et son amour. Merci d'avoir toujours été là . Tu m'as permis de m'accrocher à mes objectifs et de les atteindre, Je t'en serai éternellement reconnaissante.

**« Ne tenez pour certain que ce qui est démontré »**  
Isaac Newton

**« La connaissance s'acquiert par l'expérience,  
tout le reste n'est que de l'information »**  
Albert Einstein

**« La science moderne est un admirable monument  
qui fait honneur à l'espèce humaine et qui compense  
(un peu) l'immensité de sa bêtise guerrière »**  
Hubert Reeves

## Abréviations

3'RR : 3' Regulatory Region	ELP : Early Lymphoid Progenitor
3C : Capture de Conformation chromosomique	ERk : Extracellular Regulated kinase
<b>A</b>	Exo1 : Exonucléase I
Ag : Antigène	<b>F</b>
AEJ : Alternative End-Joining Pathway	FO : Folliculaire
AID : Activated Induced Deaminase	FDC : Follicular Dendritic Cell
ATM : Ataxia-Telangiectasia Mutated	Foxo : Forkhead box O protein
APOBEC : Apolipoprotein B RNA-Editing catalytic Component	<b>G</b>
<b>B</b>	GC : Germinal center
bcl-2 : B-Cell Lymphoma 2	<b>H</b>
bcl-6 : B-Cell Lymphoma 6	H : Heavy chain
BCR : B Cell Receptor	HAT : Histone AcetylTransferase
BER : Base Excision Repair	HBH-LZ : Hélice Boucle Hélice Leucine Zipper
Bright : B-cell Regulator of IgH Transcription	HDAC : Histone Désacétylase
<b>C</b>	HDACi : Histone Désacétylase inhibiteur
CCND1 : cycline D1	HSC : Hematopoietic Stem Cell
CBE : CTCF binding elements	<b>I</b>
Cdk : Cyclin-dependent kinase	I : Intervening
CDRs : Complementary Determining Region	Ig : Immunoglobulines
C/EBP : CCAAT-Enhancer Binding Proteins	IgH : Immunoglobulin Heavy Chain
ChIP : Immunoprécipitation de la chromatine	IgL : Immunoglobulin Light Chain
CLP : Common Lymphoid Progenitor	IL : Interleukine
CSR : Class Switch Recombination	Inr : Élément initiateur
<b>D</b>	IR : Inverted Repeat
D : Diversité	<b>J</b>
Da : Dalton	J : Jonction
DDR : DSB Dependent Response	<b>K</b>
DICE : Downstream Immunoglobulin control elements	KI : Knock-In
DNaseI : DésoxyriboNucléase I	KO : Knock-Out
DSBs : Double Strand Breaks	Kb : Kilobase
DZ : Dark Zone	<b>L</b>
<b>E</b>	LB : Lymphocytes B
E2A : E box protein binding 2 A	LT : Lymphocytes T
EBF1 : Early B Cell Factor	LS : Like Switch
	LPS : Lipopolysaccharides
	LSR : Locus Suicide Recombination
	LZi : Leucine-Zipper
	LZ : Light Zone
	<b>M</b>
	maf : musculoaponeurotic fibrosarcoma

MALT : Mucosae Associated Lymphoid Tissue	PU1 : Purine box factor-1
MAR : Matrix Association Region	pVH : Promoteur de région variable
Max : Myc-associated protein X	<b>R</b>
MB : Myc Homology Boxe	RNA Pol II : ARN Polymérase II
Mlh1/Pms2 : Mut Homologue 1 et Post meiotic segregation 2	RAG : Recombination-Activating Gene
MM : Myélome Multiple	RSS : Recombination Sequence Signal
MMR : Mismatch Repair	<b>S</b>
Msh2/Msh6 : Mus Homologue 2 et 6)	S : Switch
myc : myelocytomatosis	SI : Système immunitaire
MZ : Zone Marginale	SHM : Somatic HyperMutation
<b>N</b>	<b>T</b>
neoR : gène de résistance à la néomycine	TAD : Transcription Activation Domaine
NK : Natural killer	TC-seq : Translocation Capture – sequencing
NHEJ : Non Homologous End Joining	TdT : Terminal deoxynucleotidyltransferase
NLS : Nuclear Localization Sequence	TFH : Follicular T Helper
NF $\kappa$ B : Nuclear Factor kappa B pathway	TRRAP : Transactivation/Transformation-Associated Protein)
<b>P</b>	TSA : Trichostatin A
P : Palindromique nucleotide	<b>U</b>
PAIRS : Pax-5 Activated Intergenic Repeat	U : Uracile
PAMPs : Pathogen Associated Molecular Pattern	UNG : Uracil DNA-Glycosylase
Pb : Paire de base	<b>V</b>
PKA : Protéine Kinase A	V : Variabilité
PKC : Protéine Kinase C	<b>W</b>
PK $\delta$ : Protéine Kinase C $\delta$	WT : Wild type

# Table des figures

- 1 **Structure des Immunoglobulines (Ig)** Représentation d'une IgG1 de souris. Les chaînes lourdes sont représentées en vert, les chaînes légères en bleu. Les ponts disulfures sont en gris. Les régions variables des chaînes lourdes et légères sont notées  $V_H$  et  $V_L$ . Les régions constantes des chaînes lourdes et légères sont notées  $C_H$  et  $C_L$ .
- 2 **Représentation schématique des loci d'immunoglobulines chez la souris A** : Représentation schématique du locus  $Ig\kappa$ . **B** : Représentation schématique du locus  $Ig\lambda$ . **C** : Représentation schématique du locus IgH et représentation détaillée des exons du gène  $C\mu$ . Les segments V sont représentés en bleu foncé, les segments D en gris, les segments J en bleu clair et les gènes constants par des rectangles verts.
- 3 **Origine de la lignée lymphocytaire B** La lignée lymphocytaire B est issue de cellules souches multipotentes (HSC), une ascendance qu'elle partage avec toutes les autres lignées sanguines. Sous l'influence de facteurs de transcription, ces cellules s'engagent progressivement dans les lignées lymphocytaires. Le CLP est un précurseur commun aux lymphocytes T et B et aux cellules NK issues des HSC, qui par la suite donne le premier stade du développement précoce B : la cellule prépro B qui poursuit sa maturation jusqu'à atteindre le dernier stade de plasmocyte.
- 4 **Représentation schématique du développement B précoce** Les différents stades de l'ontogenèse B précoce sont représentés ainsi que les marqueurs de surface les caractérisant. Les réarrangements des gènes d'Ig qui ont lieu à ces différents stades sont représentés dans les cadrants.
- 5 **Représentation schématique du mécanisme des recombinaisons V(D)J** Les recombinaisons V(D)J se déroulent en deux étapes : une phase d'induction de cassures doubles brins et une phase de réparation. Le complexe RAG-1 RAG-2 se fixe au niveau de chaque RSS. Un second complexe est recruté ensuite sur une RSS partenaire de taille différente pour former une « synapse ». Des cassures doubles brins sont alors induites par l'enzyme RAG. Elles sont détectées et prises en charge par le système de réparation NHEJ. Les extrémités franches formées par les RSS sont raboutées et forment des jonctions signal qui seront éliminées. Les extrémités en épingle à cheveux sont réparées par les protéines de la voie NHEJ et forment les segments codants.(Extrait de Schatz and Ji, 2011).
- 6 **Représentation des différentes populations B matures et leur origine** Représentation de l'origine des deux principales populations B matures : les LB1 et les LB2 ainsi que les sous populations B2 MZ et FO.

## TABLE DES FIGURES

- 7 **Représentation schématique de l'initiation d'un centre germinatif au sein d'une structure lymphoïde secondaire** Représentation schématique d'une structure lymphoïde secondaire, et des interactions entre cellules présentatrices de l'Ag et les lymphocytes T helper au niveau de la zone T. Les différentes interactions  $LTFH$ , LB de la zone folliculaire et cellules dendritiques folliculaires FDC nécessaires pour l'initiation et l'établissement d'un centre germinatif sont également schématisées. Les flèches indiquent les étapes et le cheminement suivi par les LB entre zone claire et zone sombre du centre germinatif CG.
- 8 **Représentation schématique du mode d'action d'AID sur l'ADN et de la prise en charge des dommages lors de la SHM** Lors de la SHM, l'enzyme AID cible des hotspots au niveau des régions variables du locus IgH. Elle agit en désaminant une cytosine en uracile créant un mismatch qui peut être pris en charge par les trois voies représentées dans la figure. Soit il est ignoré par l'ADN polymérase qui le considère comme étant une thymidine, soit il est pris en charge par la voie BER ou la voie MMR aboutissant à l'apparition de mutations qui confèrent une plus grande affinité à l'Ig vis-à-vis de l'Ag.
- 9 **Représentation schématique du mécanisme de la CSR** Lors de la CSR, AID cible des séquences dites switch situées en amont des gènes constants induisant des DSBs. La prise en charge de ces cassures par les voies de réparation NHEJ ou AEJ aboutit, dans ce cas, au remplacement du gène  $C\mu$  par le gène  $C\gamma 1$ . Les gènes situés entre les régions switchs  $S\mu$  et  $S\gamma 1$  sont circularisés et éliminés.
- 10 **Représentation schématique du locus IgH et ses éléments cis-régulateurs** La ligne supérieure représente le locus IgH murin dans sa conformation germinale avec ses principaux éléments *cis*-régulateurs. Le promoteur DQ52, l'en-hancer  $E\mu$ , la 3'RR et la région en 3' sont représentés en rouge. Les promoteurs  $V_H$  sont représentés par des flèches noires et les promoteurs PI par des flèches rouges. Sur la deuxième ligne est détaillée la structure de l'en-hancer  $E\mu$  avec le core  $E\mu$  et les deux régions MAR (Matrix Attachment Region). La structure de la 3'RR est représentée sur la ligne inférieure avec la région palindromique constituée des enhancers hs1.2, hs3a et hs3b en rouge et les régions IR représentées par des flèches rouge clair. L'orientation des différents éléments est indiquée avec des flèches noires. À l'extérieur du palindrome on retrouve l'en-hancer hs4. Sur la même ligne on retrouve les éléments hs5, hs6 et hs7 composants la région en 3'.

## TABLE DES FIGURES

- 11 Transcription germinale des régions variables lors des recombinaisons VDJ** Les gènes des régions variables sont représentés par des rectangles bleu foncé pour les régions  $V_H$ , gris pour les segments D et bleu clair pour les segments  $J_H$ . Les flèches représentent les transcrits et leur sens. **A** : Les régions variables du locus IgH sont représentées dans leur conformation germinale. Des transcrits sens et antisens partent du promoteur DQ52 permettant ainsi l'accessibilité des segments D et  $J_H$ . **B** : Après les recombinaisons  $D - J_H$ , la transcription sens et antisens part du promoteur de segment D réarrangé. Les segments  $V_H$  sont transcrits à partir de leurs promoteurs respectifs représentés ici par des flèches noires.
- 12 Transcription germinale des régions constantes** Les gènes constants constituent des unités transcriptionnelles formées d'un promoteur inductible, pI, d'une séquence I, d'une région S et des exons C. Ici est représentée la transcription germinale du gène  $C\mu$ . Après épissage et polyadénylation, un transcript mature est obtenu. D'après Matthews et al., 2014.
- 13 Modèles murins de délétion de la région 3'RR** Représentation des différents modèles murins de délétions de la région 3'RR. La délétion d'un seul activateur transcriptionnel n'a pas d'effet, confirmant la répétition et la synergie d'activité entre les différents éléments de la 3'RR. La délétion de plusieurs activateurs perturbe fortement la CSR, la SHM et la synthèse d'Ig. La suppression du palindrome a un effet notable sur la SHM et la délétion complète de la 3'RR affecte considérablement les réarrangements secondaires et la synthèse d'Ig. Les blocs gris, violet et rouge représentent respectivement les enhancers hs3a et hs3b, hs1.2 et hs4. Les flèches grises représentent les IR du palindrôme 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 diminution du paramètre étudié. Adapté de Saintamant et al., 2017.
- 14 Origine cellulaire des lymphomes B** Les lymphomes B sont désignés d'après la contrepartie normale des cellules lymphomateuses. La majorité des lymphomes dérivent du centre germinatif ou de cellules ayant subi la réaction du centre germinatif, soulignant son rôle important dans la lymphomagenèse. Les flèches continues indiquent le cheminement des cellules lors des différentes étapes de maturations. Les flèches en pointillé désignent les lymphomes et leur cellule d'origine. D'après Küppers, 2005.
- 15 Caractéristiques acquises par les cellules lors de leur cancérisation.** La transformation maligne d'une cellule nécessite l'accumulation de plusieurs altérations géniques aboutissant à sa dérégulation. Ces mutations peuvent affecter différentes fonctions physiologiques de la cellule et conditionnent l'évolution de la tumeur.
- 16 Translocations récurrentes dans les lymphomes B** Le diagramme circulaire représente l'ensemble du génome humain. Les arcs relient les partenaires impliqués dans des réarrangements chromosomiques récurrents lors des pathologies malignes B. Les traits colorés indiquent les translocations concernant les gènes d'Ig. D'après Robbiani et Nussenzweig, 2014.

## TABLE DES FIGURES

- 17 Translocations récurrentes au sein du locus IgH liées aux mécanismes de diversification des Ig** Les différents remaniements géniques qui ont lieu sur le locus IgH au cours du développement B en font un « hotspot » de translocation. Selon le mécanisme impliqué, la translocation peut avoir lieu dans les régions variables ou constantes et impliquer différents oncogènes.
- 18 Structure du gène et de la protéine c-myc** A : La première ligne représente la structure du gène c-myc avec ses trois exons. Les promoteurs sont indiqués par des flèches noires. La seconde ligne représente le transcript mature d'après Ryan et Birnie, 1996. B : Représentation de la protéine c-myc avec ses trois domaines essentiels. Le premier, dans la partie N-terminale, contient les deux régions MBI et MBII (MYC Box). Le deuxième, central, contient MBIII et MBIV ainsi que le signal de localisation nucléaire (NLS). Le troisième, dans la partie C-terminale, contient une région basique et les deux séquences HLH « hélice-boucle-hélice » et LzI « leucine-zipper ».
- 19 Activité transcriptionnelle de Myc** A : La fixation de l'hétérodimère Myc/Max sur l'E-box (CACGTG) active la transcription du gène cible par la RNA polymérase II. B : La fixation du complexe MAD/MAX sur l'E-box réprime la transcription du gène cible par le recrutement de répresseurs transcriptionnels (Sin3, SAP et HDAC). D'après Adhikary et Eilers, 2005.
- 20 Représentation schématique des divers fonctions biologiques contrôlées par Myc** À droite sont représentés les phénomènes et mécanismes cellulaires contrôlés par c-myc en conditions physiologiques normales. Les fonctions contrôlées par c-myc au cours de la tumorigénèse sont représentées à gauche. D'après Vita et Henriksson, 2006.

# Table des matières

<b>I</b>	<b>Introduction au système immunitaire</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>Rappels bibliographiques</b>	<b>4</b>
<b>1</b>	<b>Lymphopoïèse B</b>	<b>5</b>
1.1	Phase précoce du développement B . . . . .	5
1.1.1	Les différents stades de la lymphopoïèse B précoce . . . . .	6
1.1.2	Les recombinaisons VDJ . . . . .	7
1.2	Phase tardive du développement B . . . . .	9
1.2.1	Le stade B transitionnel . . . . .	9
1.2.2	Les populations B matures . . . . .	9
1.2.3	Diversification secondaire du répertoire antigénique via la SHM et la CSR . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Les éléments <i>cis</i>-régulateurs et les remaniements géniques au locus IgH</b>	<b>15</b>
2.1	Les promoteurs . . . . .	15
2.1.1	Les promoteurs $V_H$ . . . . .	15
2.1.2	Le promoteur DQ52 . . . . .	16
2.1.3	Les promoteurs I . . . . .	16
2.2	L'activateur $E_{\mu}$ . . . . .	17
2.3	La région régulatrice en 3' (3'RR) . . . . .	18
2.3.1	Historique . . . . .	18
2.3.2	Structure et évolution de la 3'RR . . . . .	19
2.3.3	Activité de la 3'RR et sa régulation au cours du développement B	20
<b>3</b>	<b>Lymphomagenèse B</b>	<b>22</b>
3.1	Caractéristiques des cellules B malignes . . . . .	22
3.1.1	Lésions oncogéniques et origine des cellules des lymphomes B . .	22
3.1.2	BCR et activation antigénique des cellules B malignes . . . . .	24
3.1.3	Rôle du micro-environnement . . . . .	24
3.2	Translocations oncogéniques au locus IgH lors de la lymphopoïèse B . .	24
3.2.1	Translocations lors des réarrangements VDJ . . . . .	25

3.2.2 Translocations lors des réarrangements secondaires . . . . .	25
3.3 Translocations de c-myc au locus IgH et lymphomes B . . . . .	26
3.3.1 Le gène C-myc . . . . .	27
3.3.2 La protéine C-myc . . . . .	27
3.3.3 Régulation de l'expression et de l'activité de c-myc . . . . .	28
3.3.4 Le facteur de transcription c-myc : activation et répression transcriptionnelles . . . . .	28
3.3.5 Les fonctions biologiques contrôlées par c-myc . . . . .	29
<b>4 3'RR, c-myc et lymphomagenèse B</b>	<b>32</b>
4.1 Dérégulation de c-myc par la 3'RR . . . . .	32
4.2 Modèles murins de lymphomagnèse B . . . . .	32
<b>III Résultats</b>	<b>42</b>
<b>Article 1 : E<math>\mu</math> and 3'RR transcriptional enhancers of the IgH locus co-operate to promote c-myc-induced mature B-cell lymphomas</b>	<b>43</b>
<b>Article 2 : Deletion of the 3'RR cis-enhancer IgH element affects DNA repair junctions during B-cell class switch recombination</b>	<b>57</b>
<b>Article 3 : HDAC recruitment in the IgH locus 3' regulatory region is different between mature B-cells and mature B-cell lymphomas</b>	<b>61</b>
<b>Article 4 : Homozygous iMycC<math>\alpha</math> transgenic mice as a model of plasma B-cell lymphomas</b>	<b>91</b>
<b>IV Discussion et perspectives</b>	<b>116</b>
Les enhancers E $\mu$ et 3'RR coopèrent pour promouvoir la lymphomagenèse . . . . .	117
La 3'RR est impliquée dans le recrutement des voies de répartition lors de la CSR . . . . .	119
HDACs et activation de la 3'RR dans les B normaux et tumoraux . . . . .	120
Les souris Cmyc-C $\alpha$ homozygotes comme nouveau modèle de myélome . . . . .	122
<b>Conclusions et résumé</b>	<b>124</b>
<b>Appendices</b>	<b>154</b>
<b>A Class switch recombination junctions are not affected by the absence of the immunoglobulin heavy chain E<math>\mu</math> enhancer</b>	<b>155</b>
<b>B Molecular analysis of <math>\gamma 1, \gamma 3</math>, and <math>\alpha</math> class switch recombination junctions in APOBEC3-deficient mice using high-throughput sequencing</b>	<b>159</b>



## Première partie

### Introduction au système immunitaire



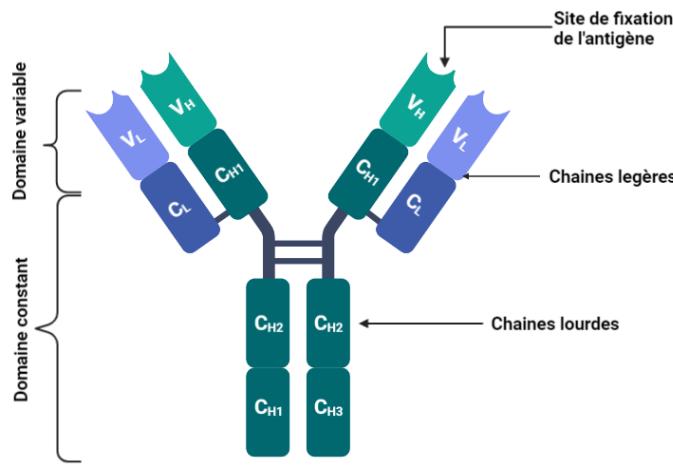
Le système immunitaire est constitué d'un ensemble de tissus et d'organes dont la fonction est de protéger l'organisme contre les diverses agressions externes (agents infectieux) et internes (transformations tumorales). À cet effet, deux types de réponse immunitaire peuvent se mettre en place : les immunités innées et adaptatives. L'immunité dite innée constitue la première barrière défensive. C'est une réponse rapide et constitutive qui repose sur une capacité à distinguer les éléments du soi et du non soi. Ce système fait intervenir, entre autres, des éléments tels que le complément, les macrophages et les cellules tueuses NK. L'immunité acquise ou adaptative, propre aux vertébrés, repose quant à elle sur une reconnaissance spécifique de l'antigène (Ag). La réponse immunitaire adaptative peut être soit à médiation cellulaire impliquant la toxicité des lymphocytes T, soit à médiation humorale dont le support est le lymphocyte B (LB) producteur de molécules effectrices appelées immunoglobulines (Ig). Les Ig se lient spécifiquement aux Ag du corps étranger afin de le neutraliser. Dans ce travail je décrirai uniquement le système immunitaire chez la souris.

Les Ig sont des hétérodimères protéiques, pouvant se présenter sous forme membranaire à la surface des LB ou sous forme sécrétée circulante. Leur poids moléculaire est d'environ 150 KD et elles sont constituées de deux chaines lourdes H (pour heavy chain) et deux chaines légères L (pour light chain) qui relient des ponts disulfures. **Figure 1** Il existe deux types de chaines L : les chaines  $\kappa$  et  $\lambda$ . On distingue également cinq différentes classes de chaines H, ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  et  $\alpha$ ) qui correspondent respectivement aux IgM, IgD, IgG (subdivisées chez la souris en 4 sous classes qui sont IgG1, IgG2a IgG2b et IgG3), IgE et IgA. Chaque type de chaîne possède un domaine variable ( $V_L$  ou  $V_H$ ) chargé de la reconnaissance et de la liaison à l'Ag et un domaine constant ( $C_L$  ou  $C_H$ ) déterminant les fonctions effectrices de l'Ig.

Les gènes codants pour les Ig sont répartis sur trois loci différents dotés d'une structure morcelée dans leur conformation germinale. **Figure 2** Le domaine variable est codé par les segments de variabilité "V", les segments de jonctions "J" (uniquement pour les chaines H) et les segments de diversité "D". Les segments "C" codent pour le domaine constant.

Les chaines L sont codées par les loci  $Ig\kappa$  et  $Ig\lambda$ .

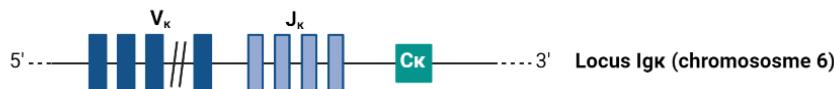
Le locus  $Ig\kappa$  est situé sur le chromosome 6 chez la souris. Il est composé de 161 segments V dont une centaine est fonctionnelles et cinq segments J. Le locus  $Ig\lambda$  est, quant à lui,



**Figure 1: Structure des Immunoglobulines (Ig)**

Représentation d'une IgG1 de souris. Les chaînes lourdes sont représentées en vert, les chaînes légères en bleu. Les ponts disulfures sont en gris. Les régions variables des chaînes lourdes et légères sont notées  $V_H$  et  $V_L$ . Les régions constantes des chaînes lourdes et légères sont notées  $C_H$  et  $C_L$ .

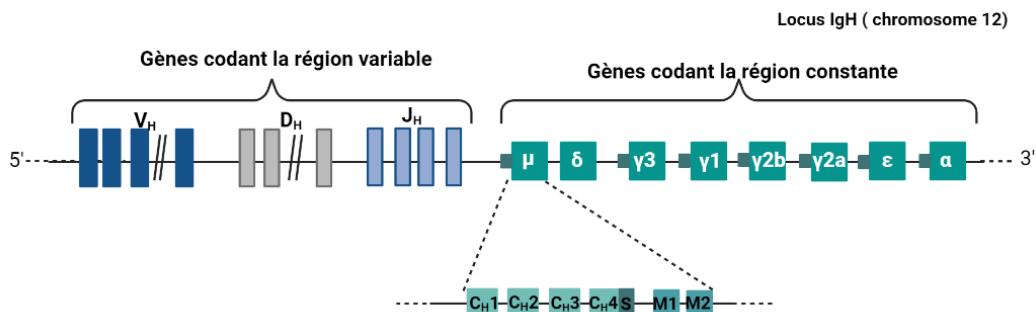
**A**



**B**



**C**



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

**A** : Représentation schématique du locus  $Ig\kappa$ . **B** : Représentation schématique du locus  $Ig\lambda$ . **C** : Représentation schématique du locus  $IgH$  et représentation détaillée des exons du gène  $C\mu$ . Les segments  $V$  sont représentés en bleu foncé, les segments  $D$  en gris, les segments  $J$  en bleu clair et les gènes constants par des rectangles verts.

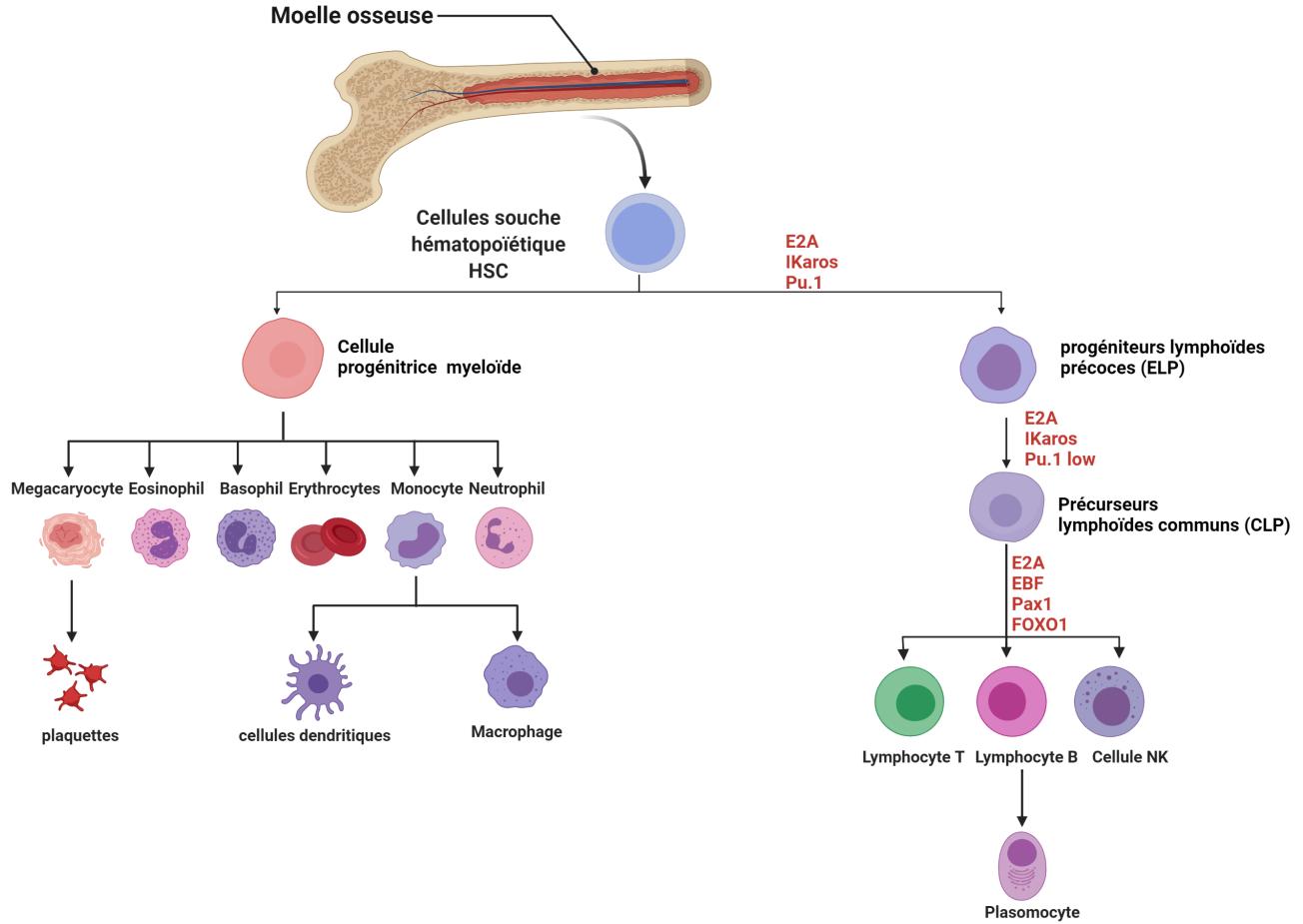
situé sur le chromosome 16 chez la souris. Il comporte seulement trois segments V, cinq segments J et quatre segments C dont deux à trois sont fonctionnels. Ig $\kappa$  est organisé en deux sub-loci qui se présentent comme suit de 5' à 3' :  $V_{\lambda_2}V_{\lambda_3} - J_{\lambda_2}C\lambda_2$  puis  $V_{\lambda_1} - J_{\lambda_3}C\lambda_3 - J_{\lambda_1}C\lambda_1$ .

Le locus IgH murin codant pour les chaines H des Ig est situé sur le chromosome 12. C'est un locus qui s'étend sur 2300 kb environ et s'organise en deux parties : une partie codant pour le domaine variable, organisée de 5' à 3' en 152 gènes V dont 97 fonctionnels répartis en 15 familles, suivis de 17 à 20 segments D regroupés en quatre familles (DFL16, DSP2, DST4, DQ52) et enfin quatre segments J. La deuxième partie du locus est constituée de huit gènes codants pour les différentes classes des régions C, de 5' à 3' :  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_{2b}$ ,  $\gamma_{2a}$ ,  $\epsilon$  et  $\alpha$ . Les gènes C comportent les exons  $C_H1$ ,  $C_H2$ ,  $C_H3$  et  $C_H4$ , codant les parties structurales de l'Ig. Afin de produire une Ig fonctionnelle, ces loci doivent subir une succession de remaniements géniques nécessaires pour la maturation et le développement du lymphocyte B. Ces événements sont hautement régulés par un certain nombre d'éléments *cis* régulateurs.

Dans ce travail nous nous intéresserons principalement au locus IgH murin pouvant être le siège de translocations oncogéniques facilitées par sa grande instabilité génomique. Les oncogènes transloqués sont ensuite dérégulés et surexprimés sous le contrôle de ses activateurs transcriptionnels ce qui favorise l'émergence de lymphomes.

# Deuxième partie

## Rappels bibliographiques



**Figure 3: Origine de la lignée lymphocytaire B**

La lignée lymphocytaire B est issue de cellules souches multipotentes (HSC), une ascendance qu'elle partage avec toutes les autres lignées sanguines. Sous l'influence de facteurs de transcription, ces cellules s'engagent progressivement dans les lignées lymphocytaires. Le CLP est un précurseur commun aux lymphocytes T et B et aux cellules NK issues des HSC, qui par la suite donne le premier stade du développement précoce B : la cellule prépro B qui poursuit sa maturation jusqu'à atteindre le dernier stade de plasmocyte.

# Chapitre 1

## Lymphopoïèse B

Les LB sont le support de la réponse immunitaire humorale. Durant leur développement, ils circulent dans plusieurs organes où ils rencontrent différents microenvironnements qui les font s'engager dans des voies de prolifération et/ou de différenciation sous l'effet de certains facteurs, ce qui est déterminant pour leur devenir.(Wilson & Trumpp 2006, Nagasawa 2006)

La lymphopoïèse B passe par deux principaux stades de développement : un stade précoce qui se déroule dans les organes lymphoïdes centraux (foie foetal et moelle osseuse), et un stade tardif, antigène dépendant, qui se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires. **Figure 3**

### 1.1 Phase précoce du développement B

La lignée lymphocytaire est issue d'une population de cellules souches dite cellule souche hématopoïétique HSC (hematopoetic stem cell). Elle partage cette ascendance avec toutes les autres lignées sanguines (Hardy et al. 2007).

L'ontogenèse B s'initie dans le foie foetal à partir du jour 12,5 du développement embryonnaire et se poursuit dans la moelle osseuse à partir du jour 13,5. À ce stade les HSC subissent plusieurs différenciations qui les engagent progressivement dans les différentes lignées myéloïdes et lymphoïdes (Tsuneto et al. 2014).

Les HSC se différencient d'abord en progéniteurs lymphoïdes précoces ELP (pour Early Lymphoid Progenitor) qui donnent sous l'effet d'un jeu de facteurs de transcription (E2A, Ikaros et PU1) une population de précurseurs lymphoïdes communs CLP (pour

Common Lymphoid progenitor) précurseur des lignées B, T et NK (Ramírez et al. 2010, Miyazaki et al. 2014).

Les facteurs E2A, EBF1, PAX5 et FOXO1 favorisent l'engagement vers la lignée B au détriment des lignées T et NK. Enfin, l'expression de Pax5 induit l'expression du récepteur CD45 (B220) et l'engagement définitif dans la lignée B (Zhang et al. 2013, Welinder et al. 2011).

### 1.1.1 Les différents stades de la lymphopoïèse B précoce

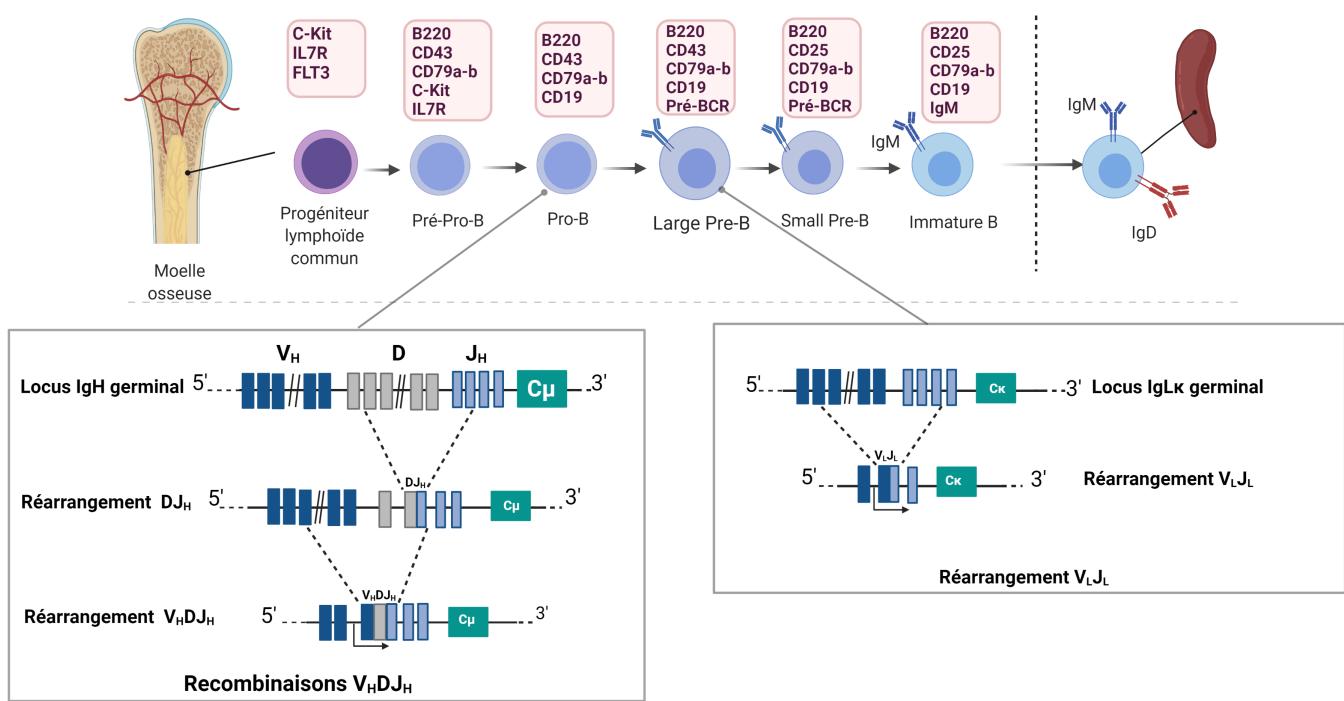
Avant de quitter la moelle osseuse et rejoindre les organes lymphoïdes secondaires, les LB passent par plusieurs stades de développement précoces durant lesquels ils acquièrent un BCR (B Cell Receptor) naïf fonctionnel. **Figure 4** Ces stades sont caractérisés par l'expression de différents facteurs de transcription et de marqueurs de surface. Ils sont également ponctués par plusieurs réarrangements des régions V des loci IgH et IgL (Hardy et al. 2007, Meffre et al. 2000).

Le stade Pré-Pro-B est le plus précoce du développement B. Les cellules expriment déjà le B220 mais aussi les protéines CD79a et CD79b (Osmond Denis G 1998, Hardy et al. 2007). Les facteurs Pax5 et EBF1 continuent à être exprimés durant ce stade, ce qui permet aux cellules B d'acquérir le marqueur CD19 et de passer au stade Pro-B (Hardy et al. 2007). À ce stade sont initiées les recombinaisons VDJ (dont je détaillerai le mécanisme un peu plus loin).

Dans un premier temps, des recombinaisons dites ordonnées ont lieu sur le locus IgH, ce qui permettra l'expression d'une chaîne H d'Ig. Ces recombinaisons sont aussi séquentielles. La première étape consiste en l'association aléatoire d'un segment D et d'un segment  $J_H$  et ce simultanément sur les deux allèles. Il est suivi par un réarrangement  $V_H\text{-}D\text{-}J_H$  par association aléatoire d'un segment  $V_H$  au segment D- $J_H$  précédemment formé (Alt et al. 1984, Jung et al. 2006). Ce dernier réarrangement n'a lieu que sur un allèle. S'il aboutit à un segment  $V_H\text{-}D\text{-}J_H$  non fonctionnel, alors une autre recombinaison a lieu sur le second allèle. Dans ce dernier cas, soit il aboutit à une combinaison non-productive et la cellule rentre alors en apoptose ou en anergie, soit elle est productive et la cellule exprimera une chaîne H (Daly et al. 2007).

En association avec une pseudo chaîne L, cette chaîne H permet l'expression d'un pré-BCR à la surface de la cellule B et le passage au stade pre-B (Kudo & Melchers 1987,

**Phase précoce de maturation B indépendante de l'Ag: Création du répertoire antigénique**



**Figure 4: Représentation schématique du développement B précoce**

Les différents stades de l'ontogenèse B précoce sont représentés ainsi que les marqueurs de surface les caractérisant. Les réarrangements des gènes d'Ig qui ont lieu à ces différents stades sont représentés dans les cadres.

Mårtensson et al. 2002).

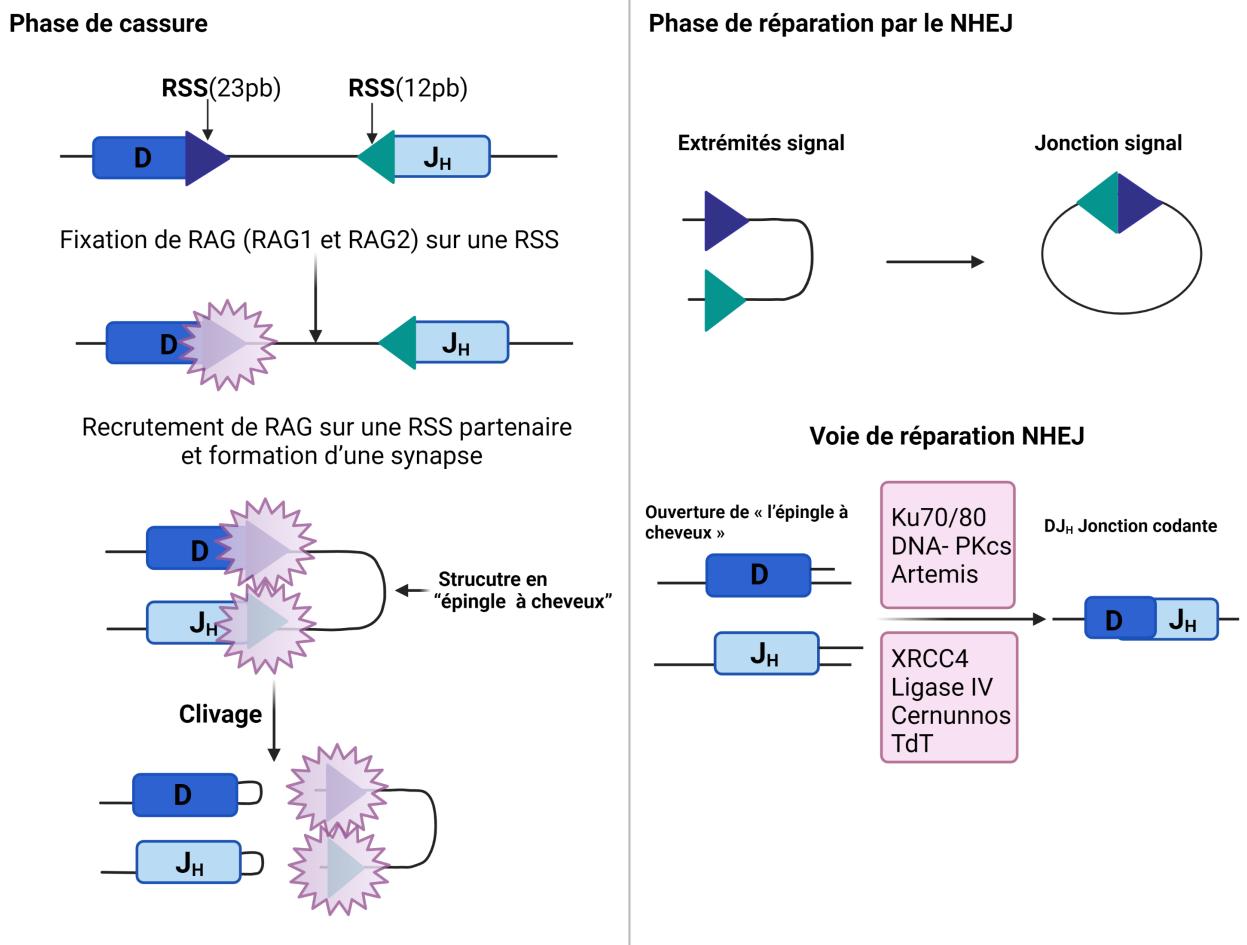
Au stade pré-B on peut distinguer deux sous populations : les grandes cellules pré-B (large pre-B) exprimant le marqueur CD43 mais pas le CD25, et les petites cellules pré-B (Small pre-B) qui n'expriment plus le CD43 mais le CD25. Ces dernières sont issues d'un certain nombre de cycles de divisions des larges pré-B. Ce n'est qu'à ce stade que seront initiées les recombinaisons sur les régions V des loci des chaînes L (Rolink et al. 2000, Clark et al. 2014). De façon ordonnée là aussi, un premier réarrangement a lieu sur le locus  $Ig\kappa$  puis sur le locus  $Ig\lambda$  (Engel et al. 1999). Un mécanisme d'exclusion allélique permet l'arrêt des recombinaisons sur l'autre allèle si un segment fonctionnel est formé sur le premier allèle (Mostoslavsky et al. 2004, Jung et al. 2006). L'exon  $V_L J_L$  fonctionnel permet la production d'une chaîne L, qui en s'associant à la chaîne H, forme une IgM de membrane. Un BCR est alors formé de l'association de cette IgM avec les protéines CD79a et CD79b ce qui permet le passage au dernier stade du développement précoce : le stade B immature.

Les cellules B immatures exprimant un BCR naïf doivent passer par un checkpoint qui grâce à un mécanisme de sélection négative permet l'élimination par apoptose ou anergie des cellules B présentant un BCR autoréactif (Pike et al. 1982, Russell et al. 1991). Ces cellules ont une dernière chance de passer la sélection en procédant à l'édition du BCR. De nouvelles recombinaisons peuvent alors être effectuées notamment sur les loci des chaînes L (Halverson et al. 2004). Si ces cellules parviennent à modifier leur BCR de telle sorte qu'il ne soit plus autoréactif, alors elles peuvent poursuivre leur développement. Les cellules ayant passées le point de contrôle avec succès rejoignent la circulation pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires et y subissent la deuxième phase de leur développement.

### 1.1.2 Les recombinaisons VDJ

Les réarrangements VDJ se déroulent en deux étapes. **Figure 5**

La première consiste en l'induction de cassures doubles brins (DSBs pour Double Strand Breaks) par l'endonucléase RAG (Recombination-Activating-Gene) constituée de deux sous-unités RAG1 et RAG2 (Mombaerts et al. 1992, Shinkai et al. 1992). L'induction de ces DSBs est initiée par la reconnaissance et la fixation du complexe RAG aux séquences signals appelées RSS (Recombination Sequence Signal) qui encadrent



**Figure 5: Représentation schématique du mécanisme des recombinaisons V(D)J**

Les recombinaisons V(D)J se déroulent en deux étapes : une phase d'induction de cassures doubles brins et une phase de réparation. Le complexe RAG-1 RAG-2 se fixe au niveau de chaque RSS. Un second complexe est recruté ensuite sur une RSS partenaire de taille différente pour former une « synapse ». Des cassures doubles brins sont alors induites par l'enzyme RAG. Elles sont détectées et prises en charge par le système de réparation NHEJ. Les extrémités franches formées par les RSS sont raboutées et forment des jonctions signals qui seront éliminées. Les extrémités en épingle à cheveux sont réparées par les protéines de la voie NHEJ et forment les segments codants. (Extrait de Schatz and Ji, 2011)

les différents segments. Elles sont constituées d'une séquence heptamérique et d'une séquence nonamérique séparées par des séquences de 12 ou 23 paires de bases appelées "spacers". Les recombinaisons ne sont possibles qu'entre des RSS possédant des spacers de tailles différentes ce qui prévient l'apparition d'appariements  $V_H J_H$ . Le complexe RAG se fixe dans un premier temps sur une première RSS puis sur une RSS partenaire, ce qui permet la formation d'une synapse et induit une première cassure simple brin et la libération d'un groupement 3'hydroxyle qui attaque le second brin et induit une DSB. Deux types d'extrémités sont générées : une structure en épingle à cheveux aux extrémités des segments codants et des extrémités franches au niveau des RSS (Jones & Gellert 2002, Mundy et al. 2002, Schatz & Spanopoulou 2005).

La deuxième phase de ces réarrangements implique la détection et la réparation rapide des cassures d'ADN qui constitue un évènement dangereux qui doit être pris en charge rapidement afin d'éviter la survenue de translocation oncogénique (Brandt & Roth 2009). Afin de limiter ce risque, le complexe RAG reste fixé aux extrémités générées par les cassures (McBlane et al. 1995). Puis ces dernières sont détectées et stabilisées par la voie de réponse aux dommages à l'ADN DDR (pour DSB Dependent Response). C'est la voie de réparation NHEJ (pour non homologous end Joining) qui prend en charge les cassures. Les extrémités franches des RSS sont liées par jonction directe formant des jonctions signals qui seront éliminées par la cellule. Les extrémités en épingle à cheveux, quant à elles, subissent des modifications. Des insertions de nucléotides ont lieu sur le brin le plus court et des nucléotides homologues sont insérés sur le brin complémentaire, donnant naissance à de courtes séquences palindromiques appelées nucléotides P (pour Palindromique nucleotide). D'autres nucléotides sont ajoutés aux extrémités des segments codants par l'enzyme TdT (Terminal deoxynucleotidyltransferase) ce qui contribue à augmenter la diversité du répertoire antigénique de cellules B. Cette diversité dite combinatoire vient s'ajouter à une diversité germinale assurée par les séquences codants les CDR1 et CDR2 situées dans les segments  $V_H$  et la diversité dite somatique assurée par la séquence codant le CDR3 localisé entre les segments  $V_H D J_H$  (Jung et al. 2006, Sakano et al. 1981, Alt & Baltimore 1982, Desiderio et al. 1984, Schatz & Spanopoulou 2005).

## 1.2 Phase tardive du développement B

### 1.2.1 Le stade B transitionnel

C'est dans les organes lymphoïdes secondaires dont la rate, les ganglions lymphatiques et les MALT (Mucosae Associated Lymphoid Tissue) que va se poursuivre et s'achever la maturation des LB. Cette dernière phase du développement sera dépendante de l'Ag. Très peu de B immatures parviennent à quitter la moelle osseuse et rejoindre la circulation et environ 40% de ces B sont auto réactifs (Wardemann et al. 2003). Ils passent alors par un nouveau checkpoint durant le stade transitionnel. Trois populations sont à distinguer à ce stade du développement, les T1, T2 et les T3, qui sont caractérisées par des marqueurs spécifiques.

**Les lymphocytes T1** sont CD93<sup>+</sup>, IgM<sup>high</sup>, IgD<sup>low</sup>, CD21<sup>low</sup> et CD23<sup>-</sup>. Ils subissent une sélection négative. Les T1 autoréactifs sont éliminés par apoptose. Ce point de contrôle implique la protéine kinase C $\delta$  (PKC $\delta$ ) et induit la voie pré-apoptotique Ca $^{2+}$ -ERK (Limnander et al. 2014). Les cellules ayant passées ce dernier checkpoint avec succès migrent vers les follicules pour se différencier en lymphocytes B T2.

**Les lymphocytes T2** sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD93<sup>+</sup>, IgM<sup>high</sup>, IgD<sup>high</sup>, CD21<sup>low</sup> et CD23<sup>high</sup>. À ce stade le LB co-exprime une IgD grâce un à mécanisme d'épissage alternatif d'un long transcript des régions constantes C $\mu$  et C $\delta$  (Enders et al. 2014, Maki et al. 1981). Contrairement aux T1, la fixation d'un antigène au BCR des T2 induit plutôt la prolifération et un effet anti-apoptotique. Le devenir des LB est déterminé par la signalisation du BCR et son intensité. Cela détermine la répartition des différentes populations matures (Allman et al. 2004, Chung et al. 2003).

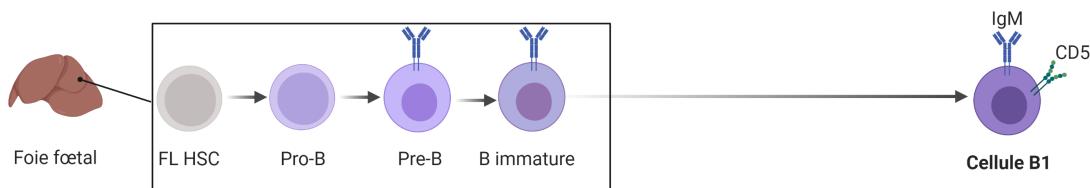
**La population T3** n'est, quant à elle, pas très bien définie. Elle regrouperait des cellules anergiques ou autoréactives exprimant les marqueurs IgM<sup>low</sup>, IgD<sup>high</sup>, CD23<sup>+</sup> (Chung et al. 2003, Allman et al. 2001).

### 1.2.2 Les populations B matures

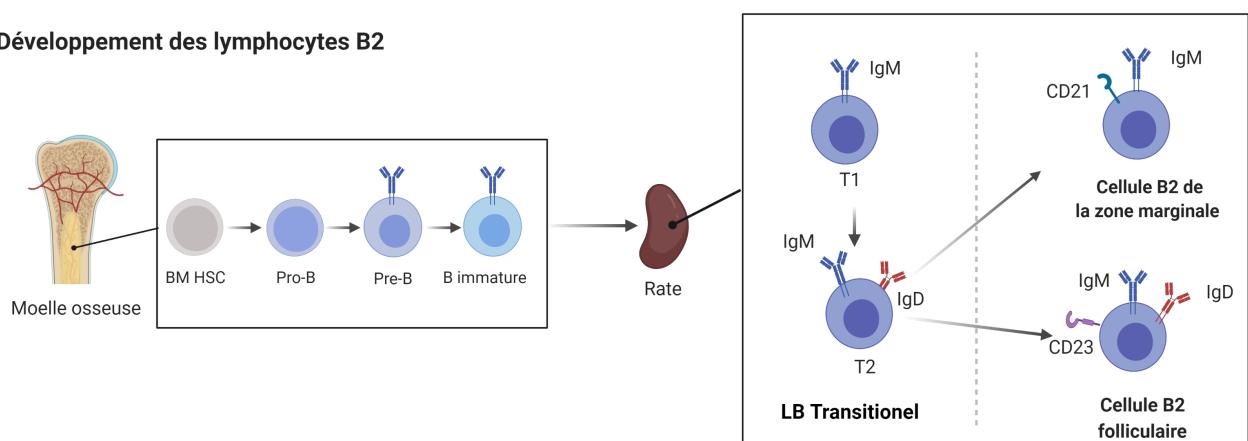
On distingue deux principales populations de cellules B matures qui diffèrent de par leur origine, localisation, rôles, leur mode d'activation et phénotype. Ce sont les lymphocytes B1 et B2 (Sagaert & De Wolf-Peeters 2003, Pillai & Cariappa 2009). **Figure 6**

La population B1 ne représente que 5% des B totaux. Les LB1 ont une origine différente

### Développement des lymphocytes B1



### Développement des lymphocytes B2



**Figure 6: Représentation des différentes populations B matures et leur origine**

Représentation de l'origine des deux principales populations B matures : les LB1 et les LB2 ainsi que les sous populations B2 MZ et FO.

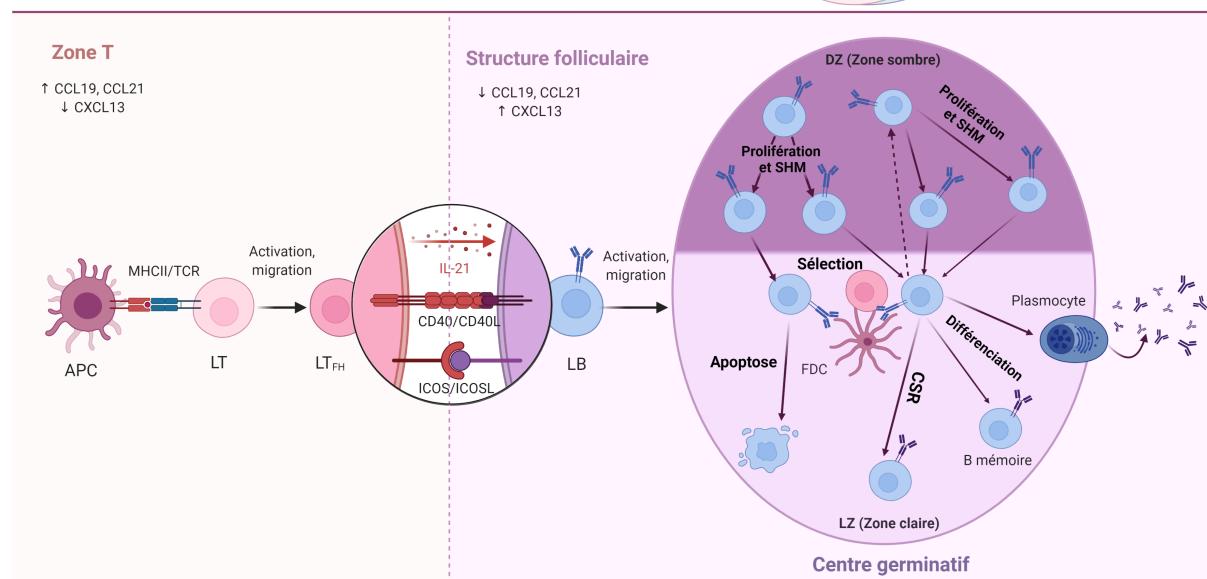
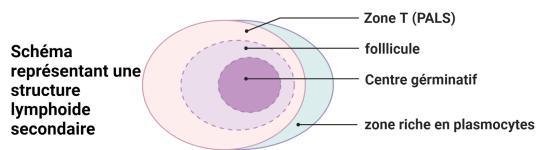
des LB2 et se développent très tôt dans le foie fœtale. Ils sont principalement localisés dans la cavité péritonéale et pleurale où ils représentent environ 50% des LB (Kantor & Herzenberg 1993, Kroese et al. 1992). Les B1 expriment à leur surface CD19<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>, IgM<sup>high</sup>, IgD<sup>low</sup> et CD11b<sup>+</sup>. On distingue deux sous populations de LB1 : les B1a CD5<sup>+</sup> et les B1b CD5<sup>-</sup>. De par leur BCR peu diversifié et une réponse T indépendante, les B1 produisent principalement des IgM polyréactives à faible affinité à l'Ag procurant ainsi à l'organisme une réponse défensive rapide se rapprochant davantage de l'immunité innée (Aziz et al. 2015, Baumgarth 2011, Ehrenstein & Notley 2010, Holodick & Rothstein 2015, Tung & Herzenberg 2007, Hardy et al. 1989).

**Les lymphocytes B2 :** On distingue les lymphocytes B de la zone marginale (MZ) et les B de la zone folliculaire (FO).

**Les lymphocytes B MZ :** Ces cellules engendrées suite à une faible signalisation du BCR des T2 sont localisées dans la MZ entre la pulpe blanche et la pulpe rouge de la rate (Cariappa et al. 2001, Zouali & Richard 2011, Weill et al. 2009). Sur le plan phénotypique les B MZ sont IgM<sup>high</sup>, IgD<sup>low</sup>, CD21<sup>high</sup>, CD1d<sup>+</sup> et CD23<sup>low</sup>. Leur principale fonction consiste à produire un grand nombre d'Ig afin de neutraliser les pathogènes apportés par le flux sanguin induit par les sinus marginaux (Cerutti et al. 2013, Mebius & Kraal 2005). Ces cellules, qui partagent des similitudes avec les LB1, présentent un BCR peu diversifié et non muté et produisent principalement des IgM polyréactives (Martin et al. 2001). Suite à une activation T-indépendante, les cellules MZ sont capables de se différencier en plasmocytes à courte durée de vie. Il a été démontré que ces dernières pouvaient également, en contact avec certaines protéines membranaires ou lipides bactériens, induire une activation T-dépendante, une différenciation en plasmocytes à longue durée de vie et une production d'Ig de classes G ou A (Cerutti 2010, Pone et al. 2012).

**Les lymphocytes B FO et réaction du centre germinatif :** Ces lymphocytes générés suite à un plus fort signal du BCR représentent la majorité des B de la rate. Ils sont principalement localisés, comme leur nom l'indique, dans les follicules des ganglions et de la rate. Ces structures folliculaires riches en cellules dendritiques, les FDC (pour Follicular dendritic Cell), sont encadrées par des PALS (Periarteriolar Lymphoid sheath) riches en lymphocytes T<sub>FH</sub> (pour follicular helper CD4<sup>+</sup>) aussi appelé zone T (Allman & Pillai 2008, Cariappa et al. 2001). Ils expriment à leur surface en plus du B220 (plus faiblement que les MZ) des IgM et d'IgD. Ils expriment fortement CD23

## Initiation d'un centre germinatif au sein d'une structure folliculaire lymphoïde



**Figure 7: Représentation schématique de l'initiation d'un centre germinatif au sein d'une structure lymphoïde secondaire**

Représentation schématique d'une structure lymphoïde secondaire, et des interactions entre cellules présentatrices de l'Ag et les lymphocytes T helper au niveau de la zone T. Les différentes interactions  $LT_{FH}$ , LB de la zone folliculaire et cellules dendritiques folliculaires FDC nécessaires pour l'initiation et l'établissement d'un centre germinatif sont également schématisées. Les flèches indiquent les étapes et le cheminement suivi par les LB entre zone claire et zone sombre du centre germinatif CG

et faiblement CD21. Les lymphocytes B FO s'activent de façon T-dépendante et impliquent la création d'un centre germinatif (GC). La collaboration entre LB FO, LT CD4<sup>+</sup> et les FDC permet la mise en place du GC (MacLennan 1994). **Figure 7** Lorsque les LB FO rentrent en contact avec un Ag, ils se dirigent vers la zone interfolliculaire où ils interagissent avec de LT<sub>FH</sub> activées par le même Ag présenté par les FDC. Ceci va induire la création d'un GC (Okada & Cyster 2006, Qi et al. 2008, Batista & Harwood 2009, Good-Jacobson & Tarlinton 2012). Les recombinaisons VDJ et les premiers stades du développement B leur confèrent une importante diversité d'Ig leur permettant de reconnaître un large éventail d'Ag. Toutefois une meilleure efficacité et une plus grande spécificité à l'Ag est requise pour une réponse immunitaire optimale. C'est là qu'interviennent les mécanismes d'hypermutations somatiques (SHM pour Somatic Hypermutations) et de commutation de classe (CSR pour Class Switch Recombination) (que je détaillerai un peu plus loin) qui vont permettre, respectivement, de générer des mutations dans les domaines variables d'Ig et de changer l'isotype de l'Ig induite (Victora & Nussenzweig 2012). C'est au sein du GC que prolifèrent les LB activés et subissent ces réarrangements secondaires suivis par une sélection des clones les plus affins. La prolifération des B a lieu dans une zone du GC appelé zone claire LZ (pour Light Zone). Les LB de cette zone sont appelés centroblastes séparés physiquement des centrocytes de la zone sombre DZ (Dark Zone) (Allen et al. 2004). Les LB réalisent alors des cycles d'allers-retours entre ces deux zones afin de sélectionner les clones présentant la meilleure affinité à l'Ag. Ces derniers pourront se différencier en plasmocytes sécréteurs d'Ig ou en LB mémoire tandis que les clones moins affins ou autoréactifs sont éliminés par apoptose ou rentrent en anergie (MacLennan 1994, Victora & Nussenzweig 2012).

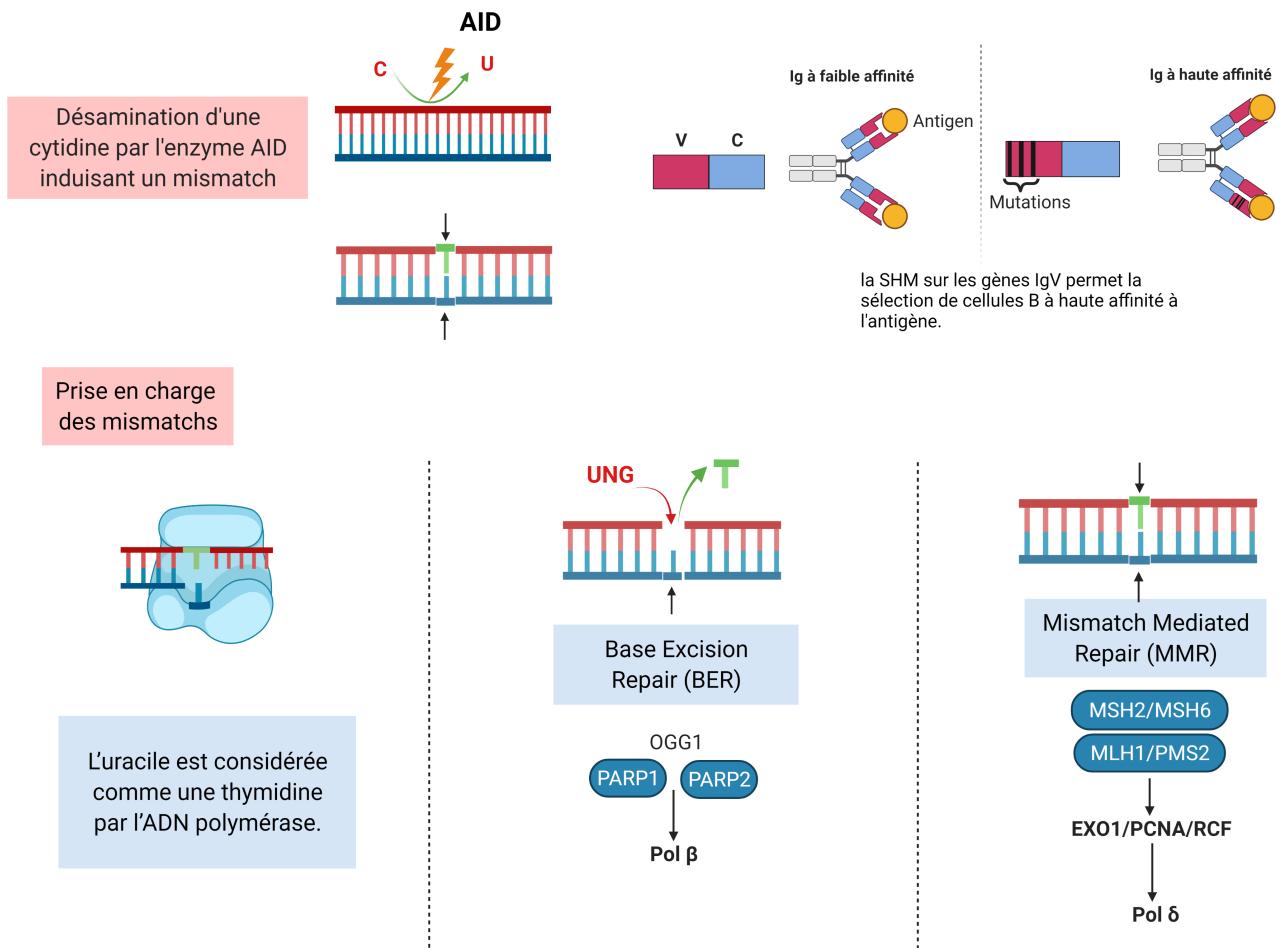
**Les plasmocytes** constituent le stade ultime du développement B. Ces cellules, qui ont perdu leur capacité à se diviser, produisent en grande quantité des Ig. Elles sont CD138<sup>+</sup> et on en distingue deux types : les plasmocytes à courte durée de vie issus des populations B1 et LB MZ (dont l'activation est T-indépendante et produisant principalement des IgM) et les plasmocytes à longue durée de vie issus de LB FO activés de façon T-dépendante. Ces derniers sont capables de produire des Ig de différentes classes et migrent dans la moelle osseuse où une sous-population est capable de continuer à sécréter des Ig à haute affinité encore longtemps (Gunn & Brewer 2006). Il existe une dernière population de B mature : les LB mémoires.

**Les LB mémoires** sont des cellules quiescentes qui ont déjà rencontré l'Ag. On en distingue plusieurs sous-populations dont l'origine peut être différente. Les B mémoires issus d'une réponse T-dépendante et donc du GC sont B220<sup>+</sup> et CD38<sup>+</sup>. Ils expriment une Ig de surface de classe différente de l'IgM, souvent une IgG. Ce sont ces derniers qui vont assurer une réponse rapide et efficace lors d'une rencontre ultérieure de l'Ag et sur lesquels repose le principe de la vaccination. En revanche les B mémoires originaires d'une réponse T-indépendante de cellules B1, expriment fortement à leur surface les marqueurs IgM et CD19 et plus faiblement B220 et IgD (Good-Jacobson & Tarlinton 2012). Ils ne sont pas capables d'induire une réponse secondaire forte et efficace mais permettent d'accroître le nombre de clones B1 spécifiques en réponse à l'Ag (Kurosaki et al. 2015).

### 1.2.3 Diversification secondaire du répertoire antigénique via la SHM et la CSR

Deux principaux mécanismes de remaniement des gènes du locus IgH contribuent à l'élaboration du répertoire antigénique secondaire des Ig et à augmenter leur efficacité en leur conférant des fonctions effectrices adaptées aux types d'Ag rencontrés. Il s'agit de la SHM et de la CSR impliquant des altérations géniques au locus IgH faisant intervenir un acteur majeur : l'enzyme AID (pour Activated Induced Deaminase) (Muramatsu et al. 1999, 2000)

**AID** est une cytidine deasaminase qui fait partie de la famille des APOBEC (Apolipoprotein B RNA-Editing Catalytic Component) (Muramatsu et al. 1999). Cette protéine de 26 KDa est codée par le gène *aicda*. Elle est principalement exprimée dans le GC où ont lieu les événements de SHM et de CSR. Elle agit dans le noyau en désaminant une cytidine en uracil (Rebhandl et al. 2015, Ito et al. 2004). Lors de la SHM ou de la CSR, AID cible préférentiellement des points chauds ou hotspots au locus IgH. Consistant en un motif particulier WRCY ( $W = dA/dT$ ;  $R = dA/dG$ ;  $Y = dT/dC/dA$ ) (Hwang et al. 2015). Une action "off-target" d'AID existe, ce qui la rend dangereuse et exige une haute régulation. Cette dernière est assurée, entre autre, par une répression du gène *Aicda* par une hyperméthylation de son promoteur dans les B resting, par la phosphorylation d'AID par les protéines kinases A et C (PKA et PKC) (Storb 2014) mais aussi par son élimination rapide par le proteasome. L'enzyme agit sur un simple brin d'ADN en désaminant une cytosine en uracil induisant ainsi un mésappariement



**Figure 8: Représentation schématique du mode d'action d'AID sur l'ADN et de la prise en charge des dommages lors de la SHM**

Lors de la SHM, l'enzyme AID cible des hotspots au niveau des régions variables du locus IgH. Elle agit en désaminant une cytosine en uracile créant un mismatch qui peut être pris en charge par les trois voies représentées dans la figure. Soit il est ignoré par l'ADN polymérase qui le considère comme étant une thymidine, soit il est pris en charge par la voie BER ou la voie MMR aboutissant à l'apparition de mutations qui confèrent une plus grande affinité à l'Ig vis-à-vis de l'Ag.

dU :dG (Chaudhuri et al. 2003, 2004, Dickerson et al. 2003, Pham et al. 2003) qui est pris en charge par un système de réparation de l'ADN BER (Base Excision Repair) ou MMR (Mismatch Repair) induisant, selon la situation, des mutations (SHM) ou des cassures doubles brins (CSR).

### La SHM

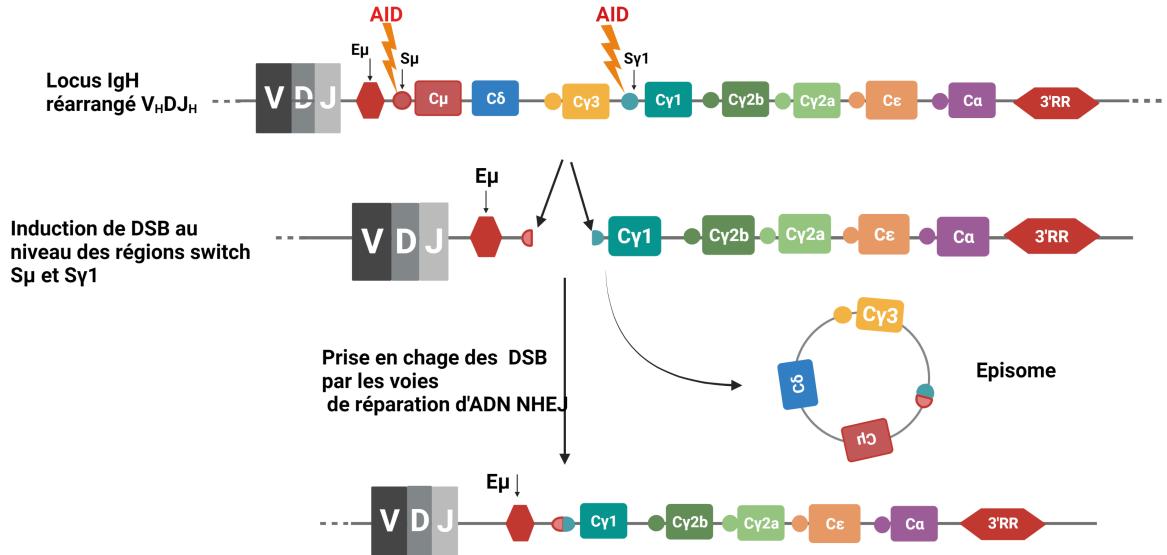
La SHM induit des mutations à haute fréquence (environ 10 mutations toutes les 100 bases) principalement dans les régions CDRs afin d'augmenter l'affinité de l'Ig à l'Ag (Seki et al. 2005). Ces mutations sont induites suite à la réparation des mésappariements causés par AID. Les voies de réparation impliquées dans ce processus doivent être infidèles afin d'engendrer de nombreuses mutations. On en distingue trois différentes (Peled et al. 2008). L'uracile générée par AID peut simplement être ignorée par l'ADN polymérase lors de la réPLICATION ce qui a comme conséquence l'apparition d'une mutation de type transition. La voie dite BER peut également prendre en charge le mésappariement. Dans ce cas la base U est excisée par UNG (Uracil DNA-Glycosylase) générant un site abasique qui est remplacé par une autre base au hasard par une polymérase infidèle aboutissant ainsi à une transition ou une inversion (Pérez-Durán et al. 2012). La dernière voie de réparation pouvant intervenir est la voie MMR. Elle permet l'insertion de multiples mutations et agit en plusieurs étapes. La première consiste en la reconnaissance des mésappariements par l'hétérodimère Msh2/Msh6 (pour Mus Homologue 2 et 6) qui recrute un complexe Mlh1/Pms2 (pour Mut Homologue 1 et Post meiotic ségrégation 2). Le fragment d'ADN entourant le mésappariement est ensuite éliminé suite au recrutement de l'exonucléase I (Exo1). Enfin une polymérase infidèle se charge de produire un nouveau brin d'ADN (Hwang et al. 2015, Rada et al. 1998).

### Figure 8

### La CSR

En fonction des stimulations que le LB perçoit de son microenvironnement, il peut opérer un switch vers une classe d'Ig particulière. Ce mécanisme de CSR se déroule en deux étapes : l'induction des DSBs et la prise en charge de leur réparation. **Figure 9**

**Induction des DSBs :** Ces cassures sont induites au niveau de séquences particulièrement riches en G/C, d'environ 1 kb à 12 kb, situées en amont des gènes constants appelées régions S. Lors du switch, deux régions S sont impliquées : une région dite



**Figure 9: Représentation schématique du mécanisme de la CSR**

Lors de la CSR, AID cible des séquences dites switch situées en amont des gènes constants induisant des DSBs. La prise en charge de ces cassures par les voies de réparation NHEJ ou AEJ aboutit, dans ce cas, au remplacement du gène  $C\mu$  par le gène  $C\gamma 1$ . Les gènes situés entre les régions switchs  $S\mu$  et  $S\gamma 1$  sont circularisés et éliminés.

donneuse qui est très souvent la région  $S\mu$  et une autre région dite accepitrice  $Sx$ . À la fin du processus ceci aboutit au remplacement de  $C\mu$  par  $Cx$  et à l'expression d'une Ig de la classe correspondante (Xu et al. 2012). Une transcription germinale de ces régions est nécessaire pour les exposer à l'enzyme AID (Chaudhuri et al. 2004). Le nombre de cibles d'AID dans les régions S (pour switch) est très élevé. Les mésappariements induits par cette dernière génèrent simultanément plusieurs cassures simples brins (SSBs pour Simple Strand Breaks) rapprochées qui seraient alors convertis en DSBs lors de leur prise en charge par les voies BER et MMR (Hackney et al. 2009).

**Prise en charge et réparation des DSBs :** Les DSBs sont détectées par le système de surveillance de l'ADN et une synapse entre la région S donneuse et receveuse est créée. Les cassures sont alors réparées par la voie de réparation NHEJ (pour Non-Homologous End Joining pathway) ou AEJ (pour Alternative End-Joining Pathway) (Boboila et al. 2012, Matthews, Zheng, DiMenna & Chaudhuri 2014, Vaidyanathan et al. 2014).

**La voie de réparation NHEJ** est le plus souvent impliquée dans la résolution des cassures. Le choix de cette voie est dû notamment à la position du locus dans le noyau, et le taux de mésappariements induits par AID (Aymard et al. 2014, Cortizas et al. 2013). Cette voie, très efficace dans la réparation de cassures séparées par une longue distance, génère le plus souvent des jonctions franches (Stavnezer & Schrader 2014) . **La voie AEJ** utilise des protéines indépendantes de la précédente. Elle génère majoritairement des jonctions présentant des longues homologies. Toutefois cette voie présente un plus grand risque de translocation oncogénique à cause de l'excision des extrémités qu'elle prend en charge (Boboila et al. 2010, 2012).

# Chapitre 2

## Les éléments *cis*-régulateurs du locus IgH

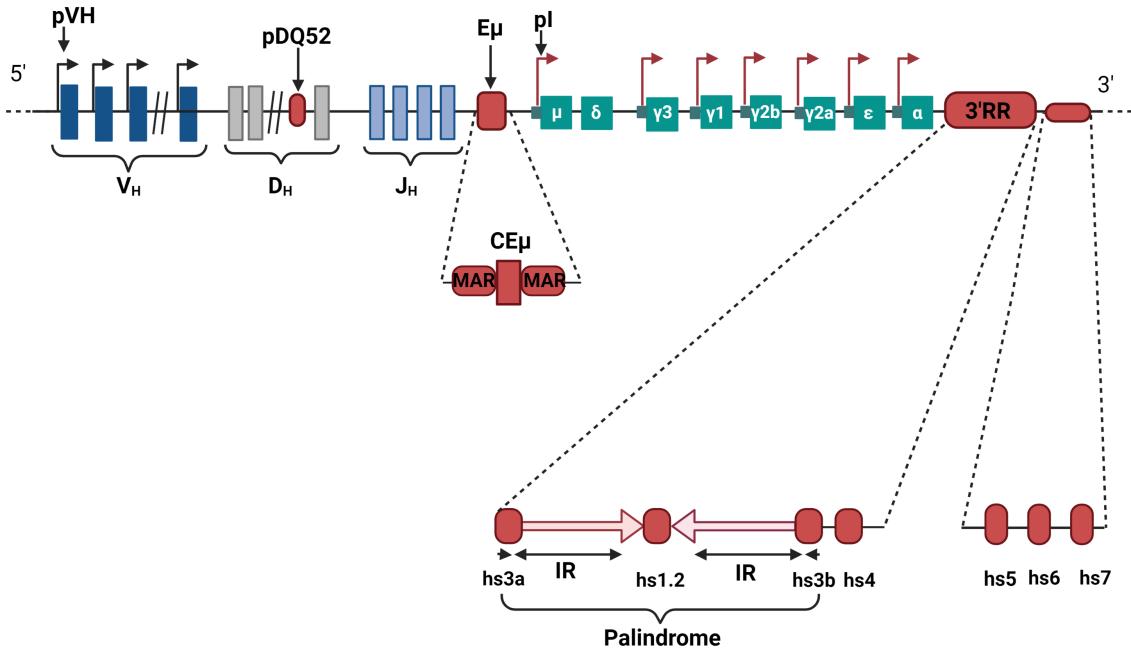
Les différents événements géniques qui marquent la lymphopoïèse B nécessitent une haute régulation afin de prévenir la survenue d'événements oncogéniques. Cette régulation est assurée, entre autres, par les différents éléments *cis*-régulateurs du locus IgH. **Figure 10** Dans ce chapitre, je décrirai les principaux éléments contrôlant ces différents remaniements géniques. Je détaillerai davantage la 3'RR incriminée dans la surexpression d'oncogènes transloqués au locus IgH.

### 2.1 Les promoteurs

Plusieurs promoteurs répartis tout au long du locus IgH sont activés de façon séquentielle. L'activation de ces derniers aboutit à la synthèse de courts transcrits germinaux non codants aussi bien au niveau des régions variables que constantes. Ils seraient liés à l'initiation des événements de recombinaisons géniques (Banerji et al. 1983, Yanopoulos & Alt 1985), en permettant aux recombinases d'accéder plus facilement à la chromatine (Sun & Storb 2001, Sen & Oltz 2006). On en distingue 3 types : les promoteurs  $V_H$ , le promoteur DQ52 et les promoteurs I.

#### 2.1.1 Les promoteurs $V_H$

Les promoteurs  $V_H$  sont localisés en amont de chaque segment V. Ils sont requis pour la transcription germinale de ces derniers mais aussi pour l'expression d'une Ig



**Figure 10: Représentation schématique du locus IgH et ses éléments cis-régulateurs**

La ligne supérieure représente le locus IgH murin dans sa conformation germinale avec ses principaux éléments cis-régulateurs. Le promoteur DQ52, l'enhancer  $E\mu$ , la 3'RR et la région en 3' sont représentés en rouge. Les promoteurs  $V_H$  sont représentés par des flèches noires et les promoteurs PI par des flèches rouges. Sur la deuxième ligne est détaillée la structure de l'enhancer  $E\mu$  avec le core  $E\mu$  et les deux régions MAR (Matrix Attachment Region). La structure de la 3'RR est représentée sur la ligne inférieure avec la région palindromique constituée des enhancers hs1.2, hs3a et hs3b en rouge et les régions IR représentées par des flèches rouge clair. L'orientation des différents éléments est indiquée avec des flèches noires. À l'extérieur du palindrome on retrouve l'enhancer hs4. Sur la même ligne on retrouve les éléments hs5, hs6 et hs7 composants la région en 3'.

mature une fois les réarrangements VDJ accomplis (Yancopoulos & Alt 1986). Ils sont constitués d'un élément initiateur (Inr) et d'une TATA box en amont de laquelle on retrouve une séquence octamérique hautement conservée, ATGCAAAT (Parslow et al. 1984, Buchanan et al. 1997).

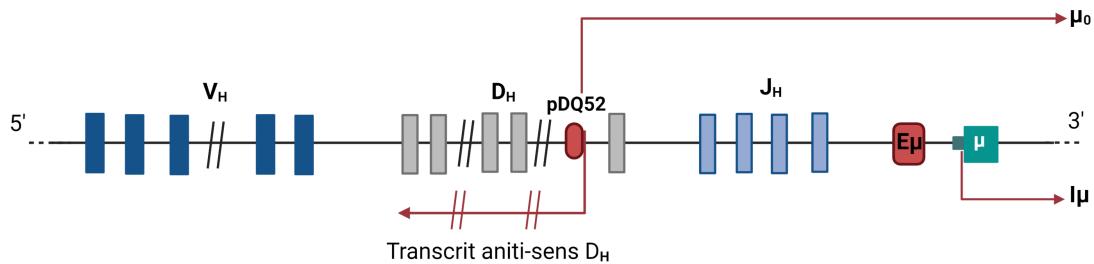
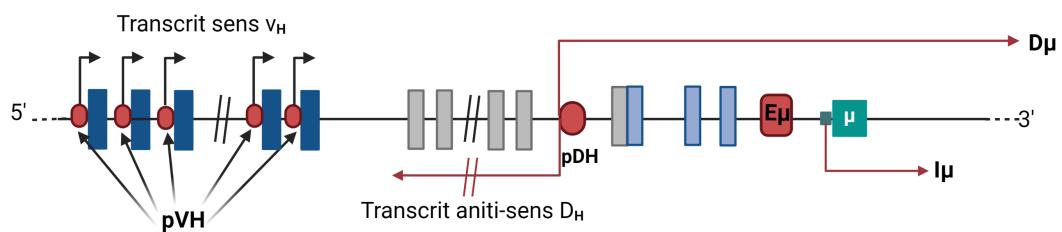
Des facteurs de transcription de la famille oct (oct1 et oct2), qui sont propres à la lignée B, se fixent sur ces octamères afin d'activer la transcription (LeBowitz et al. 1988, Pfisterer et al. 1994, Pierani & Heguy 1990). En plus de ces séquences octamériques, la majorité des promoteurs  $V_H$  contiennent un heptamètre (CTCATGA) qui permettrait une activation optimale de la transcription (Eaton & Calame 1987). Certains promoteurs, notamment ceux des segments  $V_H$  (appartenant à la famille J558 connue pour son activité très intense), possèdent en plus des séquences appelées DICE (Downstream Immunoglobulin Control Elements), en amont des sites d'initiations (Buchanan et al. 1995, Tantin et al. 2004, Roy et al. 2011). D'autres éléments jouant un rôle dans la régulation des recombinaisons VDJ sont identifiés dans les promoteurs des segments  $V_H$  distaux. Ce sont les éléments PAIRS (Pax-5 Activated Intergenic Repeat) sur lesquels se fixent des facteurs de transcription dont CTCF, Pax5 et E2 A (Ebert et al. 2011).

### 2.1.2 Le promoteur DQ52

Le promoteur DQ52 est un activateur synergique d' $E\mu$ . Situé en 5' du segment DQ52, il est activé dès les premiers stades du développement B, bien avant les recombinaisons VDJ. Ce promoteur permet la production d'un transcript germinal appelé  $\mu_0$  qui faciliterait l'accessibilité des régions D-J et l'initiation des recombinaisons. **Figure 11** (Thompson et al. 1995) Tous les autres segments D possèdent également des promoteurs bidirectionnels qui ne seront actifs qu'une fois les recombinaisons  $DJ_H$  accomplies permettant la transcription sens et antisens du segment DJ produit (Alessandrini & Desiderio 1991, Chakraborty et al. 2007, Bolland et al. 2007).

### 2.1.3 Les promoteurs I

La CSR nécessite la transcription germinale des différents gènes constants. Cette transcription est induite par l'activation des promoteurs pI (Intervening), situés en 5' de chaque gène constant à l'exception de  $C\delta$ . Les gènes constants sont organisés en unités transcriptionnelles formées d'un promoteur pI, d'une région S et des exons C. Suite à une stimulation cytokinique adéquate, la transcription germinale de chaque

**A****B**

**Figure 11: Transcription germinale des régions variables lors des recombinations VDJ**

Les gènes des régions variables sont représentés par des rectangles bleu foncé pour les régions  $V_H$ , gris pour les segments  $D$  et bleu clair pour les segments  $J_H$ . Les flèches représentent les transcrits et leur sens. **A** : Les régions variables du locus  $IgH$  sont représentées dans leur conformation germinale. Des transcrits sens et antisens partent du promoteur  $DQ52$  permettant ainsi l'accès des segments  $D$  et  $J_H$ . **B** : Après les recombinations  $D - J_H$ , la transcription sens et antisens part du promoteur de segment  $D$  réarrangé. Les segments  $V_H$  sont transcrits à partir de leurs promoteurs respectifs représentés ici par des flèches noires.

gène C est initiée à partir du promoteur pI. Le transcrit germinal primaire produit va ensuite être épissé pour produire un transcrit mature ne contenant que la séquence I et les exons C (Matthews, Zheng, DiMenna & Chaudhuri 2014). **Figure 12.** Après la CSR le promoteur pI $\mu$  permettra la synthèse d'un transcrit I $\mu$ -Cx.

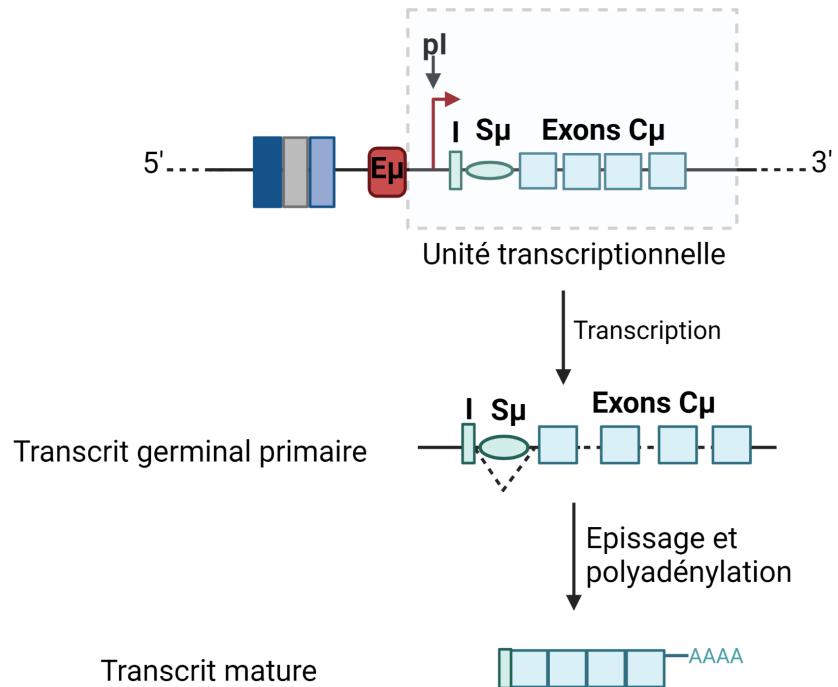
## 2.2 L'activateur E $\mu$

L'activateur intronique E $\mu$  est situé en 3' du segment J<sub>H4</sub> et en 5' du gène C $\mu$ . Il est constitué d'un core central (Core E $\mu$ ) entouré par deux régions d'attachement à la matrice nucléaire (MAR, pour Matrix Attachement Region) (Cockerill et al. 1987). E $\mu$  maintient son activité tout au long du développement B avec un pic durant la phase précoce suggérant son implication lors des recombinaisons VDJ.

Le core E $\mu$  est constitué de plusieurs sites de fixation de facteurs activateurs/inhibiteurs de la transcription C/EBP (CCAAT-Enhancers Binding Proteins). Il s'organise comme suit, de 5' à 3' :  $\mu$ 1E,  $\mu$ 2E,  $\mu$ 3E,  $\mu$ 4E,  $\mu$ 5E ainsi qu'une séquence octamérique sur laquelle se fixent des facteurs de transcription dont Oct-1 et Oct2 (Ernst & Smale 1995). La fixation de la protéine inhibitrice ZEB sur les éléments  $\mu$ E4 et  $\mu$ E5 permet d'inactiver E $\mu$  dans les lignées non B, tandis que la fixation de protéines de la famille E2A permet son activation lors des recombinaisons VDJ (Genetta et al. 1994).

Les séquences MARs, quant à elles, sont de courtes régions riches en C/T ou en G/C. On distingue les MARs dites "constitutives," attachées à la matrice nucléaire de façon permanente, des MARs "facultatives" qui flanquent Core E $\mu$ . Ces dernières sont inactivées dans les cellules non B par des facteurs répresseurs. La fixation réversible du facteur de transcription Bright (B-cell Regulator of IgH Transcription) permet leur activation (Lin et al. 2007, Kaplan et al. 2001, Zong et al. 2000). Ces séquences ne sont pas nécessaires pour le déroulement des réarrangements VDJ. Cependant elles joueraient un rôle dans la régulation de la SHM.

Des modèles de délétion de la totalité d'E $\mu$  ou de l'un ou l'autre de ses éléments par Knock-Out (KO) ont permis d'étudier sa fonction. La délétion d'E $\mu$  inhibe la transcription sens de  $\mu$ 0 et antisens des segments D et J<sub>H</sub> ce qui affecte les réarrangements VDJ (Chen et al. 1993, Serwe & Sablitzky 1993, Perlot et al. 2005, Bolland et al. 2007). La transcription des segments V<sub>H</sub> n'est pas très affectée par son absence. Cette délétion induit une baisse de l'expression de la chaîne H d'Ig au stade B immature



**Figure 12: Transcription germinale des régions constantes**

Les gènes constants constituent des unités transcriptionnelles formées d'un promoteur inducible,  $pI$ , d'une séquence  $I$ , d'une région  $S$  et des exons  $C$ . Ici est représentée la transcription germinale du gène  $C\mu$ . Après épissage et polyadénylation, un transcrit mature est obtenu. D'après Matthews et al., 2014

et transitionnel. Ceci impacte significativement le nombre de LB matures ainsi que la répartition des sous-populations B.

Au stade B mature, les expressions du BCR et de la SHM ne semblent pas être affectées par l'absence de l'enhancer  $E\mu$  alors qu'un léger effet sur la CSR est suggéré (Bottaro et al. 1998, Li & Eckhardt 2009, Li et al. 2010). Des travaux récemment menés par notre laboratoire ont cependant montré que la CSR n'est pas affectée chez les souris déletées de cet activateur (Issaoui et al. 2019).

## 2.3 La région régulatrice en 3' (3'RR)

La 3'RR est une région régulatrice d'environ 30 kb située en 3' du locus IgH. Elle est enrichie en sites de fixation pour des facteurs de transcription et des marqueurs épigéniques. Cette région contrôle la transcription de plusieurs gènes avec lesquels elle peut avoir des interactions longues distances en formant des boucles chromatiniennes. Toutes ces caractéristiques permettent de définir la 3'RR comme un "super enhancer" jouant le rôle de chef d'orchestre de divers évènements géniques au locus IgH.

### 2.3.1 Historique

$E\mu$  a longtemps été considéré comme étant le principal élément régulateur du locus IgH. Une étude menée sur des lignées cellulaires déletées pour  $E\mu$  n'a montré aucun impact sur le taux d'Ig produit (Aguilera et al. 1985, Klein et al. 1984, Wabl & Burrows 1984, Zaller & Eckhardt 1985). La disparition d' $E\mu$ , suite à une translocation chromosomique rapprochant l'oncogène c-myc du gène  $C\gamma 2$ , ne diminuait pas la forte expression de c-myc (Neuberger & Calabi 1983). Les résultats de ces études ont alors suggéré l'existence d'autres éléments régulateurs de la transcription au locus IgH.

Une première région a été identifiée comme étant un activateur transcriptionnel localisé à 25 kb en aval de  $C\alpha$ . Il s'agit de l'enhancer hs1.2. Cette appellation est dûe à la présence de deux sites hypersensibles à la DNase sur cet élément (Dariavach et al. 1991, Lieber 2010).

D'autres travaux de recherche ont permis, par la suite, d'identifier 3 autres enhancers :  $C\alpha 3'E$  et hs3, flanquant hs1.2, et 3' $\alpha$ -hs4, situé en 3' de hs3. Ces éléments ont été découverts notamment grâce à l'étude de la présence de sites d'hypersensibilité à la DNaseI (Giannini et al. 1993, Matthias & Baltimore 1993, Madisen & Groudine 1994).

Ce n'est que plus tard que les différents éléments composant la 3'RR ont été correctement délimités grâce à l'isolation d'un BAC murin comprenant la totalité de la 3'RR (Zhou et al. 2002).

La nomenclature retenue pour les 4 enhancers constituants la 3'RR a été proposée par Saleque en 1997. Ainsi on retrouve de 5' en 3' : hs3a (pour C $\alpha$ 3'E), hs1.2 (pour 3' $\alpha$ E), hs3b (pour hs3) et hs4 (pour 3' $\alpha$ -hs4).

### 2.3.2 Structure et évolution de la 3'RR

Le séquençage des 30 kb sur lesquels s'étale la 3'RR a permis de déterminer sa spécificité structurale. En effet, la 3'RR comprend 4 enhancers et des régions répétées inversées IR (pour Inverted Repeat). Elle s'organise en deux unités. Un palindrome qui comprend l'élément hs1.2 flanqué par des régions IR et bordé, de part et d'autre, par les enhancers hs3a et hs3b. Ils sont disposés en orientation inverse et présentent au moins 97% d'homologie dans les séquences. À l'extérieur de cette première unité, on retrouve l'enhancer hs4 qui constitue la limite de la 3'RR (Saintamand et al. 2017, Chauveau & Cogné 1996, Saleque et al. 1997, Pinaud et al. 2011a, Birshtein 2014). En 3' de ces quatre, éléments on retrouve la région 3' constituée des sites hs5, hs6 et hs7. Elle contient de nombreux sites CBE qui lui confèrent une activité isolatrice (Garrett et al. 2005). Cependant, il a été montré, suite à l'insertion d'une cassette néoR entre hs4 et hs5, que cette région délimite le locus IgH sans avoir d'activité régulatrice sur la transcription (Manis et al. 2003).

Des séquences répétitives similaires aux régions S appelé LS (pour Like Switch) ont été identifiées lors d'une étude menée au laboratoire. Ces régions flanquent les quatre enhancers de la 3'RR. Elles peuvent également être la cible d'AID, ce qui aboutit à une recombinaison S $\mu$  – 3'RR. Cette recombinaison appelée LSR (pour Locus Suicide Recombination) induit la délétion de l'ensemble des gènes constants et la mort du lymphocyte B par apoptose (Péron et al. 2012). La comparaison de la structure de la 3'RR chez les vertébrés montre un polymorphisme des régions IR mais pas dans les séquences des enhancers. La conservation des régions IR au cours de l'évolution (D'Addabbo et al. 2011), suggère qu'elles possèdent un rôle fonctionnel important (Saintamand et al. 2017). Chez l'homme, on retrouve deux 3'RR. Les gènes C sont dupliqués et forment deux blocs avec chacun une 3'RR en aval des gènes C $\alpha$ . Elles comprennent chacune 3 enhancers (hs3 et hs4 de part et d'autre de l'élément central

hs1.2). L'activation de la 3'RR lors du développement B chez l'homme présente un profil similaire à celui de la souris, ce qui fait de cette dernière un modèle d'étude pertinent (Mills et al. 1997, Pinaud et al. 1997).

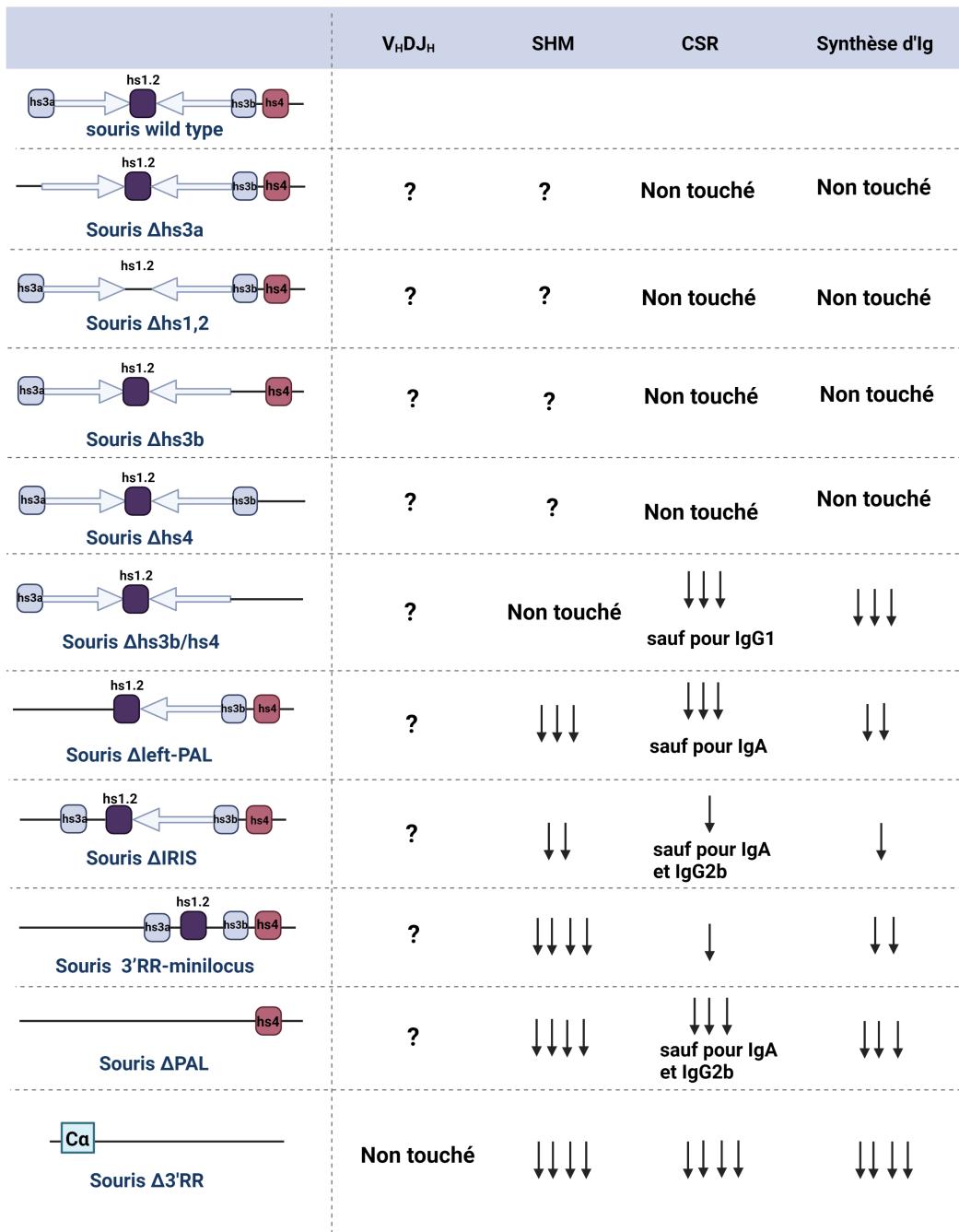
### 2.3.3 Activité de la 3'RR et sa régulation au cours du développement B

Plusieurs études, dont certaines menées au sein de notre laboratoire, ont permis de mieux comprendre la fonction des différents éléments de la 3'RR ainsi que leur action synergique. Ceci grâce notamment à des modèles de souris transgéniques ou déficientes pour un, plusieurs éléments ou la totalité de la 3'RR (Saintamand et al. 2017). **Figure 13** La 3'RR ne semble pas être impliquée lors des phases précoce de l'ontogenèse B (contraction du locus IgH, recombinaison  $DJ_H$  et  $V_H DJ_H$ ) (Rouaud-Tinguely et al. 2012). La délétion totale ou partielle de la 3'RR a montré le rôle important de la structure palindromique lors de la SHM (Saintamand et al. 2016, Le Noir et al. 2017).

Il a été montré que ce sont les activateurs transcriptionnels qui régulent les phénomènes de CSR (Le Noir et al. 2017, Vaidyanathan et al. 2014) (Saintamand et al. 2015a), ainsi que la transcription des gènes constants du locus IgH (Saintamand et al. 2015b). La coopération entre les quatre enhancers est observée pour ces deux activités *in-vitro* et *in-vivo*. Au stade B mature, c'est la 3'RR qui prend le dessus et devient l'unique élément régulant tous les processus de transcription (sens, antisens, codant et non codant) au locus IgH (Saintamand et al. 2017).

L'action de la 3'RR est régulée, entre autres, par des facteurs *trans* qui peuvent être recrutés sur les nombreux sites de fixations répartis sur les quatre enhancers (Pinaud et al. 2011a). En effet, en plus des sites de fixation pour les facteurs oct1 et oct2 présents sur les éléments hs3a et hs3b, (Matthias & Baltimore 1993) on retrouve également des sites de liaisons pour les protéines  $\mu$ E2 et  $\mu$ E5 de la famille E2A ou encore des sites de fixation de protéines inhibitrices bloquant la transcription aux stades précoce avant les réarrangements permettant l'expression d'une Ig fonctionnelle (Muto et al. 1998).

L'élément hs1.2 est également parsemé de sites de fixation pour des facteurs permettant son activation ou sa répression en fonction du stade de développement et de l'état d'activation du LB. On retrouve par exemple des sites pour les protéines Oct-



**Figure 13: Modèles murins de délétion de la région 3'RR**

Représentation des différents modèles murins de délétions de la région 3'RR. La délétion d'un seul activateur transcriptionnel n'a pas d'effet, confirmant la répétition et la synergie d'activité entre les différents éléments de la 3'RR. La délétion de plusieurs activateurs perturbe fortement la CSR, la SHM et la synthèse d'Ig. La suppression du palindrome a un effet notable sur la SHM et la synthèse d'Ig. Les blocs gris, violet et rouge représentent respectivement les enhancers hs3a et hs3b, hs1.2 et hs4. Les flèches grises représentent les IR du palindrôme 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 diminution du paramètre étudié. Adapté de Saintamant et al., 2017

2 et OCA-B permettant son activation au stade plasmocytaire (Tang & Sharp 1999) ainsi que des sites de fixation de protéines nécessaires à l'engagement dans la lignée B telles que E12 et E47. Dans les LB matures au repos ou au stade précoce, les protéines inhibitrices Id1, Id2 et Id3 vont au contraire permettre de réprimer l'activation de la 3'RR (Kadesch 1992, Meyer et al. 1995).

D'autres sites sont également identifiés sur cet élément dont un pour NF $\kappa$ B qui va jouer le rôle d'inhibiteur durant les stades précoces et d'activateur durant les stades tardifs. Tout comme les autres enhancers de la 3'RR, hs4 possède également des sites de fixation. Mais contrairement aux autres, ce dernier est activé dès les premiers stades du développement B.

Il a été montré que la 3'RR pouvait être activée *in-vitro* par plusieurs molécules chimiques dont le ligand du récepteur d'hydrocarbure acrylique ou encore des HDACs (Histone Desacetylase) bien qu'elles soient habituellement associées à une activité inhibitrice de la transcription des gènes (Fischle et al. 2003). En effet, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont montré que HDAC1 est recruté sur l'enhancer hs1.2 de la 3'RR alors que l'utilisation d'inhibiteurs d'HDAC (HDACi) diminuaient l'activité de la 3'RR (Lu et al. 2005, Waibel et al. 2015). Certains de ces d'HDACi sont déjà utilisés en clinique comme traitements adjuvants de certaines hématopathies malignes. Toutefois les mécanismes d'action justifiant leur utilisation restent mal connus. C'est ce que nous avons essayé de comprendre lors d'une étude présentée dans la partie résultat.

# Chapitre 3

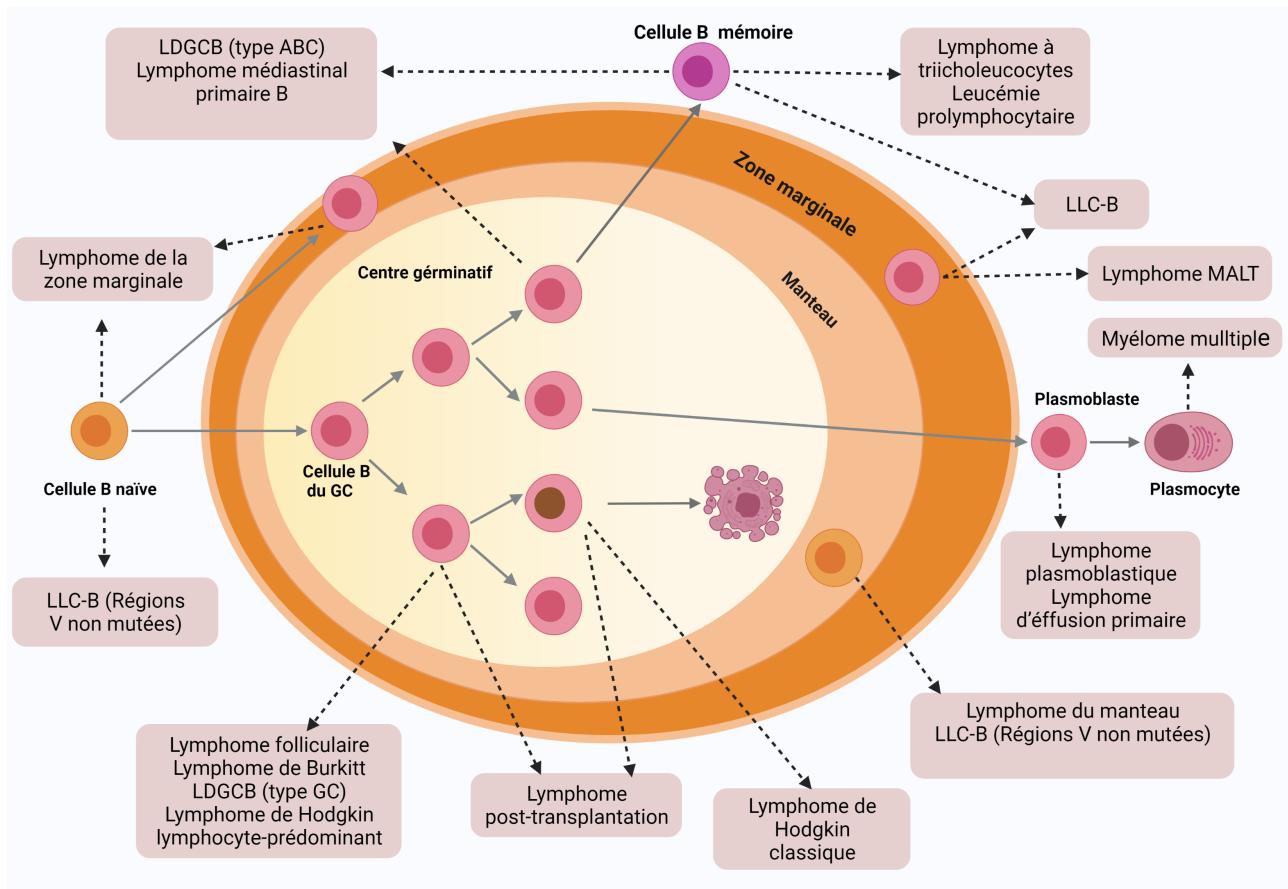
## Lymphomagenèse B

### 3.1 Caractéristiques des cellules B malignes

#### 3.1.1 Lésions oncogéniques et origine des cellules des lymphomes B

La perturbation du fragile équilibre entre apoptose et prolifération dans les cellules B peut être à l'origine de leucémies ou de lymphomes. Le lymphome B est induit par un désordre lymphoprolifératif d'un clone de cellule B bloqué à un stade précis de maturation.

En effet, chaque stade du développement de la cellule B présente des caractéristiques phénotypiques et une structure du BCR spécifique. Lors d'une transformation maligne, cette cellule conserve certaines de ses caractéristiques. Leur analyse permet alors d'identifier la cellule d'origine et le niveau de maturité du lymphome (Küppers 2005, Shaffer et al. 2002). Ainsi il existe environ 40 sous-types de lymphomes B dont une majorité originaire de cellules B matures. Toutefois la transformation maligne d'une cellule B peut survenir à n'importe quel stade de sa maturation : des plus précoce comme dans les B-ALL, au dernier stade de différenciation comme dans le myélome multiple (Robbiani & Nussenzweig 2013). Une grande partie de ces lymphomes sont cependant issus de cellules du GC ou post-GC, ce qui peut s'expliquer par la prolifération intense de ces cellules ainsi que le déroulement des réarrangements secondaires (SHM et CSR) accentuant ainsi le risque d'apparition de lésions oncogéniques.**Figure 14**



**Figure 14: Origine cellulaire des lymphomes B**

Les lymphomes B sont désignés d'après la contrepartie normale des cellules lymphomateuses. La majorité des lymphomes dérivent du centre germinatif ou de celles ayant subi la réaction du centre germinatif, soulignant son rôle important dans la lymphomagenèse. Les flèches continues indiquent le cheminement des cellules lors des différentes étapes de maturations. Les flèches en pointillé désignent les lymphomes et leur cellule d'origine. D'après Küppers, 2005.

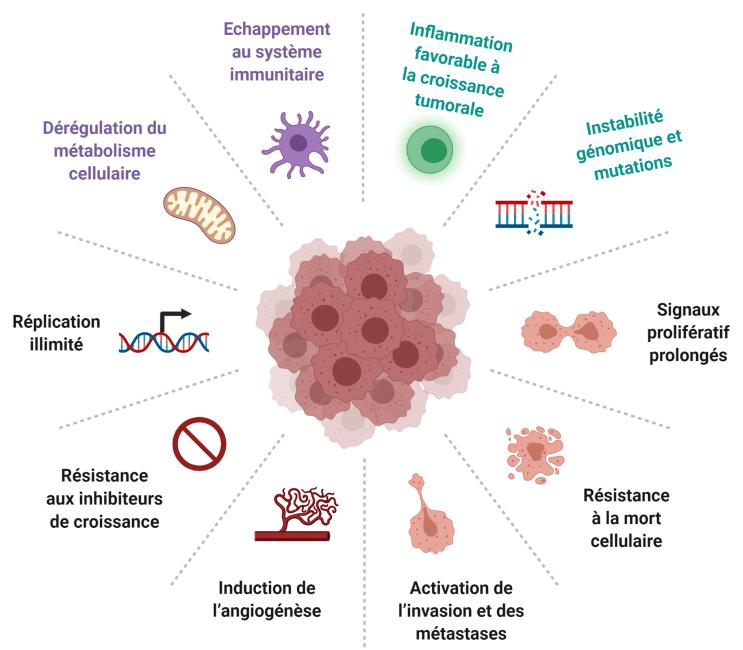
plusieurs étapes. C'est par exemple le cas du lymphome folliculaire qui porte comme signature la translocation de l'oncogène bcl-2 au locus IgH. Cette translocation survient au stade pro-B mais les lymphomes n'émergent que durant les stades tardifs (Seifert et al. 2013). C'est pourquoi il est plus judicieux de parler de contrepartie normale que de cellule d'origine d'un lymphome.

Ces transformations oncogéniques altèrent considérablement l'homéostasie du LB en affectant son rapport avec son environnement et/ou ses fonctions en lien avec la prolifération, l'apoptose ou encore la différenciation. En effet, certains lymphomes comme le lymphome de Burkitt ou certains lymphomes B diffus à grandes cellules sont caractérisés par une surexpression de c-myc, qui favorise la croissance et la prolifération.

**Figure 15** À l'inverse, la surexpression de bcl-2 (comme dans le lymphome folliculaire) ou l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (dans certains lymphomes B diffus à grandes cellules et le lymphome d'Hodgkin) permettent d'inhiber l'apoptose. Enfin, la différenciation peut également être bloquée dans certains lymphomes. C'est, par exemple, le cas dans le lymphome non hodgkinien où la dérégulation de bcl-6 bloquerait les cellules B au stade du GC (Lenz & Staudt 2010, Shaffer et al. 2002).

Des lésions géniques souvent aléatoires mais pouvant aussi être liées aux différents remaniements géniques qui surviennent tout au long de la lymphopoïèse B sont à l'origine de ces transformations (Robbiani & Nussenzweig 2013). Les premières translocations récurrentes à l'origine de la cancérisation des cellules B ont été identifiées dans les années 1970 grâce au développement des techniques de cytogénétique (Rowley 1973a,b). La caractérisation de certaines de ces translocations, dont celle de c-myc, a été rendue possible une décennie plus tard suite au développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire (Crews et al. 1982, Dalla-Favera et al. 1982, Adams et al. 1985, Cory et al. 1983). Plus récemment le développement des techniques de séquençage haut débit (TC-seq Translocation Capture – sequencing) ont permis la découverte et l'étude de nombreuses autres mutations et translocations à l'origine des lymphomes B (Campbell et al. 2008, Greenman et al. 2007, Robbiani & Nussenzweig 2013).

Ces translocations constituent le plus souvent l'événement initiateur de la lymphomagénèse. Elles sont le plus souvent suivies par d'autres mutations ou "hit". Ces altérations génétiques affectent notamment le cycle cellulaire, la résistance à l'apoptose, la signalisation intracellulaire, la réponse immunitaire et permettent à la cellule d'échapper à différents checkpoints physiologiques (Vogelstein & Kinzler 1993, Hanahan & Weinberg



**Figure 15: Caractéristiques acquises par les cellules lors de leur cancérisation.**

La transformation maligne d'une cellule nécessite l'accumulation de plusieurs altérations géniques aboutissant à sa dérégulation. Ces mutations peuvent affecter différentes fonctions physiologiques de la cellule et conditionnent l'évolution de la tumeur.

2011). Par exemple, une mutation du gène TP53 codant pour le facteur suppresseur de tumeur P53 crée un environnement permissif qui favorise l'émergence de tumeurs. Ce facteur a comme fonction d'induire l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire suite un défaut de réPLICATION ou une lésion de l'ADN. Sa mutation est récurrente et retrouvée dans un grand nombre de lymphomes ou de tumeurs non B (Zilfou & Lowe 2009, Goh et al. 2011).

### 3.1.2 BCR et activation antigénique des cellules B malignes

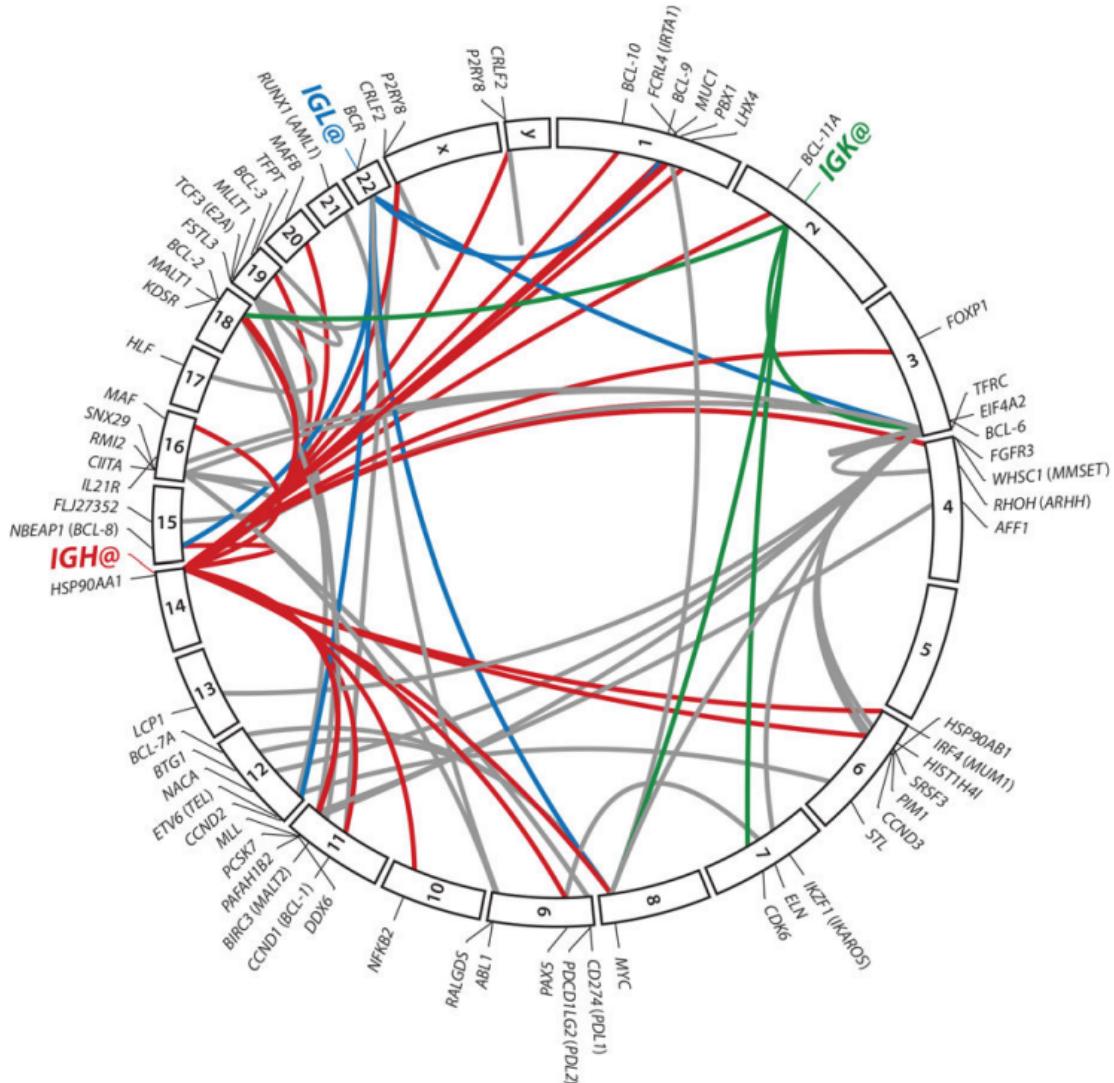
Tout comme dans les cellules B normales, le BCR joue également un rôle important pour la survie des cellules tumorales. La majorité des cellules B de lymphomes présentent un BCR à leur surface, les translocations oncogéniques n'affectant que très rarement l'allèle productif. En effet, l'inactivation de l'allèle exprimé serait incompatible avec la survie de la cellule. La présence de SHM dans les régions variables d'Ig de clones tumoraux montre que les cellules B malignes reçoivent également des signaux de survie transmis par le BCR. Les cellules de lymphomes sont également capables de reconnaître des Ag. Le contact avec l'Ag peut en effet contribuer à la survie et la prolifération de ces cellules (Küppers 2005, Shaffer et al. 2002).

### 3.1.3 Rôle du micro-environnement

Les interactions entre les cellules lymphomateuses et leur environnement sont d'une grande importance pour beaucoup de lymphomes. C'est notamment le cas des lymphomes folliculaires nécessitant la présence de cellules T CD4<sup>+</sup> pour proliférer *in-vitro*. De plus, dans ce type de lymphomes, les cellules se concentrent dans les structures folliculaires où elles interagissent avec les cellules T et les FDC. Les cellules B pouvant se retrouver dans les zones intermoléculaires présentent une capacité proliférative inférieure (Küppers 2005).

## 3.2 Translocations oncogéniques au locus IgH lors de la lymphopoïèse B

La majorité des lymphomes B portent les stigmates de translocations oncogéniques au locus IgH. **Figure 16** Au cours des différents stades de la lymphopoïèse B, l'intégrité génomique de la cellule B est mise en danger durant les remaniements géniques



**Figure 16: Translocations récurrentes dans les lymphomes B**

Le diagramme circulaire représente l'ensemble du génome humain. Les arcs relient les partenaires impliqués dans des réarrangements chromosomiques récurrents lors des pathologies malignes B. Les traits colorés indiquent les translocations concernant les gènes d'Ig. D'après Robbiani et Nussenzweig, 2014.

aboutissant à la formation des répertoires antigéniques primaires et secondaires.

En effet, comme cela a été expliqué dans le chapitre précédent, des DSBs sont générées au cours de ces évènements géniques. La résolution aberrante de ces cassures favorise la survenue de translocations. La plupart d'entre elles vont induire la juxtaposition d'un oncogène à un élément *cis*-régulateurs du locus IgH. L'oncogène transloqué va alors être transcrit de façon constitutive et dérégulé sous l'effet de l'activateur actif à ce moment là (Küppers 2005, Seifert et al. 2013, Nussenzweig & Nussenzweig 2010).

### 3.2.1 Translocations lors des réarrangements VDJ

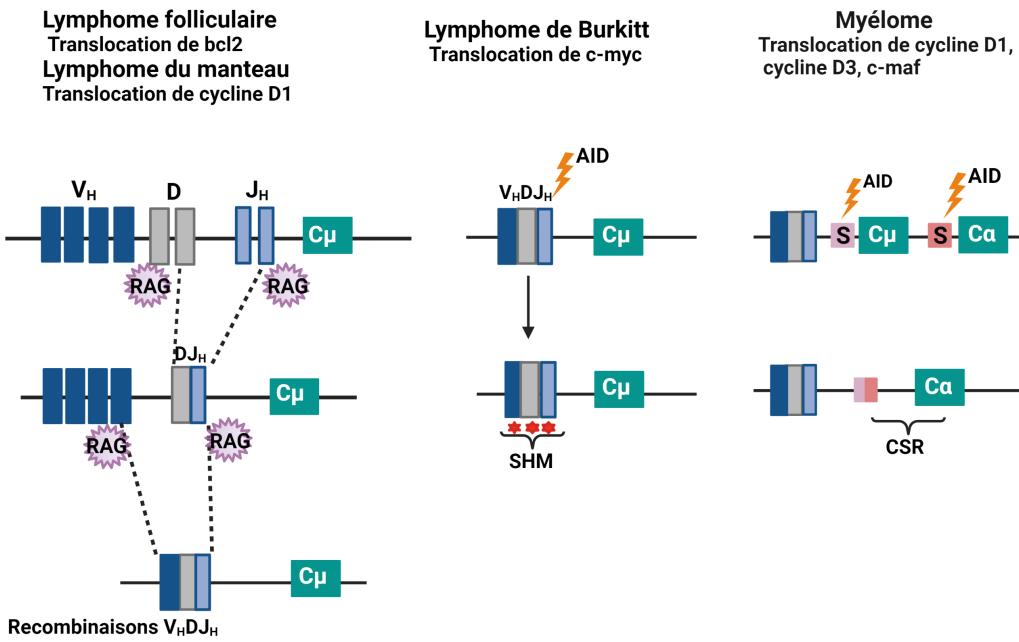
Certains lymphomes sont caractérisés par des translocations oncogéniques au locus IgH dont le point de cassure est situé à proximité de RSS de segments D ou J. C'est le cas par exemple du lymphome du manteau qui présente une translocation CCND1-IgH (cycline D1) ou encore du lymphome folliculaire caractérisé par une translocation bcl2-IgH (Küppers 2005, Robbiani & Nussenzweig 2013). **Figure 16**

Ces translocations impliquent le plus souvent des remaniements VDJ illégitimes. Elles nécessitent l'induction de deux DSBs. L'une est induite au locus IgH par RAG et l'autre générée suite à l'action "off-target" de cette même enzyme. Ce deuxième DSB est généré suite à l'attaque de RAG sur des séquences cryptiques similaires aux séquences RSS à proximité d'un oncogène. Des séquences de structure non B mais en mesure de recruter le complexe RAG peuvent également être ciblées. Une synapse est alors formée par les complexes RAG recrutés sur les deux DSBs aboutissant à la juxtaposition de l'oncogène et d'un segment de la région variable. Il arrive également que la deuxième DSB ne soit pas dépendante de RAG (Mani & Chinaiyan 2010).

### 3.2.2 Translocations lors des réarrangements secondaires

Des translocations oncogéniques peuvent également survenir lors des recombinaisons secondaires au locus IgH. **Figure 17**

Dans certains lymphomes, des points de cassures sont retrouvés sur le segment VDJ réarrangé, suggérant que les translocations sont dues à un défaut de réparation lors de la SHM. C'est le cas de la translocation c-myc-IgH lors du lymphome de Burkitt endémique. Cette translocation est due à la génération simultanée de deux DSBs. La première sur le locus IgH, suite à l'action d'AID au cours de la SHM et la deuxième à



**Figure 17: Translocations récurrentes au sein du locus IgH liées aux mécanismes de diversification des Ig**

Les différents remaniements géniques qui ont lieu sur le locus IgH au cours du développement B en font un « hotspot » de translocation. Selon le mécanisme impliqué, la translocation peut avoir lieu dans les régions variables ou constantes et impliquer différents oncogènes.

proximité d'un oncogène suite à une action "off-target" de cette enzyme.

Un mécanisme similaire ciblant à la fois une région S et une séquence oncogénique lors de la CSR est également à l'origine de translocations oncogéniques. C'est notamment le cas lors de la translocation c-myc-IgH dans le lymphome de Burkitt sporadique ou de c-maf-IgH dans le myélome multiple (MM).

Il a été démontré que de nombreux gènes pouvaient être la cible non spécifique d'AID (Yamane et al. 2011). En effet, l'enzyme AID a été incriminée dans la lymphomagenèse suite à de nombreuses études utilisant des modèles murins (Ramiro et al. 2004, Jankovic et al. 2010, Matthews, Husain & Chaudhuri 2014). Certaines de ses cibles "off-target" ont été identifiées sur certains oncogènes dont c-myc grâce aux techniques de TC-seq. La présence de mutations somatiques sur ces derniers confirme leur ciblage par AID (Chiarle et al. 2011, Klein et al. 2011, Robbiani & Nussenzweig 2013).

La disposition spéciale des chromosomes au sein du noyau favoriserait la survenue de translocation notamment lors du rapprochement ou le positionnement en *cis* du locus IgH de certains gènes (Klein et al. 2011, Zhang et al. 2012). Ce rapprochement favoriserait également des attaques "off-target" d'AID (Hakim et al. 2012, Gramlich et al. 2012, Rocha et al. 2013).

### 3.3 Translocations de c-myc au locus IgH et lymphomes B

La translocation c-myc est caractéristique de nombreux lymphomes B à l'instar du lymphome de Burkitt (Dalla-Favera et al. 1982, Neel et al. 1982, Taub et al. 1982). Il a été démontré que lorsque c-myc est dérégulé sous l'effet des enhancers  $E\mu$  ou  $E\kappa$  dans des souris transgéniques, il pouvait promouvoir l'émergence de leucémies ou de lymphomes (Adams et al. 1985).

C-myc est défini comme un facteur de transcription essentiel. Il est impliqué dans plusieurs processus biologiques dont, entre autres, le cycle cellulaire, le métabolisme, la survie, la croissance, etc. (Dang 1999, Dang et al. 2006). L'activité pro-proliférative de c-myc est contrebalancée par son activité pro-apoptotique dans les cellules normales. Cependant, dans les cellules tumorales, cette balance finement régulée est perturbée. Ceci confère à c-myc une fonction transformante (Pelengaris et al. 2002), liée à la

Ceci confère à c-myc une fonction transformante (Pelengaris et al. 2002), liée à la surexpression de la protéine c-myc dans la cellule. Cette amplification peut être induite par l'insertion d'un stimulateur proviral en amont du gène c-myc (Dudley et al. 2002). Cependant elle est le plus souvent le résultat de sa translocation aux loci des Ig et de sa dérégulation par leurs éléments régulateurs (Erikson et al. 1983).

### 3.3.1 Le gène C-myc

Le gène c-myc murin est situé sur le chromosome 15. Il est formé de trois exons dont le premier est non codant. La transcription de ce gène peut être initiée depuis l'un de ses trois promoteurs. Il existe en effet 3 chez la souris qui sont les promoteurs P1, P2 et P3. Les promoteurs P1 et P2 sont les plus utilisés dans les cellules normales à raison de 75 à 90% pour P2 et 10 à 15% pour P1, donnant ainsi les protéines c-myc1 (67 KDa) et c-myc2 (64 KDa). Deux sites d'initiation de la transcription sont également retrouvés sur ce gène. Le premier "CTG" est situé à l'extrémité 3' de l'exon 1 et un deuxième "ATG" à l'extrémité 5' de l'exon 2 (Facchini & Penn 1998, Ryan & Birnie 1996). L'expression de ce gène est hautement régulée notamment *via* des facteurs de transcription tels que NF $\kappa$  qui interagit avec ses promoteurs. **Figure 18**

### 3.3.2 La protéine C-myc

La protéine c-myc est formée de 3 domaines :

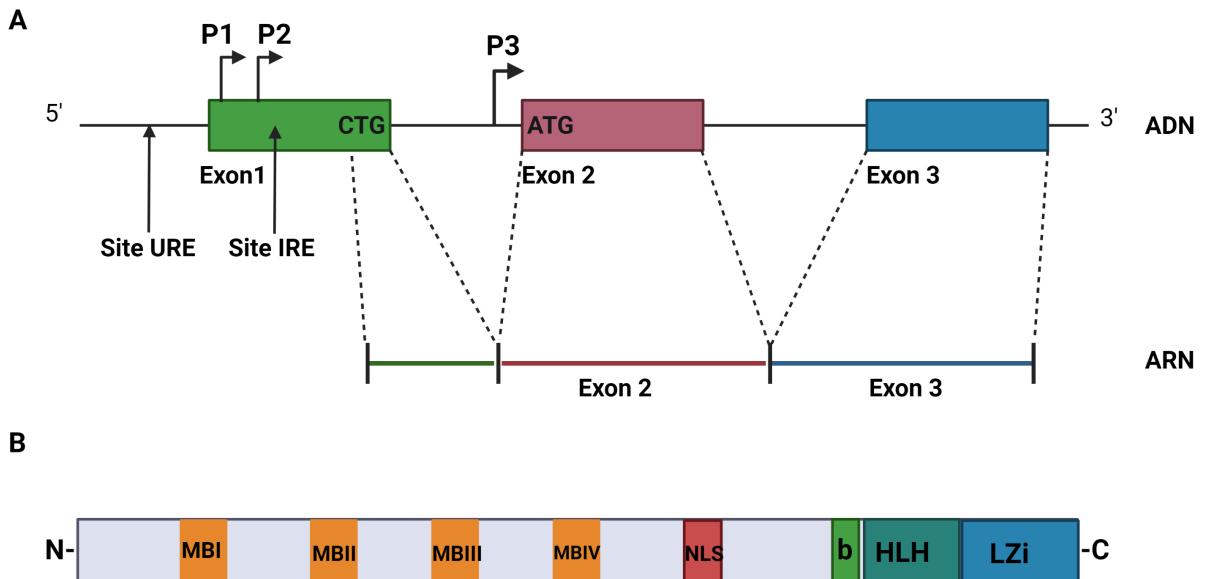
#### Le domaine d'activation de la transcription (TAD) :

Il est situé dans la partie N-terminale. Il est constitué de 2 régions hautement conservées qui sont les boîtes d'homologie myc MBI et MBII (pour Myc Homology Boxes). La régulation de c-myc est assurée par des phosphorylations sur la région MBI.

La boîte MBII, quant à elle, est indispensable pour les activations et les répressions transcriptionnelles. Cette région interagit avec plusieurs cofacteurs impliqués dans la transformation ainsi qu'avec TRRAP (transactivation/transformation-associated protein). **Figure 18**

#### Le domaine central :

Il est composé par une séquence de localisation nucléaire (NLS), d'un élément MBIIIa jouant un rôle dans la transformation cellulaire, d'un élément MBIIIb dont le rôle est encore peu connu et d'une boîte MBIV qui participe à des processus tels que l'apop-



**Figure 18: Structure du gène et de la protéine *c-myc***

*A* : La première ligne représente la structure du gène *c-myc* avec ses trois exons. Les promoteurs sont indiqués par des flèches noires. La seconde ligne représente le transcript mature d'après Ryan et Birnie, 1996. *B* : Représentation de la protéine *c-myc* avec ses trois domaines essentiels. Le premier, dans la partie N-terminale, contient les deux régions MBI et MBII (MYC Box). Le deuxième, central, contient MBIII et MBIV ainsi que le signal de localisation nucléaire (NLS). Le troisième, dans la partie C-terminale, contient une région basique et les deux séquences HLH « hélice-boucle-hélice » et LZi « leucine-zipper ».

tose, la transformation et l'arrêt du cycle cellulaire en G2 (Cowling et al. 2006).

#### Le domaine C-terminal :

Il est formé d'une région basique permettant la liaison spécifique de c-myc à ses séquences d'ADN cibles en collaborant avec son partenaire Max. Et d'un motif « hélice boucle hélice leucine zipper » (HBH-LZ) possédant une fonction transformante (Facchini & Penn 1998, Meyer & Penn 2008, Ryan & Birnie 1996).

### 3.3.3 Régulation de l'expression et de l'activité de c-myc

L'expression et l'activité de c-myc sont régulées aux stades transcriptionnels et post-transcriptionnels.

Plusieurs voies de signalisation contribuent à la régulation positive ou négative de c-myc. Il peut également s'autoréguler en réprimant son propre promoteur. Au niveau post-transcriptionnel, c-myc est directement régulé par phosphorylation, glycosylation et ubiquitination ou indirectement en interagissant avec des partenaires régulant son activité. Les promoteurs de c-myc présentent également plusieurs sites de fixation de facteurs de transcription (Arcinas & Boxer 1994).

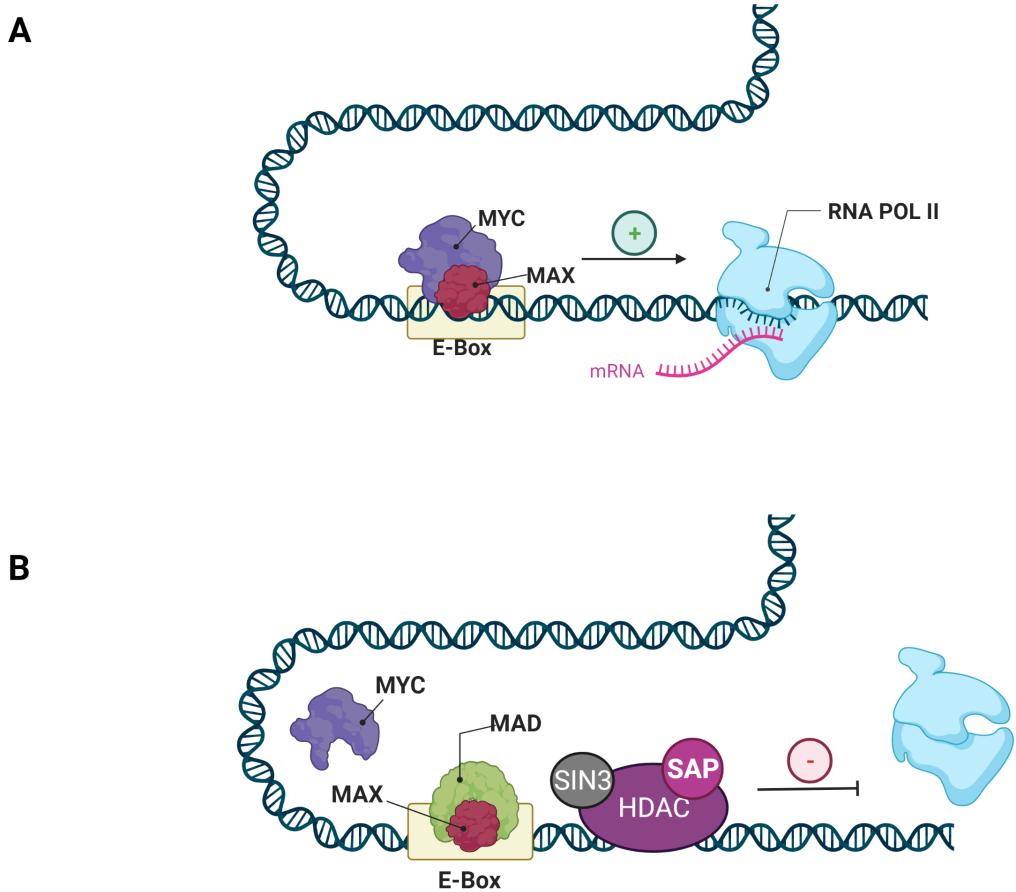
Une diminution du taux de transcrits c-myc dans la cellule peut aussi résulter d'un arrêt de l'élongation lors de la transcription (Bentley & Groudine 1986, Eick & Bornkamm 1986, Nepveu & Marcu 1986).

### 3.3.4 Le facteur de transcription c-myc : activation et répression transcriptionnelles

L'association du domaine HBH-LZ de c-myc, avec un autre domaine HBH-LZ situé sur son partenaire Max, forme un complexe Myc/Max. Cet hétérodimère joue un rôle activateur de plusieurs gènes (Blackwood & Eisenman 1991). Il reconnaît et fixe une séquence d'ADN spécifique "CACGTG" dite E-box (Blackwell et al. 1993). **Figure 19**

Le facteur de transcription c-myc active le plus souvent la transcription de ses gènes cibles en induisant un remodelage chromatinien. Il a été montré que leur activité augmentait suite au recrutement d'histone acétyltransférase (HAT) (Grandori et al. 2000).

C-myc est également capable de réprimer l'expression de certains gènes en interagissant avec les éléments initiateurs de leur région promotrice (Li et al. 1994).



**Figure 19: Activité transcriptionnelle de Myc**

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

*B : La fixation du complexe MAD/Max sur l'E-box réprime la transcription du gène cible par le recrutement de répresseurs transcriptionnels (Sin3, SAP et HDAC). D'après Adhikary et Eilers, 2005.*

avec les éléments initiateurs de leur région promotrice (Li et al. 1994).

La stabilité de la protéine c-myc est assurée par la phosphorylation dans l'un des 2 sites situés dans le domaine N-terminal par ERk (Extracellular Regulated kinase). Une phosphorylation sur le second site par GSK-3 $\beta$  induit sa dégradation. Ce site est d'ailleurs souvent muté dans de nombreux lymphomes dont le lymphome de Burkitt. Ces mutations empêchent sa phosphorylation et induit l'accumulation de la protéine c-myc dans la cellule (Bahram et al. 2000). Les mutations de ces sites peuvent également affecter la fonction pré-apoptotique de c-myc (Hemann et al. 2005).

La régulation de c-myc peut également passer par la protéine Max. En formant des homodimères, la protéine Max peut rentrer en compétition avec c-myc en ciblant les E-Boxes. Elle peut également réprimer les gènes cibles de c-myc dans des cellules au repos en s'associant à des protéines telles que MAD1, Mix1, MAD3, MAD4 et Mnt. Ces complexes se fixent sur les E-boxes et induisent le recrutement d'HDACs (Adhikary & Eilers 2005).

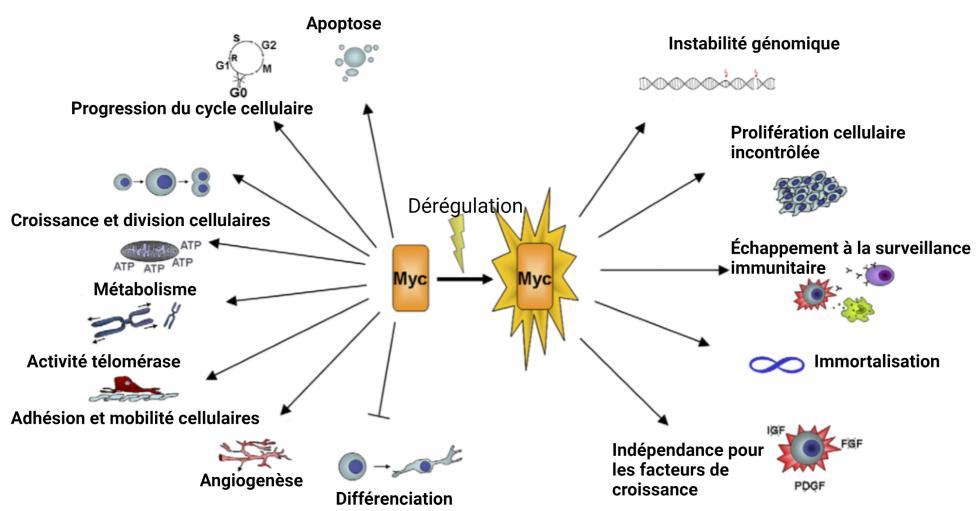
### 3.3.5 Les fonctions biologiques contrôlées par c-myc

C-Myc est une protéine très importante pour le développement cellulaire. Elle est exprimée tout au long de la vie et dès les premiers stades de l'embryogenèse. Des souris c-myc déficientes sont incapables de franchir ce stade de développement (Davis et al. 1993). Elle est impliquée dans plusieurs processus biologiques dont la prolifération, l'apoptose, la différenciation et le métabolisme (Dang 1999, Vita & Henriksson 2006).

#### Figure 20

#### C-myc et le cycle cellulaire

Une étude réalisée sur une lignée de cellules fibroblastiques présentant une inactivation de c-myc a démontré son importance dans la prolifération cellulaire (Prochownik & Kukowska 1986). Il est à noter que c-myc cible de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire dont les cyclines D1, D2, E et A. Il permet l'activation de cyclines dépendantes kinases (cdk) et régule ainsi la progression du cycle cellulaire (Hanson et al. 1994, Hoang et al. 1994, Jansen-Dürr et al. 1993). C-myc en collaboration avec RAS cible le promoteur de cdk1 et l'active. Il agit également sur cdk4 (Born et al. 1994, Hermeking et al. 2000). L'action de c-myc sur les cdk passe par différents mécanismes.



**Figure 20: Représentation schématique des divers fonctions biologiques contrôlées par Myc**

À droite sont représentés les phénomènes et mécanismes cellulaires contrôlés par *c-myc* en conditions physiologiques normales. Les fonctions contrôlées par *c-myc* au cours de la tumorigénèse sont représentées à gauche. D'après Vita et Henriksson, 2006.

Il peut activer cdk2 et cdk4 en éliminant les groupements phosphates qui les inhibent suite à l'activation du gène cdc25A codant pour une phosphatase (Galaktionov et al. 1996, Steiner et al. 1995). C-myc peut également réguler le cycle cellulaire en impactant négativement l'activité de P27 et contrecarrer ainsi l'effet inhibiteur du complexe cdk2-cycline E (Vlach et al. 1996, Yang et al. 2001). Enfin c-myc peut empêcher l'arrêt du cycle cellulaire en dérégulant l'expression de la cycline E. Ce qui aboutit à la répression de l'activité de P16INK4a, un inhibiteur du complexe cycline D/cdk4.

Il a été montré que c-myc ciblait des gènes codants pour des protéines impliquées dans la réPLICATION de l'ADN (Dominguez-Sola et al. 2007), la croissance et le métabolisme cellulaire (Gallant et al. 1996, Johnston et al. 1999, Gomez-Roman et al. 2003, Grandori et al. 2005, Grewal et al. 2005, Schmidt 2004).

### C-myc et instabilité génomique

La surexpression de c-myc met en danger la stabilité génomique de la cellule (Meyer & Penn 2008, Oster et al. 2002, Prochownik & Li 2007). En effet, elle a comme conséquence l'accélération de la prolifération et la réDUCTION des périodes de détection et de prise en charge des erreurs de l'ADN avant sa duplication augmentant le risque d'accumulation de mutations pouvant conférer à la cellule une résistance à l'apoptose.

En affectant le métabolisme, c-myc peut être à l'origine d'un stress réPLICATIF induisANT des lésions de l'ADN (Dominguez-Sola et al. 2007, Cole & Cowling 2008). Il va également abolir les points de contrôle durant les phases G0 et S (Felsher & Bishop 1999). Il permet de contourner tous les niveaux de sécurité et de mettre ainsi en péril la stabilité génomique de la cellule.

### C-myc et apoptose

C-myc possède également une fonction régulatrice de l'apoptose. Les mécanismes lui permettant d'induire l'apoptose ou d'y sensibiliser les cellules sont encore mal définis (Evan et al. 1992, Shi et al. 1992). Dans les lymphomes causés par c-myc, les fonctions des suppresseurs de tumeurs de la voie ATM/ARF-MDM2-p53 sont altérées. C-myc active l'expression de P19 ARF et stimule, via son effet génotoxique, ATM puis P53 (Bouchard et al. 2007, Capoulade et al. 1998, Eischen et al. 1999, Schmidt 1999). Il peut aussi affecter l'apoptose en réprimant des facteurs anti-apoptotiques de la famille bcl-2. La fonction pro-apoptotique de c-myc constitue un mécanisme de sécurité censé

prévenir la cancérisation des cellules. L'apparition d'événements mutagènes secondaires contribue à promouvoir la tumorigenèse.

### C-myc et différentiation cellulaire

C-myc est impliqué dans les phénomènes de différenciation et la régulation des cellules souches. L'expression de c-myc a un effet inhibiteur de la différenciation dans plusieurs types cellulaires (Meyer & Penn 2008, Oster et al. 2002, Pelengaris et al. 2002). C-myc possède également la faculté de transformer des cellules différencierées en cellules souches pluripotentes suite à son association à des facteurs de transcription propres aux cellules souches. Dans une population tumorale, il permet le maintien d'une sous population de cellules cancéreuses présentant une capacité d'auto-renouvellement similaire aux cellules souches.

# Chapitre 4

## 3'RR, c-myc et lymphomagenèse B

### 4.1 Dérégulation de c-myc par la 3'RR

De nombreux lymphomes B matures présentent une translocation de c-myc à différentes positions du locus IgH en fonction de l'événement génique à l'origine de celle ci. La 3'RR étant l'élément régulateur dominant aux stades tardifs du développement B, il est l'acteur critique prenant sous son contrôle l'oncogène transloqué (Vincent-Fabert et al. 2010, Pinaud et al. 2011*a*). C-myc est alors constitutivement transcrit ce qui aura pour conséquence l'augmentation de sa traduction et du taux de protéines c-myc dans la cellule. À ces évènements précurseurs viendront s'ajouter d'autres mutations collaboratives, aboutissant à l'émergence de lymphomes. Le rôle de cette région dans la dérégulation de c-myc a été mis en évidence grâce à plusieurs modèles murins décrit dans la revue ci-après.

### 4.2 Modèles murins de lymphomagnèse B

La revue ci-dessous décrit les divers modèles murins publiés montrant le rôle des deux principaux éléments régulateurs du locus IgH ( $E\mu$  et 3'RR) dans la dérégulation de c-myc et la génération de lymphomes B.





# Mouse Models of *c-myc* Deregulation Driven by IgH Locus Enhancers as Models of B-Cell Lymphomagenesis

Melissa Ferrad, Nour Ghazzaui, Hussein Issaoui, Jeanne Cook-Moreau and Yves Denizot\*

Inserm U1262, UMR CNRS 7276, Equipe Labellisée LIQUE 2018, Université de Limoges, Limoges, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Gema Perez-Chacon,  
Spanish National Cancer Research  
Center (CNIO), Spain

### Reviewed by:

Ignacio Moreno De Alborán,  
Consejo Superior de Investigaciones  
Científicas (CSIC), Spain  
Anne Corcoran,  
Babraham Institute (BBSRC),  
United Kingdom

### \*Correspondence:

Yves Denizot  
yves.denizot@unilim.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
B Cell Biology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 29 April 2020

Accepted: 15 June 2020

Published: 23 July 2020

### Citation:

Ferrad M, Ghazzaui N, Issaoui H, Cook-Moreau J and Denizot Y (2020) Mouse Models of *c-myc* Deregulation Driven by IgH Locus Enhancers as Models of B-Cell Lymphomagenesis. *Front. Immunol.* 11:1564.  
doi: 10.3389/fimmu.2020.01564

Chromosomal translocations linking various oncogenes to transcriptional enhancers of the immunoglobulin heavy chain (IgH) locus are often implicated as the cause of B-cell malignancies. Two major IgH transcriptional enhancers have been reported so far. The  $E_{\mu}$  enhancer located upstream of the  $C_{\mu}$  gene controls early events in B-cell maturation such as VDJ recombination. The 3' regulatory region (3'RR) located downstream from the  $C_{\alpha}$  gene controls late events in B-cell maturation such as IgH transcription, somatic hypermutation, and class switch recombination. Convincing demonstrations of the essential contributions of both  $E_{\mu}$  and 3'RR in B-cell lymphomagenesis have been provided by transgenic and knock-in animal models which bring the oncogene *c-myc* under  $E_{\mu}$ /3'RR transcriptional control. This short review summarizes the different mouse models so far available and their interests/limitations for progress in our understanding of human *c-myc*-induced B-cell lymphomagenesis.

**Keywords:** MYC, B-cell lymphoma, transgenic mouse models, IgH locus, IgH transcriptional enhancers

## INTRODUCTION

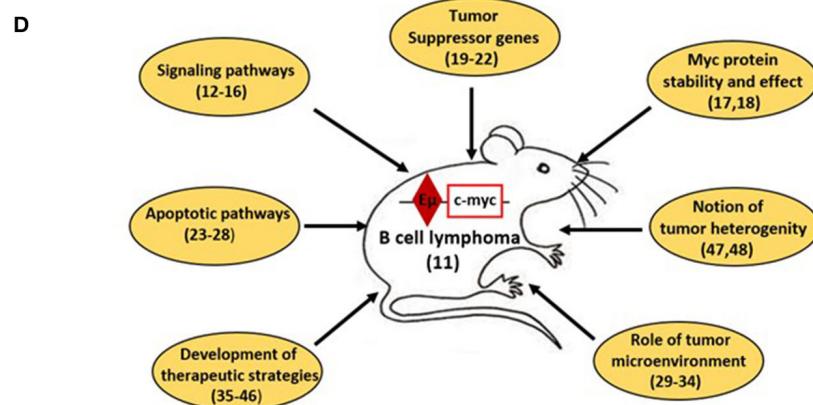
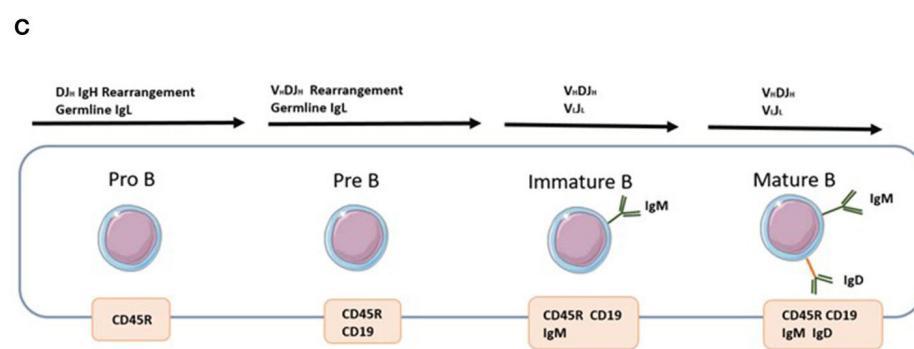
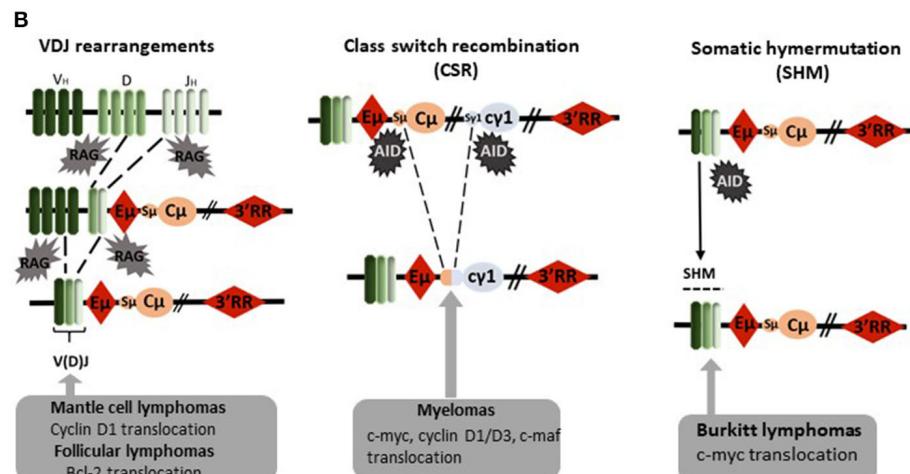
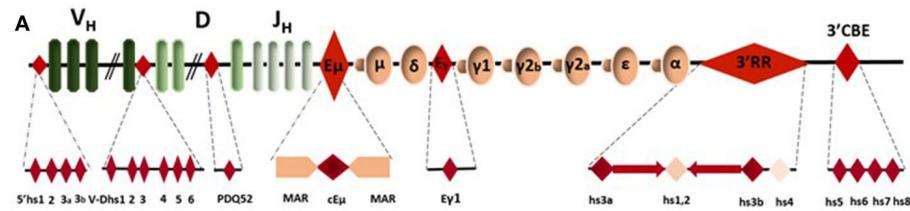
RAG-induced recombination, AID-induced DNA breaks and mutations throughout B-cell development make the IgH locus a hotspot for translocations (1) (Figures 1A,B). Bcl-2 translocation, the typical hallmark of follicular lymphomas (FL), occurs during RAG-induced VDJ recombination. Cyclin D1 translocation, associated with mantle cell lymphomas (MCL), occurs either during AID-induced somatic hypermutation (SHM) or AID-induced class switch recombination (CSR). *C-myc* translocation, the typical hallmark of Burkitt lymphoma (BL), takes place during AID-induced SHM and CSR. Finally, several translocations (such as *c-myc*, *c-maf*, *cyclin D1/D3*) found in myelomas are also related to AID-induced CSR. During CSR, AID-induced DNA double strand breaks (DSB) appear in the switch (S) donor region (usually  $S_{\mu}$ ) and in the S acceptor region (for example  $S_{\gamma 1}$  and  $S_{\alpha}$  for CSR toward IgG1 and IgA, respectively). S regions are of various lengths (for example 3.5 and 10 kb long for  $S_{\mu}$  and  $S_{\gamma 1}$ , respectively) and are unusually G-rich. AID deaminates C into U at preferential AID hotspot motifs located throughout S regions. The AID-introduced U in S region DNA is removed by UNG to generate an abasic site that is recognized by the endonuclease APE1 generating a nick. A closely spaced, similarly created nick on the opposite strand induces a staggered DSB. Translocation of the DNA fragment encompassing *c-myc* is due to an off target AID effect on the chromosome bearing *c-myc*. Since AID transforms C to U all along S donor/acceptor regions, there is no common breakpoint identified in S regions for mature B-cell lymphomas. It is the same AID effect for SHM where AID targets the VDJ rearranged segments (and up to several kB in 3') and can induce DNA DSB for *c-myc* translocation. Similarly to CSR, there is no common breakpoint established in VDJ regions for mature B-cell lymphomas.

During VDJ recombination RAG binds to recombination signal sequences adjacent to V, D, and J coding segments and induces DNA DSB. *C-myc* translocation could take place during this process. Similarly to CSR/SHM, there is no common breakpoint singled out in VDJ regions for B-cell lymphomas. The common point for all these *c-myc* translocations is the occurrence of DSB in the IgH locus during its remodeling required for B-cell repertoire formation and B-cell maturation. All remodeling events of the IgH locus (VDJ recombination, SHM, and CSR) require transcription to occur (2). Transcriptional control and remodeling of the IgH locus are under the control of several *cis*-regulatory elements located throughout the IgH locus. In the murine IgH locus seven regions of interest can be defined including *cis*-regulatory elements, matrix attachment regions (MARs), and hypersensitivity (hs) sites with potential transcriptional enhancer or insulator activity: 4 hs sites located 5' of the first V segments, 6 hs sites in the V-D intergenic region, the DQ52 promoter-enhancer, the  $E_{\mu}$  enhancer (between  $J_H$  and  $C_{\mu}$ ) and its flanking MARs, the  $\gamma 1$  enhancer element, the 3' regulatory region (3'RR) downstream from  $C_{\alpha}$  with its four enhancers (hs3a, hs1,2, hs3b, and 4) and the 3'CBE insulator region (hs5, 6, 7, 8) as the 3' boundary of the locus (Figure 1A). Two potent transcriptional enhancers act during B-cell maturation:  $E_{\mu}$  (during early B-cell maturation stages) and 3'RR (during late B-cell maturation stages) (Figure 1A). These elements obviously intervene in oncogene-induced B-cell lymphomagenesis as reported by several transgenic mouse models (using both transgene and knock-in (KI) strategies) developed in order to mimic human mature B-cell lymphomagenesis. Since *c-myc* is a key regulator of cell growth through its action on cell cycle progression, metabolism, differentiation, death receptor signaling, and DNA damage recovery, the vast majority of available models use *c-myc* as a deregulated oncogene (3). This short review describes how  $E_{\mu}$  and 3'RR enhancers might play a critical role in *c-myc* deregulation during *c-myc*-induced mature B-cell lymphomas, why these models are not silver bullets to totally mimic human B-cell lymphomagenesis and why it is possible that targeting the 3'RR would be an interesting strategy in human B-cell lymphomagenesis.

## THE $E_{\mu}$ *cis*-TRANSCRIPTIONAL IGH ENHANCER AND *c-myc* DEREGLULATION

Forty years ago,  $E_{\mu}$  was the first discovered IgH *cis*-transcriptional enhancer (4–6). It is located upstream of the  $C_{\mu}$  gene (Figure 1A).  $E_{\mu}$ -deficient mice revealed its role in controlling IgH locus access at immature B-cell stages and thus its key role for efficient VDJ recombination (7, 8). In contrast,  $E_{\mu}$  is dispensable for late B-cell maturation events such as IgH locus transcription for Ig synthesis and CSR (9, 10). In 1985, transgenic mice bearing *c-myc* coupled to the  $E_{\mu}$  enhancer were reported to consistently develop immature (pre-B) and sometimes mature B-cell lymphomas (11). Our entire knowledge of  $E_{\mu}$  involvement in *c-myc* oncogenic deregulation for B-cell lymphoma development was built from this model. Since 1985, 183 papers with “ $E_{\mu}$ -Myc mice” in their abstract have been

referenced. Of note, 153 have been published in the last 15 years showing the great interest of the scientific community for this transgenic mouse model of B-cell lymphoma. It is thus impossible in this short review to reference them all. Therefore, the authors apologize in advance for the numerous interesting manuscripts which have not been cited in the present review. Lymphomas from  $E_{\mu}$ -Myc mice range from the pre-B to the mature B-cell stages (Figure 1C). They are usually all positive for the CD45R (B220), CD19 and CD93 (AA4.1) B-cell specific markers and negative for the CD3 T-cell marker. Tumors of pre-B-cell type are characterized by the lack of membrane IgM and no Ig light chain (IgL) rearrangements. Tumors of immature B-cell types are more mature and express membrane IgM after efficient IgL rearrangements. Tumors of mature B-cell types are even more mature and express both membrane IgM and IgD. The majority of lymphomas in  $E_{\mu}$ -Myc mice are at the pre-B and immature B-cell stages. In their original study, Adams et al. (11) stated that “these *myc* mice should aid study of lymphoma development, B-cell ontogeny and Ig regulation.” Clearly 35 years later this is the case. Creation of these mice resulted in the dissection of many mechanisms implicated in B-cell lymphomagenesis (Figure 1D). They have highlighted the importance of several signaling pathways (such as Ras/Mapk, mTOR, and Akt) (12–14), several cell cycle check-points (such as Mdm2/p53/p73) (15, 16) and processes that affect *c-myc* stability and action (17, 18). Using these mice clearly demonstrated the importance of numerous (new and well-known) tumor suppressor genes (such as FoxO3, CDK4, Mtap, and Smchd1) (19–22). This model reinforced our knowledge concerning the signaling/regulation of the B-cell apoptotic program (members of the Bcl-2 family of apoptosis regulator) and deficiencies in apoptotic pathways leading to B-cell lymphomagenesis (23–28). To our knowledge the influence of genetic background in the development of B-cell lymphomas in  $E_{\mu}$ -Myc mice has not been documented. The  $E_{\mu}$ -Myc model has also opened a new area of research concerning the role of tumor microenvironment via release of angiocrine/chemokine factors (29–31) and the importance of cells from the vascular niche for NK cell surveillance, senescence, and homing of B-cell lymphomas (32–34). Perhaps most importantly, this model is at the origin of a wide number of publications investigating new therapeutic treatments or combinations of drugs in order to affect (among various targets) DNA synthesis (cytarabine, doxycytosine, cyclophosphamide), mTOR signaling (rapamycin analogs), microtubule formation (vincristine), *c-myc* (decursin), apoptosis (venetoclax and BET inhibitors), protein synthesis (silvestrol), or B-cell receptor (BCR)-induced, or chemokine-mediated signaling (ibrutinib) (35–42). The rapid occurrence of lymphoma in  $E_{\mu}$ -Myc mice and its high penetrance make this mouse model an accurate, reliable, easy, and fast experimental model not only to test new therapeutic approaches but also combinatory associations. This model is also unique by providing the possibility to monitor the assay of new NK therapeutic vaccination strategies (43, 44), to stimulate immune defenses for tumor rejection (45) and to test protocols for monoclonal antibody therapies (46).  $E_{\mu}$ -Myc mice have thus proven their great potential as a model to study human B-cell lymphomagenesis during the



**FIGURE 1 |** *E<sub>μ</sub>-Myc* mice as a model of B-cell lymphomagenesis. **(A)** Schematic diagrams of the mouse IgH locus. Locations of the various IgH cis-regulatory elements with enhancer or insulator activity are reported: four hs sites located 5' of the first V segments, six hs sites in the V-D intergenic region, the DQ52

Continued)

**FIGURE 1 |** promoter-enhancer, the  $E_{\mu}$  enhancer (the core region ( $cE_{\mu}$ ) and its flanking MARs), the  $\gamma 1$  enhancer, the 3' regulatory region (3'RR) [four enhancers (namely hs3a, hs1,2, hs3b, and 4) with flanking inverted repeats] and the 3'CBE insulator region (hs5, 6, 7, and 8) as the 3' boundary of the locus. **(B)** Schematic representation of oncogene translocation affecting the IgH locus during VDJ recombination, CSR and SHM. Arrows indicate the site of oncogene translocation found during follicular lymphomas, mantle cell lymphomas, myelomas, and Burkitt lymphomas. **(C)** Schematic representation of B-cell development from pro-B to mature B-cells. Lymphomas from  $E_{\mu}$ -Myc mice are from the pre-B to the mature B-cell stages. The immature B-cell stage is characterized by the expression of membrane IgM whereas membrane IgD occurs at the mature B-cell stage. **(D)** Schematic representation of the various field of research developed with  $E_{\mu}$ -Myc mice. Bibliographic references are reported (number in parenthesis).

past decade. Moreover, arising lymphomas are heterogeneous (47, 48) mirroring genomic differences observed between human BL, germinal center B-cell lymphomas (GCBCL), activated B-cell lymphomas (ABCL), and diffuse large B-cell lymphomas (DLBCL). The different genomic signatures (toward specific proliferative and/or apoptotic pathways) of B-cell lymphomas in  $E_{\mu}$ -Myc mice might be used as biomarkers of response against specific therapeutic strategies. Thus, and especially with the development of transcriptomic tools,  $E_{\mu}$ -Myc mice can serve as relevant model for human B-cell lymphoma subtype experimental or associated treatments. The only but nevertheless major drawback of  $E_{\mu}$ -Myc mice relates to the window of activity for  $E_{\mu}$  which has been clearly demonstrated to occur at the immature pro-B/pre-B B-cell stages (49, 50).  $E_{\mu}$  is not implicated in IgH hypertranscription occurring at the mature/plasma cell stages.  $E_{\mu}$  is also not implicated in DNA breaks occurring during SHM/CSR and thus clearly not implicated in oncogenic translocation induced by off target AID action occurring during CSR or SHM in the majority of human mature B-cell lymphoma subtypes. As confirmation of this fact, the great majority of lymphomas from  $E_{\mu}$ -Myc mice have a pre-B/immature B-cell stage.

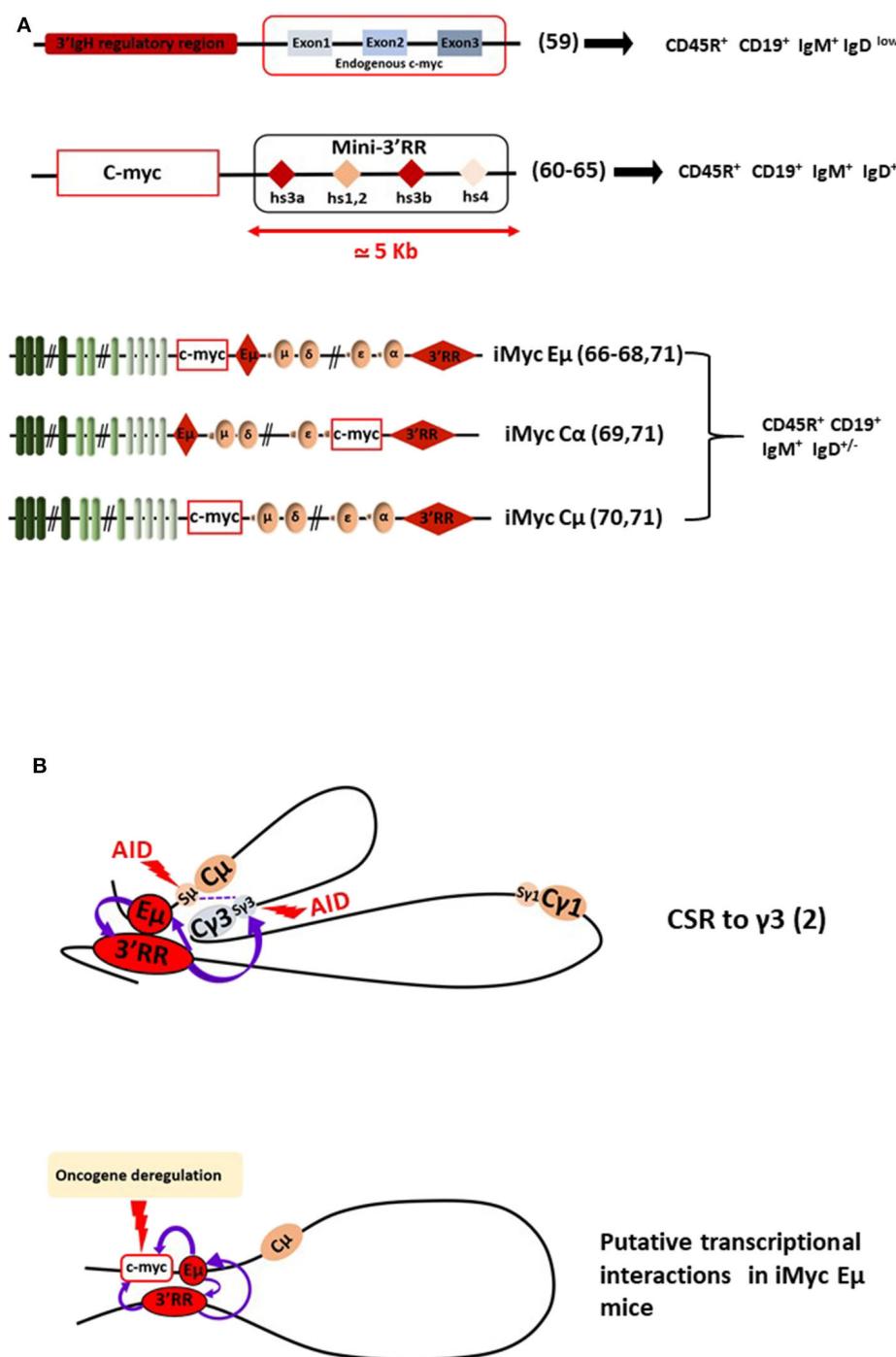
## THE 3'RR *cis*-TRANSCRIPTIONAL IgH ENHANCER AND *c-myc* DEREGLULATION

The second transcriptional enhancer located in the IgH locus is the 3'RR (Figure 1). The 3'RR is a complex element with four transcriptional enhancers (namely hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) encompassed in a unique and functional 3D palindromic architecture (51). The 3'RR controls  $\mu$  transcription (7), CSR (52, 53), and SHM (54) in mature B-cells. The transcriptional activity of the 3'RR occurs from pre-B to mature B-cell stages (55) and thus has a much larger window of activity than the  $E_{\mu}$  enhancer. In 1994, Madisen and Groudine reported (in stable transfection assays in plasmacytomas and BL cells) that the 3'RR was efficient and sufficient to deregulate *c-myc* transcription (56). Convincing demonstration of 3'RR involvement in lymphomagenesis has been produced by a transgenic 3'RR-deficient model of B-cell lymphomas with IgH-*c-myc* translocations (57). The integrity of the 3'RR (deletion of hs3b to hs4) has been shown to be dispensable for development of pro-B-cell lymphomas with V(D)J recombination-initiated translocations suggesting the key role of  $E_{\mu}$ . In contrast, 3'RR integrity (for its optimal transcriptional activity) is required for B-cell lymphomas with CSR-associated translocations (57). In another study modeling murine plasmacytomas with T (12, 15)

translocations, the same hs3b-hs4 deletion of the 3'RR in Bcl-xL transgenic mice was without effect for *Myc* deregulation and mouse plasmacytoma generation (58). However, total 3'RR deletion in these plasmacytomas lowered Myc expression and cell growth confirming 3'RR involvement for *myc* deregulation by T (12, 15). Nevertheless, these models are not sufficient to monitor in detail and to modulate signaling pathways for B-cell lymphoma development. The same comments can be made for the transgenic mouse model of Wang and Boxer (59) which develops mature B-cell lymphomas ( $CD19^+ B220^+ IgM^+ IgD^{low}$ ) after the KI of a 3'RR cassette upstream of the endogenous *c-myc* gene (this model is the reverse of natural *c-myc* translocation into the human IgH locus) (Figure 2). More than 15 years after the development of transgenic  $E_{\mu}$ -Myc mice, transgenic *Myc*-3'RR mice were generated and were shown to develop BL-like proliferations and diffuse anaplastic B-cell lymphomas (60). All these lymphomas exhibited a mature B-cell phenotype ( $CD19^+ B220^+ IgM^+ IgD^+$ ) but differed by their Ki67 status (low and high for diffuse anaplastic B-cell lymphomas and BL lymphomas, respectively). This model was used to study the role of second hits such as p53 deficiency, Cdk4 mutation, and change of class-specific B cell receptor (BCR) tonic signals. Results clearly demonstrated that a second hit affects the phenotype of B-cell lymphomas, their aggressiveness and transcriptomic signatures differently (61–64). This model was, however, progressively abandoned due to its medium B-cell lymphoma penetrance (compared to  $E_{\mu}$ -Myc mice), long delay for B-cell lymphoma development (compared to  $E_{\mu}$ -Myc mice), key differences with human B-cell lymphomas (such as mutations lacking for the p53-ARF-Mdm2 apoptotic pathways in numerous cases) and the description that the occurrence of B-cell lymphomas was much too sensitive to genetic background [C57Bl/6 mice developed BL-like lymphomas while none occurred in a Balb/c background (65)]. All these points argued against the use of *Myc*-3'RR mice as an accurate experimental model to test new pharmacologic or vaccination strategies.

## THE COMBINATION OF $E_{\mu}$ AND 3'RR *cis*-TRANSCRIPTIONAL ENHANCERS AND *c-myc* DEREGLULATION

As reported above, a transgenic model with IgH-*c-myc* translocations in response to pristine demonstrated the involvement of IgH *cis*-transcriptional enhancers in B-cell lymphomagenesis (57). In another manner, this study confirmed results obtained with three transgenic mouse models with a *c-myc* KI in various locations in the IgH locus (i.e., under the



**FIGURE 2 |** The 3'RR and B-cell lymphomagenesis. **(A)** Schematic representation of several transgenic mouse models reporting *c-myc* 3'RR-driven deregulation leading to B-cell lymphomagenesis. B-cell lymphoma phenotypes are reported. Bibliographic references are reported (number in parenthesis). The “Mini-3'RR” contains the four transcriptional enhancers hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4 but not the 3'RR palindromic sequences flanking hs1,2 and the DNA sequence between hs3a and hs4. **(B)** Long-range loop interactions between chromatin segments of the IgH locus comprise the mechanism of normal gene transcription regulation by the E<sub>μ</sub> and 3'RR transcriptional enhancers. The example of the IgG<sub>3</sub> CSR process is schematized. Putative long-range interactions leading to *c-myc* oncogene deregulation in iMycE<sub>μ</sub> mice are schematized.

dependence of both E<sub>μ</sub> and 3'RR elements) (Figure 2). These models provided the most convincing data for the essential roles of both E<sub>μ</sub> and 3'RR in *c-myc* B-cell lymphomagenesis.

The KI of *c-myc* in the mouse IgH locus just 5' to E<sub>μ</sub> (namely iMycE<sub>μ</sub> mice), thus modeling human endemic BL, induced, as expected, B-cell lymphoma development with alterations

in the p19<sup>Arf</sup>-Mdm2-p53 tumor suppressor axis (66) and NF?B/STAT3/PI3K signaling (67). In this model, *c-myc* is under the control of both E<sub>μ</sub> and 3'RR at immature and mature B-cell stages, respectively. iMycE<sub>μ</sub> mice also mimic T (12, 15) mouse plasmacytoma translocation and thus also lead to plasmacytomas (68). KI of *c-myc* directly into C<sub>α</sub> just 5' to the 3'RR (iMycC<sub>α</sub> mice) produced B-cell lymphomas with low kinetics which were increased after overexpression of the anti-apoptotic Bcl-X<sub>L</sub> gene (69). In this model, *c-myc* is located in a site where E<sub>μ</sub> has no transcriptional influence, *c-myc* transcription being only under the dependence of 3'RR at mature B-cell stages. *c-myc* KI in the mouse IgH locus just 5' to C<sub>μ</sub> with E<sub>μ</sub> deletion (namely iMycC<sub>μ</sub> mice), thus modeling human sporadic BL, confirmed that 3'RR alone is sufficient to deregulate *c-myc* in the B-cell lineage and to induce B-cell lymphoma development (70). Taken altogether, these KI models carrying *c-myc* at the IgH locus are prone to B-cell lymphomas of various penetrance, kinetics, and fate as recently reported in a study comparing the three mouse models (71). The lymphoma signatures are also heterogeneous even comparing lymphomas from a specific KI, mirroring the genomic differences observed between the various subtypes of human mature B-cell lymphomas and those previously reported with the model of transgenic E<sub>μ</sub>-Myc mice. In our opinion, these transgenic mouse models represent the “most physiological” experimental mouse models by mimicking the direct effect of *c-myc* in the context of the endogenous IgH locus. However, the main drawbacks of these various KI mice (and similarly to Myc-3'RR mice) remain their low lymphoma penetrance and their low kinetics of B-cell lymphoma development arguing against their use as efficient and easy experimental models to test new experimental therapeutic approaches. The low kinetics of B-cell lymphoma development compared with 3'RR-Myc mice would be related to the 3'CBE insulator region at the 3' boundary of the endogenous IgH locus (72, 73). This region is not present in the transgenic mouse model of 3'RR-induced *c-myc* deregulation. The 3'CBE insulator region contains a high density of binding sites for CCCTC-binding factor (CTCF), a protein associated with mammalian insulator activity. Deletion of the 3'CBE insulator region resulted in significant effects on VDJ rearrangement, IgH locus compaction, and IgH locus insulation. Furthermore, physical interactions occur in B-cells between 3'CBE and 3'RR enhancers suggesting that the entire 3' region (3'RR enhancers + 3'CBE insulators) works as a physical unit. The lack of 3'CBE in 3'RR-Myc mice could induce stronger and longer *c-myc* deregulation (and thus faster lymphoma emergence) than that obtained when *c-myc* is inserted

into the IgH locus under the control of the entire (enhancer + insulator) region.

## CONCLUSION

Knock-out mice models have clarified the functions of E<sub>μ</sub> and 3'RR enhancers as essential for DNA remodeling and IgH locus transcription at specific stages of B-cell development and maturation. Thus, these enhancers have a major potential to be oncogene deregulators for IgH-translocated oncogenes, even when the breakpoints lie several 100 kb away from them. All these models contribute different but interesting data to our understanding of human B-cell lymphoma development and treatments especially with regards to the great functional and structural similarities found between human and mouse IgH loci (74). However, we must keep in mind that these mice are experimental models that do not reflect 100% of what happens in humans. For example, if the vast majority of human mature B-cell lymphomas are mutated in their VDJ region (highlighting their post-germinal center status) it is not the case in mice where mature B-cell lymphomas are unmutated (highlighting their pre-germinal center status) (75). Long-range loop interactions between chromatin segments of the IgH locus comprise the mechanism of normal and abnormal gene transcription regulation by the 3'RR (2, 76) (**Figure 2B**). Therefore, it is possible to suggest that targeted inhibition of the 3'RR would be a therapeutic approach for the treatment of some mature B-cell lymphomas. Finally, it is also of importance to mention that the *c-myc* oncogene driven by Ig light chain enhancers also induces B-cell lymphoid malignancy in transgenic mice (11, 77). These models highlight not only the importance of all Ig enhancers for B-cell lymphoma development but also that a 3'RR targeting strategy (if any) would not be a silver bullet to treat all B-cell lymphomas but at best some mature B-cell subtypes.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

## FUNDING

This work was supported by grants from Equipe Labellisée LIGUE 2018 and ANR Episwitch 2016. MF was supported by a grant from Université de Limoges and Région Nouvelle Aquitaine. NG and HI were supported by ANR Episwitch 2016.

## REFERENCES

1. Lieber MR. Mechanisms of human lymphoid chromosomal translocations. *Nat Rev Cancer*. (2016) 16:387–98. doi: 10.1038/nrc.2016.40
2. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Peron 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. doi: 10.1016/B978-0-12-387663-8.002-8
3. Kuzyk A, Mai S. C-MYC induced genomic instability. *Cold Spring Harb Perspect Med*. (2014) 4:a014373. doi: 10.1101/cshperspect.a014373
4. Alt FW, Rosenberg N, Casanova RJ, Thomas E, Baltimore D. Immunoglobulin heavy-chain expression and class switching in a murine leukaemia cell line. *Nature*. (1982) 296:325–331. doi: 10.1038/296325a0
5. Gillies SD, Morrison SL, Oi VT, Tonegawa S. A tissue-specific transcription element is located in the major

- intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell.* (1983) 33:717–28. doi: 10.1016/0092-8674(83)90014-6
6. Banerji J, Olson L, Schaffner W. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell.* (1983) 33:729–40. doi: 10.1016/0092-8674(83)90015-6
  7. Perlot T, Alt FW, Bassing CH, Heikyung S, Pinaud E. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2005) 102:14362–7. doi: 10.1073/pnas.0507090102
  8. Marquet M, Garot A, Bender S, Carrion C, Rouaud P, Lecardeur S, et al. The E $\mu$  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. doi: 10.4049/jimmunol.1302868
  9. Saintamand A, Rouaud P, Garot A, Carrion C, Oblet C, Cogné M, et al. The IgH 3' regulatory region governs  $\mu$  chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget.* (2015) 6:4845–52. doi: 10.18632/oncotarget.3010
  10. Issaoui H, Ghazzau I, Ferrad M, Boyer F, Denizo Y. Class switch recombination junctions are not affected by the absence of the immunoglobulin heavy chain E $\mu$  enhancer. *Cell Mol Immunol.* (2019) 16:671–3. doi: 10.1038/s41423-019-0229-x
  11. Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, Corcoran LM, Alexander W, Cory S, et al. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature.* (1985) 318:533–8. doi: 10.1038/318533a0
  12. Hussain S, Bedekovics T, Liu Q, Hu W, Jeon H, Johnson H, et al. UCH-L1 bypasses mTOR to promote protein biosynthesis and is required for MYC-driven lymphomagenesis in mice. *Blood.* (2018) 132:2564–74. doi: 10.1182/blood-2018-05-848515
  13. Hussain S, Foreman O, Perkins SL, Witzig TE, Miles RR, van Deursen J, et al. The de-ubiquitinase UCH-L1 is an oncogene that drives the development of lymphoma *in vivo* by deregulating PHLPP1 and Akt signaling. *Leukemia.* (2010) 24:1641–55. doi: 10.1038/leu.2010.138
  14. Gramling MW, Eischen CM. Suppression of Ras/Mapk pathway signaling inhibits Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ.* (2012) 19:1220–7. doi: 10.1038/cdd.2012.1
  15. Nemajerova A, Petrenko O, Trümper L, Palacios G, Moll UM. Loss of p73 promotes dissemination of Myc-induced B cell lymphomas in mice. *J Clin Invest.* (2010) 120:2070–80. doi: 10.1172/JCI40331
  16. Odvody J, Vincent T, Arrate M, Pgrieb B, Wang S, Garriga J, et al. A deficiency in Mdm2 binding protein inhibits Myc-induced B-cell proliferation and lymphomagenesis. *Oncogene.* (2010) 29:3287–96. doi: 10.1038/onc.2010.82
  17. Chen J, Shin JH, Zhao R, Phan L, Wang H, Xue Y, et al. CSN6 drives carcinogenesis by positively regulating Myc stability. *Nat Commun.* (2014) 5:5384. doi: 10.1038/ncomms6384
  18. Wong DM, Li L, Jurado S, King A, Bamford R, Wall M, et al. The transcription factor ASCIZ and its target DYNLL1 are essential for the development and expansion of MYC-driven B cell lymphoma. *Cell Rep.* (2016) 14:1488–99. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.012
  19. Kadariya Y, Tang B, Wang L, Al-Saleem T, Hayakawa K, Slifker MJ, et al. Germline mutations in *Mtap* cooperate with Myc to accelerate tumorigenesis in mice. *PLoS ONE.* (2013) 8:e67635. doi: 10.1371/journal.pone.0067635
  20. Leong HS, Kelan C, Hilton DJ, Blewitt ME, Yifang HU, Lee S, et al. Epigenetic regulator Smchd1 functions as a tumor suppressor. *Cancer Res.* (2012) 73:1591–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3019
  21. Lu Y, Wu Y, Feng X, Shen R, Wang JH, Fallahi M, et al. CDK4 deficiency promotes genomic instability and enhances Myc-driven lymphomagenesis. *J Clin Invest.* (2014) 124:1672–84. doi: 10.1172/JCI63139
  22. Vandenberg CJ, Motoyama N, Cory S. FoxO3 suppresses Myc driven lymphomagenesis. *Cell Death Dis.* (2016) 7:e2046. doi: 10.1038/cddis.2015.396
  23. Olive V, Sabio E, Bennett MJ, De Jong CS, Biton A, McGann JC, et al. A component of the mir-17-92 polycistronic oncomir promotes oncogene-dependent apoptosis. *eLife.* (2013) 2:e00822. doi: 10.7554/eLife.00822
  24. Chu B, Kon N, Chen D, Li T, Liu T, Jiang L, et al. ALOX12 is required for p53-mediated tumour suppression through a distinct ferroptosis pathway. *Nat Cell Biol.* (2019) 21:579–91. doi: 10.1038/s41556-019-0305-6
  25. Takahashi Y, Young MM, Serfass JM, Hori T, Wang HG. Sh3glb1/Bif-1 and mitophagy. *Autophagy.* (2013) 9:1107–9. doi: 10.4161/auto.24817
  26. Tuzlak S, Haschka MD, Mokina AM, Rülicke T, Cory S, Labi V, et al. Differential effects of Vav-promoter-driven overexpression of BCLX and BFL1 on lymphocyte survival and B cell lymphomagenesis. *FEBS J.* (2018) 285:1403–18. doi: 10.1111/febs.14426
  27. Sochalska M, Schuler F, Weiss JG, Prchal-Murphy M, Sexl V, Villunger A. MYC selects against reduced BCL2A1/A1 protein expression during B-cell lymphomagenesis. *Oncogene.* (2017) 36:2066–73. doi: 10.1038/onc.2016.362
  28. Nguyen HV, Vandenberg CJ, Ng AP, Robati MR, Anstee NS, Rimes J, et al. Development and survival of MYC-driven lymphomas require the Myc antagonist MNT to curb MYC-induced apoptosis. *Blood.* (2020) 135:1019–31. doi: 10.1182/blood.2019003014
  29. Vecchio E, Fiume G, Mignogna C, Iaccino E, Mimmi S, Maisano D, et al. IBTK haploinsufficiency affects the tumor microenvironment of Myc-driven lymphoma in E-myc mice. *Int J Mol Sci.* (2020) 21:885. doi: 10.3390/ijms21030885
  30. Rehm A, Mensen A, Schradt K, Gerlach K, Wittstock S, Winter S, et al. Cooperative function of CCR7 and lymphotoxin in the formation of a lymphoma-permissive niche within murine secondary lymphoid organs. *Blood.* (2011) 118:1020–33. doi: 10.1182/blood-2010-11-321265
  31. Cao Z, Ding BS, Guo P, Lee SB, Butler JM, Casey C, et al. Angiocrine factors deployed by tumor vascular niche induce B cell lymphoma invasiveness and chemoresistance. *Cancer Cell.* (2014) 25:350–65. doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.005
  32. Reimann M, Lee S, Loddenkemper C, Dorr JR, Tabor V, Aichele P, et al. Tumor stroma-derived TGF- $\beta$  limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer Cell.* (2010) 17:262–72. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.043
  33. Sauer M, Schuldner M, Hoffmann N, Cetintas A, Reiners KS, Shatnayeva O, et al. CBP/p300 acetyltransferases regulate the expression of NKG2D ligands on tumor cells. *Oncogene.* (2017) 36:933–41. doi: 10.1038/onc.2016.259
  34. Rehm A, Gätjen M, Gerlach K, Scholz F, Mensen A, Gloger M, et al. Dendritic cell-mediated survival signals in E $\mu$ -Myc B-cell lymphoma depend on the transcription factor C/EBP $\mu$ . *Nat Comm.* (2014) 5:5057. doi: 10.1038/ncomms6057
  35. Lasorsa E, Smonksey M, Kirk JS, Rosario S, Hernandez-Ilizaliturri FJ, Ellis L, et al. Mitochondrial protection impairs BET bromodomain inhibitor-mediated cell death and provides rationale for combination therapeutic strategies. *Cell Death Dis.* (2015) 6:e2014. doi: 10.1038/cddis.2015.352
  36. Hogg SJ, Newbold A, Vervoort SJ, Cluse LA, Martin BP, Gregory P, et al. BET inhibition induces apoptosis in aggressive B-cell lymphoma via epigenetic regulation of BCL-2 family members. *Mol Cancer Ther.* (2016) 15:2030–41. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0924
  37. Lin CJ, Robert F, Sukarieh R, Michnick S, Pelletier J. The antidepressant sertraline inhibits translation initiation by curtailing mammalian target of rapamycin signaling. *Cancer Res.* (2010) 70:3199–208. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4072
  38. Rava M, D'Andrea A, Nicoli P, Grittì I, Donati G, Doni M, et al. Therapeutic synergy between tigecycline and venetoclax in a preclinical model of Myc/BCL2 double-hit B cell lymphoma. *Sci Transl Med.* (2018) 10:eaan8723. doi: 10.1126/scitranslmed.aan8723
  39. Ross J, Rashkovian M, Fraszczak J, Beauparlant CJ, Vadnais C, Winkler R, et al. C and B-ALL/lymphoma mouse models. *Cancer Res.* 79:4184–95. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3038
  40. Reiff SD, Mantel R, Smith LL, Greene JT, Muñoz EM, Fabian A, et al. The BTK inhibitor ARQ531 targets ibrutinib-resistant CLL and Richter transformation. *Cancer Discov.* (2018) 8:1300–15. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1409
  41. Wall M, Poortinga G, Stanley KL, Lindemann RK, Bots M, Chan J, et al. The mTORC1 inhibitor everolimus prevents and treats em-Myc lymphoma by restoring oncogene-induced senescence. *Cancer Discov.* (2013) 3:82–95. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0404
  42. Rodrigo M, Cencic R, Roche SP, Pelletier J, Porco JA Jr. Synthesis of rocamamide hydroxamates and related compounds as eukaryotic translation inhibitors: synthetic and biological studies. *J Med Chem.* (2012) 55:558–62. doi: 10.1021/jm201263k
  43. Mattarollo SR, West AC, Steegh K, Duret H, Paget C, Martin B, et al. NKT cell adjuvant-based tumor vaccine for treatment

- of myc oncogene-driven mouse B-cell lymphoma. *Blood*. (2012) 120:3019–29. doi: 10.1182/blood-2012-04-426643
44. Kobayashi T, Doff BL, Rearden RC, Leggatt GR, Mattarollo SR. NKT cell-targeted vaccination plus anti-4-1BB antibody generates persistent CD8 T cell immunity against B cell lymphoma. *Oncol Immunol*. (2015) 4:e990793. doi: 10.4161/2162402X.2014.990793
45. Croxford JL, Tang ML, Pan MF, Huang CW, Kamran N, Phua M, et al. ATM-dependent spontaneous regression of early Eμ-myc-induced murine B-cell leukemia depends on natural killer and T cells. *Blood*. (2013) 121:2512–21. doi: 10.1182/blood-2012-08-449025
46. Westwood JA, Matthews GM, Shortt J, Faulkner D, Pegram HJ, Duong P, et al. Combination anti-CD137 and anti-CD40 antibody therapy in murine myc-driven hematological cancers. *Leukemia Res*. (2014) 38:948–54. doi: 10.1016/j.leukres.2014.05.010
47. Johnston HE, Carter MJ, Cox KL, Dunscombe M, Manousopoulou A, Townsend A, et al. Integrated cellular and plasma proteomics of contrasting B-cell cancers reveals common unique and systemic signatures. *Mol Cell Proteomics*. (2017) 16:386–406. doi: 10.1074/mcp.M116.063511
48. Rempel RE, Jiang X, Fullerton P, Tan TZ, Ye J, Lau A, et al. Utilization of the Eμ-Myc mouse to model heterogeneity of therapeutic response. *Mol Cancer Ther*. (2014) 13:3219–29. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0044
49. Guglielmi L, Truffinet V, Carrion C, Le Bert M, Cogné N, Cogné M, et al. The 5'HS4 insulator element is an efficient tool to analyse the transient expression of an Eμ-GFP vector in a transgenic mouse model. *Trans Res*. (2005) 14:361–4. doi: 10.1007/s11248-005-3239-7
50. Ghazzaui N, Issaoui H, Boyer F, Martin OA, Saintamand A, Denizot Y. 3'RR and 5'Eμ immunoglobulin heavy chain enhancers are independent engines of locus remodeling. *Cell Mol Immunol*. (2019) 16:198–200. doi: 10.1038/s41423-018-0171-3
51. Saintamand A, Vincent-Fabert C, Garot A, Rouaud P, Oruc Z, Magnone V, et al. Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region. *Nat Commun*. (2016) 7:10730. doi: 10.1038/ncomms10730
52. 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) 116:1895–98. doi: 10.1182/blood-2010-01-264689
53. 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. doi: 10.1038/ncomms8084
54. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, 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. doi: 10.1084/jem.20130072
55. Guglielmi L, Le Bert M, Truffinet V, Cogné M, Denizot Y. Insulators to improve expression of a 3'IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models. *Biochem Biophys Res Commun*. (2003) 307:466–71. doi: 10.1016/S0006-291X(03)01185-9
56. Madisen L, Groudine M. 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*. (1994) 8:2212–26. doi: 10.1101/gad.8.18.2212
57. 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) 462:803–8. doi: 10.1038/nature08633
58. Kovalchuk AL, Sakai T, Qi CF, Du Bois W, Dunnick WA, Congé M, et al. (2018) 3'Igh enhancers hs3b/hs4 are dispensable for Myc deregulation in mouse plasmacytomas with T(12;15) translocations. *Oncotarget*. 9:34528–42. doi: 10.18632/oncotarget.26160
59. 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*. (2006) 280:12766–73. doi: 10.1074/jbc.M412446200
60. Truffinet V, Pinaud E, Cogné N, Petit B, Guglielmi L, Cogné M, 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. doi: 10.4049/jimmunol.179.9.6033
61. Fiancette R, Rouaud P, Vincent-Fabert C, Laffleur B, Magnone V, Cogné M, et al. 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) 187:5772–82. doi: 10.4049/jimmunol.1102059
62. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Rouaud P, Baudet C, Truffinet V, Magnone V, et al. 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) 180:1688–701. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.01.004
63. Rouaud P, Fiancette R, Vincent-Fabert C, Magnone V, Cogné M, Dubus P, et al. Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53+/- mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget*. (2012) 3:586–93. doi: 10.18632/oncotarg.474
64. Amin R, Marfak A, Pangault C, Oblet C, Chanut A, Tarte K, et al. 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
65. 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:e203–6. doi: 10.1016/j.leukres.2009.05.018
66. Park SS, Kim JS, Tessarollo L, Owens JD, Peng L, Su Han S, et al. Insertion of c-Myc into IgH induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res*. (2005) 65:1306–15. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0268
67. Han SS, Yun H, Son DJ, Tompkins VS, Peng L, Chung T, et al. NF-kappaB/STAT3/PI3K signaling crosstalk in iMyc E mu B lymphoma. *Mol Cancer*. (2010) 9:97. doi: 10.1186/1476-4598-9-97
68. Park SS, Shaffer AL, Kim JS, Dubois W, Potter M, Staudt M, et al. Insertion of Myc into IgH accelerates peritoneal plasmacytomas in mice. *Cancer Res*. (2005) 65:7644–52. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1222
69. Cheung WC, Kim JS, Linden M, Peng L, Van Ness B. Novel targeted deregulation of c-myc cooperates with Bcl-XL to cause plasma cell neoplasms in mice. *J Clin Invest*. (2004) 113:1763–73. doi: 10.1172/JCI200420369
70. Rosean TR, Holman CJ, Tompkins VS, Jing X, Krasowski MD, Rose-John S, et al. KSHV-encoded vIL6 collaborates with deregulated c-MYC to drive plasmablastic neoplasm in mice. *Blood Cancer J*. (2016) 6:e398. doi: 10.1038/bcj.2016.6
71. Ghazzaui N, Issaoui H, Ferrad M, Carrion C, Cook-Moreau J, Denizot Y, et al. Eμ and 3'RR transcriptional enhancers of the IgH locus cooperate to promote c-myc-induced mature B-cell lymphomas. *Blood Adv*. (2020) 4:28–39. doi: 10.1182/bloodadvances.201900845
72. Volpi SA, Verma-Gaur J, Hassan R, Ju Z, Roa S, Chatterjee S, et al. Germline deletion of IgH 3' regulatory region elements hs 5, 6, 7 (hs5–7) affects B cell-specific regulation, rearrangement, and insulation of the IgH locus. *J Immunol*. (2012) 188: 2556–66. doi: 10.4049/jimmunol.1102763
73. Birshstein BK. Epigenetic regulation of individual modules of the immunoglobulin heavy chain locus 3' regulatory region. *Front Immunol*. (2014) 5:163. doi: 10.3389/fimmu.2014.00163
74. 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. doi: 10.1186/1471-2148-11-71
75. Saintamand A, Garot A, Saad F, Moulinas R, Denizot Y. Pre-germinal center origin for mature mouse B cell lymphomas: a major discrepancy with human mature lymphomas. *Cell Cycle*. (2015) 14:3656–8. doi: 10.1080/15384101.2015.1093708
76. Duan H, Xiang H, Ma L, Boxer LM. Functional long-range interactions of the IgH 3' enhancers with the bcl-2 promoter region in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene*. (2008) 27:6720–8. doi: 10.1038/onc.2008.286

77. Kovalchuk AL, Qi CF, Torrey TA, Tadesse-Heath L, Feigenbaum L, Park SS, et al. Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med.* (2000) 192:1183–90. doi: 10.1084/jem.192.8.1183

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Ferrad, Ghazzaui, Issaoui, Cook-Moreau and Denizot. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



# Troisième partie

## Résultats

## Article 1 : $E\mu$ and 3'RR transcriptional enhancers of the IgH locus cooperate to promote c-myc-induced mature B-cell lymphomas

La majorité des lymphomes B humains est caractérisée par une translocation oncogénique au locus IgH. Ces oncogènes transloqués passent alors sous le contrôle transcriptionnel des principaux éléments régulateurs du locus IgH : l'élément intronique  $E\mu$  et la 3'RR.

L'objectif de cette étude était de comprendre le rôle de ces deux éléments et leur potentielle collaboration lors de la lymphomagenèse B.

Dans ce travail nous avons utilisé trois modèles murins développés par le laboratoire du Pr Janz (Université Iowa, US). Ils consistent en des insertions, par KI, de l'oncogène c-myc à différentes positions du locus IgH :

Souris Cmyc- $E\mu$  : c-myc est inséré en 5' de l'élément intronique  $E\mu$  comme lors du Burkitt endémique.

Souris Cmyc- $C\mu$  : c-myc est inséré en 5' du gène constant  $C\mu$  avec déletion d' $E\mu$  comme lors du Burkitt sporadique.

Souris Cmyc- $C\alpha$  : c-myc est inséré dans le gène constant  $C\alpha$  mimant partiellement certains types de myélomes.

Nous avons analysé, dans les cellules B, les modifications que pouvait induire l'insertion de c-myc au locus IgH sur le taux de transcript et l'expression de la protéine c-myc, ainsi que son impact sur leur prolifération et l'apoptose. Nous nous sommes également intéressés aux conséquences de l'insertion de cet oncogène sur le développement de lymphomes B et le devenir du lymphocyte B. La cinétique d'émergence des tumeurs dans les trois modèles a été suivie durant deux ans, nous renseignant sur la participation et la coopération de ces deux enhancers ( $E\mu$  et 3'RR) dans la dérégulation de c-myc.

Nos principaux résultats sont les suivants :

1. Les tumeurs apparaissent plus rapidement dans le modèle Cmyc- $E\mu$  où l'oncogène est sous le contrôle des deux enhancers  $E\mu$  et 3'RR indiquant une action conjointe sur l'oncogène transloqué. Le développement de tumeurs par le modèle Cmyc- $C\mu$  démontre que la 3'RR seule est capable de déréguler l'oncogène

transloqué induisant l'émergence de lymphomes.

2. L'analyse phénotypique des tumeurs développées montre une majorité de lymphomes B matures IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> sans différence significative entre les trois modèles.
3. L'analyse transcriptomique des lymphomes matures permet de distinguer deux groupes : Le premier minoritaire présente une signature moléculaire similaire à celle de LB activés, avec une prévalence des voies de régulation immunitaire, le second, majoritaire, présente un profil transcriptionnel Burkitt-like caractérisé par un enrichissement des voies impliquées dans le cycle cellulaire et le métabolisme.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer l'action d'E $\mu$  et/ou de la 3'RR sur l'oncogène c-myc inséré au locus IgH. Leur effet cumulé ou l'action seule de la 3'RR sont capables de déréguler la transcription de cet oncogène indépendamment de sa position sur le locus. La surexpression de c-myc constitue un événement initiateur pour le développement de lymphomes majoritairement IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> et dont la signature transcriptome est proche de celle du lymphome de Burkitt humain.



# $E_{\mu}$ and 3'RR transcriptional enhancers of the IgH locus cooperate to promote c-myc–induced mature B-cell lymphomas

Nour Ghazzaui,\* Hussein Issaoui,\* Mélissa Ferrad,\* Claire Carrion, Jeanne Cook-Moreau, Yves Denizot,<sup>†</sup> and François Boyer<sup>†</sup>

Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 7276, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1262, Equipe Labelisée Ligue 2018, Université de Limoges, Limoges, France

## Key Points

- Transcriptional cooperation between IgH  $E_{\mu}$  and 3'RR enhancers is found during B-cell lymphomagenesis in IgH-c-myc mice.
- Transcriptome analysis reveals wide similarities between human and mouse Burkitt B-cell lymphomas.

Numerous B-cell lymphomas feature translocations linking oncogenes to different locations in the immunoglobulin heavy chain (IgH) locus. During Burkitt lymphoma (BL), IgH breakpoints for c-myc translocation stand either close to  $J_H$  segments or within switch regions. Transcription, accessibility, and remodeling of the IgH locus are under the control of the 2 potent *cis*-acting enhancer elements:  $E_{\mu}$  and the 3' regulatory region (3'RR). To ensure their respective contributions to oncogene deregulation in the context of the endogenous IgH locus, we studied transgenic mice harboring a knock-in of c-myc in various positions of the IgH locus (3' to  $J_H$  segments, 5' to  $C_{\mu}$  with  $E_{\mu}$  deletion and  $C_{\alpha}$ ). The observed spectrum of tumors, kinetics of emergence, and transcriptome analysis provide strong evidence that both  $E_{\mu}$  and 3'RR deregulate c-myc and cooperate together to promote B-cell lymphomagenesis. Transgenics mimicking endemic BL (with c-myc placed 3' to  $J_H$  segments) exhibited the highest rate of B-cell lymphoma emergence, the highest Ki67 index of proliferation, and the highest transcriptomic similarities to human BL. The 3'RR enhancer alone deregulated c-myc and initiated the development of BL-like lymphomas, suggesting that its targeting would be of therapeutic interest to reduce c-myc oncogenicity *in vivo*.

## Introduction

c-myc plays a critical role in cell proliferation, apoptosis, differentiation, metabolism, and genomic instability.<sup>1</sup> Burkitt lymphoma (BL) is characterized by chromosomal translocations involving the c-myc gene and 1 of the immunoglobulin (Ig) loci.<sup>2</sup> Once translocated and having lost its normal control, c-myc is constitutively expressed throughout the cell cycle in B cells. In 80% of cases, the translocation involves the IgH locus, itself regulated by a complex interplay of regulatory elements responsible for tissue- and stage-specific regulation of both transcription and rearrangements. The oncogenic deregulation is considered, only with partial scientific validation, to result from juxtaposition to IgH enhancers.<sup>3</sup> Two potent *cis*-acting elements are proposed for c-myc deregulation in BL: the intronic  $E_{\mu}$  enhancer and the 3'RR.  $E_{\mu}$  is the key transcriptional regulatory element for efficient variable-diversity-junction (VDJ) recombination.<sup>4,5</sup> Associated with c-myc,  $E_{\mu}$  has been shown to promote B-cell malignancies with a pro-B phenotype.<sup>3,6</sup> The 3'RR encompasses the 4 transcriptional enhancers, hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4; controls  $\mu$  transcription in mature B cells<sup>7</sup>; and is the master control element of conventional class switch recombination (CSR),<sup>8,9</sup> locus suicide recombination,<sup>10</sup> and somatic hypermutation,<sup>11</sup> but with little role in VDJ recombination except for silencing early transcription in pro-B cells.<sup>12-14</sup> In conjunction with c-myc, the 3'RR promotes B-cell malignancies with a mature B-cell phenotype.<sup>3,15-17</sup>

In B-cell lymphomas, c-myc is inserted in various positions of the IgH locus. IgH locus breakpoints are located in either the VDJ (endemic BL) or the switch (S) regions (sporadic BL and myelomas). When

Submitted 27 August 2019; accepted 12 November 2019; published online 3 January 2020. DOI 10.1182/bloodadvances.2019000845.

\*N.G., H.I., and M.F. contributed equally to this study.

<sup>†</sup>Y.D. and F.B. contributed equally to this study.

RNAseq data reported in this article have been deposited in the Gene Expression Omnibus database (accession number GSE132721).

The full-text version of this article contains a data supplement.

© 2020 by The American Society of Hematology

upstream of  $E_{\mu}$ , chromosomal breakage may result from abnormal somatic hypermutation. Breakpoints located within S regions are initiated by an erroneous CSR and link c-myc to a downstream portion of the locus lacking  $E_{\mu}$ . Thus, the 3'RR is always conserved on the c-myc translocated chromosome. During B-cell maturation, IgH intrachromosomal interactions were found between the 3'RR and the  $E_{\mu}$  enhancer, despite their 200-kb distance on the chromosome.<sup>18</sup> To ensure the real contribution of these enhancer elements in c-myc deregulation in the context of the IgH locus, we studied transgenic mice harboring a knock-in (KI) of c-myc in various positions of this locus. The observed spectrum of tumors, kinetics of emergence, and transcriptome analysis provide strong evidence that both  $E_{\mu}$  and 3'RR deregulate c-myc and cooperate together to promote B-cell lymphomagenesis.

## Materials and methods

### Transgenic mice

Mice housing and 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<sup>er</sup> 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'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and reviewed by the ethics committee of the University of Limoges. Thus, all methods in the current study were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations, and all experimental protocols were approved by French institutions. Three transgenic models (c-myc-KIE $_{\mu}$ , c-myc-KIC $_{\mu}$ , and c-myc-KIC $_{\alpha}$ ) were used. c-myc-KIE $_{\mu}$  mice have a c-myc KI upstream of the  $E_{\mu}$  enhancer.<sup>19</sup> c-myc-KIC $_{\mu}$  mice have a c-myc KI upstream of the  $C_{\mu}$  gene with deletion of the  $E_{\mu}$  enhancer.<sup>20</sup> c-myc-KIC $_{\alpha}$  mice have a c-myc KI within  $C_{\alpha}$  exons.<sup>21</sup>

### B-cell purification

For studies evaluating proliferation, apoptosis, and mRNA expression, splenic B cells were purified using CD43-coupled beads from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Bone marrow immature B cells were recovered from CD23-depleted cells (Miltenyi Biotec) with the EasySep mouse B-cell isolation Kit (STEMCELL Technologies) designed to isolate B cells from single-cell suspensions by negative selection.

### Proliferation analysis

CD43 $^{-}$  splenic B-cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were cultured (in sextuplicates) in 96-well plates in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% fetal calf serum, glutamine, nonessential amino acids, and antibiotics either alone or in the presence of lipopolysaccharide (LPS) (0.5  $\mu$ g/mL) plus anti-CD40 (0.1  $\mu$ g/mL) for 72 hours. The number of viable cells was assessed using the CellTiter 96 One Solution Cell Proliferation assay (Promega Corporation) according to the manufacturer's recommendations.

### Apoptosis assay

Freshly isolated CD43 $^{-}$  B-splenocytes ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were cultured in growth medium (Dulbecco's modified Eagle medium

supplemented with 10% fetal calf serum, glutamine, nonessential amino acids, and antibiotics) with 0.01  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 24-well plates. Immediately after isolation and after 24 hours' growth, cells were incubated (15 minutes, 4°C) with 7-aminoactinomycin D and fluorescein isothiocyanate-labeled Annexin V antibodies (Becton Dickinson), and analyzed by flow cytometry.

### mRNA expression

Total RNA was extracted using Trisol (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse-transcribed into cDNA by the addition of reverse transcriptase (2  $\mu$ g total RNA, 20  $\mu$ L final volume). Quantitative polymerase chain reaction (QPCR) was performed in duplicate by using TaqMan assay reagents, and analyzed on an ABI Prism 7000 system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Product references for c-myc and GAPDH were Mm00487803-m1 and Mm99999915-g1, respectively (Applied Biosystems).

### Clonality assay

Genomic DNA extracted from tumors was amplified by PCR with the OneTaq DNA polymerase from New England Biolabs (Evry, France). The following primers were used: forward primer: V<sub>H</sub>J558 5'-GCGAAGCTARGCCTGGGRCTTCAGAAG-3'; reverse primer: J<sub>H4</sub> 5'-AGGCTCTGAGATCCCTAGACAG-3'. PCR parameters: 95°C for 2 minutes (1 cycle); 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 68°C for 2 minutes (40 cycles); 68°C for 10 minutes (1 cycle). PCR products were migrated on a 2% agarose gel.

### Next-generation sequencing for repertoire analysis

Repertoire analysis was carried out on RNA from mouse tumor or spleen samples after RACE PCR and library preparation. Total RNA was extracted using Trisol (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. RACE was performed on 250 ng RNA incubated at 72°C for 3 minutes and at 42°C for 2 minutes with a specific mouse C $\mu$ 1 $\mu$ -rev downstream primer and 1  $\mu$ L dNTP (10 Mm; MP Biomedicals). Caprace forward primer, dithiothreitol, 5X ProtoScript buffer, and ProtoScript enzyme (BioLabs) were added to the mixture and incubated at 42°C for 90 minutes and then at 70°C for 10 minutes. Libraries were prepared on RACE products, using an upstream mix of 2 C $\mu$ -reverse specific primers (C $\mu$ -rev1, C $\mu$ -rev 2) and a mix of 2 forward primers (UnivShortFw, UnivLongFw; supplemental Table 1). For PCR, DNA was denatured 30 seconds at 98°C and then submitted to 30 cycles consisting of 98°C for 10 seconds, 65°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and followed by 72°C for 5 minutes as a final step. Next, 400- to 600-bp PCR products were purified from gels using PCR clean-up kit (Macherey-Nagel). Purified PCR products were used to perform another PCR round using primers with adapters (supplemental Table 1). Amplification was performed with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) according to the following program: DNA was denatured 30 seconds at 98°C and then submitted to 12 cycles consisting of 98°C for 10 seconds, 62°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds, and 1 cycle at 72°C for 5 minutes. Next, 400- to 600-bp PCR products were purified from gels using PCR clean-up kit (Macherey-Nagel). Purified PCR products (20 ng) were sequenced on an Illumina MiSeq sequencer as previously reported.<sup>22</sup>

## RNAseq analysis

LPS-stimulated and unstimulated B-cell splenocytes of IgH-c-myc transgenic mice were compared with wild-type animals. Experiments were performed in duplicate (each sample consisted of RNA from 3 mice). RNA from lymphoma cells (purified with B220-coupled beads from Miltenyi Biotech) isolated from IgH-c-myc mice was also analyzed by microarray (Nice-Sophia Antipolis Microarray Facility).<sup>23,24</sup> Quantification of normalized gene expression (transcripts per million [TPM]) was obtained from raw RNAsed data, using Kallisto.<sup>25</sup> Principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering (Ward-Pearson) were performed, respectively, with Easy Microarray Analysis and edgeR R packages, using Kallisto TPM tables. Genes with low expression (TPM < 4 for < 4 samples), non-protein-coding genes, genes on sex chromosomes, and gene model genes were removed from TPM tables. Differential analysis was performed with Sleuth.<sup>25</sup> Gene set enrichment analysis (GSEA) was used to evaluate enriched molecular signatures (either gene ontology (GO) biological processes or BL signatures from Hummel et al<sup>26</sup> and Sha et al<sup>27</sup>). RNAseq data were deposited in the Gene Expression Omnibus database with accession number GSE132721.

## Flow cytometry analysis

Single-cell suspensions of lymphomas from spleen and/or lymph nodes were labeled with various antibodies: anti-B220-BV510 (BioLegend), anti-CD19-PE (e-Bioscience), anti-CD117-BV421 (BD Biosciences), anti-IgM-fluorescein isothiocyanate (e-Bioscience), anti-IgD-BV421 (BioLegend), anti-CD5-fluorescein isothiocyanate (BD Biosciences), anti-CD138-APC (BD Biosciences), anti-CD4-PE (BD Biosciences), anti-CD8-PC5 (BD Biosciences), anti-CD11b-APC-eF780 (e-Bioscience), and anti-CD43-PE (BD Biosciences). Cells were analyzed on a Fortessa LSR2 (Beckman Coulter, Fullerton, CA).

## Results

The location of c-myc in the IgH locus for the 3 transgenic models (c-myc-KIE<sub>μ</sub>, c-myc-KIC<sub>μ</sub>, and c-myc-KIC<sub>α</sub>) is schematized in Figure 1A.

### B-cell expression of c-myc in young IgH-c-myc transgenic mice

We first used real-time PCR to analyze tissue c-myc RNA expression in 6- to 8-week-old IgH-c-myc transgenic mice. At this point, premalignant mice showed markedly elevated levels of c-myc transcripts in B-cell splenocytes compared with controls (Figure 1B). In agreement with data reporting that at the mature B-cell stage, IgH transcription is totally under the 3'RR control<sup>28</sup>; no differences were documented among the 3 c-myc models. c-myc transcripts were also markedly elevated in femoral bone marrow immature B cells of transgenic mice compared with controls (Figure 1B). Because at the immature B-cell stage IgH transcription is under both E<sub>μ</sub> and 3'RR control,<sup>29</sup> c-myc transcription in c-myc-KIE<sub>μ</sub> mice was significantly elevated compared with c-myc-KIC<sub>μ</sub> mice (devoid of the E<sub>μ</sub> enhancer) and c-myc-KIC<sub>α</sub> mice (with a c-myc inserted in a position that is only accessible at late stages of B-cell maturation). The overexpression of B-cell c-myc transcripts translated into elevated levels of B-cell c-myc protein (Figure 1C).

## B-cell proliferation and apoptosis in young IgH-c-myc transgenic mice

As reported in Figure 1D, proliferation of B-cell splenocytes from transgenic mice was significantly elevated in response to low doses of anti-CD40 plus LPS compared with wt B cells. The rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis was also significantly higher in transgenic B-cell splenocytes compared with wt B cells (Figure 1D). Thus, premalignant splenic B cells from IgH-c-myc mice showed increased proliferation and apoptosis compared with wt B cells, but with no differences between the 3 transgenic models.

## Lifespan of IgH-c-myc transgenic mice

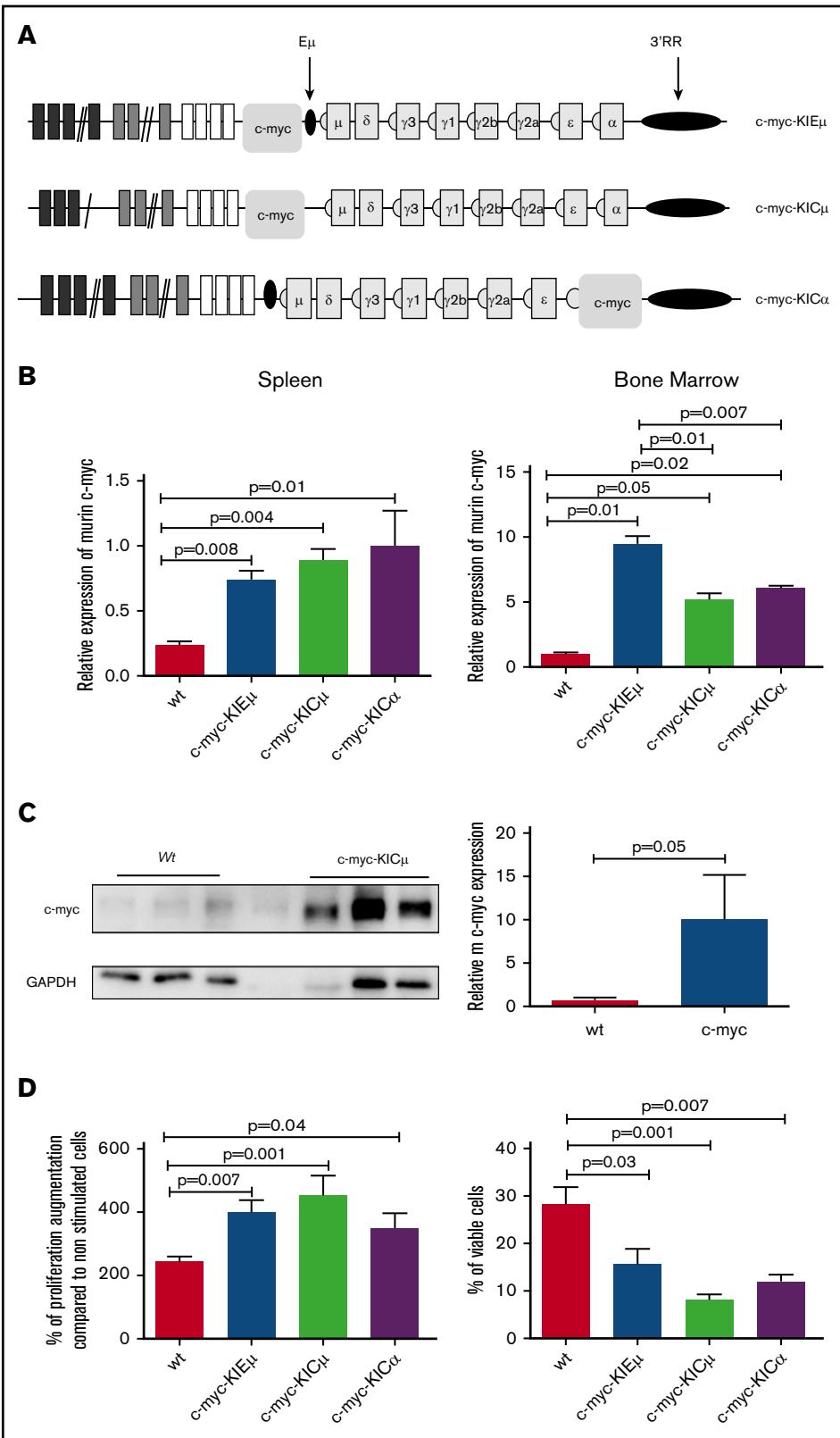
Beginning at age 4 months, transgenic mice progressively developed profound enlargement of lymph nodes (inguinal/brachial, superficial/deep cervical, mediastinal, and mesenteric) and spleens. Mice exhibiting obvious tumors or presenting signs of illness were sacrificed. Twenty-six c-myc-KIE<sub>μ</sub>, 21 c-myc-KIC<sub>μ</sub>, and 42 c-myc-KIC<sub>α</sub> mice were followed to record their lifespan. The mean age of death for c-myc-KIE<sub>μ</sub> transgenic mice was approximatively 6 months. Mean survival for c-myc-KIC<sub>μ</sub> and c-myc-KIC<sub>α</sub> transgenic mice was approximately 13 months (Figure 2A). Tumors in c-myc-KIE<sub>μ</sub> mice appeared significantly sooner ( $P < .0001$ , Gehan-Breslow-Wilcoxon test) than in c-myc-KIC<sub>μ</sub> and c-myc-KIC<sub>α</sub> mice. The locations (spleen, mesenteric lymph nodes, inguinal/brachial lymph nodes, and mediastinal lymph nodes) of these B-cell lymphomas were similar in the 3 IgH-c-myc models (Figure 2B). The strong proliferative activity of these tumor cells was highlighted by high expression of the nuclear proliferation-associated antigen Ki67, a nuclear protein present during G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, and M phases of the cell cycle. In agreement with their kinetics of emergence, the Ki67 index was significantly elevated in c-myc-KIE<sub>μ</sub> mice compared with c-myc-KIC<sub>μ</sub> and c-myc-KIC<sub>α</sub> mice (Figure 2C). PCR (with a forward primer in the V<sub>H</sub>558 family and a reverse 3' to the J<sub>H</sub> segment) on genomic B-cell lymphoma DNA revealed rearranged bands indicating lymphoma cells from clonal origins (Figure 2D). PCR on genomic DNA including various tissues (spleen, lymph nodes) from the same lymphoma mice revealed similar rearranged bands indicating that spleen and lymph nodes were invaded by lymphoma cells from the same clonal origin (data not shown). VDJ repertoire sequencing of B-cell lymphomas confirmed their clonal status (Figure 2E) and revealed no bias compared with the normal B-cell repertoire of healthy mice (Figure 2F). Thus, the insertion of c-myc in the IgH locus did not favor the proliferation of a specific B-cell subset such as those expressing an autoreactive BCR. Finally, Ig V<sub>H</sub> genes were sequenced in tumors. Strikingly, and as previously reported for other murine B-cell lymphomas,<sup>30</sup> all were essentially un-mutated ( $0.27 \pm 0.08$  vs  $0.43 \pm 0.08$  mutations per 100 bp for wt splenic B cells and lymphoma B cells, respectively;  $P = .82$ , Mann-Whitney *U* test).

### Phenotypic analysis of B-cell lymphomas in IgH-c-myc mice

Figure 3A reports typical flow cytometry analysis (B220, CD19, CD43, CD117, CD138, IgM, IgD) for lymphoma phenotyping. All lymphomas obviously have a B-cell phenotype assessed by the presence of either B220 or CD19 B-cell surface antigens and the absence of CD4/CD8 T-cell antigens and CD11b monocyte antigen (supplemental Table 2). Only 2 among 89 B-cell lymphomas expressed CD5, which assigned their B2 (but not B1) phenotype.

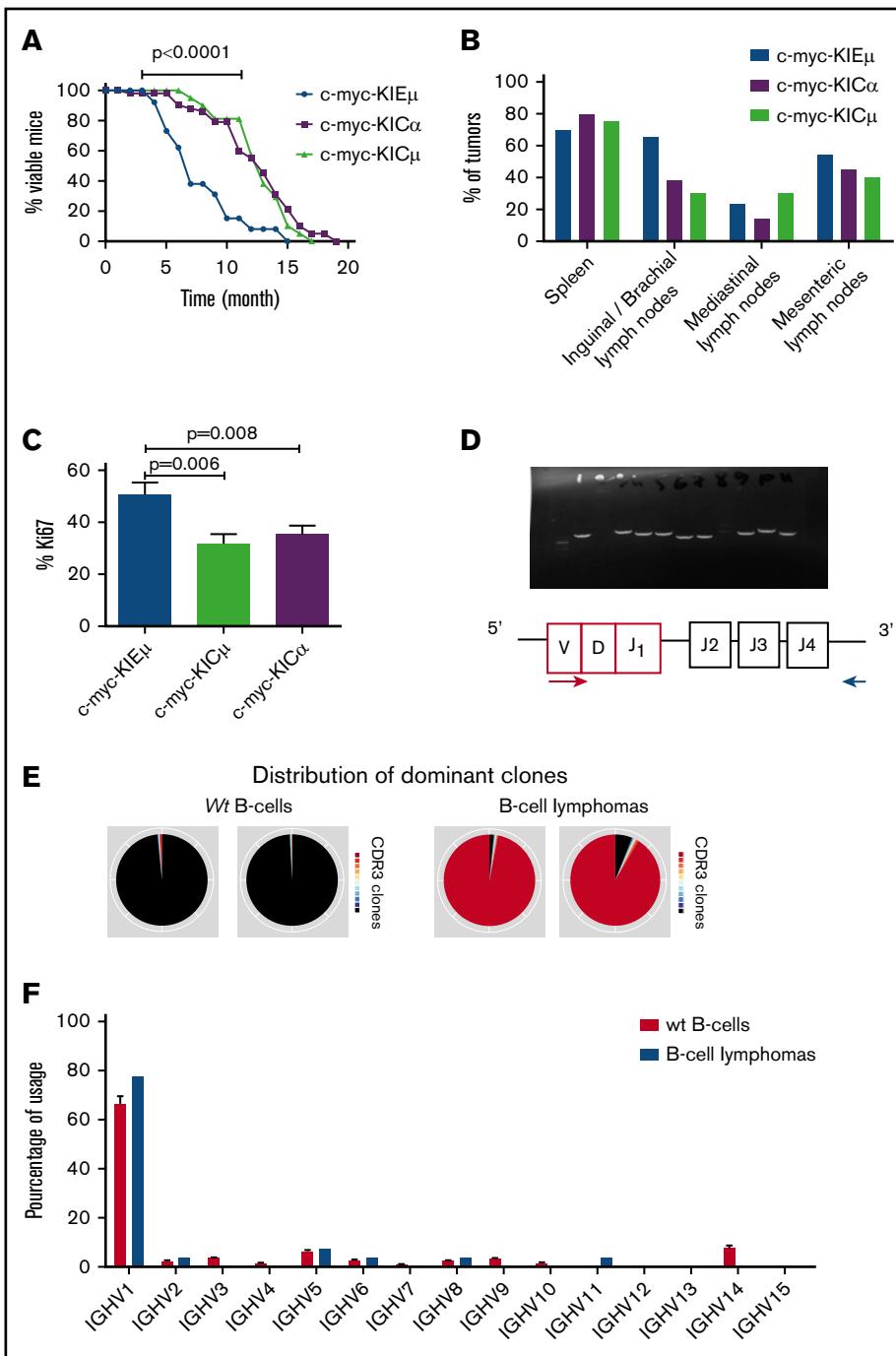
**Figure 1. c-myc in IgH-c-myc transgenic mice.** (A)

Schematic representation of the IgH locus (not to scale) with the location of the inserted c-myc. (B) QPCR analysis of c-myc transcripts in B-cell splenocytes (left) and immature bone marrow B-cells (right). B-cell splenocytes results are reported as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of 4 c-myc-KIE $_{\mu}$ , 5 c-myc-KIC $_{\mu}$ , 3 c-myc-KIC $_{\alpha}$ , and 8 wt mice. Immature bone marrow B-cell results are reported as means  $\pm$  SEM of 5 c-myc-KIE $_{\mu}$ , 3 c-myc-KIC $_{\mu}$ , 4 c-myc-KIC $_{\alpha}$ , and 3 wt mice. Significances were determined with the Mann-Whitney U test. (C) Western blot analysis of c-myc in B-cell splenocytes from wt and transgenic mice. An experiment with cells from 3 wt mice and 3 c-myc-KIC $_{\mu}$  mice is reported. Significance determined with the Mann-Whitney U test. Please note that line 4 contains a too-diluted c-myc sample not included in the statistical analysis (this line was kept to conserve the original format of the western blot). The original blot is reported in supplemental Figure 1. (D) Proliferation (left) and apoptosis (right) in B splenocytes from IgH c-myc KI transgenic mice. (Left) Proliferation was evaluated with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium assay after 3 days stimulation with 0.5  $\mu$ g/mL LPS + 0.1  $\mu$ g/mL anti-CD40. Results (percentage of increase compared with unstimulated cells) are reported as means  $\pm$  SEM of 4 c-myc-KIE $_{\mu}$ , 8 c-myc-KIC $_{\mu}$ , 7 c-myc-KIC $_{\alpha}$ , and 18 wt mice. (Right) Apoptosis in B-cell splenocytes from IgH c-myc KI transgenic mice. Percentages of living cells were determined after 24 hours treatment with 0.01  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Results are reported as means  $\pm$  SEM of 4 c-myc-KIE $_{\mu}$ , 6 c-myc-KIC $_{\mu}$ , 6 c-myc-KIC $_{\alpha}$ , and 14 wt mice.



Flow cytometry analysis revealed a majority of mature B-cell lymphomas ( $\text{IgM}^+ \text{IgD}^+$ ) for the 3 IgH-c-myc models (Figure 3B). If the ratio of mature ( $\text{IgM}^+ \text{IgD}^+$ )/immature ( $\text{IgM}^+ \text{IgD}^-$ ) B-cell lymphomas was similar between these mice, an elevated percentage of

plasmablastic CD138 $^+$  lymphomas was found for c-myc-KIE $_{\mu}$  mice (Figure 3C). Strikingly, an elevated percentage of B-cell lymphomas with the loss of CD19 expression was found for c-myc-KIC $_{\mu}$  mice (Figure 3D).



**Figure 2. Lifespan of IgH-c-myc transgenic mice.**

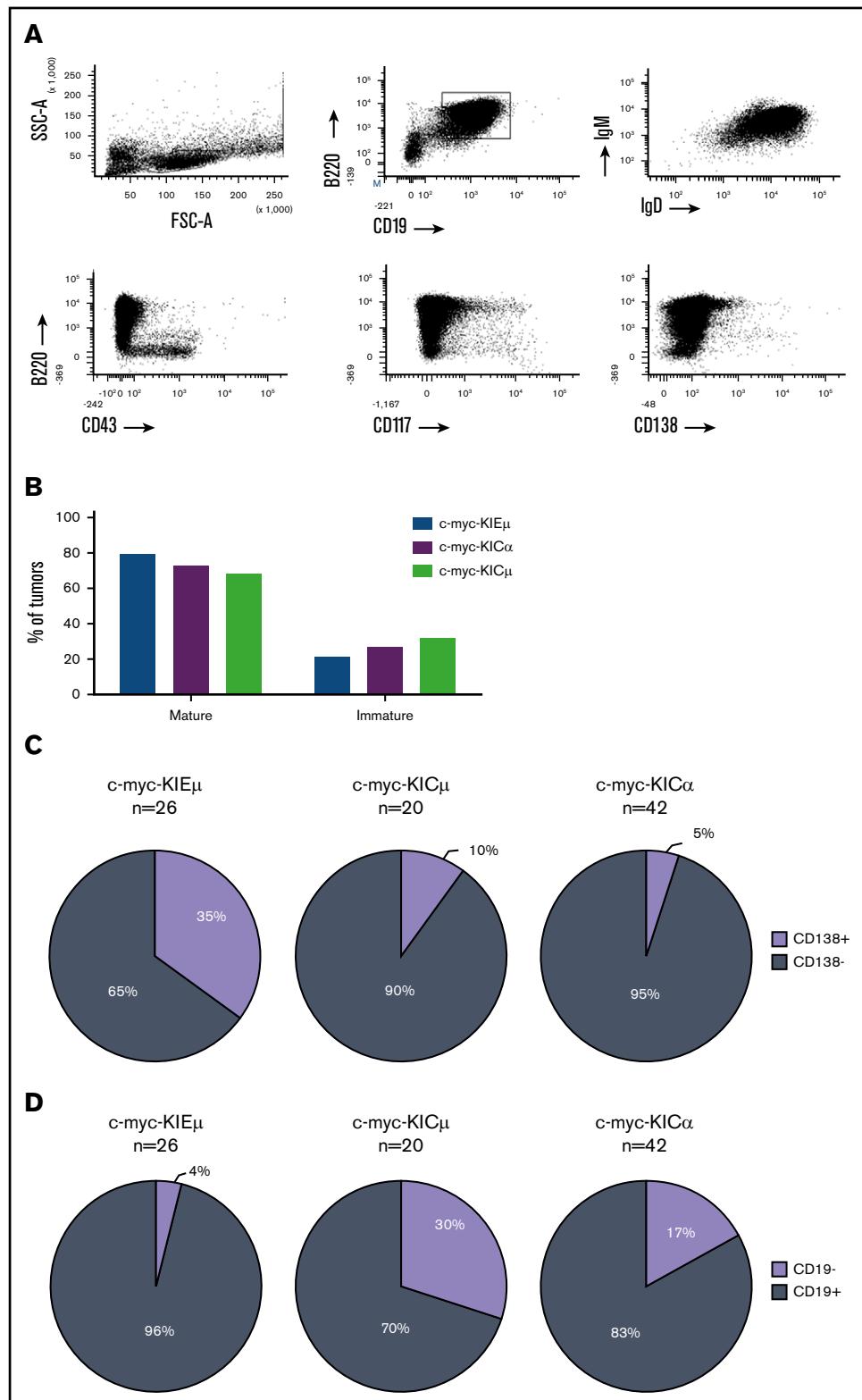
(A) Survival curves of 26 c-myc-KIE $\mu$ , 21 c-myc-KIC $\mu$ , and 42 c-myc-KIC $\alpha$  mice. Significance was determined with the Gehan-Breslow-Wilcoxon test. (B) Locations of lymphomas in c-myc-KIE $\mu$ , c-myc-KIC $\mu$ , and c-myc-KIC $\alpha$  mice. Several sites were found in the same mouse. (C) Ki67 index of proliferation of B-cell lymphomas in IgH-c-myc transgenic mice. The Ki67 index was calculated in B-cell lymphomas from 24 c-myc-KIE $\mu$ , 20 c-myc-KIC $\mu$ , and 42 c-myc-KIC $\alpha$  mice. (D) Clonal origin of B-cell lymphomas of IgH-c-myc transgenic mice. The forward primer was consensus for the V $_{H558}$  family and the reverse primer was 3' to the J $_{H4}$  segment, thus amplifying in theory 4 rearranged bands (V $_{H558}D_xJ_1$ , V $_{H558}D_xJ_2$ , V $_{H558}D_xJ_3$ , and V $_{H558}D_xJ_4$ ) of various lengths. The scheme represents a VDJ $_1$  rearrangement. Amplification with several different genomic DNAs confirmed the clonal status of the B-cell lymphoma. The lack of amplification indicated the use of a V segment different from the V $_{H558}$  family. The size marker is in the first lane. (E) Sequencing confirmed the clonal status of B-cell lymphoma of IgH-c-myc transgenic mice. Two representative experiments of 5 for wt mice (left) and of 27 for B-cell lymphomas from IgH-c-myc transgenic mice (right) are reported. (F) The V $_H$  segments used for B-cell lymphomas from IgH-c-myc transgenic mice matched with the B-cell repertoire in wt mice (same mice as in panel E).

## Transcriptome analysis of nonmalignant and malignant B cells

To document molecular signatures of tumors in the 3 IgH-c-myc transgenic models, RNA sequencing of 28 B-cell samples (B220 $^+$  IgM $^+$ IgD $^+$ ) was performed, and normalized expression data were obtained for all protein-coding genes. In Figure 4A-B, PCA and hierarchical clustering clearly defined groups of samples with similar transcriptome signatures. Nonmalignant (resting and LPS-stimulated) B-cell samples appear as distinct clusters from tumor samples. These samples segregate as 2 distinct groups (of, respectively, 6 and 13 samples) both in PCA and hierarchical

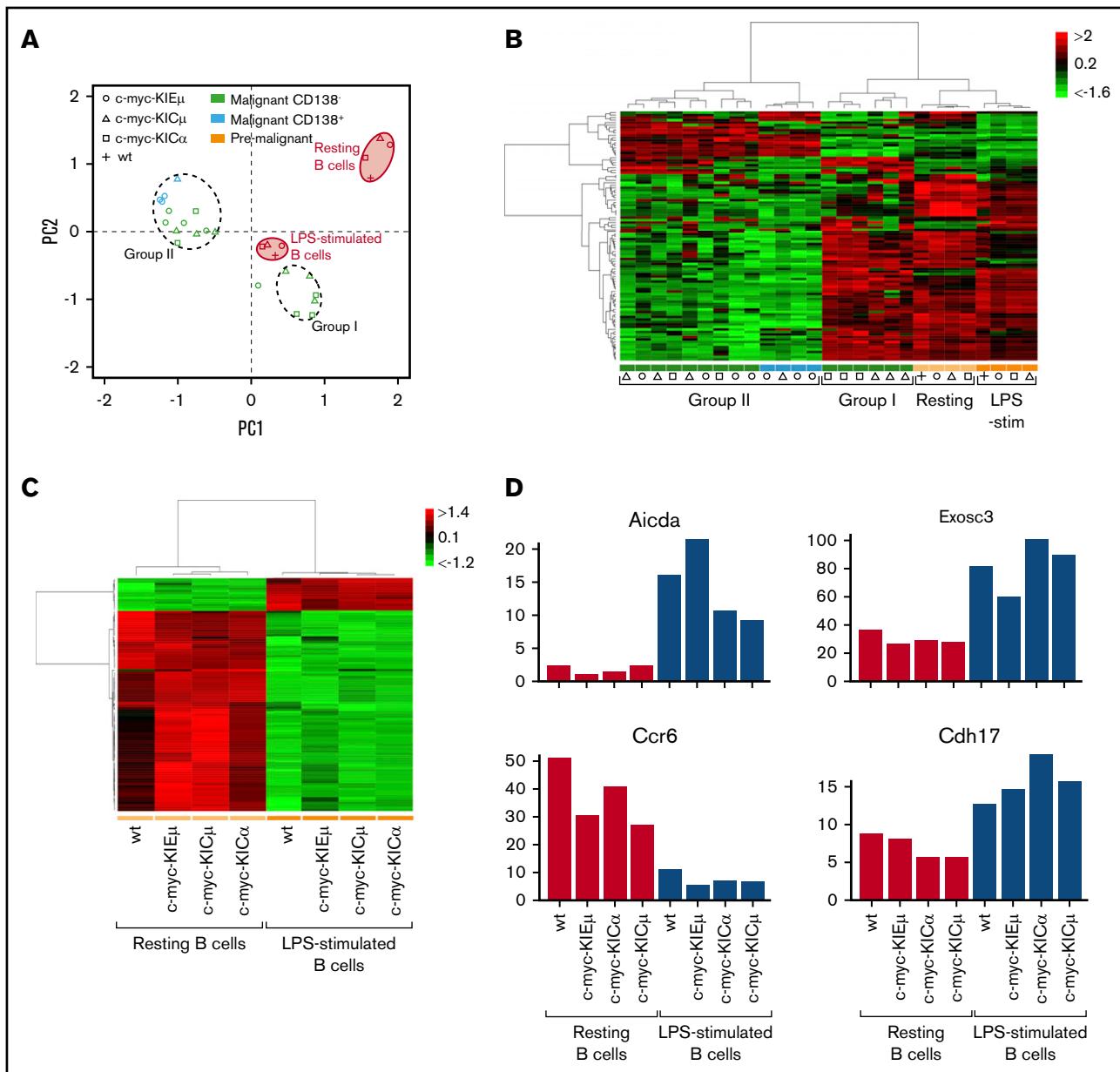
clustering representations. We thus define group I as the 6-sample cluster that shares more similarities with LPS-stimulated B-cell samples and group II as the other 13-sample cluster. Among 20 tumor samples, 4 CD138 $^+$  samples are found only in group II. Of note, 1 c-myc-KIE $\mu$  sample did not cluster in either of these 2 groups and was withdrawn from further differential analysis. Nonmalignant B-cell samples not only provide reference data to attest to the transcriptome signature of tumor samples but also identify differences in gene expression, depending on the c-myc insertion. Figure 4C exhibits gene expression and hierarchical clustering of the top 100 most variable genes across 8 nonmalignant B-cell samples. Again, independent of the c-myc insertion

**Figure 3. B-cell lymphoma phenotypes in IgH-c-myc transgenic mice.** (A) A typical flow cytometry analysis for B-cell lymphoma phenotyping. One representative experiment for a  $B220^+CD19^+IgM^+IgD^-CD43^-CD117^-CD138^-$  B-cell lymphoma is shown. (B) Percentage of mature ( $IgM^+IgD^+$ ) and immature ( $IgM^{+/-}IgD^-$ ) B-cell lymphomas (24 c-myc-KIE $\mu$ , 19 c-myc-KIC $\mu$ , and 37 c-myc-KIC $\alpha$  mice). (C) Percentages of  $CD138^+$  mature B-cell lymphomas in c-myc-KIE $\mu$ , c-myc-KIC $\mu$ , and c-myc-KIC $\alpha$  mice. The number (n) of mice for each group is indicated. (D) Percentages of  $CD19^-$  mature B-cell lymphomas in c-myc-KIE $\mu$ , c-myc-KIC $\mu$ , and c-myc-KIC $\alpha$  mice. Same mice as in panel C.



site, all 3 models share a common B-cell signature with the *wt* control, under both resting and LPS-stimulated conditions. Figure 4D shows expression data for 4 representative B-cell activation genes (*A1CDA*, *EXOSC3*, *CCR6*, *CDH17*), emphasizing similar gene regulation of relevant biological processes. Functional profiling of tumor samples

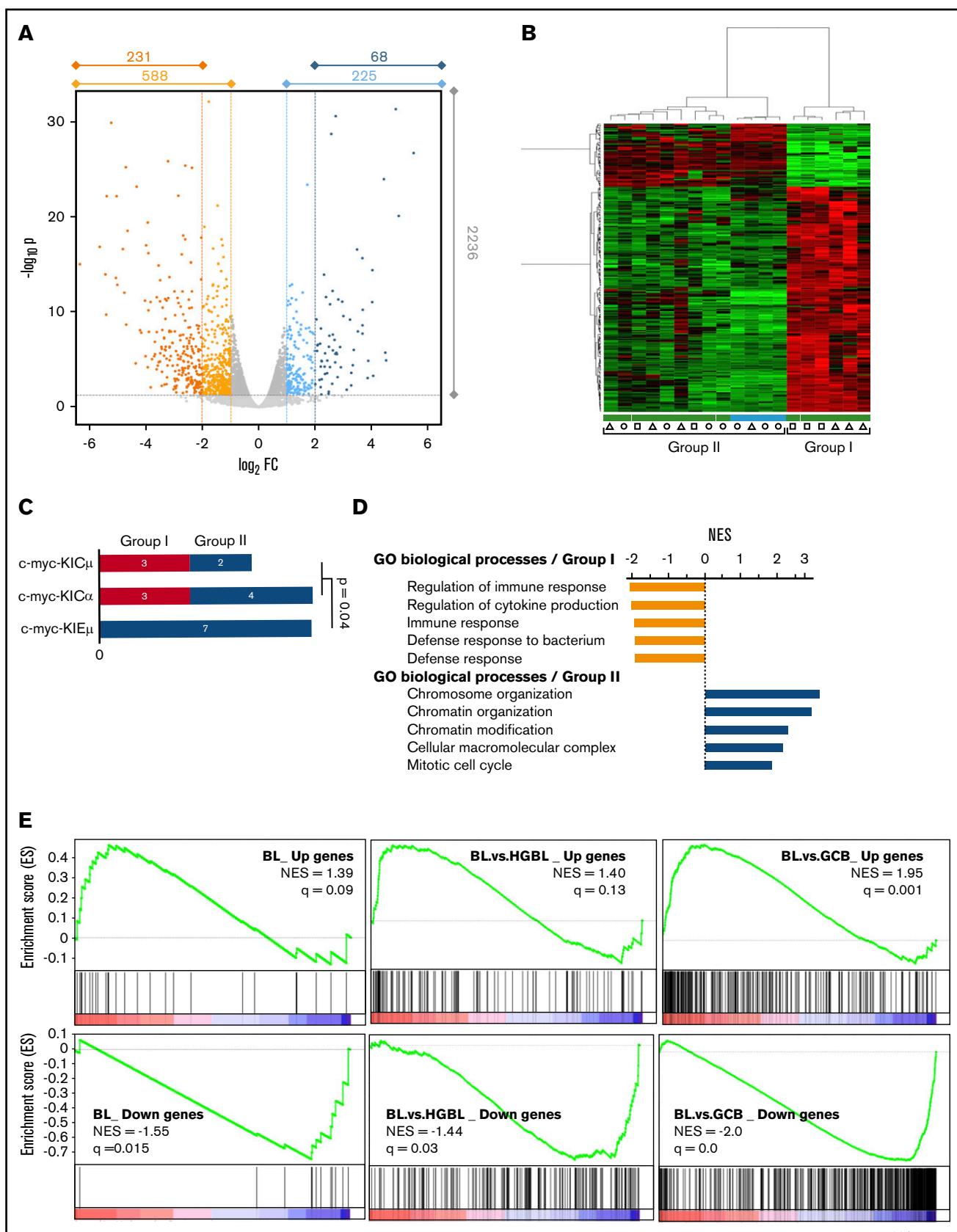
was achieved by analyzing differential gene expression between the 2 above-defined groups (group II vs group I; Figure 5A). Among 9995 genes that passed the minimum-expression filter, 2236 genes exhibit significantly different expression (adjusted  $P < .05$ ), most of them with slight to moderate differences. Limiting to genes changing



**Figure 4. RNAseq analysis of splenic B cells and B-cell lymphomas.** (A) PCA of RNAseq gene expression data from 1 *wt* splenic B-cell sample (stimulated or not with LPS), 3 premalignant B-cell samples (stimulated or not with LPS) and 20 tumor samples. Each *wt* and premalignant B-cell sample is pooled mRNA from 4 different mice. Same mice for LPS-stimulated and unstimulated B cells. Premalignant splenic B-cell samples were from c-myc-KIE $\mu$ , c-myc-KIC $\mu$ , and c-myc-KIC $\alpha$  mice. (B) Heat map of the 100 most variable gene expressions across all samples; hierarchical clustering of genes per sample according to Pearson's correlation metric and Ward's method. Same symbols, colors, and group definitions as in panel A. (C) Heat map of 100 most variable gene expressions across the *wt* and premalignant B-cell samples only; hierarchical clustering of genes per sample according to Pearson's correlation metric and Ward's method. (D) Expression of 4 representative genes (drawn from GO:0002312 "B-cell activation involved in immune response") in *wt* and premalignant samples. AICDA, gene for the AID protein implicated in Ig somatic hypermutation and CSR; CDH17, a member of the cadherin superfamily; CCR6, the MIP-3 $\alpha$  receptor; EXOSC3, subunit of the RNA exosome.

by more than 2-fold, we found 225 upregulated genes and 588 downregulated genes in group II compared with in group I samples ( $>4$ -fold: 68 up genes, 231 down genes). The set of differentially expressed genes indeed segregates samples according to expected groups, as emphasized in Figure 5B. GSEA software identified upregulated biological processes (as defined in gene ontology) in each group (Figure 5C). Distribution of genotypes according the group I and group II classifications showed

a significant commitment of c-myc-KIE $\mu$  samples to group II (Figure 5C). Group I tumor samples revealed a prevalence of immune regulation pathways, as one would expect from the proximity of their transcriptomic profiles to those of activated B cells (Figure 4A-B). Group II tumor samples were characterized by enriched DNA metabolism and cell cycle pathways, indicative of proliferative disorders. More specifically, enrichment of previously established<sup>27</sup> human BL signatures was tested in group II



**Figure 5. Analysis of B-cell lymphomas in transgenic mice.** (A) Volcano plot of differential gene expression in group II vs group I tumor samples. Same B-cell lymphomas as in Figure 4A. The numbers of significantly upregulated (in blue) and downregulated (in orange) genes are shown. (B) Heat map of the 100 most variable gene expressions across all tumor samples; hierarchical clustering of genes/samples according to Pearson's correlation metric and Ward's method. Same symbols, colors, and group definitions

vs group I differential expression results. All BL up and down signatures were significantly enriched at false discovery rate  $q < 25\%$ , emphasizing the molecular similarity of group II tumor samples to human BL cells (Figure 5E, left). Moreover, from normalized enrichment scores and  $q$ -values, group II vs group I differential expression was closer to the BL vs DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma) signature (Figure 5E, medium) than it was to the BL vs high-grade B-cell lymphoma signature (Figure 5E, right), indicating molecular similarity of group I tumor samples to DLBCL.

## Discussion

c-myc translocation in the IgH locus followed by its deregulation seems to be the key step in BL development. Consistent with this critical role of c-myc, mouse models carrying insertions of c-myc into the IgH locus develop B-cell and plasma cell neoplasms.<sup>19-21</sup> However, the precise role of IgH *cis*-transcriptional enhancers on c-myc deregulation in the context of the IgH locus remains an open question. Analysis of mice bearing c-myc insertion into 3 different sites in the IgH locus showed the additive contribution of both  $E_{\mu}$  and 3'RR *cis*-enhancers in c-myc deregulation. In agreement with the pro-B to immature B-cell window of activity of  $E_{\mu}$ ,<sup>31,32</sup>  $E_{\mu}$  is a c-myc deregulator during the immature steps of B-cell lymphopoiesis. In agreement with its pre-B to mature B-cell window of activity,<sup>29,31</sup> the 3'RR deregulates c-myc from the immature to the mature steps of B-cell lymphopoiesis. When both  $E_{\mu}$  and 3'RR are present in the IgH locus, c-myc deregulation occurs during all stages of B-cell maturation, as previously reported with an  $E_{\mu}$ -GFP-3'RR transgene.<sup>33</sup>

$E_{\mu}$  has been used to deregulate c-myc with the aim of mimicking human BL, but  $E_{\mu}$ -c-myc transgenic mice developed malignancies with a pro-B phenotype rather than the IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> mature phenotype observed in BL.<sup>6</sup> The c-myc KI into the IgH locus did not generate B-cell malignancies with a pro-B phenotype suggesting that the physiological window of activity of  $E_{\mu}$  during B-cell maturation (pro-B/pre-B-cell stages) is insufficient by itself to initiate their development. However, the absence of  $E_{\mu}$  (c-myc-KIC $_{\mu}$  mice) or c-myc insertion into the constant heavy chain region (c-myc-KIC $_{\alpha}$  mice) where  $E_{\mu}$  has no transcriptional role<sup>28</sup> markedly delays the rate of B-cell lymphoma occurrence. These results clearly show a contribution (although nonessential) for  $E_{\mu}$  in B-cell lymphomagenesis. The ability of  $E_{\mu}$  alone, that is, in an IgH locus devoid of a 3'RR, to induce B-cell lymphomagenesis remains an open question. The physiological rationale of such mice for human B-cell lymphomagenesis would be doubtful, as the 3'RR is always conserved after oncogene translocation into the IgH locus. At this time, the development of c-myc-induced plasmacytomas in mice bearing a truncated 3'RR gave divergent results.<sup>34,35</sup>

Insertion of c-myc into the IgH locus displayed an increase in c-myc transcripts in B cells of young mice. In most cell types, c-myc enforces proliferation but also triggers apoptosis. We demonstrated such an effect in B splenocytes from young transgenic mice.

No differences were found with respect to the location of the inserted c-myc. This result reinforces data reporting that in mature B cells, the IgH locus falls totally under the transcriptional control of the 3'RR.<sup>28</sup> Confirming these data, RNAseq analysis of resting and LPS stimulated B cells from transgenic mice did not reveal specific signatures between them. Furthermore, their transcriptome signatures in response to LPS stimulation were similar to those of *wt* B cells indicating that IgH c-myc insertion by itself is not sufficient to dramatically affect B-cell physiology. These results confirm the concept that if c-myc translocation into the IgH locus is the *primum movens* of B-cell lymphomagenesis, it is the progressive accumulation of mutations (affecting cell proliferation, apoptosis, differentiation, and metabolism) generated by the c-myc-induced genomic instability that plays the critical role in B-cell lymphoma emergence.

c-myc insertion in front of  $E_{\mu}$  or in front of  $C_{\mu}$  (with  $E_{\mu}$  deletion) prevents the development of efficient VDJ recombination and BCR expression by this chromosome. It is the other chromosome carrying an intact IgH locus that will be used for B-cell development. Insertion of c-myc in front of the 3'RR (into  $C_{\alpha}$ ) does not prevent VDJ recombination, BCR expression, and B-cell development. During B-cell maturation, IgH loci of both chromosomes were transcribed and underwent CSR. A 3-dimensional chromatin loop bringing  $E_{\mu}$  and 3'RR into close proximity is found in resting B cells and during CSR.<sup>18</sup> Could c-myc KI between the enhancers disrupt their cooperation, explaining that deleted  $E_{\mu}$  and mice with c-myc KI close to the 3'RR enhancer have a similar c-myc expression pattern, tumor localization, and life expectancy? This seems unlikely because no transcriptional cooperation has been documented between  $E_{\mu}$  and 3'RR enhancers at mature<sup>28</sup> and immature B-cell stages.<sup>13</sup> Moreover, deletion of the  $E_{\mu}$  enhancer did not affect CSR and DNA repair.<sup>36</sup> Are these  $E_{\mu}$ -3'RR IgH intrachromosomal interactions really relevant? We favor the hypothesis that they are only mechanical because of the IgH location of both  $E_{\mu}$  and 3'RR and to 3-dimensional folding bringing switch regions into contact with each other. The simplest explanation is an additive effect of  $E_{\mu}$  and 3'RR on c-myc transcription during B-cell maturation.  $E_{\mu}$  deletion is thus equivalent to the c-myc KI close to the 3'RR, as  $E_{\mu}$  has no transcriptional effect on transcription of IgH constant genes at immature and mature B-cell stages.<sup>13,28</sup>

5'E $_{\mu}$  and/or 3'RR oncogene-induced deregulations had no influence on the localization of B-cell lymphomas and a minor effect on their degree of maturity and phenotypic characteristics (an elevated percentage of CD138<sup>+</sup> lymphoma for c-myc-KIE $_{\mu}$  mice was, however, found). Two specific transcriptome signatures were detected for mature (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) B-cell lymphomas from c-myc-KIE $_{\mu}$ , c-myc-KIC $_{\mu}$ , and c-myc-KIC $_{\alpha}$  mice. One is clearly a signature that mimics that of human BL, which does not or only slightly resembles that of LPS-activated B cells (such as those in indolent B-cell lymphomas). These results reinforce the concept that regardless of the location of the IgH c-myc insertion, it is the progressive accumulation of mutations generated by c-myc-induced genomic instability that participate in B-cell lymphoma

**Figure 5. (continued)** as in Figure 4A. (C) Number of RNAseq samples in each group according to genotype.  $P$  value from Fisher's exact test. (D) Summary of GSEA analysis of differential gene expression: top 5 enriched GO biological processes (false discovery rate  $<0.05$ , size  $>80$ ) for both groups. (E) Detailed GSEA analysis of differentially expressed genes against human BL signatures (up- and downregulated genes from Hummel et al<sup>26</sup> [left] and from Sha et al<sup>27</sup> [middle and right]) defined by BL vs germinal center (GC) B-cell like DLBCL (left), BL vs HGBVL (middle), or BL vs GC-DLBCL (right) comparisons.

emergence. The emergence of B-cell lymphomas was significantly elevated when c-myc was under the transcriptional control of both 5' and 3' IgH enhancers (schematized with c-myc-KIE<sub>μ</sub> mice). This is the first report of their *in vivo* transcriptional cooperation for oncogene deregulation in the context of the endogenous IgH locus. Previous studies have highlighted such transcriptional cooperation with transgenic models bearing a GFP cassette.<sup>29,32,33</sup> The most notable difference for c-myc-KIE<sub>μ</sub> mice compared with c-myc-KIC<sub>μ</sub> and c-myc-KIC<sub>α</sub> mice is their elevated amounts of c-myc transcripts at immature B-cell stages when c-myc transcription is still under the transcriptional control of the E<sub>μ</sub> enhancer. The most important effect of E<sub>μ</sub> and 3'RR cooperation in c-myc deregulation is their higher rate of B-cell lymphoma emergence that fits well with their higher Ki67 proliferation index compared with B-cell lymphomas in mice without E<sub>μ</sub> or with c-myc inserted into C<sub>α</sub>. Transcriptome analysis of B-cell lymphomas in c-myc-IgH transgenic mice highlighted the prevalence of proliferative pathways instead of alterations in apoptotic programs for their development. Similar results were reported with c-myc-3'RR transgenic animal,<sup>16,17,24</sup> when more than half of the lymphomas arising in E<sub>μ</sub>-myc mice,<sup>37</sup> or after insertion of truncated 3'IgH upstream of the c-myc coding region,<sup>15</sup> overexpressed the anti-apoptotic molecules Bcl-2 and Bcl-xL.

If the vast majority of B-cell lymphomas expressed CD19, a specific subset of CD19<sup>-</sup> B-cell lymphomas was found for c-myc-KIC<sub>μ</sub> mice. CD19 is a B-cell-specific membrane protein regulating BCR-independent and BCR-dependent signal transduction pathways. Loss of CD19 reduced lymphomagenesis in c-Myc-E<sub>μ</sub> transgenic mice showing that a c-myc:CD19 regulatory loops positively controls B-cell lymphoma progression.<sup>38</sup> However CD19 deficiency was reported to aggravate the antitumor immune response by affecting T-cell activation.<sup>39</sup> CD19 loss was also associated with poorer survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma.<sup>40</sup> Thus, in some cases, CD19 deficiency may be used by the B-cell lymphoma for its progression and development. Why a specific subset of B-cell lymphomas developed only in an E<sub>μ</sub>-deficient locus remains an open question.

Our study primarily examines the contribution of E<sub>μ</sub> and/or 3'RR IgH enhancers to c-myc deregulation and B-cell lymphomagenesis. However, it also is relevant concerning different types of myc rearrangements encountered in different human B-cell lymphomas. c-myc rearrangement not only is characteristic of BL but is also found in high-grade B-cell lymphoma (in association with bcl2 and/or bcl6 rearrangements), DLBCL (both not otherwise specified or germinal center B-cell type), in plasmablastic lymphoma, unclassifiable B-cell lymphoma with intermediate features between DLBCL and BL (B-UNC/BL/DLBCL), and myeloma.<sup>41-44</sup> Comparison of transcriptome analyses indicated that group II tumor samples had strong similarities to human BL, whereas group I tumor samples were closer to DLBCL. These results reinforce the suitability of IgH-c-myc mice as a model to study human B-cell lymphomas with c-myc translocation to the IgH locus.

In summary, we have shown with the synchronous usage of 3 transgenic mice models, the additive cooperation of the 2 IgH transcriptional enhancers E<sub>μ</sub> and 3'RR in c-myc deregulation leading to B-cell lymphomagenesis. We also assessed the

predominant contribution of the 3'RR transcriptional element to mature B-cell lymphoma generation. This result is in agreement with the long-distance effect of 3'RR on IgH transcription at mature B-cell stages.<sup>28</sup> Indeed, during B-cell development, the 3'RR is crucial for μ chain transcription and density of BCR expression at the B-cell membrane.<sup>7</sup> 3'RR knock-out models indicate that its deletion affects mature B-cell lymphoma occurrence, highlighting the key role of this IgH *cis*-regulatory region for lymphoma progression.<sup>34,35,45</sup> Therefore, as previously reported by us and others,<sup>3,35,46</sup> 3'RR targeting would in theory provide a potential strategy for the treatment of mature B-cell lymphomas. Translocations in B-cell lymphomas induce epigenetic changes,<sup>47</sup> suggesting that epigenetic drugs that target histone acetylation (inhibitors of histone deacetylases) and histone methylation (EZH2 inhibitors) may provide a new strategy to treat several B-cell lymphoid malignancies.<sup>48</sup> Recently, data demonstrated that direct inhibition of EZH2 and histone deacetylases are synergistic in germinal center B-cell lymphomas.<sup>49</sup> Reports have documented that 3'RR activation and transcription can be downregulated by inhibitors of histone deacetylases.<sup>50</sup> 3'RR-induced effects are largely mediated through activation of specific epigenetic marks in 3'RR targeted DNA,<sup>8</sup> reinforcing the idea that targeting the IgH 3'RR would be of interest in the downregulation of oncogene transcription. Furthermore, data obtained from mice are transferable to human lymphomagenesis with respect to the strong structural homology between mouse and human 3'RRs.<sup>51</sup> Altogether, these results reinforce the hypothesis that considers 3'RR as an interesting target for antilymphoma drug therapy.

## Acknowledgments

The authors are "Equipe Labellisée LIGUE 2018." This work is also supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) "Epi-Switch 2016." N.G. is supported by a grant from "Société Française d'Hématologie" and ANR "Epi-Switch 2016." H.I. is supported by University of Limoges (France) and ANR "Epi-Switch 2016." M.F. is supported by "Région Nouvelle Aquitaine" (France). F.B. is supported by Fondation Partenariale de l'Université de Limoges and Association Limousine pour l'Utilisation du Rein Artificiel à Domicile.

## Authorship

Contribution: N.G., H.I., M.F., and C.C. performed flow cytometry experiments and analysis; N.G., H.I., M.F., and Y.D. performed research; J.C.-M. and Y.D. designed research; Y.D. and F.B. analyzed mRNASeq data; N.G., H.I., M.F., F.B., C.C., J.C.-M., and Y.D. wrote the paper; and Y.D. obtained grant support.

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

ORCID profiles: C.C., 0000-0003-3221-6319; Y.D., 0000-0003-0143-5543; F.B., 0000-0002-0351-685X.

Correspondence: Yves Denizot, UMR CNRS 7276, Inserm U1262, CBRS, Rue du Professeur Descottes, 87025 Limoges, France; e-mail: yves.denizot@unilim.fr; and François Boyer, UMR CNRS 7276, Inserm U1262, CBRS, Rue du Professeur Descottes, 87025 Limoges, France; e-mail: francois.boyer@unilim.fr.

## References

- Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. 2004;104(10):3009-3020.
- Kuzyk A, Mai S. c-MYC-induced genomic instability. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(4):a014373.
- Ghazzai 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.
- Perlot T, Alt FW, Bassing CH, Suh H, Pinaud E. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(40):14362-14367.
- Marquet M, Garot A, Bender S, et al. The E $\mu$  enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response in vivo. *J Immunol*. 2014;193(3):1171-1183.
- Adams JM, Harris AW, Pinkert CA, et al. The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*. 1985;318(6046):533-538.
- Saintamand A, Rouaud P, Garot A, et al. The IgH 3' regulatory region governs  $\mu$  chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget*. 2015;6(7):4845-4852.
- 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(1):7084.
- Rouaud P, Saintamand A, Saad F, et al. Elucidation of the enigmatic IgD class-switch recombination via germline deletion of the IgH 3' regulatory region. *J Exp Med*. 2014;211(5):975-985.
- 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(6083):931-934.
- Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, et al. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J Exp Med*. 2013;210(8):1501-1507.
- 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.
- Ghazzai N, Issaoui H, Boyer F, Martin OA, Saintamand A, Denizot Y. 3'RR and 5'E $\mu$  immunoglobulin heavy chain enhancers are independent engines of locus remodeling. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(2):198-200.
- Ghazzai N, Issaoui H, Martin OA, et al. Trans-silencing effect of the 3'RR immunoglobulin heavy chain enhancer on Igk transcription at the pro-B cell stage. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(7):668-670.
- 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(13):12766-12773.
- 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(9):6033-6042.
- 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(5):586-593.
- Wuerffel R, Wang L, Grigera F, et al. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity*. 2007;27(5):711-722.
- Rosean TR, Holman CJ, Tompkins VS, et al. KSHV-encoded vIL-6 collaborates with deregulated c-Myc to drive plasmablastic neoplasms in mice. *Blood Cancer J*. 2016;6(2):e398.
- 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(4):1306-1315.
- Cheung WC, Kim JS, Linden M, et al. Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-X(L) to cause plasma cell neoplasms in mice. *J Clin Invest*. 2004;113(12):1763-1773.
- Vincent-Fabert C, Saintamand A, David A, et al. Reproducing indolent B-cell lymphoma transformation with T-cell immunosuppression in LMP1/CD40-expressing mice. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(4):412-414.
- 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;5(19):8995-9006.
- Fiancette R, Rouaud P, Vincent-Fabert C, et al. 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(11):5772-5782.
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification [published correction appears in *Nat Biotechnol*. 2016;34(8):888]. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):525-527.
- Hummel M, Bentink S, Berger H, et al; Molecular Mechanisms in Malignant Lymphomas Network Project of the Deutsche Krebsforschung. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2419-2430.
- Sha C, Barrans S, Cucco F, et al. Molecular high-grade B-cell lymphoma: defining a poor-risk group that requires different approaches to therapy. *J Clin Oncol*. 2019;37(3):202-212.
- Saintamand A, Vincent-Fabert C, Marquet M, et al. E $\mu$  and 3'RR IgH enhancers show hierachic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):442.

29. Guglielmi L, Le Bert M, Truffinet V, Cogné M, Denizot Y. Insulators to improve expression of a 3' IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;307(3):466-471.
30. Saintamand A, Garot A, Saad F, Moulinas R, Denizot Y. Pre-germinal center origin for mature mouse B cell lymphomas: a major discrepancy with human mature lymphomas. *Cell Cycle.* 2015;14(22):3656-3658.
31. 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.
32. Guglielmi L, Truffinet V, Carrion C, et al. The 5'HS4 insulator element is an efficient tool to analyse the transient expression of an Em  $\mu$ -GFP vector in a transgenic mouse model. *Transgenic Res.* 2005;14(4):361-364.
33. Guglielmi L, Le Bert M, Comte I, et al. Combination of 3' and 5' IgH regulatory elements mimics the B-specific endogenous expression pattern of IgH genes from pro-B cells to mature B cells in a transgenic mouse model. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1642(3):181-190.
34. Kovalchuk AL, Sakai T, Qi CF, et al. 3'Igh enhancers hs3b/hs4 are dispensable for Myc deregulation in mouse plasmacytomas with T(12;15) translocations. *Oncotarget.* 2018;9(77):34528-34542.
35. 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(7274):803-807.
36. Issaoui H, Ghazzaui N, Ferrad M, Boyer F, Denizot Y. Class switch recombination junctions are not affected by the absence of the immunoglobulin heavy chain  $E_{\mu}$  enhancer. *Cell Mol Immunol.* 2019;16(7):671-673.
37. Eischen CM, Woo D, Roussel MF, Cleveland JL. Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol Cell Biol.* 2001;21(15):5063-5070.
38. Poe JC, Minard-Colin V, Kountikov EI, Haas KM, Tedder TF. A c-Myc and surface CD19 signaling amplification loop promotes B cell lymphoma development and progression in mice. *J Immunol.* 2012;189(5):2318-2325.
39. Ruella M, Maus MV. Catch me if you can: leukemia escape after CD19-directed T cell immunotherapies. *Comput Struct Biotechnol J.* 2016;14:357-362.
40. Kazantseva M, Hung NA, Mehta S, et al. Tumor protein 53 mutations are enriched in diffuse large B-cell lymphoma with irregular CD19 marker expression. *Sci Rep.* 2017;7(1):1566.
41. Beham-Schmid C. Aggressive lymphoma 2016: revision of the WHO classification. *Memo.* 2017;10(4):248-254.
42. Quintanilla-Martinez L. The 2016 updated WHO classification of lymphoid neoplasias. *Hematol Oncol.* 2017;35(suppl 1):37-45.
43. Xie Y, Pittaluga S, Jaffe ES. The histological classification of diffuse large B-cell lymphomas. *Semin Hematol.* 2015;52(2):57-66.
44. Misund K, Keane N, Stein CK, et al; MMRF CoMMpass Network. MYC dysregulation in the progression of multiple myeloma [published online ahead of print 22 August 2019]. *Leukemia.*
45. Saad F, Saintamand A, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Ig $\lambda$ -Myc mice. *Oncotarget.* 2015;6(24):20302-20311.
46. Saintamand A, Saad F, Denizot Y. 3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy? *Cell Cycle.* 2015;14(6):789-790.
47. Lindström MS, Wiman KG. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(5):381-387.
48. Berg T, Thoene S, Yap D, et al. A transgenic mouse model demonstrating the oncogenic role of mutations in the polycomb-group gene EZH2 in lymphomagenesis. *Blood.* 2014;123(25):3914-3924.
49. Lue JK, Prabhu SA, Liu Y, et al. Precision targeting with EZH2 and HDAC inhibitors in epigenetically dysregulated lymphomas. *Clin Cancer Res.* 2019;25(17):5271-5283.
50. 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(1):204-209.
51. 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.

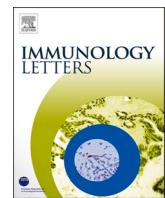
## Article 2 : Deletion of the 3'RR *cis*-enhancer IgH element affects DNA repair junctions during B-cell class switch recombination

La 3'RR est le chef d'orchestre régulant les principaux remaniements géniques du locus IgH au stade B mature, parmi lesquels sa transcription et la CSR. Le recrutement de l'enzyme AID aux régions S et l'induction des DSBs sont régulés principalement par la 3'RR. D'autres activateurs transcriptionnels comme  $E\mu$  et 5'E $\gamma$ 1 (situé entre les gènes C $\gamma$ 1 et C $\gamma$ 2b) semblent impliqués dans la CSR, bien que dans une moindre mesure.

Le rôle joué par ces éléments lors de la réparation des DSBs générés au cours de la CSR est encore mal connu. L'objectif de cette étude était de déterminer la contribution de ces 3 éléments *cis*-régulateurs dans le recrutement des voies de réparation lors de la CSR. La voie de réparation conventionnelle NHEJ est préférentiellement utilisée lors de la CSR dans les cellules B normales. Elle induit, le plus souvent, des jonctions franches ou à micro-homologies alors que la voie AEJ, moins utilisée, induit plutôt des jonctions à longues homologies.

Dans cet article nous montrons par analyse NGS de jonctions S $\mu$ -S $\gamma$ 3, S $\mu$ -S $\gamma$ 1 et S $\mu$ -S $\alpha$  induites chez des cellules B matures issues de souris délétées pour chacun des enhancers, que seul la 3'RR intervient dans l'étape de résolutions des DSBs.

La délétion de la 3'RR induit, en plus d'une baisse significative du switch vers les différents isotopes, une différence dans le type de jonctions générées. En effet, le type de jonctions induit, lors du switch résiduel vers différents isotopes, présente une augmentation significative du nombre de jonctions avec insertions et longues homologies. Ceci suggère que la voie AEJ intervient plus lors de la résolution des DSBs. La 3'RR participerait donc au recrutement et la stabilisation de facteurs de réparations lors de la CSR. Ces résultats sont à mettre en perspective par rapport au rôle de la 3'RR lors de la lymphomagenèse B. Une 3'RR défaillante serait-elle à l'origine de certaines translocations au locus IgH ?



## Correspondence

## Deletion of the 3'RR *cis*-enhancer IgH element affects DNA repair junctions during B-cell class switch recombination.



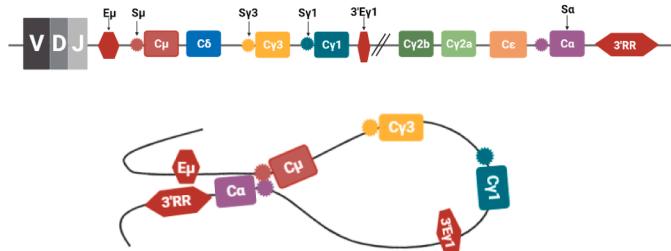
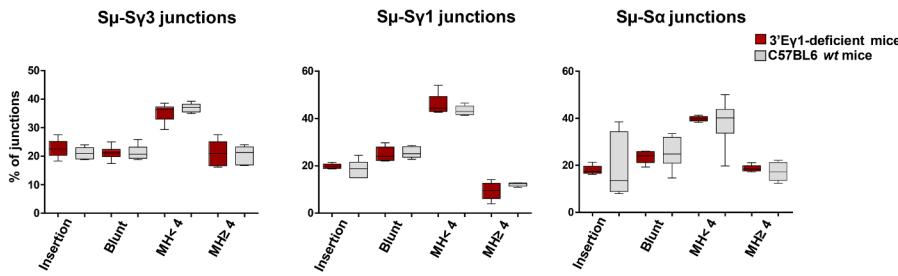
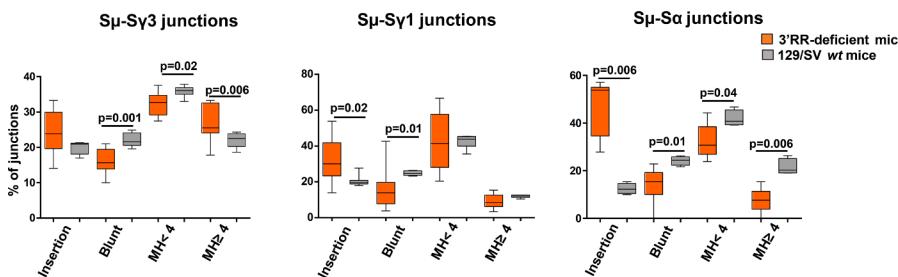
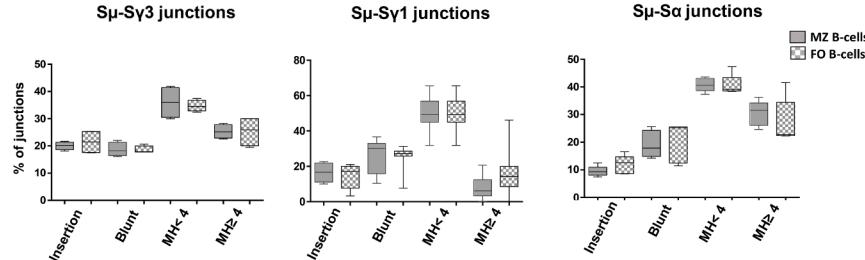
In mature B-cells class switch recombination (CSR) substitutes the immunoglobulin heavy chain (IgH) constant ( $C_\mu$ ) gene with  $C_\gamma$ ,  $C_\epsilon$  or  $C_\alpha$ , thereby generating IgG, IgE or IgA antibodies. These antibodies have, thus, new effector functions but the same antigenic specificity [1]. The DNA-editing enzyme activation-induced deaminase (AID) is required for CSR. AID targets specific DNA switch (S) regions preceding C regions [2].  $S_\mu$  is usually the donor region whereas  $S_{\gamma,\epsilon,\alpha}$  are the acceptor regions. AID generates double stand breaks (DSBs) in rich GC donor and acceptor regions separated by up to 200 kb. DSBs activate a wide range of damage response proteins that promote repair and long-range recombination. The classical non-homogenous end joining (c-NHEJ) and the alternative end joining (A-EJ) DNA repair pathways are implicated in the resolution of DNA breaks during CSR. The c-NHEJ pathway preferentially leads to blunt and micro-homology structure junctions whereas the A-EJ pathway favors junctions with large-homologies [3–5]. 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 [5]. Three IgH *cis*-transcriptional elements are reported to control (near or far) CSR (Fig. 1A). The IgH 3' regulatory region (3'RR) enhancers are essential to poise AID on the S acceptor region during CSR through long range IgH intrachromosomal interactions [6]. The 5' $E_\mu$  element that plays a key role during DJ recombination is also implicated during these CSR-induced IgH intrachromosomal interactions although CSR is (at most) only modestly influenced by 5' $E_\mu$  deletion [7–10]. Genomic deletion of the 3' $E_{\gamma 1}$  located between  $C_{\gamma 1}$  and  $C_{\gamma 2b}$  has been reported to affect CSR in an isotype dependent-manner [11]. The contributions of these IgH *cis*-enhancer elements in the resolution of DSBs remain largely unknown. We developed a computational tool (CSReport) for automatic analysis of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing [12], and used it to analyze rare CSR junctions [13,14], and junctions in deficient conditions [10,15–18]. We thus used this technical approach to analyze the molecular signature of  $\gamma 3, \gamma 1$  and  $\alpha$  junctions in 3'RR-deficient and 3' $E_{\gamma 1}$ -deficient mice to search for a difference in their DNA repair pathways compared to *wt* mice.

Mice were housed in a conventional animal facility and 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<sup>er</sup> février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques ». The present project (APAFiS#13,855) was authorized by the « Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ». Single-cell suspensions of spleen cells from *cis*-enhancer deficient mice [6, 11] and *wt* mice (C57BL6 and 129 background) were cultured 4 days ( $1 \times 10^6$  cells/ml) in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum and 5 µg/ml LPS, with (CSR toward IgG1) or without (CSR toward IgG3) addition of 20 ng/ml IL-4 or

5 ng/ml TGF $\beta$  (CSR toward IgA) (PeproTech, Rocky Hill, NJ) [10, 15–18]. Similar stimulations were done with purified follicular (FO) and marginal zone (MZ) spleen B-cells (MZ and FO B-cell isolation kit, Miltenyi Biotec) from 129 *wt* mice. Stimulated spleen B-cell DNA was extracted for determination of  $S_\mu - S_{\gamma 3}$ ,  $S_\mu - S_{\gamma 1}$  and  $S_\mu - S_\alpha$  junctions. As previously described [12], junctions were PCR amplified. Libraries of 200 bp were prepared from the 1–2 kb PCR products of  $S_\mu - S_{\gamma 3}$ ,  $S_\mu - S_{\gamma 1}$  and  $S_\mu - S_\alpha$  amplification for Ion Proton sequencing (“GénoLim platform” of the Limoges University, France). Sequenced reads were then mapped to  $S_\mu$ ,  $S_{\gamma 1}$ ,  $S_{\gamma 3}$  and  $S_\alpha$  regions using the BLAST algorithm. As previously reported [12], the computational tool developed for experiments performs junction assembly, identifies breakpoints in  $S_\mu$ ,  $S_{\gamma 1}$ ,  $S_{\gamma 3}$  and  $S_\alpha$ , identifies junction structure (blunt, micro-homology, large-homology or junction with insertions) and outputs a statistical summarization of these junctions.

While a few dozen of CSR junctions are reported after cloning and subsequent sequencing by the Sanger method, several hundred junctions can be documented using our computational tool of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing. The IgH locations of  $S_{\mu, \gamma 3, \gamma 1, \alpha}$ ,  $5'E_\mu$ , 3' $E_{\gamma 1}$  and 3'RR are schematized in Fig. 1A. 3'RR-deficient junctions (mice with a 129 background) and 3' $E_{\gamma 1}$ -deficient junctions (mice with a C57BL6 background) were compared with junctions obtained with their appropriate controls (129 and C57BL6 *wt* mice, respectively). We previously reported that deletion of the 5' $E_\mu$  element (without significant role for CSR efficiency) had no effect on the profiles of  $\gamma 3, \gamma 1$  and  $\alpha$  Ig junctions [10]. Similarly, deletion of 3' $E_{\gamma 1}$ , known to affect CSR in an isotype dependent manner, did not affect  $\gamma 3, \gamma 1$  and  $\alpha$  junction profiles (Fig. 1B). In contrast, deletion of the conductor CSR element 3'RR had a significant effect on the profiles of remaining  $\gamma 3, \gamma 1$  and  $\alpha$  junctions with less blunt junctions and more junctions with insertions (Fig. 1C). 3'RR deletion has been reported to reduce the percentage of MZ spleen B-cells compared to FO spleen B-cells [19]. This observation could explain junction differences in 3'RR-deficient mice especially since class switching was described as being different between FO and MZ cells for certain isotypes [20]. To test this hypothesis we compared  $S_\mu - S_{\gamma 3}$ ,  $S_\mu - S_{\gamma 1}$  and  $S_\mu - S_\alpha$  junctions obtained with FO and MZ B-cells from 129 *wt* mice and found identical junctions (Fig. 1D).

During CSR the 3'RR is required for IgH intrachromosomal interactions between S donor/acceptor regions, to poise AID on S regions and, thus, for the generation of DSBs. These IgH intrachromosomal interactions included interactions with 5' $E_\mu$  and 3' $E_{\gamma 1}$  elements outside and inside the intrachromosomal loop, respectively (Fig. 1A). Results of this study clearly indicate that among these 3 *cis*-transcriptional elements, only 3'RR enhancers are of importance to recruit/stabilize DNA repair factors. When 3'RR is absent DNA repair is oriented toward more junctions with insertions suggesting that repair factors are not optimally

**A****B****C****D**

recruited for the resolution of DNA breaks. This effect appears more pronounced for  $\gamma 1$  and  $\alpha$  isotypes. This result would suggest either a B-cell signaling dependent effect or would be linked to the distance to  $S_\mu$  ( $S_\gamma 1$  and  $S_\alpha$  being further away than  $S_\gamma 3$  to  $S_\mu$  breaks). While authors intuitively favor the second hypothesis, the experimental resolution of this question is an interesting challenge to address.

#### Author contributions

Y.D. designed research and obtained grants. M.F., N.G., H.I., and T.M. performed research. J.C.M and Y.D. analyzed data. M.F., N.G., J.C.M.,

and Y.D. wrote the paper.

**Declaration of Competing Interest**

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments**

Authors are “Equipe Labellisée LIGUE 2018”. This work, N.G. and H.I. are supported by ANR(projet EpiSwitch- 3'RR 2016). M.F. is supported by University of Limoges and “Région Nouvelle Aquitaine”. We thank

Bernardo Reina-San-Martin (IGBMC, Illkirch, France) for sending us 3'E<sub>g1</sub>-deficient mice.

## References

- [1] J. Stavnezer, C.E. Schrader, IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation, *J. Immunol.* 193 (2014) 5370–5378.
- [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] J. Chaudhuri, F.W. Alt, Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 541–552.
- [4] H.H.Y. Chang, N.R. Pannunzio, N. Adachi, M.R. Lieber, Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 18 (2017) 495–506.
- [5] R.A. Panchakshari, X. Zhang, K. Kumar, Z. Du, P.C. Wei, J. Kao, J. Dong, F.W. Alt, DNA double-strand break response factors influence end-joining features of IgH class switch and general translocation junctions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115 (2018) 762–767.
- [6] 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.
- [7] M. Marquet, A. Garot, S. Bender, C. Carrion, P. Rouaud, S. Lecardeur, Y. denizot, M. Cogné, E. Pinaud, The Eμ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgV<sub>H</sub> repertoire and immune response *in vivo*, *J. Immunol.* 193 (2014) 1171–1183.
- [8] F. Li, Y. Yan, J. Pieretti, D.A. Feldman, L.A. Eckhardt, Comparison of identical and functional IgH alleles reveals a nonessential role for Eμ in somatic hypermutation and class-switch recombination, *J. Immunol.* 185 (2010) 6049–6057.
- [9] T. Perlot, F.W. Alt, C.H. Bassing, H. Suh, E. Pinaud, Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 14362–14367.
- [10] H. Issaoui, N. Ghazzai, M. Ferrad, F. Boyer, D. Denizot, Class switch recombination junctions are not affected by the absence of the immunoglobulin heavy chain Eμ enhancer, *Cell. Mol. Immunol.* 16 (2019) 671–673.
- [11] R. Amoretti-Villa, M. Rogier, I. Robert, V. Heyer, B. Reina-San-Martin, A novel regulatory region controls IgH locus transcription and switch recombination to a subset of isotypes, *Cell. Mol. Immunol.* 16 (2019) 887–889.
- [12] F. Boyer, H. Boutouil, I. Dalloul, Z. Dalloul, J. Cook-Moreau, J.C. Aldigier, C. Carrion, H. Bastien, 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.
- [13] N. Ghazzai, H. Issaoui, A. Saintamand, F. Boyer, Y. Denizot, Analysis of IgD CSR junctions by high-throughput sequencing, *Immunol. Lett.* 188 (2017) 86–88.
- [14] H. Issaoui, N. Ghazzai, A. Saintamand, Y. Denizot, F. Boyer, IgD class switch recombination is not controlled through the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region super-enhancer, *Cell. Mol. Immunol.* 14 (2017) 871–874.
- [15] H. Issaoui, N. Ghazzai, A. Saintamand, Y. Denizot, F. Boyer, High throughput sequencing reveals similar molecular signatures for class switch recombination junctions for the γ and α isotypes, *Cell. Mol. Immunol.* 16 (2019) 90–92.
- [16] N. Ghazzai, H. Issaoui, A. Saintamand, Y. Denizot, F. Boyer, Uracil-DNA glycosylase is not implicated in the choice of the DNA repair pathway during B-cell class switch recombination, *Cell. Mol. Immunol.* 16 (2019) 93–95.
- [17] H. Issaoui, M. Ferrad, N. Ghazzai, S. Lecardeur, J. Cook-Moreau, F. Boyer, Y. Denizot, Molecular analysis of γ<sub>1</sub>, γ<sub>3</sub> and α class switch recombination junctions in APOBEC3-deficient mice using high-throughput sequencing, *Cell. Mol. Immunol.* 17 (2020) 418–420.
- [18] H. Issaoui, N. Ghazzai, A. Saintamand, C. Carrion, C. Oblet, Y. Denizot, The IgH 3' regulatory region super-enhancer does not control IgA class switch recombination in the B1 lineage, *Cell. Mol. Immunol.* 15 (2018) 289–291.
- [19] A. Saintamand, P. Rouaud, A. Garot, F. Saad, C. Carrion, C. Oblet, C. Cogné, E. Pinaud, Y. Denizot, The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate, *Oncotarget* 6 (2015) 4845–4852.
- [20] D.A. Kaminski, J. Stavnezer, Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice, *Int. Immunol.* 4 (2007) 545–556.

Melissa Ferrad<sup>1</sup>, Nour Ghazzai<sup>1</sup>, Hussein Issaoui, Tiffany Marchiol,  
Jeanne Cook-Moreau, Yves Denizot<sup>\*</sup>  
UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Equipe Labelisée LIGUE 2018,  
Université de Limoges, CBRS, rue Pr. Descottes, 87025 Limoges, France

\* Corresponding author.

E-mail address: [yves.denizot@unilim.fr](mailto:yves.denizot@unilim.fr) (Y. Denizot).

<sup>1</sup> Equal contribution



## **Article 3 : HDAC recruitment in the IgH locus 3' regulatory region is different between mature B-cells and mature B-cell lymphomas**

Nous avons précédemment montré que la 3'RR était capable de déréguler un oncogène inséré au locus IgH et promouvoir l'apparition de lymphomes B matures. Toutefois sa mécanistique d'activation reste encore peu connue. Une meilleure compréhension permettrait des avancées conceptuelles sur son mode d'action sur l'oncogène transloqué et donc dans la lymphomagenèse B. Une précédente étude avait montré que la surexpression de l'histone déacétylase 1 (HDAC1) entraînait une augmentation de l'activité de la 3'RR. Un traitement par des HDACi diminuait son activité et la transcription du locus IgH (Lu et al. 2005, Waibel et al. 2015).

Le premier objectif de cette étude était de déterminer le rôle de divers HDAC dans l'activation de la 3'RR (sites de fixation) et les conséquences de celle-ci sur la transcription au locus IgH, la prolifération des LB, la CSR et la synthèse d'Ig. Le second objectif était de voir si les résultats obtenus sur les LB normaux se retrouveraient sur des lymphomes B fraîchement isolés.

Les résultats de notre étude montrent que HDAC1 est recruté sur l'enhancer hs1.2 lors de l'activation de la 3'RR. L'utilisant de l'HDACi SAHA (Vorinostat) sous différentes conditions expérimentales (stimulation LPS/LPS+IL4) montre un effet-dose dépendant sur la prolifération et isotype dépendant sur le switch ainsi que la synthèse d'Ig.

Le SAHA est utilisé en clinique comme traitement adjuvant de certains lymphomes, bien que son mode d'action reste mal défini. Nous avons émis l'hypothèse que le ciblage de l'activité de la 3'RR par l'HDACi SAHA permettrait de diminuer son impact transcriptionnel sur l'oncogène transloqué. L'analyse transcriptomique de splénocytes stimulés au LPS et traitées au SAHA a montré qu'il n'affecte pas le taux d'enhancer RNA (eRNA) de la 3'RR signifiant que les effets observés sur la prolifération, le switch et la synthèse d'Ig dans les LB normaux ne sont pas médiés par une action directe sur la 3'RR.

Enfin des expériences de chromatine immuno-précipitation (ChIP) ont montré que dans les cellules B tumorales HDAC1 ne se fixe plus sur l'élément hs1.2, au contraire de l'acé-

tyltransférase CPB qui se lie aux éléments hs3a et hs3b constituant la bordure de la structure palindromique de la 3'RR.

Nous avons enfin analysé l'effet du SAHA sur la prolifération *in-vitro* des cellules lymphomateuses issues de nos modèles de souris Cmyc-IgH. Les résultats montrent une réponse tumeur dépendante au SAHA. La prolifération diminue dans certaines tumeurs pendant qu'elle augmente dans d'autres sans aucun lien apparent avec le phénotype tumoral.

Cette étude montre que la voie HDAC/HAT est différemment régulée chez les LB normaux et leucémiques. L'hypothèse de réduire l'activité de la 3'RR par un HDACi (ici le vorinostat) s'est révélée non concluante. Les résultats de notre étude ont fait l'objet d'une lettre dans Leukemia Lymphoma et d'un chapitre de livre où nous détaillons/discutons plus longuement nos résultats et hypothèses.



## HDAC recruitment in the IgH locus 3' regulatory region is different between mature B-cells and mature B-cell lymphomas

Nour Ghazzoui<sup>a\*</sup>, Mélissa Ferrad<sup>a\*</sup>, Hussein Issaoui<sup>a\*</sup>, Sandrine Lecardeur<sup>a</sup>, Jeanne Cook-Moreau<sup>a</sup>, Justine Pollet<sup>b</sup>, Sandrine Le Noir<sup>a</sup> and Yves Denizot<sup>a</sup>

<sup>a</sup>UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Equipe Labellisée LIGUE 2018, University of Limoges, CBRS, rue Pr. Descottes, Limoges, France;

<sup>b</sup>BISCEM - Pôle analyses moléculaires, University of Limoges, CBRS, rue Pr. Descottes, Limoges, France

**ARTICLE HISTORY** Received 10 May 2021; Revised 28 June 2021; Accepted 19 July 2021

Transcription of the immunoglobulin heavy chain (IgH) locus is controlled in *cis* by the 3'regulatory region (3'RR) [1]. The 3'RR thus control somatic hypermutation, class switch recombination (CSR), Ig secretion and B-cell fate in mature B-cells. Previous studies with transgenic mice (IgH-KI-c-myc) bearing an IgH inserted c-myc (*i.e.* under transcriptional dependence of the 3'RR) have suggested that targeting the 3'RR with histone deacetylase inhibitors (HDACi) would be of interest in order to down regulate c-myc deregulated transcripts leading to B-cell lymphomagenesis [2,3]. The 3'RR is a complex element with four transcriptional enhancers (namely hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) encompassed in a unique and functional 3D palindromic architecture [4,5]. The aim of this study was to compare 3'RR HDAC binding on normal mouse B-cells and B-cell lymphomas and if the effect of the HDACi SAHA (suberanilohydroxamic acid also known as vorinostat) on B-cell responses was mediated by a direct effect on 3'RR enhancer activation.

Mice were housed and procedures were conducted in agreement with European directive 2010/63/EU on animals used for scientific purposes (APAFiS ≠ 13855). CD43<sup>-</sup> spleen cells from *wt* mice (and ΔIRIS mice for ChIP experiments) were cultured at  $1 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1640 with 10% FCS, 5 µg/ml LPS with or without 20 ng/ml IL4 in presence or not of SAHA. At day 2, cells were recovered and ChIP experiments were done as described [6,7] with HDAC1, HDAC2, HDAC3 and CBP specific antibodies (Abcam). At day 3, cell proliferation (six replicates) was evaluated using the MTS assay [6]. At day 3, cells were recovered and RNA extracted using miRNeasy kit from QIAGEN. RNA libraries were obtained using TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold (Illumina). Libraries were sequenced on a NextSeq500 sequencer, using NextSeq 500/550 High Output Kit (Illumina) (Nice Sophia-Antipolis Functional Genomics Platform, France)

[7]. RNAseq data were deposited (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc>) under accession numbers GSE169690/GSE169691. At day 3,  $1 \times 10^6$  cells were cultured for 24 h in medium without LPS/cytokine/SAHA. Supernatants were used for Ig quantification (specific IgG<sub>1</sub>/IgG<sub>3</sub> ELISA assays) [4,6]. At day 4, CSR was evaluated by incubating cultured B-cells with anti-B220-SpectralRed-labeled antibodies and anti-IgG<sub>1</sub>/anti-IgG<sub>3</sub>-fluorescein-isothiocyanate labeled antibodies and analyzed on a Fortessa LSR2 (Beckton-Dickinson).

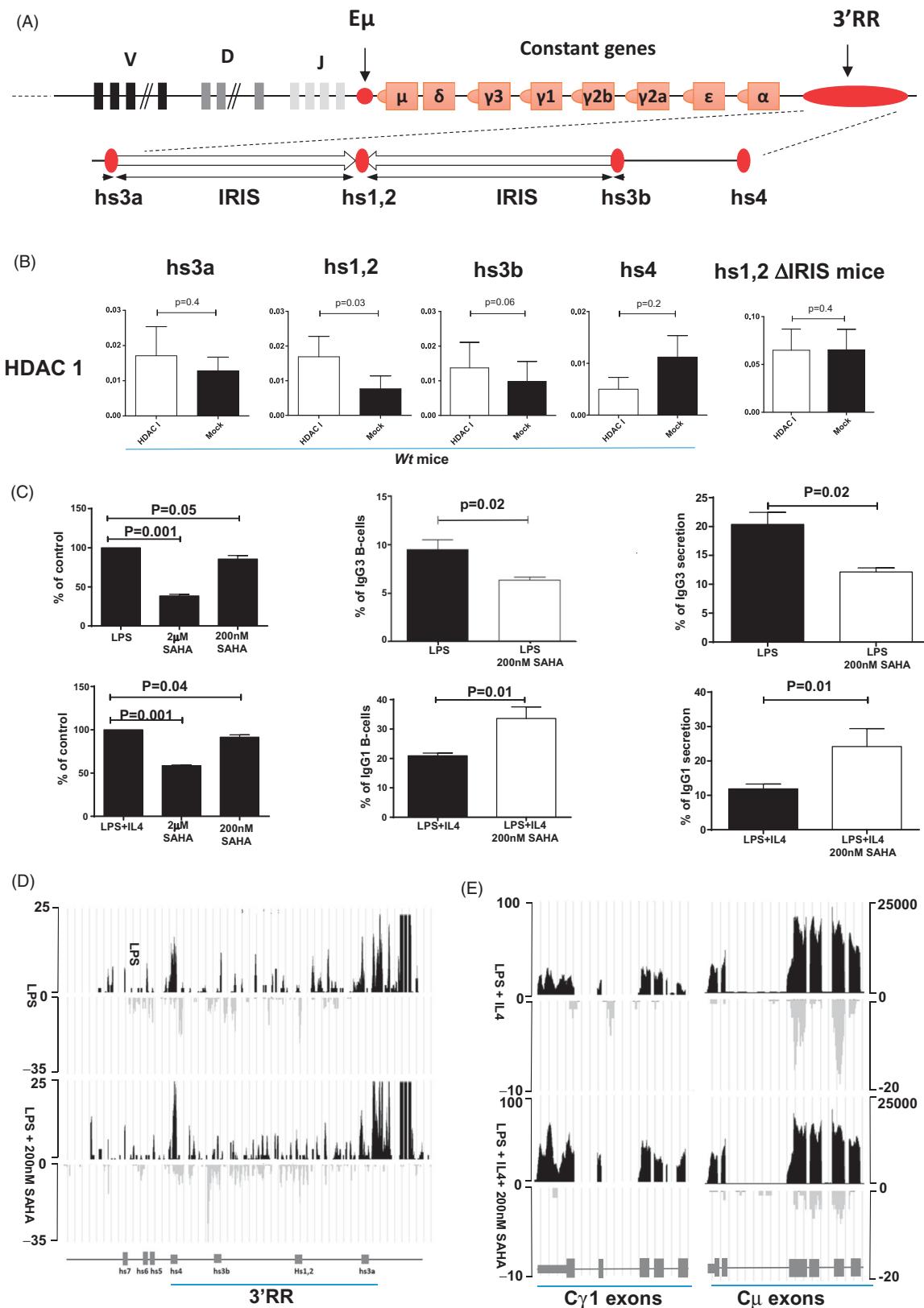
A schematic representation of the IgH locus (not to scale) is reported in Figure 1(A). The IgH 3'RR palindromic structure (to scale) with its four enhancer elements (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) and the intervening response inverted sequences (IRIS) are represented. We investigated CD43<sup>-</sup> mature spleen B-cells (*i.e.* depleted CD43<sup>+</sup> T-cells/monocytes). The vast majority (>90%) of spleen B-cells had a mature B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> phenotype. The remaining cells consisted of transitional B-cells (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>). Less than 1% expressed the CD138 plasmocyte antigen (data not shown). Confirming a previous study [8], ChIP assays indicated that HDAC1 bound to the 3'RR hs1,2 enhancer in LPS-stimulated B-cell splenocytes (Figure 1(B)). No significant HDAC1 binding was found for the 3 other 3'RR enhancers (Figure 1(B)). No HDAC2 and HDAC3 binding to hs1,2 was found (not shown). Deconstructing the palindromic 3'RR structure by deleting the 5'IRIS [4], precluded hs1,2 HDAC1 binding (Figure 1(B)). SAHA selectively inhibited HDAC I/II classes. We thus investigated the role of SAHA on B-cell growth, CSR and Ig synthesis. As shown in Figure 1(C), SAHA decreased B-cell growth in two experimental conditions (LPS ± IL4). SAHA decreased IgG<sub>3</sub> CSR (LPS stimulation) and increased IgG<sub>1</sub> CSR (LPS + IL4 stimulation) (Figure 1(C)). The effects of SAHA on IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>1</sub> CSR paralleled those on IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>1</sub> secretion (Figure 1(C))

**CONTACT** Yves Denizot [yves.denizot@unilim.fr](mailto:yves.denizot@unilim.fr) UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Equipe Labellisée LIGUE 2018, University of Limoges, CBRS, rue Pr. Descottes, Limoges, France

\*These authors have contributed equally to this work and share first authorship.

© 2021 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



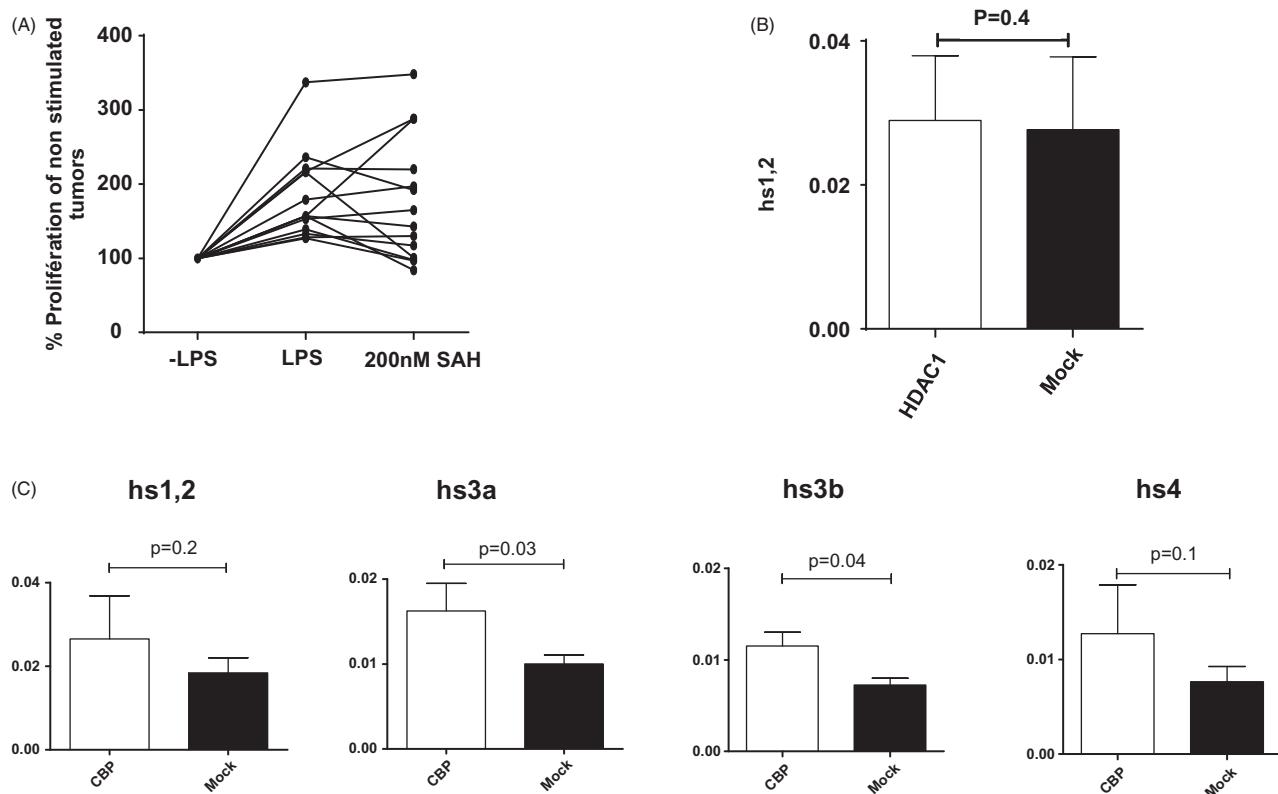
**Figure 1.** HDAC, HDACi and wt B-cells. (A) IgH locus (not to scale). The locations of V-D-J segments, E $\mu$  enhancer, constant genes and 3'RR are indicated. The palindromic structure of the IgH 3'RR (to scale) with its four enhancer elements (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) and the IRIS sequences are represented. (B) HDAC1 fixation on enhancer elements of the 3'RR. ChIP experiments were performed on 2-day LPS-stimulated wt B-cell splenocytes (mean  $\pm$  SEM of 5 experiments) and on 2-day LPS-stimulated  $\Delta$ IRIS B-cell splenocytes (mean  $\pm$  SEM of 6 experiments). The mock immunoprecipitation (IP) during ChIP is the control IP to avoid unspecific antigen-antibody reactions. Quantitative PCR experiments were compared between samples treated with HDAC1 antibodies (white

**Figure 1.** (Continued)

bars) and unspecific antibodies (mock, black bars). Significance with the student-*t*-test for paired data. PCR primers for quantitative PCR are the following: hs4-Fw-ChIP 5'-CCATGGGACTGAAACTCAGGGAACAGAAC-3'; hs4-Rev-ChIP 5'-CTCTGTGACTCGTCCTTAGC-3'; hs3b-Fw-ChIP 5'-TGGTTGGGCCACCTGTGCTGAG-3'; hs3b-Rev-ChIP 5'-GGGTAGGGCAGGGATGCTCACAT-3'; hs3a-Rev-ChIP 5'-GCTCTGGTTGGGCACCTGTGC-3'; hs1,2-Fw-ChIP 5'-AGCATACACTGGGACTGG-3'; hs1,2-Fw-ChIP 5'-CTCTCACTCCCTGGGGTGT-3'. ChIP experiments were done with HDAC1 (ab7028, Abcam) specific antibodies. (C) Influence of SAHA on *in vitro* B-cell growth, CSR and Ig secretion. Proliferation (six replicates) was evaluated with the MTS assay after 3 days stimulation with LPS (5 µg/ml) ± IL-4 (20 ng/ml) in the presence of 2µM and 200 nM SAHA. Results (mean±SEM of 4 experiments) are reported as % of variations as compared to stimulated cells without SAHA (Mann-Whitney *U*-test for significance). IgG3 CSR (LPS stimulation) and IgG1 CSR (LPS + IL4 stimulation) were evaluated by flow cytometry. Results are reported as mean±SEM of 4 and 5 experiments for IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>1</sub>, respectively (Mann-Whitney *U*-test for significance). *In vitro* Ig secretion was evaluated at day 4 by specific ELISAs. Results are reported as mean±SEM of 4 and 5 experiments for IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>1</sub>, respectively (Mann-Whitney *U*-test for significance). (D) Influence of SAHA on 3'RR eRNAs. Sense (in black) and antisense (in grey) transcription in two-day LPS (5µg/ml) ± SAHA (200 nM) stimulated B-cell splenocytes of *wt* mice. One representative experiment out of two (pooled cells from three mice per group) is reported. The locations of the various 3'RR enhancer elements are reported. (E) Influence of SAHA on IgH locus transcription. IgM and IgG<sub>1</sub> sense (in black) and antisense (in grey) transcription in LPS (5µg/ml) ± SAHA (200 nM) stimulated B-cell splenocytes of *wt* mice. Same samples as in D.

suggesting that levels of Ig production depend on the number of switched cells. CSR and Ig synthesis are controlled through IgH locus transcription with 3'RR as a conductor [1]. RNAseq experiments indicated that SAHA treatment had no effect on 3'RR activation judging by the expression of 3'RR sense and antisense enhancer RNAs (eRNAs) (Figure 1(D)). RNAseq data indicated no effect on IgM transcription and increased IgG<sub>1</sub> transcription in response to LPS + IL4 (Figure 1(E)). This result would be related to the increased amount of IgG<sub>1</sub> switched cells in response to SAHA. RNAseq experiments indicated 112 genes down regulated by SAHA with genes implicated in epigenetic-related processes (Smyd2, Nek2, Trmt10a, Rnmtl1) and histone markers (Hist1h2ai/2an/2ah/2ag/2af/2ab/3b/3g) highlighting effectiveness of SAHA treatment. Seventy seven genes were up regulated by SAHA including genes of DNA reparation (Msh5) and inflammation processes (Tnf/Tnfrsf18, Naip5) without evident links with HDAC/AID pathways and switch processes (data not shown). Convincing demonstrations of the essential contributions of 3'RR in B-cell lymphomagenesis have been provided by knock-in (KI) animal models which bring the oncogene *c-myc* under 3'RR transcriptional control [2,9]. We next examined the effect of SAHA on growth of IgH-KI-c-myc mouse B-cell lymphomas. As shown in Figure 2(A), results indicated an inconsistent effect (when using iMycE $\mu$ , iMycC $\mu$  and iMycCo IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> B-cell lymphomas) of SAHA on B-cell lymphoma growth; some increased their LPS stimulated growth, some had unchanged growth and some reduced their growth (despite same B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> mature B-cell phenotype). ChIP assays indicated no HDAC1 binding to the 3'RR hs1,2 enhancer in these freshly isolated mice B-cell lymphomas (Figure 2(B)). In contrast, the histone acetyl transferase (HAT) CBP was recruited to hs3a and hs3b in IgH-KI-c-myc mature B-cell lymphomas (Figure 2(C)) when absent in normal mature B-cell splenocytes (not shown).

We observed that in LPS-activated mature B-cell splenocytes HDAC1 was recruited to the hs1,2 element of the 3'RR. Evolution maintained the unique 3'RR palindromic arrangement in mammals suggesting that it is functionally significant [10]. Deconstructing the palindromic IgH 3'RR in  $\Delta$ IRIS mice strongly impacts its function [4]. In agreement with this result we report that HDAC1 is not efficiently recruited to the hs1,2 enhancer in LPS-stimulated  $\Delta$ IRIS B-splenocytes. Histone acetylation has been associated with key remodeling events of the IgH locus including CSR [11]. The HDACi SAHA decreased *in vitro* B-cell growth in response to various stimulatory conditions. In contrast, SAHA decreased CSR toward IgG<sub>3</sub> and stimulated CSR toward IgG<sub>1</sub>. The effect of SAHA on Ig production (stimulation for IgG<sub>1</sub> and inhibition for IgG<sub>3</sub>) paralleled its effect on CSR. This result differs markedly from previously reported results with primary spleen B-cells from MRL-lpr mice (a mouse strain prone to develop an autoimmune disease resembling systemic lupus erythematosus) [8]. RNAseq analysis of IgH locus transcription in *wt* B-cells in response to LPS revealed no evident effect of SAHA on 3'RR eRNAs suggesting no direct effect on 3'RR activation. The effect of SAHA on CSR and Ig production was thus not through a direct effect on 3'RR activation but through another mechanism (such as iso-type-dependent acetylation/deacetylation of switch regions) that remains to be determined. Our results indicated that HDAC1 does not bind to the hs1,2 enhancer element in murine mature B-cell lymphoma; a major difference compared to stimulated normal mature B-cells. Another major difference, previously reported with the human Raji Burkitt's cell line [12], was the binding of HAT CBP to hs3a/hs3b enhancers that bound the 3'RR palindrome indicating that the HAT/HDAC pathway is not identically regulated in normal mature B-cells and *Δ*IRIS mature B-cell lymphomas. Furthermore if mature B-cell growth was consistently down regulated *in vitro* by SAHA, this was not the case in mature B-cell lymphomas where



**Figure 2.** HDAC, HDACi and mature B-cell lymphomas. (A) Effect of SAHA on *in vitro* proliferation of mature B-cell lymphomas. Freshly isolated B-cell mature B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> lymphomas from i Myc E $\mu$ , i Myc C $\mu$  and i Myc C $\alpha$ ; mice [2] were used. Each line represents one B-cell lymphoma. Each point represents the % of proliferation in response to LPS with or without 200nM SAHA (14 different mouse B-cell lymphomas). Each point is the mean of six replicates. B-cell lymphoma proliferation was evaluated with the MTS assay. The first part of each graph shows the effect of LPS on the B-cell lymphoma proliferation. Only B-cells lymphomas with a higher proliferation in response to LPS were investigated for SAHA treatment to withdrawn lymphomas unable to survey during the experimental conditions. (B) hs1,2 HDAC1 binding on freshly isolated mouse mature B-cell lymphomas. hs1,2 HDAC1 binding (mean  $\pm$  SEM of 10 experiments) was analyzed by ChIP on freshly isolated mouse mature B-cell lymphomas (significance with the Wilcoxon matched paired test) from IgH-KI-c-myc mice. (C) 3'RR enhancer CBP binding on freshly isolated mouse mature B-cell lymphomas. CBP ChIP experiments were performed on freshly isolated B-cell lymphomas from IgH-KI-c-myc mice. Mean  $\pm$  SEM of 4 experiments. Significance with the student-t-test for paired data. ChIP experiments were done with CBP (ab2832) specific antibodies

SAHA sometimes had no effect or a decreased/stimulatory effect without evident links to a B-cell lymphoma phenotype. This effect is consistent with the fact that despite similar *primom movens* (c-myc insertion in the IgH locus) mature B-cell lymphomas arise with different kinetics, KI67 indices and locations due to the numerous different oncogenic hits favoring lymphoma emergence [2]. Our results clearly indicated that even though SAHA affects normal mature B-cell growth [13], this effect is not consistently found in mature B-cell lymphomas and that trying to use HDACi to down regulate 3'RR activation in order to down regulate its effect on oncogene transcription (c-myc in our animal models) is utopic. Translocations in B-cell lymphomas undoubtedly induce epigenetic changes [14] and epigenetic drugs targeting histone acetylation (HDACi) are already used to treat several lymphoid malignancies [15]. The precise mechanism underlining their beneficial use remains to be elucidated

but is clearly not mediated by direct action on IgH 3'RR enhancers. As the HAT CBP, rather than HDAC1, was recruited to the 3'RR in mature B-cell lymphomas but not normal mature B-cells, it would be interesting to see whether targeting CBP would be active against B-cell lymphomas. It is possible that recruitment of CBP, instead of HDAC1, causes the intrinsic resistance to HDAC inhibitors in some types of B-cell lymphomas.

In this study only mature splenic B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> wt B-cells were specifically considered because 3'RR is the major driver of CSR and Ig synthesis. It is also why we explored HDAC binding and HDACi effects only in mature B-cell lymphomas (B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>). It is evident that similar studies on the whole spectrum of B-cell subsets (from pro-B cells to plasmocytes) and B-cell lymphomas would be of interest. Finally, despite wide functional/structural similarities between mouse and human 3'RR [10], our results cannot

be directly translated into human counterparts requiring further studies to clarify this point.

## Acknowledgments

Authors are "Equipe Labellisée LIGUE 2018". This work was in part supported by ANR (projet EpiSwitch-3'RR 2016). N.G. and H.I. were supported by a grant from ANR (projet EpiSwitch-3'RR 2016). M.F. is supported by University of Limoges and "Région Nouvelle Aquitaine". We thank the animal and bioinformatics facilities of Limoges University (BISCEm, France) and the Nice/Sophia Antipolis microarray facility (France) for RNAseq experiments.

## Author contributions

Y.D. designed research and obtained financial grants. N.G., M.F., and H.I. performed research. M.F., S.LN., J.CM., J.P. and Y.D. analyzed transcriptomic data. N.G., M.F., S.LN., J.P., J.CM. and Y.D. wrote the paper.

## Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest.

## Funding

This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche and Ligue Contre le Cancer.

## References

- [1] Oudinet C, Braikia FZ, Dauba A, et al. Mechanism and regulation of class switch recombination by IgH transcriptional control elements. *Adv Immunol.* 2020;147:89–137.
- [2] Ghazzaui N, Issaoui H, Ferrad M, et al. Eμ and 3'RR transcriptional enhancers of the IgH locus cooperate to promote c-myc-induced mature B-cell lymphomas. *Blood Adv.* 2020;4(1):28–39.
- [3] Saintamand A, Saad F, Denizot Y. 3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy? *Cell Cycle.* 2015;14(6):789–790.
- [4] 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.
- [5] 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(10):5829–5837.
- [6] 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.
- [7] Saintamand A, Vincent-Fabert C, Marquet M, et al. Eμ and 3'RR IgH enhancers show hierachic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):442.
- [8] Lu ZP, Ju ZL, Shi GY, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin a reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330(1):204–209.
- [9] Ferrad M, Ghazzaui N, Issaoui H, et al. Mouse models of c-myc deregulation driven by IgH locus enhancers as models of B-cell lymphomagenesis. *Front Immunol.* 2020;11:1564.
- [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] Nambu Y, Sugai M, Gonda H, et al. Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science.* 2003;302(5653):2137–2140.
- [12] Hu HM, Kanda K, Zhang L, et al. Activation of the c-myc P1 promoter in Burkitt's lymphoma by the hs3 immunoglobulin heavy-chain gene enhancer. *Leukemia.* 2007;21(4):747–753.
- [13] Waibel M, Christiansen AJ, Hibbs ML, et al. Manipulation of B-cell responses with histone deacetylase inhibitors. *Nat Comm.* 2015;6:6838.
- [14] Lindström MS, Wiman KG. Role of genetic and epigenetic changes in burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(5):381–387.
- [15] Sborov DW, Canella A, Hade EM, et al. A phase 1 trial of the HDAC inhibitor AR-42 in patients with multiple myeloma and T- and B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(10):1218–2310.



## Book Chapter

# HDAC/HDACi, IgH 3'RR Enhancers, B-Cells and B-Cell Lymphomas

Melissa Ferrad<sup>1#</sup>, Nour Ghazzaui<sup>1#</sup>, Hussein Issaoui<sup>1#</sup>, Jeanne Cook-Moreau<sup>1</sup>, Tiffany Marchiol<sup>1</sup>, Justine Pollet<sup>2</sup>, Sandrine Le Noir<sup>1</sup> and Yves Denizot<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Equipe Labellisée LIGUE 2018, Université de Limoges, CBRS, France

<sup>2</sup>BISCEm - Pôle analyses moléculaires, France

#Equal contributors

\*Corresponding Author: Yves Denizot, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Equipe Labellisée LIGUE 2018, Université de Limoges, CBRS, rue Pr. Descottes, 87025 Limoges, France

Published September 15, 2021

**How to cite this book chapter:** Melissa Ferrad, Nour Ghazzaui, Hussein Issaoui, Jeanne Cook-Moreau, Tiffany Marchiol, Justine Pollet, Sandrine Le Noir, Yves Denizot. HDAC/HDACi, IgH 3'RR Enhancers, B-Cells and B-Cell Lymphomas. In: Hussein Fayyad Kazan, editor. Immunology and Cancer: Advanced concepts. Hyderabad, India: Vide Leaf. 2021.

© The Author(s) 2021. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Acknowledgments:** Authors are “Equipe Labellisée LIGUE 2018”. This work was in part supported by ANR (projet EpiSwitch-3'RR 2016). N.G. and H.I were supported by a grant from ANR (projet EpiSwitch-3'RR 2016). M.F. is supported by University of Limoges and “Région Nouvelle Aquitaine”. We

thank the animal facility of Limoges University (France) for housing mice and the Nice/Sophia Antipolis Microarray Facility (France) for RNAseq experiments.

**For readers:** Some of these results were previously published in the following article: Nour Ghazzaui, Mélissa Ferrad, Hussein Issaoui, Sandrine Lecardeur, Jeanne Cook-Moreau, Justine Pollet, Sandrine Le Noir & Yves Denizot (2021) HDAC recruitment in the IgH locus 3' regulatory region is different between mature B-cells and mature B-cell lymphomas, Leukemia & Lymphoma, DOI: 10.1080/10428194.2021.1961239

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Author contributions:** Nour Ghazzaui, Melissa Ferrad, Hussein Issaoui and Tiffany Marchiol performed experiments. Sandrine Le Noir, Jeanne Cook-Moreau and Yves Denizot analysed data and wrote the paper. Justine Pollet, Sandrine Le Noir and Yves Denizot analyzed transcriptomic data. Yves Denizot obtained financial grants.

## Abstract

Numerous B-cell lymphomas feature translocations linking oncogenes with the immunoglobulin heavy chain (IgH) locus. Epigenetic drugs such as histone deacetylase inhibitors (HDACi) have been approved to treat certain T-cell and B-cell lymphomas. Transcription, accessibility and remodelling of the IgH locus are under the control of the potent *cis*-acting 3' regulatory region (3'RR) suggesting that its targeting would be of therapeutic interest to reduce oncogenicity *in vivo*. We thus investigated HDAC recruitment and HDACi effects on 3'RR activation in normal mature mouse B-cells and whether or not results paralleled those obtained with mature mouse B-cell lymphomas. HDAC1 was recruited to the hs1,2 enhancer element in the centre of the 3'RR palindromic structure during mouse B-cell activation. The HDACi SAHA (suberanilohydroxamic acid) reduced B-cell growth and affected B-cell class switch recombination (CSR) in an isotype-dependent

manner (decreased IgG<sub>3</sub> and increased IgG<sub>1</sub>) without any obvious effect on complete IgH locus transcription (including 3'RR eRNA production). Results were markedly different in mature mouse B-cell lymphomas with no HDAC1 recruitment to the 3'RR but recruitment of the CBP histone acetyl transferase (HAT) to hs3a and hs3b elements bordering the 3'RR palindromic structure. No corresponding effect of SAHA on *in vitro* growth of freshly isolated B-cell lymphomas was found. In conclusion, differences in HDAC recruitment and HDACi effects exist between normal mature B-cells and mature B-cell lymphomas. The precise mechanism underlining beneficial use of HDACi to treat several B-cell lymphoid malignancies remains to be elucidated but is clearly not mediated by direct action on IgH 3'RR enhancers.

## Introduction

After encountering antigen, B-cells undergo class switch recombination (CSR) that substitutes the constant (C)<sub>μ</sub> gene with C<sub>γ</sub>, C<sub>ε</sub> or C<sub>α</sub>, thereby generating IgG, IgE and IgA antibodies with new effector functions but the same antigenic specificity [1]. CSR is controlled in *cis* by the immunoglobulin heavy chain (IgH) 3'regulatory region (3'RR) that is essential to target the DNA-editing enzyme activation-induced deaminase (AID) onto DNA switch (S) acceptor regions [2,3]. The 3'RR is a complex element with four transcriptional enhancers (namely hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) encompassed in a unique and functional 3D palindromic architecture [4,5]. The 3'RR has transcriptional activator activity from immature to mature B-cell stages [6,7] and is the conductor for Ig production [8]. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) are a class of compounds reported to modulate gene expression by remodelling chromatin accessibility. HDACi are reported to affect *in vivo* and *in vitro* B-cell responses [9,10]. HDACi are approved for treating certain T-cell and B-cell lymphomas [11,12]. Deciphering the molecular events or mechanisms that underlie the B-cell HDACi-induced effect is of interest not only for basic B-cell immune responses but also for a better understanding of the rationale for the use of HDACi in B-cell lymphoma treatment. HDAC1 has been previously reported to bind to the IgH 3'RR during B-cell

activation suggesting a direct role for HDAC recruitment on 3'RR regulatory functions [9]. The aim of this study was to determine if the effect of the HDACi SAHA on B-cell responses is mediated by a direct effect on the IgH locus through a repressive effect on 3'RR enhancer activation or to a more pleiotropic effect on all cell proliferation/activation/survival pathways.

## Material and Methods

**Mice** - 129 *wt* mice and ΔIRIS mice [4] were used. Mice were housed and 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<sup>er</sup> 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'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche ».

**Spleen Cell Cultures for Growth, CSR and Ig Determinations** - Single-cell suspensions of CD43<sup>-</sup> spleen cells of *wt* mice (8-12 week old, males and females) were cultured 3 days at 1x10<sup>6</sup> cells/ml in RPMI 1640 with 10% foetal calf serum (FCS), 5µg/ml LPS with or without 20ng/ml IL4 (PeproTech, Rocky Hill, NJ) in the presence or not of various concentrations of SAHA. At day 3, cell proliferation (six replicates) was evaluated using the MTS assay. At day 4, CSR was evaluated by incubating cultured spleen B-cells with anti-B220-SpectralRed (PC5)-labelled antibodies (Biolegend, ref: 103212), anti-IgG<sub>1</sub>- (ref: 107020) and anti-IgG<sub>3</sub>- (ref: 110002) fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labelled antibodies (Southern Biotechnologies) and analyzed on a Fortessa LSR2 (Beckton-Dickinson). At day 3, 1x10<sup>6</sup> cells were cultured for 24 hours in growth medium without LPS/cytokine/SAHA. Supernatants were recovered and stored at -20°C until used for Ig quantification (ELISA assays specific for IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub>) [3,13]. In a separate set of experiments spleen B-cells were directly labelled with anti-B220-, anti-CD19-, anti-IgM-, anti-IgD- and anti-CD138- antibodies to assess the percentage of transitional

B-cells ( $B220^+CD19^+IgM^+IgD^-$ ), mature B-cells ( $B220^+CD19^+IgM^+IgD^+$ ) and plasma B-cells ( $B220^+CD19^+CD138^+$ ) in our experimental conditions.

**ChIP Experiments** - Single-cell suspensions of  $CD43^-$  spleen cells from *wt* mice and  $\Delta$ IRIS mice were cultured 2 days at  $1 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1640 with 10% FCS and 5 $\mu$ g/ml LPS. ChIP experiments were done as previously described [3] with HDAC1 (ab7028, Abcam), HDAC2 (ab7030), HDAC3 (ab7029), CBP (ab2832) and PCAF (ab12188) specific antibodies. PCR primers for quantitative PCR were the following: hs4-Fw-ChIP 5'-CCATGGGACTGAAACTCAGGGAACCAGAAC-3'; hs4-Rev-ChIP 5'-CTCTGTGACTCGTCCTAGC-3'; hs3b-Fw-ChIP 5'-TGGTTGGGCCACCTGTGCTGAG-3'; hs3b-Rev-ChIP 5'-GGGTAGGGCAGGGATGTTCA CAT-3'; hs3a-Fw-ChIP 5'-GGGTAGGGCAGGGATGCTCACAT-3'; hs3a-Rev-ChIP 5'-GCTCTGGTTGGGCACCTGTGC-3'; hs1,2-Fw-ChIP 5'-AGCATACACTGGGACTGG-3'; hs1,2-Fw-ChIP 5'-CTCTCACTCCCTGGGGTGT-3'.

**RNAseq Experiments** -  $CD43^-$  splenocytes were obtained from *wt* mice after 48h of *in vitro* stimulation ( $1 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1640 with 10% FCS) with 5 $\mu$ g/ml LPS  $\pm$  200 ng/ml SAHA. RNA was extracted using miRNeasy kit from QIAGEN, according to the manufacturer's instructions. Two pooled RNAs (each with three samples) were obtained for each stimulatory condition. RNA libraries were obtained using TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold (Illumina), according to the manufacturer's instructions. Libraries were sequenced on a NextSeq500 sequencer, using NextSeq 500/550 High Output Kit (Illumina) (Nice Sophia-Antipolis Functional Genomics Platform, France). Illumina NextSeq500 paired-end 2x150nt reads were mapped with STAR release v2.4.0a versus mm10 with gene model from Ensembl release 77 with default parameters. RNAseq data were deposited with the accession number GSE169690 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE169690>) and GSE169691 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE169691>). 72

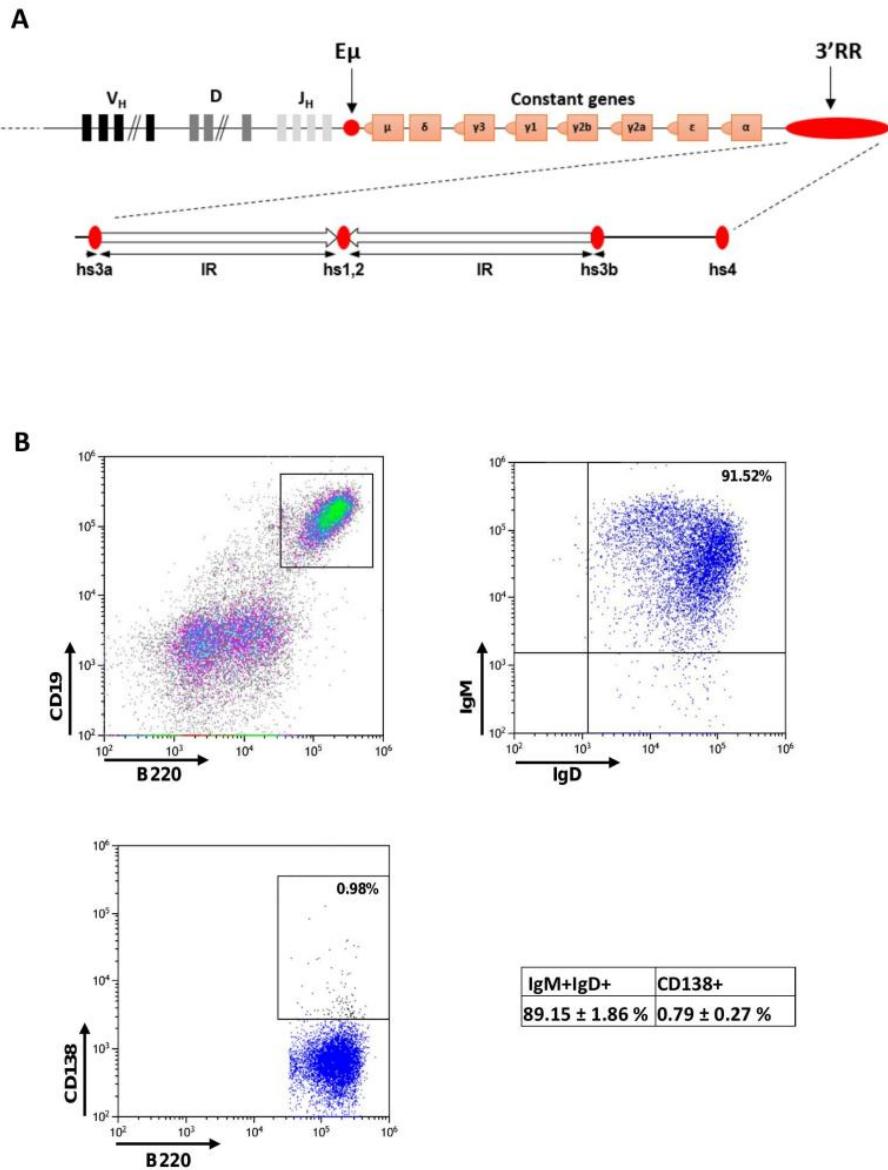
**Mature B-Cell Lymphomas** - Freshly isolated B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> mature B-cell lymphomas were obtained from *iMycC<sub>μ</sub>*, *iMycE<sub>μ</sub>* and *iMycC<sub>α</sub>* mice [14-18]. ChIP experiments and proliferation studies were performed as for mature *wt* B-cells.

## Results

**HDAC1 is Recruited to the 3'RR hs1,2 Enhancer** - A schematic representation of the IgH locus (not to scale) is shown in Figure 1A. The IgH 3'RR palindromic structure (to scale) with its four enhancer elements (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) and the IRIS sequences are represented. In this study we investigated CD43<sup>-</sup> mature spleen B-cells (*i.e.*, depleted CD43<sup>+</sup> T-cells and monocytes). About 90% of spleen B-cells had a mature B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> phenotype. The remaining cells consisted of transitional B-cells (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>). Less than 1% expressed the CD138 plasmocyte antigen (Figure 1B). Confirming a previous study [9], ChIP assays indicated that HDAC1 binds to the 3'RR hs1,2 enhancer in LPS-stimulated mature B-cell splenocytes (Figure 2A). No significant HDAC1 binding was found for the 3 other 3'RR enhancers (*i.e.*, hs3a, hs3b and hs4). No hs1,2 HDAC1 binding was found in resting B-cell splenocytes (data not shown). In similar LPS-stimulated conditions no significant HDAC2 and HDAC3 binding to hs1,2 was found (Figure 2A). Deconstructing the palindromic 3'RR structure by deleting the 5'IRIS [4] precluded hs1,2 HDAC1 binding in mature B-cell (Figure 2B).

**SAHA Effect on In Vitro Mature B-Cell Proliferation, CSR and Ig Synthesis** - SAHA selectively inhibits HDAC I (such as HDAC1) and II classes. We thus investigated the role of SAHA on mature B-cell growth, CSR and Ig synthesis. As shown in Figure 3A, MTS assay indicated that SAHA decreased B-cell growth in a dose-dependent manner in two experimental conditions (LPS ± IL4). Flow cytometry analysis indicated that SAHA decreased IgG<sub>3</sub> CSR (LPS stimulation) and increased IgG<sub>1</sub> CSR (LPS+IL4 stimulation) (Figure 3B). ELISA experiments indicated that SAHA effects on IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>1</sub> CSR paralleled those on IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>1</sub> secretion (Figure 3C)

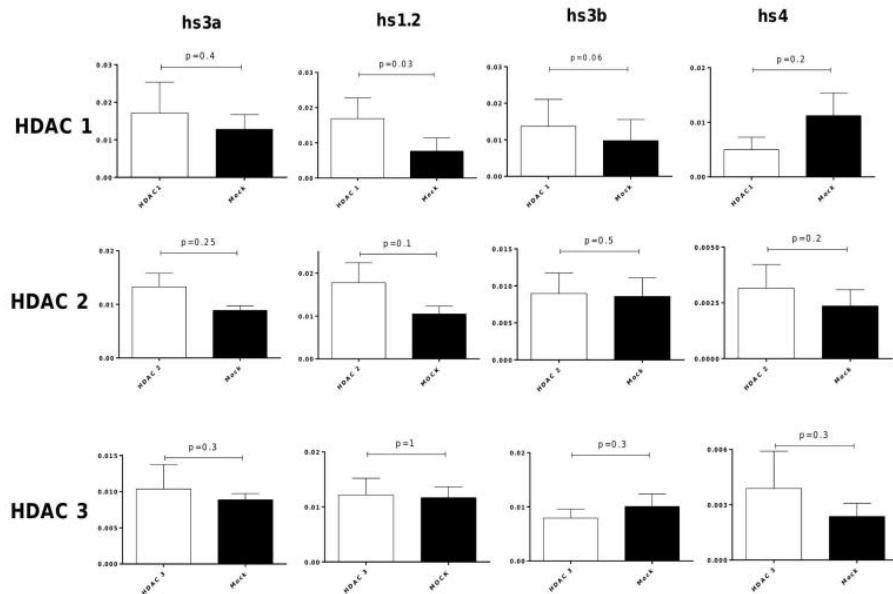
suggesting that levels of Ig productions depend on the number of switched cells.



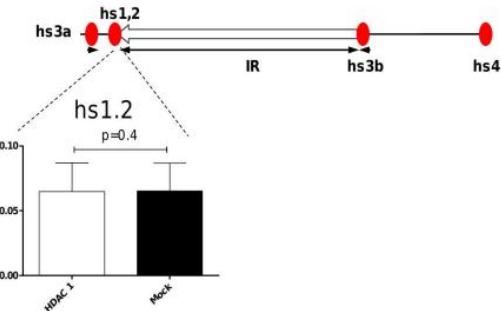
**Figure 1:** IgH locus and mature spleen B-cells. A: IgH locus (not to scale). The locations of variability (V), diversity (D), junction (J) and constant segments are indicated as well as 5' Eμ and 3' RR enhancers. The palindromic structure of the IgH 3' RR (to scale) with its four enhancer elements (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) and the IRIS sequences are represented.

B: Surface phenotype of CD43<sup>-</sup> spleen B-cells. % of IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> and IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> cells were determined after gating on B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> cells. The following labelled antibodies were used: B220-bv510, CD19-PE, IgM-FITC, IgD-bv421 and CD138-APC. Results are representative of 4 mice. Results are reported as mean  $\pm$  SEM of 4 experiments.

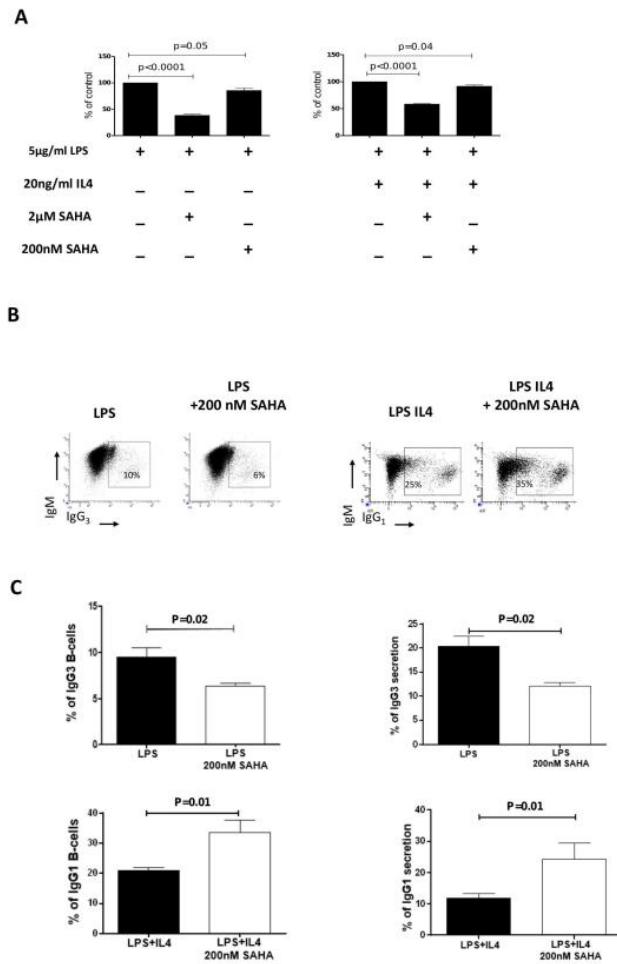
A



B



**Figure 2:** HDAC and 3'RR enhancers. A: HDAC1, HDAC2 and HDAC3 fixation on enhancer elements of the 3'RR. ChIP experiments were performed on 2-day LPS-stimulated spleen B-cells. Mean  $\pm$  SEM of 5 experiments (significance with the student-*t*-test for paired data). The mock IP during ChIP is the control IP to avoid nonspecific antigen-antibody reactions. Another antibody (anti mouse rabbit IgG) which does not specifically bind HDAC was used. Quantitative PCR experiments were compared between samples treated with HDAC antibodies (white bars) and unspecific antibodies (mock, black bars). B: The 3'RR in ΔIRIS mice (to scale). HDAC1 fixation on the hs1,2 enhancer was studied on 2-day LPS-stimulated spleen ΔIRIS B-cells. Mean  $\pm$  SEM of 6 experiments (significance with the student-*t*-test for paired data).



**Figure 3:** Influence of SAHA on *in vitro* mature B-cell growth, CSR and Ig secretion. A: Influence of SAHA on *in vitro* mature B-cell growth. Proliferation (six replicates) was evaluated by the MTS assay after 3 days stimulation with LPS (5  $\mu$ g/ml)  $\pm$  IL-4 (20 ng/ml) in the presence of various SAHA concentrations. Results (mean  $\pm$  SEM of 4 independent experiments) are reported as % of variations as compared to stimulated cells without SAHA. Mann-Whitney *U*-test for significance. B: Influence of SAHA on *in vitro* mature B-cell CSR. Spleen B-cells were stimulated as in A. IgG<sub>3</sub> CSR (LPS stimulation) and IgG<sub>1</sub> CSR (LPS+IL4 stimulation) were evaluated by flow cytometry. Cells gated on B220 $^{+}$  and/or CD138 $^{+}$  cells were labelled with anti-IgM, anti-IgG<sub>3</sub> and anti-IgG<sub>1</sub> antibodies. A typical flow cytometry phenotyping was reported for each stimulatory condition. Results are reported as mean  $\pm$  SEM of 4 and 5 independent experiments for IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>1</sub>, respectively. Mann-Whitney *U*-test for significance. C: Influence of SAHA on *in vitro* Ig secretion. Spleen B-cells were stimulated as in A and Ig secretion was evaluated at day 4 by specific ELISAs. Results are reported as mean  $\pm$  SEM of 4 and 5 independent experiments for IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>1</sub>, respectively. Mann-Whitney *U*-test for significance.

**SAHA Effect on IgH Locus Transcription -** CSR and Ig synthesis are controlled through IgH locus transcription with 3'RR as a conductor [8, 13]. We then determined if the effect of SAHA on B-cell responses was mediated through an overall down regulation of IgH locus transcription and/or a specific targeting of 3'RR activation assessed through generation of enhancer RNA (eRNA). RNAseq experiments indicated that SAHA treatment had no effect on 3'RR activation judging by the expression of 3'RR eRNA (both sense and antisense) (Figure 4). Since the 3'RR controls IgH locus transcription, the lack of SAHA effect on 3'RR activation was consistent with the absence of obvious effects of SAHA on  $I_{\gamma 3}$ - $C_{\gamma 3}$  transcription (LPS stimulation) and  $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$  transcription (LPS+IL4 stimulation) of the IgH locus (Figure 4). We next analyzed genome-wide gene expression between LPS- and LPS+SAHA-treated mature spleen B-cells. Data indicated 112 down-regulated genes by SAHA (log<sub>2</sub> fold change threshold > 1, adjusted p value <0.05) (Table 1). Numerous genes were implicated in growth processes, in epigenetic-related processes (Smyd2, Nek2, Trmt10a, Rnmtl1) and histone markers (Hist1h2ai/2an/2ah/2ag/2af/2ab/3b/3g) highlighting efficiency of SAHA treatment. Seventy seven genes were up-regulated in response to SAHA but without evident links to HDAC/AID pathways and switch processes (Table 2).

**Table 1:** Down-regulated genes in response to SAHA. CD43<sup>+</sup> spleen B-cells were stimulated for 2-day with LPS ± SAHA. Genes implicated in growth processes are colored in yellow. Genes implicated in epigenetic-related processes and histone markers are colored in blue. Log2 fold change threshold > 1 and adjusted p value <0.05.

Down regulated genes									
Genes	log2 fold change	P adjusted	Genes	log2 fold change	P adjusted	Genes	log2 fold change	P adjusted	
Hspd1	-1.11	4.15e-6	Cdca8	-1.05	7.90e-4	Kpna2	-1.07	4.63e-6	
Sgol2a	-1.03	0.001	Rcc1	-1.05	3.07e-5	Birc5	-1.07	9.03e-5	
Ctla4	-1.71	0.004	Sesn2	-1.27	0.006	Idi1	-1.03	1.99e-4	
Il10	-1.28	3.07e-5	Hmgn2	-1.10	5.94e-5	Hist1h2ai	-1.00	0.002	
Aspm	-1.08	6.00e-5	Alpl	-1.15	0.001	Hist1h2an	-1.18	8.18e-4	
Nuf2	-1.01	0.001	Cldn12	-1.10	0.036	Hist1h2ah	-1.29	1.89e-4	
Cenpf	-1.06	1.55e-4	Dbf4	-1.00	1.45e-4	Hist1h2ag	-1.12	0.002	
Smyd2	-1.26	0.001	Ncapg	-1.10	6.00e-5	Hist1h2af	-1.34	6.22e-6	
Nek2	-1.01	0.001	Adap1	-1.01	0.002	Hist1h3g	-1.00	0.001	
Suv39h2	-1.12	0.011	Asns	-1.41	9.08e-8	Hist1h2ab	-1.21	1.14e-4	
Sapcd2	-1.07	0.034	RP23-5D6.6	-1.59	0.048	Hist1h3b	-1.25	3.07e-5	
Snora17	-1.00	0.047	Ptgir	-1.35	4.06e-4	Eeff1e1	-1.15	1.64e-4	
Pkp4	-1.26	0.008	Slco3a1	-1.24	0.001	Cenpp	-1.13	0.011	
Kif18a	-1.12	1.06e-4	Prc1	-1.19	2.51e-5	Nfil3	-1.64	0.001	
Aven	-1.05	0.013	Lrrc32	-1.22	0.025	Trip13	-1.13	9.03e-5	
Chac1	-2.14	1.14e-4	Plik1	-1.09	0.001	Ccnb1	-1.33	2.09e-8	
Oip5	-1.03	0.010	Fbxo5	-1.13	4.94e-4	Pgap2a	-1.03	0.021	
Nusap1	-1.09	3.07e-5	Prdm1	-1.43	1.65e-5	Rrm2	-1.05	8.49e-5	
Bub1	-1.13	2.03e-5	Ppa1	-1.22	1.31e-6	Id2	-1.10	0.033	
Eif2s2	-1.00	9.03e-5	Dna2	-1.06	0.002	Mis18bp1	-1.25	2.03e-5	
Fam83d	-1.16	0.013	Cdk1	-1.21	4.72e-7	Cdc45	-1.05	2.79e-4	
Mybl2	-1.08	3.18e-4	Hsp90b1	-1.04	1.08e-4	Tfrc	-1.03	3.07e-5	
Ube2c	-1.10	4.20e-5	Parpbp	-1.01	0.016	Sgoll	-1.32	7.60e-5	
Pfdn4	-1.08	0.005	Nup37	-1.05	0.001	Kif20a	-1.15	7.85e-4	
Aurka	-1.21	9.24e-5	Hmgb2	-1.11	6.66e-4	Tubb6	-1.33	0.014	
Cfp	-1.48	4.44e-6	Neto2	-1.09	0.031	Skal1	-1.07	0.006	
Kif4	-1.01	4.10e-4	Cenpn	-1.07	0.009	Kif11	-1.09	1.03e-5	
Slc7a3	-1.60	3.73e-6	Slc7a5	-1.11	0.001	Slc35g1	-1.16	0.036	
Siah1b	-1.15	0.015	Cdkn3	-1.24	0.010	Psmc3ip	-1.15	0.003	

Immunology and Cancer: Advanced concepts

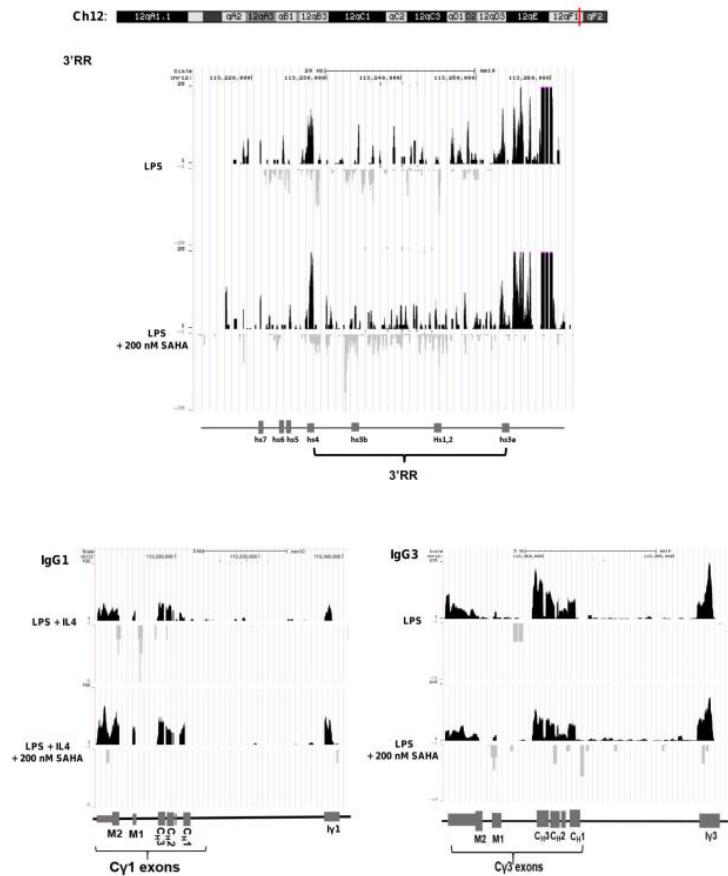
Fabp5	-1.19	0.002	Ska3	-1.22	0.001	Mfsd2a	-1.18	0.004
Ect2	-1.15	2.39e-5	Pbk	-1.08	0.001			
Ccna2	-1.06	8.66e-6	Spc24	-1.08	2.79e-4			
Plk4	-1.02	1.48e-4	H2afx	-1.06	2.66e-4			
Fam46c	-1.60	9.08e-8	Kif23	-1.24	1.01e-5			
Slc16a1	-1.04	3.54e-5	Ccnb2	-1.01	4.67e-4			
Cenpe	-1.02	3.40e-4	Traip	-1.01	0.006			
Trmt10a	-1.00	0.006	Pno1	-1.02	4.68e-4			
Depdc1a	-1.05	0.002	Hmmr	-1.07	9.03e-5			
Ccne2	-1.02	0.001	Rnmtl1	-1.10	0.013			
Kif2c	-1.08	0.001	Tmem97	-1.13	2.06e-4			
Cdc20	-1.37	4.19e-6	Top2a	-1.02	8.66e-6			

**Table 2:** Up-regulated genes in response to SAHA treatment. Same cells as in Table 1. Log2 fold change threshold > 1 and adjusted p value <0.05.

Up-regulated genes					
Genes	log2 fold change	P adjusted	genes	log2 fold change	P adjusted
Dst	1.51	0.012	Tsc22d1	1.45	0.006
Bmp2	1.75	0.015	Ddx25	1.45	0.036
Mroh2a	2.35	0.010	Cyp4f18	1.50	2.72e-7
Mr1	1.11	0.047	Lpcat2	1.78	0.004
Pbx1	2.23	0.026	Fam65a	1.53	0.023
Cr2	1.22	9.08e-8	Cbf2t3	1.32	0.045
Ralgps1	1.29	0.037	Zflhx2	1.26	0.025
Gsn	1.53	6.22e-6	Slc9a9	2.54	2.796e-4
Cers6	1.06	0.015	Abhd14b	1.63	0.045
Ttn	2.20	0.023	Fbxw10	1.87	0.048
Accs	1.10	0.033	Cacnb1	1.83	0.041
Slpi	1.52	0.005	Kif19a	2.55	0.004
Arhgap6	1.28	0.033	Rab37	1.56	0.030
Maml3	1.13	0.033	Sox4	1.29	0.049
Cd1d1	1.22	0.001	Pdlim7	1.09	0.037

Immunology and Cancer: Advanced concepts

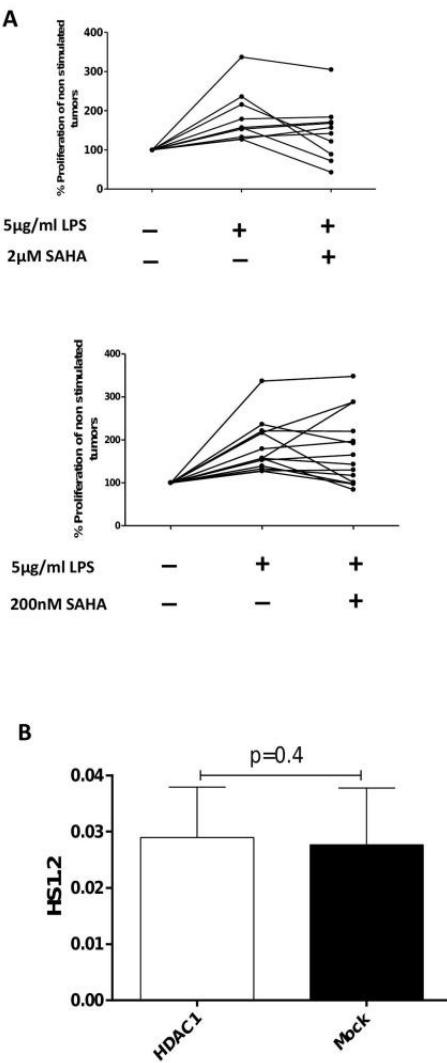
Tspan2	1.02	0.008	Naip5	1.20	0.016
Rwdd3	1.29	0.037	Zfp36l1	1.02	8.89e-5
Sit1	1.19	0.031	Ift43	2.29	0.037
Mir5120	1.43	0.032	Lifr	2.35	0.040
Whrn	1.52	0.001	Mapk11	1.03	0.005
Rnu11	1.11	0.005	Igk4	1.99	0.048
Ahdc1	1.13	0.031	Lamp3	1.70	0.035
Padi2	1.50	0.044	Bcl6	1.15	9.493e-4
Tnfrsf18	1.94	0.003	BC051142	1.61	0.026
Gisap	1.33	8.52e-4	Msh5	1.24	0.035
Afap1	2.09	0.018	Tnf	1.12	7.90e-4
Antxr2	1.02	0.034	Lta	1.24	0.041
Rasgef1b	1.13	7.46e-4	Gabbr1	1.23	0.028
Gbp8	2.32	3.99e-4	Crisp3	1.49	7.90e-4
Clip2	1.65	0.018	Cxxc5	1.01	0.006
Hip1	1.48	0.002	Clcf1	1.03	0.002
Vamp5	1.40	0.032	Ifit1bl1	1.06	0.017
Pex26	1.30	0.048	Grk5	1.26	0.044
Tmem147os	1.49	0.043	mt-Tq	1.39	0.016
Arrb1	1.13	0.001	Evi5l	1.21	0.032
Trim3	1.29	0.048			
Sbf2	1.12	0.003			
Rassf7	1.35	0.040			
Marcks	1.24	2.03e-5			
Smpdl3a	1.07	0.012			
Gdf11	1.04	0.001			
Fcer2a	1.17	1.67e-6			



**Figure 4:** Influence of SAHA on IgH locus transcription. Upper panel: Effect of SAHA on 3'RR eRNA. Sense (in black) and antisense (in grey) transcription in two-day LPS (5 $\mu$ g/ml)  $\pm$  SAHA (200 nM) stimulated mature B-cell splenocytes from *wt* mice. One representative experiment out of 2 is reported (pooled cells from three mice per group). The locations of hs3a, hs1,2, hs3b and hs4 enhancer elements of the 3'RR are shown. Lower panels: Effect of SAHA on  $I_{\gamma 3}$ - $C_{\gamma 3}$  transcription (LPS stimulation) and  $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$  transcription (LPS+IL4 stimulation). One representative experiment out of 2 is reported.

**SAHA and in vitro B-Cell Lymphoma Proliferation -** Convincing demonstrations of the essential contributions of the 3'RR in mature B-cell lymphomagenesis have been provided by knock-in (KI) animal models which bring the oncogene *c-myc* under 3'RR transcriptional control (such as for *iMycC $\mu$* , *iMycE $\mu$*  and *iMycC $\alpha$*  mice) [14-18]. We next examined the effect of SAHA on growth of mature mouse B-cell lymphomas ( $B220^+CD19^+IgM^+IgD^+$ ) induced after *c-myc* insertion into the IgH locus. As shown in Figure 5A, and in contrast to normal mature B-cells, results clearly indicated an inconsistent SAHA

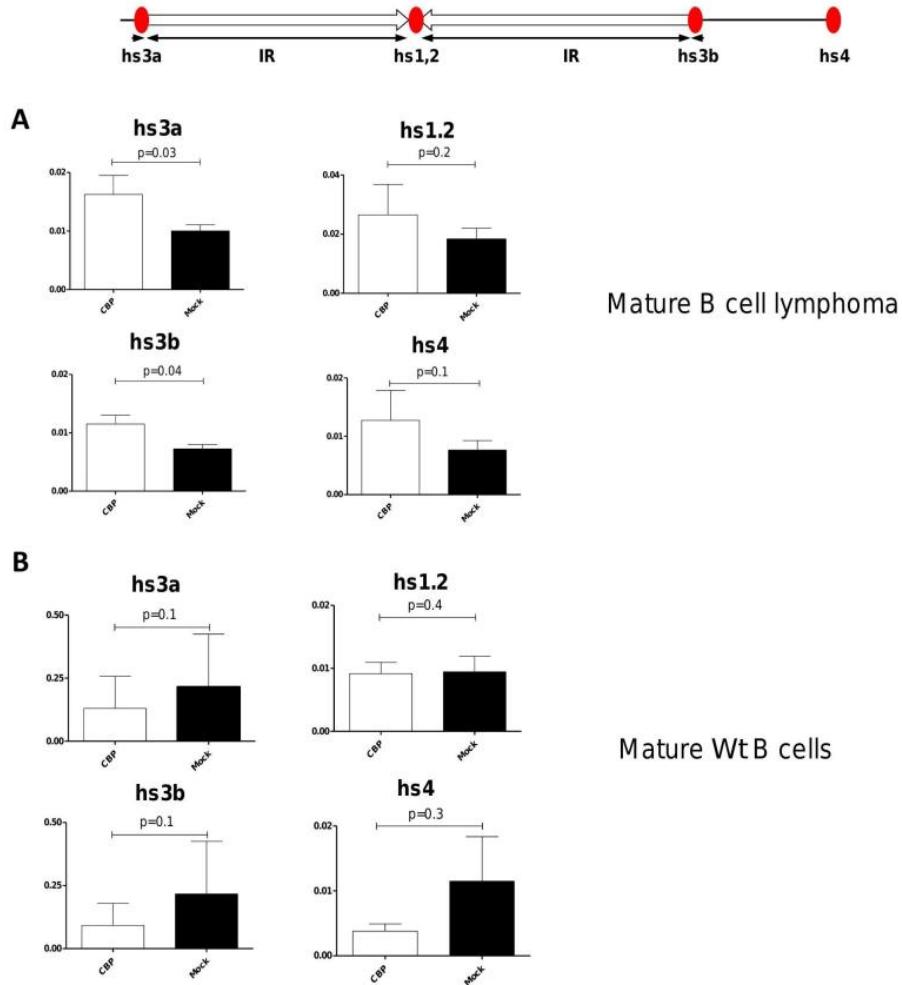
effect on mature B-cell lymphoma growth; some lymphoma samples increased their LPS stimulated growth in response to SAHA, some had unchanged growth and some reduced their growth (despite the same IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> mature B-cell phenotype). ChIP assays indicated no HDAC1 binding to the 3'RR hs1,2 enhancer in these freshly isolated mature mouse B-cell lymphomas (Figure 5B).



**Figure 5:** Influence of SAHA on proliferation of c-myc-induced mature B-cell lymphomas. A: Freshly isolated mature B-cell lymphomas from iMycE<sub>μ</sub>, iMycC<sub>μ</sub> and iMycC<sub>α</sub> mice were used. Each line represents one B-cell lymphoma. Each point represents the % proliferation in response to LPS with or without SAHA (10 and 14 different mouse B-cell lymphomas for 2mM SAHA and 200 nM SAHA, respectively). Each point is the mean of six

replicates. Proliferation of B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> B-cell lymphomas was evaluated with the MTS assay. The first part of each graph shows the effect of LPS on B-cell lymphoma proliferation (to ensure that B-cell lymphomas remain alive after 3 days of *in vitro* growth). Thus all tested lymphomas had a percentage of proliferation higher than their controls without LPS (indicated as 100%). Only B-cells lymphomas with a higher proliferation in response to LPS were investigated for SAHA treatment to withdraw lymphomas unable to survive under the experimental conditions. B: hs1,2 HDAC1 binding in mature mouse B-cell lymphomas. ChIP experiments were performed on freshly isolated B-cell lymphomas from iMycE<sub>μ</sub>, iMycC<sub>μ</sub> and iMycC<sub>α</sub> mice. Mean ± SEM of 10 experiments (no significance with the Wilcoxon matched paired test). See legend to Figure 1 for mock explanation.

**CPB is recruited to the hs3a and hs3b Enhancer in Freshly Isolated Mature Mouse B-Cell Lymphomas** - Histone acetyl transferases (HATs) and HDACs act in concert to remodel chromatin and alter gene expression. CBP HAT binding to the hs3 enhancer was reported in Raji cells (a human Burkitt's cell line) [19]. As reported in Figure 6A, CBP was recruited to hs3a and hs3b in freshly isolated B-cell lymphomas. However, PCAF, another HAT, was not (data not shown). In contrast to B-cell lymphomas, no significant CBP binding was found in normal resting B-cell splenocytes or after 2-days LPS-stimulation (Figure 6B).



**Figure 6:** CBP fixation on 3'RR in freshly isolated mature B-cell lymphomas and wt B-cells. A: CBP ChIP experiments were performed on freshly isolated B-cell lymphomas from transgenic mice bearing c-myc in various locations of the IgH locus (iMycE<sub>μ</sub>, iMycC<sub>μ</sub> and iMycC<sub>α</sub> mice). Mean ± SEM of 4 experiments. Significance with the student-*t*-test for paired data. B: CBP ChIP experiments were performed on 2-day LPS-stimulated spleen B-cells. Mean ± SEM of 5 experiments (significance with the student-*t*-test for paired data). See legend to Figure 1 for mock explanation.

## Discussion

The balance between acetylation and deacetylation of chromatin histone proteins and non-histone proteins controls gene expression regulation. HATs and HDACs are chromatin-modifying enzymes. Their interplay regulates the action of numerous signal transducers and activators of transcription with,

in the end, potent effects on a wide range of cell processes such as cell cycle, cell death, differentiation, immune response and cancer. HDACi have been approved as additional treatment for lymphomas [11,12]. HDACi are reported to affect B-cell responses both *in vivo* and *in vitro*. We studied the relationship between the HAT/HDAC pathway and 3'RR enhancers of the IgH locus during normal mature B-cell responses and mature B-cell lymphoma growth.

As previously reported [9], we observed that in LPS-activated mature B-cell splenocytes HDAC1 was recruited to the hs1,2 element of the 3'RR as determined by ChIP assays. In similar experimental conditions, other members of HDAC class I with ubiquitous tissue distribution such as HDAC2 and HDAC3 were not recruited to the 3'RR. The mouse 3'RR contains four enhancer elements with hs1,2 flanked by IRIS sequences and the center of a 25-kb palindrome bordered by two hs3 enhancer inverted copies (hs3a and hs3b). Evolution maintained this unique palindromic arrangement in mammals suggesting that it is functionally significant [20]. Deconstructing the palindromic IgH 3'RR in  $\Delta$ IRIS mice strongly impacts its function [4]. In agreement with this latter result we report that HDAC1 is not efficiently recruited to the hs1,2 enhancer in LPS-stimulated  $\Delta$ IRIS mature spleen B-cells.

Histone acetylation has been associated with key remodelling events of the IgH locus including CSR [21]. We examined the role of the HDACi SAHA in B-cell growth, CSR, Ig production and IgH locus transcription. SAHA decreased *in vitro* mature B-cell growth in a dose dependent manner and in response to various stimulatory conditions. In contrast, SAHA decreased CSR toward IgG<sub>3</sub> and stimulated CSR toward IgG<sub>1</sub>. The effect of SAHA on Ig production (stimulation for IgG<sub>1</sub> and inhibition for IgG<sub>3</sub>) paralleled its effect on CSR. Thus the elevated production of IgG<sub>1</sub> in response to SAHA was due to an increased level of IgG<sub>1</sub> switched cells. In turn, reduced production of IgG<sub>3</sub> in response to SAHA was due to decreased amounts of IgG<sub>3</sub> switched cells. This result differs markedly from previously reported results with primary spleen B-cells from MRL-lpr mice (a mouse strain prone to develop an autoimmune disease

resembling systemic lupus erythematosus) where the HDACi Trichostatin A (TSA) inhibited both germline and post-switch  $\gamma 1$  and  $\gamma 2a$  transcription suggesting that inhibition of HDAC activity can downregulate gene transcription [9]. RNAseq analysis of transcription at the IgH locus of *wt* mature spleen B-cells in response to LPS revealed no evident effect of SAHA on transcription at the IgH locus in  $I_{\gamma 3}$ - $C_{\gamma 3}$  regions (nor in  $I_{\gamma 1}$ - $C_{\gamma 1}$  regions in response to LPS+IL4 stimulation). Furthermore, 3'RR eRNAs were not affected by SAHA treatment suggesting no direct effect on 3'RR activation. The effect of SAHA on CSR and Ig production is thus not through a direct effect on 3'RR activation but through another mechanism (such as isotype-dependent acetylation/deacetylation of S regions) that remains to be determined. Genome-wide gene expression analysis in response to SAHA indicated several down-regulated genes implicated in growth processes, a result that fitted well with the effect of SAHA as an inhibitor of cell proliferation. Similarly several down-regulated genes linked to epigenetic-related processes were found highlighting efficiency of SAHA treatment on mature B-cell responses.

Deciphering the mechanism that underpins the B-cell HDACi-induced effect is also of interest for a better understanding of the rationale for use of HDACi to treat B-cell lymphomas. Our results indicated that HDC1 does not bind to the hs1,2 enhancer element in freshly isolated mature mouse B-cell lymphomas with a c-myc insertion in the IgH locus; a major difference compared to results of stimulated normal mature B-cells. Another major difference was the binding of the HAT CBP to hs3a and hs3b enhancers that bounder the 3'RR palindrome indicating that the HAT/HDAC pathway is not identically regulated in stimulated normal mature B-cells and freshly isolated mature B-cell lymphomas. Furthermore if normal mature B-cell growth was consistently down regulated *in vitro* by SAHA, this was not the case in freshly isolated mature B-cell lymphomas where SAHA sometimes had no effect or a decreased/stimulatory effect without evident links to a B-cell lymphoma phenotype. This effect is consistent with the fact that despite similar “primom movens” (the insertion of c-myc in the IgH locus) B-cell lymphomas arise with different kinetics, various KI67 indices

and different locations due to the numerous different oncogenic hits favouring lymphoma emergence. Our results clearly indicated that even though SAHA affects normal mature B-cell growth, this effect is not consistently found in mature B-cell lymphomas and that trying to use HDACi to down regulate 3'RR activation in order to down regulate its effect on oncogene transcription (c-myc in our animal models) is utopic.

Important differences thus exist concerning the effect of SAHA on proliferation of *wt* mature B-cells *vs* mature B-cell lymphomas. Differences are also documented concerning the recruitment of CBP/HDAC1 to the IgH 3'RR. We report an isotype-effect of SAHA on B-cell CSR and no effect of SAHA on IgH locus transcription. SAHA effects are not mediated by down-regulation of 3'RR transcriptional activity in normal mature B-cells. Previous studies with transgenic mice bearing an IgH with an inserted c-myc (*i.e.* under transcriptional dependence of the 3'RR) have suggested that targeting the 3'RR would be of interest in order to down regulate c-myc deregulated transcripts leading to B-cell lymphomagenesis [14,18,22]. Our present results argue against this hypothesis. Translocations in B-cell lymphomas undoubtedly induce epigenetic changes [23] and epigenetic drugs targeting histone acetylation (HDACi) and histone methylation (EZH2 inhibitors) are already used to treat several B-cell lymphoid malignancies [11,12]. The precise mechanism underlining their beneficial use remains to be elucidated but is clearly not mediated by direct action on IgH 3'RR enhancers.

Only one HDACi (*i.e.*, SAHA, a pan-HDACi) was investigated in this study, which might limit the generalization of our results across different HDACi (particularly pan-HDACi *vs* class I-specific inhibitors). HDACi are approved for treatment of certain lymphomas but their narrow therapeutic index limits their use. Inconsistent effects of HDACi treatments have been reported [12] and HDACi are found to synergize with other treatments such as PD1 blockade [24]. As the HAT CBP, rather than HDAC1, was recruited to the 3'RR in mature B-cell lymphomas but not normal mature B cells, it will be interesting to see whether targeting CBP would be active against mature B-cell

lymphomas. It is possible that recruitment of CBP, instead of HDAC1, causes the intrinsic resistance to HDACi in some types of B-cell lymphomas.

In this study only *wt* mature spleen IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> B-cells were specifically considered because the 3'RR is the major driver of CSR and Ig synthesis. It is also why we explored HDAC binding and HDACi effects only in mature B-cell lymphomas (B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>). It is evident that similar studies on the entire spectrum of B-cell subsets (from pro-B cells to plasmocytes) and B-cell lymphomas would be of interest. Finally, despite wide functional/structural similarities between mouse and human 3'RRs [20], our results cannot be directly translated into human counterparts requiring further studies to clarify this point.

## References

1. Oudinet C, Braikia FZ, Dauba A, Khamlich AA. Mechanism and regulation of class switch recombination by IgH transcriptional control elements. *Adv Immunol.* 2020; 147: 89-137.
2. Rouaud P, Saintamand A, Saad F, Carrion C, Lecardeur S, 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.
3. Saintamand A, Rouaud P, Saad F, Rios G, Cogné M, et al. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat Commun.* 2015; 6: 7084.
4. Saintamand A, Vincent-Fabert C, Garot A, Rouaud P, Oruc Z, et al. Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region. *Nat Commun.* 2016; 7: 10730.
5. Le Noir S, Boyer F, Lecardeur S, Brousse M, Oruc Z, 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: 5829-5837.
6. Saintamand A, Vincent-Fabert C, Marquet M, Ghazzaui N, Magnone V, et al. E□ and 3'RR IgH enhancers show

- hierarchic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci Rep.* 2017; 7: 442.
- 7. Guglielmi L, Le Bert M, Truffinet V, Cogné M, Denizot Y. Insulators to improve expression of a 3'IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 307: 466-471.
  - 8. Saintamand A, Rouaud P, Garot A, Saad F, Carrion C, et al. The IgH 3' regulatory region governs  $\mu$  chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget.* 2015; 6: 4845-4852.
  - 9. 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 Comm.* 2005; 330: 204-209.
  - 10. Waibel M, Christiansen AJ, Hibbs ML, Shortt J, Jones SA, et al. Manipulation of B-cell responses with histone deacetylase inhibitors. *Nat Comm.* 2015; 6: 6838.
  - 11. Cheng T, Grasse L, Shah J, Chandra J. Panobinostat, a pan-histone deacetylase inhibitor: Rationale for and application to treatment of multiple myeloma. *Drugs Today.* 2015; 51: 491-504.
  - 12. Sborov DW, Canella A, Hade EM, Mo X, Khountham S, et al. A phase 1 trial of the HDAC inhibitor AR-42 in patients with multiple myeloma and T- and B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2017; 58: 2310-1218.
  - 13. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, 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.
  - 14. Ferrad M, Ghazzaui N, Issaoui H, Cook-Moreau J, Denizot Y. Mouse models of c-myc deregulation driven by IgH locus enhancers as models of B-cell lymphomagenesis. *Front Immunol.* 2020; 11: 1564.
  - 15. Rosean TR, Holman CJ, Tompkins VS, Jing X, Krasowski MD, et al. KSHV-encoded vIL6 collaborates with deregulated c-MYC to drive plasmablastic neoplasm in mice. *Blood Cancer J.* 2016; 6: e398.
  - 16. Cheung WC, Kim JS, Linden M, Peng L, Ness BV, et al. Novel targeted deregulation of c-myc cooperates with Bcl-

- XL to cause plasma cell neoplasms in mice. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1763-1773.
- 17. Park SS, Kim JS, Tessarollo L, Owens JD, Peng L, Han SS, et al. Insertion of c-Myc into IgH induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res.* 2005; 65: 1306-1315.
  - 18. Ghazzaui N, Issaoui H, Ferrad M, Carrion C, Cook-Moreau J, et al. Eμ and 3'RR transcriptional enhancers of the IgH locus cooperate to promote c-myc-induced mature B-cell lymphomas. *Blood Adv.* 2020; 4: 28-39.
  - 19. Hu HM, Kanda K, Zhang L, Boxer LM. Activation of the c-myc P1 promoter in Burkitt's lymphoma by the hs3 immunoglobulin heavy-chain gene enhancer. *Leukemia.* 2007; 21: 747-753.
  - 20. 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.
  - 21. Nambu Y, Sugai M, Gonda H, Lee CG, Katakai T, et al. Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science.* 2003; 302: 2137-40.
  - 22. Saintamand A, Saad F, Denizot Y. 3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy? *Cell Cycle.* 2015; 14: 789-790.
  - 23. Lindström MS, Wiman KG. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol.* 2002; 12: 381-387.
  - 24. Wang X, Waschke BC, Woolaver RA, Chen Z, Zhang G, et al. Histone Deacetylase Inhibition Sensitizes PD1 Blockade-Resistant B-cell Lymphomas. *Cancer Immunol Res.* 2019; 7: 1318-1331.



## Article 4 : Homozygous iMycC $\alpha$ transgenic mice as a model of plasma B-cell lymphomas

La majorité des lymphomes développés par nos modèles murins présentent un profil mature IgM $^+$  IgD $^+$ . Seul un faible pourcentage est CD138 $^+$ . Les souris Cmyc-C $\alpha$  expriment naturellement un plus grand nombre de cellules B CD138 $^+$  dans la rate et dans la moelle osseuse. Dans l'optique de développer un modèle murin de myélome, nous avons mis ces souris dans un fond homozygote pour accentuer le phénotype CD138 $^+$  de leur LB et tenter la mise au point d'un modèle murin de lymphomes B de phénotype plasmocytaire CD138 $^+$ .

Nos résultats montrent que :

1. L'insertion de c-myc en C $\alpha$  dans les deux allèles n'impacte pas la lymphopoïèse B ni le déroulement des commutations de classes mais affecte négativement la production d'Ig du fait d'un rôle isolateur du c-myc inséré. Les cellules B des souris Cmyc-C $\alpha$  se différencieraient alors davantage en plasmocytes afin de compenser ce défaut de synthèse d'Ig.
2. Les souris Cmyc-C $\alpha$  homozygotes développent relativement rapidement des lymphomes avec une moyenne d'émergence de 6 mois contre 13 mois chez les souris hétérozygotes. Ils présentent majoritairement un profil plasmocytaire *CD138 $^+$* .
3. L'analyse du taux de protéine c-myc dans les lymphomes CD138 $^+$  a permis de distinguer deux sous-populations. L'une exprime fortement c-myc pendant que l'autre ne l'exprime que faiblement. Toutefois l'analyse transcriptomique n'a révélé qu'une faible différence entre ces deux groupes (une vingtaine de gènes différentiellement exprimés).
4. Cette même analyse a permis de souligner d'importantes différences dans les voies dérégulées dans les lymphomes CD138 $^-$  et CD138 $^+$  des souris Cmyc-C $\alpha$  homozygotes. Ces derniers présentent une signature moléculaire proche de celle du myélome multiple (MM) humain et éloignée du Burkitt humain.

En conclusion, les souris Cmyc-C $\alpha$  s'avèrent être un intéressant modèle (myélome-like) pouvant être utilisé dans des études visant, entre autres, à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces résultats font l'objet d'un article en soumission présenté ci-après.

## **Homozygous iMycC $\alpha$ transgenic mice as a model of plasma B-cell lymphomas**

Melissa Ferrad<sup>1</sup>, Nour Ghazzaui<sup>1</sup>, Hussein Issaoui<sup>1</sup>, Emilie Drouineau<sup>2</sup>, Christelle Oblet<sup>1</sup>,  
Tiffany Marchiol<sup>1</sup>, Jeanne Cook-Moreau<sup>1</sup>, Yves Denizot<sup>1</sup>

Running title: Homozygous Ki-myc-C $\alpha$  mice B-cell lymphomas.

<sup>1</sup>UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Equipe Labellisée LIGUE 2018, Université de Limoges, CBRS, rue Pr. Descottes, 87025 Limoges, France

<sup>2</sup>I2BC, IBITEC-S, CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France,

Present address: Nour Ghazzaui - Vaccine Research Institute, INSERM U955, Hôpital Henri Mondor, 94010 Créteil, France; Hussein Issaoui - Université Côte d'Azur, INSERM U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3 M), 06204, Nice, France.

<sup>4</sup>Corresponding author: yves.denizot@unilim.fr

M.F., N.G., H.I. and E.D. contributed equally to this work and share first authorship.

## **ABSTRACT**

Chromosomal translocations linking various oncogenes (such as *c-myc*) to transcriptional enhancers of the immunoglobulin heavy chain (IgH) locus are often implicated as the cause of B-cell malignancies. The 3' regulatory region (3'RR) located downstream from the C<sub>α</sub> gene is the conductor of transcription, accessibility and remodelling of the IgH locus at mature B-cell stages. Convincing demonstrations of the essential contributions of the 3'RR in B-cell lymphomagenesis have been provided by mouse models which bring the oncogene *c-myc* under the 3'RR transcriptional control. In this study we developed a mouse model of CD138<sup>+</sup> plasma B-cell lymphomas. If the knock-in (KI) of *c-myc* directly into C<sub>α</sub> just 5' to the 3'RR in iMycC<sub>α</sub> mice produced B-cell lymphomas with low kinetics (Cheung et al. 2004), we enforced c-myc production in iMycC<sub>α</sub> mice by the generation of homozygous myc transgenic mice. Our results show that homozygous iMycC<sub>α</sub> mice lead to a mouse model of plasma CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas with interesting and wide transcriptomic similarities to human multiple myeloma and appropriated emergence kinetics that can be used to test new experimental therapeutic approaches.

## INTRODUCTION

AID-induced DNA breaks and mutations throughout B-cell development make the IgH locus a hotspot for translocations (1). Several translocations (such as Myc and cyclin D1/D3) found in myelomas are related to AID-induced class-switch recombination (CSR). During CSR, AID-induced DNA double strand breaks (DSBs) appear in the IgH switch (S) donor region (usually 5' S<sub>μ</sub> close to the constant C<sub>μ</sub> gene) and in the S acceptor region (for example 5' S<sub>α</sub> close to C<sub>α</sub> for CSR toward IgA). Translocation of the DNA fragment encompassing the oncogene (such as *c-myc*) is due to an off target AID effect on the chromosome bearing *c-myc*. After translocating into the IgH locus the oncogene falls under the transcriptional control of the *cis*-acting regulatory element acting at the mature B-cell stage, the 3' regulatory region (3'RR) located downstream from C<sub>α</sub>. The 3'RR controls μ transcription in mature B-cells (2), and is the master control element of conventional CSR (3), locus suicide recombination (4) and somatic hypermutation (SHM) (5) but with no evident role on VDJ recombination (6).

Various transgenic mouse models with IgH-*c-myc* translocations at various places throughout the IgH locus were of interest for the better understanding of the role of IgH *cis*-transcriptional enhancers (and their cooperation) during B-cell lymphomagenesis (7-11). The vast majority of generated B-cell lymphomas were IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> confirming their mature B-cell status with a few of them being CD138<sup>+</sup> thereby highlighting their plasma-like B-cell status. Plasma cell neoplasms in human are composed of several mature B-cell subset diseases including multiple myeloma often with *Myc* translocation and deregulation (12). Several mouse models have been developed as experimental approaches to human B-cell neoplasms. One of them used transgenic mice with the Myc gene inserted into the IgH C<sub>α</sub> locus (iMycC<sub>α</sub> mice) in association with a Bcl-X<sub>L</sub> transgene (9). The knock-in (KI) of Myc directly into C<sub>α</sub> just 5' to the 3'RR in iMycC<sub>α</sub> mice produced B-cell lymphomas with low kinetics which were increased after overexpression of the anti-apoptotic Bcl-X<sub>L</sub> gene. Interestingly

94

iMycC $\alpha$  mice exhibited elevated levels of bone marrow B220 $^+$ CD138 $^+$  plasmablasts compared with *wt* counterparts. In this study, in an effort to develop a Myc-induced plasma cell B-cell lymphoma model (without affecting as a primum movens apoptotic B-cell pathways) we forced c-myc production in iMycC $\alpha$  mice by the generation of homozygous Myc transgenic mice. Our results show that homozygous iMycC $\alpha$  mice lead to a mouse model of plasma B-cell lymphomas with interesting transcriptomic similarities with human myeloma and appropriated emergence kinetics that can be used to test new experimental therapeutic approaches.

## MATERIALS AND METHODS

**Transgenic mice:** Mice housing and 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<sup>er</sup> 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'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche » and reviewed by ethics committee of the University of Limoges (France). Thus, all methods in the current study were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations and all experimental protocols were approved by French institutions. iMycC $\alpha$  mice (in a C57BL6 background) have a c-myc KI within a C $\alpha$  intron (9). Heterozygous Myc transgenic mice were crossed to generate homozygous iMycC $\alpha$ . Homozygous iMycC $\alpha$  mice were detected with the following forward (P1: 5'TGCGAGAAATCCCACCATCT3') and reverse (P2: 5'GATGCCATCTCCCTCTGACA3') primers. The inserted myc was amplified with the following forward (P3: 5'TTGGAAACCCCGCAGACA3') and reverse (P4: 5'CTTCTTGCTCTTCAGAGTCGC3') primers. *Wt* C57BL6 mice were used as controls.

**B-cell purification:** For studies evaluating proliferation and Myc protein, spleen B-cells were recovered with the EasySep™ mouse B-cell isolation Kit (STEMCELL Technologies, France) designed to isolate B-cells from single-cell suspensions by negative selection. For transcriptomic studies of B-cell lymphomas, cells were purified using B220-coupled beads from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's recommendations.

**Proliferation analysis:** Splenic B-cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were cultured (in sixplicates) in 96-well plates using RPMI 1640 supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), glutamine, non-essential amino acids and antibiotics either alone or in the presence of various concentrations of LPS and/or anti-CD40 for 72h. The number of viable cells was assessed using the CellTiter 96® One Solution Cell Proliferation assay (Promega Corporation) according to the manufacturer's recommendations.

**CSR and Ig secretion experiments:** Single-cell suspensions of spleen B-cells (8-12 weeks old mice, males and females) were cultured 4 days at  $1 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1640 with 10% FCS, 5 $\mu$ g/ml LPS with or without 20ng/ml IL4 (PeproTech, Rocky Hill, NJ) and with or without 20 ng/ml TGF $\beta$ . CSR was evaluated by incubating cultured spleen B-cells with anti-B220-bv510-, anti-IgG<sub>1</sub>-PE-, anti-IgG<sub>3</sub>-PE-, anti-IgA-PE- and anti-CD138-APC-labelled antibodies and analysed on a Fortessa LSR2 (Beckton-Dickinson). At day 3,  $1 \times 10^6$  cells were cultured for 24 hours in growth medium without LPS+cytokine. Supernatants were recovered and stored at -20°C until used for Ig quantification (ELISA assays specific for IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub> and IgA) (3, 13).

**Flow cytometry analysis:** Single cell suspensions of B-cell lymphomas were labelled with various antibodies to ensure their B-cell status (B220-BV510/CD4-PE/CD8-PC5/CD11b-FITC or B220-BV510/CD5-FITC) and degree of maturity (B220-BV510/CD19-PE/IgM-FITC/IgD-PE, B220-BV510/CD43-PE/CD138-APC/CD117-BV421 or B220-BV510/CD5<sup>96</sup>-

FITC). Single cell suspensions of bone marrow cells were labelled with antibodies to ensure their pre-pro B-cell status ( $B220^+CD43^+CD117^+CD19^+CD24^-CD25^-$ ), their large pre B-cell status ( $B220^+CD43^{+/-}CD117^-CD19^+CD24^{high}CD25^{+/-}$ ) or immature B-cell status ( $B220^+CD43^+CD117^-CD19^+CD24^{high}CD25^-IgM^+$ ). Single cell suspensions of spleen B-cells were labelled with antibodies to ensure their mature B-cell status ( $B220^+CD19^+IgM^+IgD^+$ ), their B1 B-cell status ( $B220^+CD19^+IgM^{high}IgD^{low}CD21^-CD23^-$ ), their plasma B-cell status ( $B220^+IgM^+IgD^+CD138^+$ ), their follicular (FO) B-cell status ( $B220^+IgM^+IgD^{high}CD21^{high}CD23^{high}$ ) or marginal zone (MZ) B-cell status ( $B220^+IgM^{high}IgD^{low}CD21^{high}CD23^{low}$ ).

**RNAseq experiments:**  $B220^+IgM^+IgD^+CD138^+$  and  $B220^+IgM^+IgD^+CD138^-$  B-cell lymphomas were investigated. Total RNA from lymphoma cells (purified with B220-coupled beads from Miltenyi Biotech) was extracted and analysed by microarray (Génome et Transcriptome, GenoToul, Toulouse, France; get.genotoul.fr). RNA-seq paired-end libraries were prepared according to the Illumina protocol with some adjustments, using the TruSeq Stranded Total RNA Gold library prep Kit (Illumina, San Diego, USA). Libraries were quantified by qPCR using the KAPA Library Quantification Kit (Roche, Basel, Switzerland). Libraries quality was assessed by the HS NGS kit on the Fragment Analyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Libraries were equimolarly pooled and RNA sequencing was then performed on one S4 lane of the Illumina NovaSeq 6000 instrument (Illumina, San Diego, USA), using the NovaSeq 6000 S4 v1.5 Reagent Kit (300 cycles), and a paired-end 2 x 150 pb strategy. Quality control were done on raw FastQ files with FastQC (version: 0.11.9, default parameters) and fastq-screen (version: 0.14.0, default paramters) (14, 15). Trimming was done with fastp (version: 0.20.1, parameters: --length\_required 25 --detect\_adapter\_for\_pe --cut\_front --cut\_tail --cut\_window\_size 6 --cut\_mean\_quality 10 --unqualified\_percent\_limit 40 --n\_base\_limit 7 --average\_qual 0 --over<sup>97</sup>

representation\_analysis) (16). Quality reports were gathered with MultiQC (version: 1.9, default parameters) (17). Abundance estimation was performed with Salmon (version: 1.5.2, parameters: --numBootstraps 100 --threads 8 --gcBias --validateMappings --seqBias --posBias --libType A) on the mouse genome (mm10) (18). The differential gene expression analysis was done with DESeq2 for the 3 comparisons (19). The gene expression heatmap was created from the differentially expressed gene list with pandas and bioinfokit in python. For all R calculations (R version 3.6.1), the packages clusterProfiler (version: 3.14.0), enrichplot (version: 1.6.0), org.Mm.eg.db (version: 3.10.0), org.Hs.eg.db (version: 3.10.0) and DOSE (version: 3.12.0) were used. An enriched GO term plot was constructed for the differentially expressed mouse genes. Gene set analysis was produced after a conversion of mouse gene IDs to human gene IDs.

**Western blot experiments:** Cells were lysed in RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology) according to manufacturer's instructions. Lysates were assayed with the bicinchoninic acid kit (Pierce) and 30 $\mu$ g total proteins were loaded on a 12% polyacrylamide gel (Bio-Rad) under reducing conditions. Proteins were transferred onto PVDF membranes (Bio-rad). After blocking, membranes were incubated with rabbit anti-c-Myc (Cell Signaling technology) and rabbit anti-actin antibodies (Sigma-Aldrich), and revealed with HRP labelled goat anti-rabbit IgG (Southern-Biotech) by chemiluminescence (Immobilon® Forte Western HRP substrate, Millipore) on the ChemiDoc™ Touch imaging system (Bio-Rad). Results were analyzed with Image Lab™ software (Bio-Rad). Data were analysed using Prism software (GraphPad Software).

## RESULTS AND DISCUSSION

*Analysis of young homozygous iMycC $\alpha$  mice* - The location of Myc in C $\alpha$  (thus in the C region of the IgH locus, Figure 1A) did not preclude the generation of functional B-cells in 98

iMycC $\alpha$  mice. Specific PCR screened heterozygous/homozygous iMycC $\alpha$  mice (Figure 1B). We first analysed Myc protein expression in 6-8 weeks-old heterozygous and homozygous iMycC $\alpha$  mice. Myc protein was elevated in homozygous iMycC $\alpha$  mice (Figure 1C). This elevation was due to the fact that 100% of B-cells in homozygous iMycC $\alpha$  mice used an IgH allele bearing a targeted IgH locus when statistically only 50% used it in heterozygous iMycC $\alpha$  mice. As consequence, *in vitro* proliferation of B-cell splenocytes in response to various concentrations of LPS+anti-CD40 was higher in homozygous compared to heterozygous iMycC $\alpha$  mice (Figure 1D). B-cell development was not affected at immature B-cell stages (pre-pro-B-cells, large pre-B-cells, immature B-cells) in homozygous iMycC $\alpha$  mice. In contrast, they exhibited reduced levels of mature B220 $^{+}$  B-cells affecting both FO and MZ B-cell subsets (Figure 2A). This effect was obviously related to the 3'RR kinetics of action/activation. Insertion of c-myc in C $\alpha$  5' to the 3'RR affects its function and mimics, in homozygous iMycC $\alpha$  mice, the observed effect of 3'RR deletion (no effect at immature B-cell stages and an effect on mature B-cell development with reduced production of the  $\mu$  chain and thus B-cell receptor signalling) (19). As expected the percentage of B220 $^{+}$ CD138 $^{+}$  B-cells was significantly elevated in bone marrows and spleens from homozygous iMycC $\alpha$  compared to heterozygous mice (Figure 2B). To explain this observation we investigated Ig production in homozygous iMycC $\alpha$  mice. Despite elevated CD138 $^{+}$  B-cells, circulating IgM, IgG<sub>3</sub> and IgA (but not IgG<sub>1</sub>) levels were lower in homozygous iMycC $\alpha$  mice compared to heterozygous mice (Figure 3A). If B-cells from homozygous iMycC $\alpha$  mice efficiently underwent CSR toward  $\gamma$ 3 (LPS stimulation),  $\gamma$ 1 (LPS+IL4 stimulation) (although slightly reduced) and  $\alpha$  (LPS+TGF $\beta$  stimulation) (Figure 3B), they failed to produce significant levels of IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>1</sub> and IgA *in vitro* (Figure 3C). A functional 3'RR is required for both CSR and Ig synthesis. The insulator effect of the inserted c-myc (previously observed for mature B-cell<sup>99</sup>

development) explains the low Ig production of switched isotypes observed both *in vitro* and *in vivo* in homozygous iMycC $\alpha$  mice. In contrast, inserted c-myc did not affect involvement of the 3'RR in the CSR mechanism (known to act *via* long range loop interactions and AID targeting on S regions). This divergent effect for CSR and Ig synthesis was previously reported for B1 B-cell IgA CSR of 3'RR-deficient mice (20). Similarly to that observed in 3'RR-deficient mice (13), the  $\gamma$ 1 isotype was less affected than  $\gamma$ 3 and  $\alpha$  isotypes in homozygous iMycC $\alpha$  mice (Figure 3C) reinforcing the hypothesis of the c-myc-induced insulator effect on 3'RR activity. In conclusion, the higher numbers of CD138 $^{+}$  B-cells in homozygous iMycC $\alpha$  mice might be an attempt to produce more plasmocytes in order to bypass their low circulating Ig levels.

**B-cell lymphomas in homozygous iMycC $\alpha$  mice** – Mice exhibiting obvious tumors or presenting signs of illness were sacrificed. Figure 4A reports typical flow cytometry analysis (B220, CD19, CD43, CD117, CD138, IgM, IgD) for lymphoma phenotyping. All lymphomas obviously have a B-cell phenotype assessed by the presence of either B220 or CD19 B-cell surface antigens and the absence of CD4/CD8 T-cell antigens and CD11b monocyte antigen (data not shown). As previously reported (9, 10), heterozygous transgenic mice infrequently developed lymphomas and those that did develop arose late in life. In contrast, homozygous iMycC $\alpha$  mice quickly developed B-cell lymphomas (Figure 4B). The mean age of tumor development for homozygous mice was approximatively 5 months compared with 12 months in heterozygous mice ( $p<0.0001$ , Mann Whitney  $U$  test). The locations (spleen, mesenteric lymph nodes, inguinal/brachial lymph nodes and mediastinal lymph nodes) of these B-cell lymphomas were similar in homozygous and heterozygous mice (data not shown). The maturity status (mature IgM $^{+}$ IgD $^{+}$  vs immature IgM $^{+}$ IgD $^{-}$ ) of B-cell lymphomas was not significantly different between heterozygous and homozygous mice ( $p=0.39$ , Mann Whitney

*U* test) (Figure 4C). In contrast, the percentage of plasmablastic CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas was markedly elevated ( $p<0.0001$ , Mann Whitney *U* test) in homozygous iMycCα mice (64.5%) compared to heterozygous mice (16.7%) (Figure 4C). Myc is recurrently expressed during B-cell maturation but switches off before plasmatic B-cell stages (21). Western blot analysis of CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas showed two entities with respect to c-myc expression (low and high c-myc expression) (Figure 4D) revealing a heterogeneity between the apparent homogeneity among CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas. In conclusion, forcing c-myc expression in homozygous iMycCα mice accelerated B-cell lymphomagenesis. The vast majority (>90%) of lymphomas had a mature B-cell phenotype. Comforting our hypothesis to develop a model of plasma B-cell lymphomas, the majority of them exhibited a CD138<sup>+</sup> phenotype, a markedly innovative characteristic compared to the various transgenic and KI c-myc mouse models so far (11).

**Transcriptome analysis of B-cell lymphomas from homozygous iMycCα mice** - In order to document molecular signatures of homozygous iMycCα B-cell lymphomas, RNA sequencing of CD138<sup>+</sup> and CD138<sup>-</sup> B-cell lymphomas was performed and normalized expression data was obtained for all protein-coding genes. In Figure 5A-C, bioinformatic analysis (principal component analysis (PCA), volcano plot and heat map) defined CD138<sup>+</sup> and CD138<sup>-</sup> B-cell lymphomas as two groups with a different transcriptome signature driving various arrays of the immune responses and expressing different signaling/metabolic pathways (Figure 6A), thus confirming their phenotypic difference previously observed by flow cytometry labelling. In contrast, transcriptome analysis (Fig. 5A) revealed only few differences (only 28 differently expressed genes, data not shown) in c-myc<sup>+</sup> vs c-myc<sup>-</sup> CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas suggesting that remaining myc expression is not sufficient by itself to drive a specific transcriptome signature among CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas. Thus,

CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas in our animal model showed a homogenous transcriptome signature, of major interest compared to data obtained with other c-myc-induced B-cell lymphoma models (such as E<sub>μ</sub>-Myc and 3'RR-Myc mice) where arising lymphomas are heterogeneous with wide genomic differences (11, 22). Enrichment of previously established human Burkitt lymphoma (BL) and multiple myeloma signatures was tested in our CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas. In contrast to BL (also with c-myc in the IgH locus), myeloma up and down signatures were significantly enriched, emphasizing the molecular similarity of mouse CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas to human multiple myeloma cells (Figure 6B) and the relevance of our mice as pertinent model of plasma B-cell lymphomas.

### **Concluding remarks**

C-myc translocation in the IgH locus followed by its deregulation, with the predominant contribution of the IgH transcriptional elements, is a key step in B-cell lymphoma development (11). If c-myc translocation into the IgH locus is the *primum movens* of several mature B-cell lymphomagenesis, it is the progressive accumulation of mutations (affecting cell proliferation, apoptosis, differentiation and metabolism) generated by the c-myc-induced genomic instability that plays the critical role in B-cell lymphoma emergence. Consistent with this critical role of c-myc, a mouse model carrying a homozygous insertion of c-myc into the IgH locus develops B-cell lymphoma with a large part of CD138<sup>+</sup> plasma cell neoplasms. The relatively rapid occurrence of plasma cell lymphomas in homozygous iMycCα mice and its interesting and large transcriptome similarities with human myelomas make this mouse model an accurate, reliable, easy and fast experimental model, not only to test new therapeutic approaches, but also combinations to monitor new NK therapeutic vaccination strategies, to stimulate immune defenses for tumor rejection and to test protocols for monoclonal antibody therapies. As previously reported by us and others (11, 23, 24), 3'RR targeting would in T02

theory provide a potential strategy for the treatment of mature B-cell lymphomas. Until now only few compounds have been reported to down regulate IgH 3'RR activation such as histone deacetylase inhibitors (HDACi) (23), aryl hydrocarbon receptor ligands (25, 26), and chemical compounds (27). Recently the use of the HDACi SAHA (suberanilohydroxamic acid also known as vorinostat) was reported to be ineffective to target the 3'RR in B-cell lymphomas from mouse models bearing an IgH inserted c-myc (28), highlighting the fact that 3'RR appears to be regulated differently in normal mature B-cells and mature B-cell lymphomas. Despite these first negative results, targeting IgH 3'RR enhancers would represent a promising therapeutic approach for the treatment of plasma cell malignancies and homozygous iMycC $\alpha$  mice would provide valuable insights into the identification of new IgH 3'RR-deregulated pathways for questioned/tested signalling pathways implicated not only on plasma cell malignancies but also in immune mature B-cell related disorders.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Acknowledgments:** Authors are “Equipe Labellisée LIGUE 2018”. N.G. was supported by a grant from “Société Française d’Hématologie”. H.I. and M.F. are supported by University of Limoges and “Région Nouvelle Aquitaine”. We thank the GenoToul (Toulouse, France, get.genotoul.fr) for RNA seq experiments.

**Author contributions:** N.G., M.F., H.I., and E.D. contributed equally. Y.D and J.C-M designed research. N.G., H.I., M.F. and Y.D. performed research. E.D., M.F., and Y.D. analyzed mRNASeq data. C.O. performed western blot experiments. M.F., J.C-M, C.O., E.D., and Y.D. wrote the paper. Y.D. obtained grant supports.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interest

## REFERENCES

1. Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. 2004;104:3009-3020.
2. Saintamand A, Rouaud P, Garot A, et al. The IgH 3' regulatory region governs  $\mu$  chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget*. 2015;6:4845-4852.
3. 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.
4. Péron S, Laffleur B, Denis-Lagache N, et al. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain “locus suicide recombination” in B cells. *Science*. 2012;336:931-934.
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;210:1501-1507.
6. 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;287:8356-8360.
7. Rosean TR, Holman CJ, Tompkins VS, et al. KSHV-encoded vIL6 collaborates with deregulated c-MYC to drive plasmablastic neoplasm in mice. *Blood Cancer J*. 2016;6:e398.
8. 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.
9. 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.
10. Ghazzaui N, Issaoui H, Ferrad M, et al. E $\mu$  and 3'RR transcriptional enhancers of the IgH locus cooperate to promote c-myc-induced mature B-cell lymphomas. *Blood Adv*. 2020;4:28-39.

11. Ferrad M, Ghazzaui N, Issaoui H, et al. Mouse models of c-myc deregulation driven by IgH locus enhancers as models of B-cell lymphomagenesis. *Frontiers Immunol.* 2020;11:1564.
12. Jovanović KK, Roche-Lestienne C, Ghobrial IM, et al. Targeting MYC in multiple myeloma. *Leukemia.* 2018;32:1295-1306.
13. Vincent-Fabert C., R. Fiancette, E. Pinaud, 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.
14. Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Res.* 2018;7:1338.
15. Shifu Chen, Yanqing Zhou, Yaru Chen, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* 2018;17:17;i884–i890.
16. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics.* 2016;32:3047-3048.
17. Patro R, Duggal G, Love MI, et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods.* 2017;14:417-419.
18. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15:550.
19. Saintamand A, Rouaud P, Garot A, et al. The IgH 3' regulatory region governs  $\mu$  chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget.* 2015;6:4845-4852.
20. Issaoui H, Ghazzaui 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;15:289-291.
21. De Barrios O, Meler A, Parra M. MYC's fine line between B cell development and malignancy. *Cells.* 2020;9:523.

22. Rempel RE, Jiang X, Fullerton P, et al. Utilization of the E $\mu$ -Myc mouse to model heterogeneity of therapeutic response. *Mol Cancer Ther.* 2014;13:3219-3229.
23. Lu ZP, Ju ZL, Shi GY, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription. *Biochem Biophys Res Comm.* 2005;330:204-209.
24. Saintamand A, Saad F, Denizot Y. 3'RR targeting in lymphomagenesis: a promising strategy? *Cell Cycle.* 2015;14:789-790.
25. Wourms MJ, Sulentic CEW. The aryl hydrocarbon receptor regulates an essential transcriptional element in the immunoglobulin heavy chain gene. *Cell Immunol.* 2015;295:60-66.
26. Snyder AD, Ochs SD, Johnson BE, et al. Aryl hydrocarbon receptor-induced activation of the human IGH hs1.2 enhancer: Mutational analysis of putative regulatory binding motifs. *Mol Immunol.* 2020;120:164-178.
27. Dolloff NG. Discovery platform for inhibitors of IgH gene enhancer activity. *Cancer Biol Therapy.* 2019;20:571-581.
28. Ghazzaui N, Ferrad M, Issaoui H, et al. HDAC recruitment in the IgH locus 3' regulatory region is different between mature B-cells and mature B-cell lymphomas. *Leuk Lymphoma.* 2021 Aug 24:1-5. Epub ahead of print.

## LEGENDS TO FIGURES

### Figure 1: B-cell proliferation in iMycC $\alpha$ mice.

A: IgH locus (not to scale) with the location of the inserted Myc. Locations of PCR primers for mice screening are indicated. B: Screening of heterozygous and homozygous iMycC $\alpha$ <sub>106</sub>

mice. One representative experiments with two *wt* mice, two heterozygous and two homozygous iMycC $\alpha$  mice. Left panel: detection of the inserted Myc (the forward P3 and reverse P4 primers hybridize to the KI Myc cDNA; PCR band of  $\approx$  1500 bp). Right panel: detection of heterozygous and homozygous iMycC $\alpha$  mice (the forward P1 and reverse P2 primers are in C $\alpha$ ). PCR bands of  $\approx$  2000 bp and  $\approx$  5000 bp for *wt* and KI alleles, respectively. C: Western blot analysis of c-myc in B-cell splenocytes from 4 heterozygous and 5 homozygous iMycC $\alpha$  mice.  $\beta$ -actin was used as a control gene. Data, expressed as means  $\pm$  SEM, were analysed using Prism software (GraphPad Software). Significance was determined with the Mann-Whitney *U*-test. D: Proliferation of spleen B-cells from heterozygous and homozygous iMycC $\alpha$  mice in response to various concentrations of LPS+anti-CD40. Results are reported as mean  $\pm$  SEM of 5 mice per genotype. Significance determined with the Mann-Whitney *U*-test.

**Figure 2: B-cell development in iMycC $\alpha$  mice.**

A: Percentage of immature and mature B-cell subtypes (flow cytometry analysis) in heterozygous and homozygous iMycC $\alpha$  mice. Pre-pro-B-cells (B220 $^+$ CD19 $^+$ CD43 $^+$ CD117 $^+$ CD24 $^-$ CD25 $^-$ ), large pre-B-cells (B220 $^+$ CD19 $^+$ CD43 $^{+/-}$ CD117 $^-$ CD24 $^+$ CD25 $^{+/-}$ ) and immature B-cells (B220 $^+$ CD19 $^+$ CD117 $^-$ CD24 $^+$ CD25 $^-$ IgM $^+$ IgD $^-$ ) were investigated in femoral bone marrow. B220 $^+$  B-cells, FO B-cells (B220 $^+$ IgM $^+$ IgD $^{\text{high}}$ CD21 $^{\text{high}}$ CD23 $^{\text{high}}$ ) and MZ B-cells (B220 $^+$ IgM $^{\text{high}}$ IgD $^{\text{low}}$ CD21 $^{\text{high}}$ CD23 $^{\text{low}}$ ) were studied in the spleen. Results are reported as mean  $\pm$  SEM of 3 to 6 mice. Significance determined with the Mann-Whitney *U*-test. B: Percentage of CD138 $^+$  B-cells in spleen and bone marrow from heterozygous and homozygous iMycC $\alpha$  mice. Right panel: One representative experiment is shown (B220 and

CD138 labelling). Left panel: Results are reported as mean  $\pm$  SEM of 5 mice. Significance determined with the Mann-Whitney *U*-test.

**Figure 3: CSR and Ig synthesis in homozygous iMycC $\alpha$  mice.**

A: Serum IgM, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub> and IgA in heterozygous and homozygous iMycC $\alpha$  mice. Ig levels were assessed by specific ELISA. Results are reported as mean  $\pm$  SEM of 5 mice. Significance was determined with the Mann-Whitney *U*-test. B: CSR in B-cells from heterozygous and homozygous iMycC $\alpha$  mice. On representative flow cytometry analysis for IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub> and IgA CSR. Results are reported as mean  $\pm$  SEM of 5 mice. Significance was determined with the Mann-Whitney *U*-test. C: *In vitro* Ig secretion by spleen B-cells from heterozygous and homozygous iMycC $\alpha$  mice. Results are reported as mean  $\pm$  SEM of 5 mice. Significance was determined with the Mann-Whitney *U*-test. Same cells as in B.

**Figure 4: B-cell lymphomas in homozygous iMycC $\alpha$  mice.**

A: Typical flow cytometry analysis of B-cell lymphomas. Cells previously gated on SSC/FSC parameters were labelled with anti-B220/anti-CD43, anti B220/anti-CD117, anti-B220/anti-CD138, anti-B220/antiCD19 antibodies. Cells labelled with anti-IgM/anti-IgD antibodies were previously gated on B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> cells. B: Time course generation of B-cell lymphomas in heterozygous and homozygous iMycC $\alpha$  mice. Significance was determined with the Mann-Whitney *U*-test. C: B-cell lymphoma maturity from homozygous iMycC $\alpha$  mice. Upper panel: Percentages of mature (IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) and immature (IgM<sup>+/</sup>IgD<sup>-</sup>) B-cell lymphomas (30 B-cell lymphomas per group). Lower panel: Percentages of CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas among mature B-cell lymphomas (30 mature B-cell lymphomas per group). Significance was determined with the Mann-Whitney *U*-test. D: Western blot analysis of c-108

myc in CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas from homozygous iMycC $\alpha$  mice.  $\beta$ -actin was used as control gene.

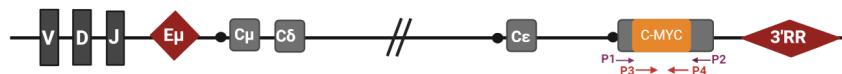
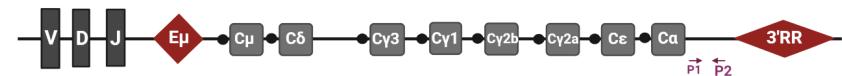
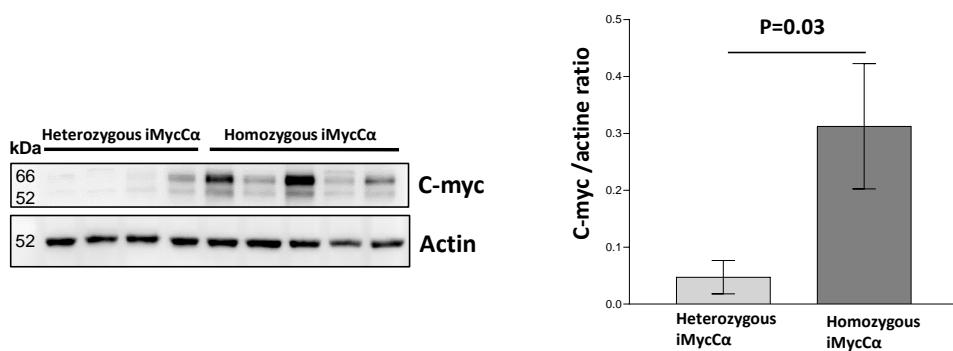
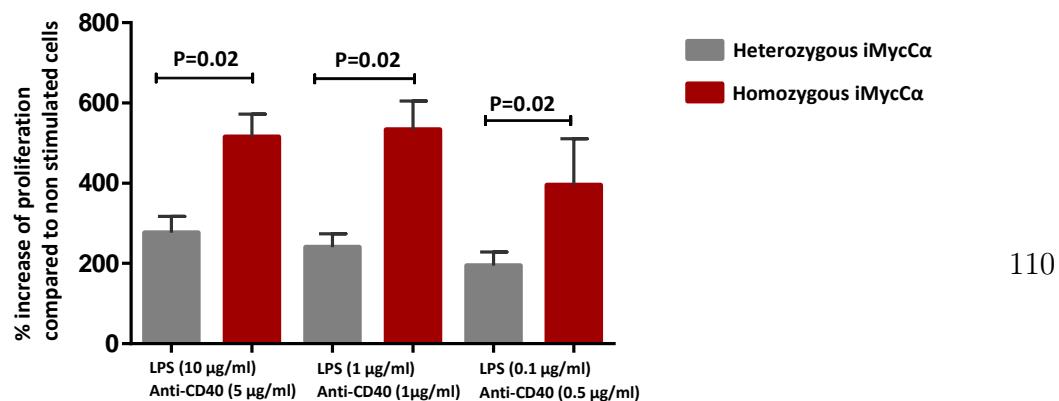
**Legend to Figure 5: Transcriptome analysis of CD138<sup>+</sup> and CD138<sup>-</sup> B-cell lymphomas.**

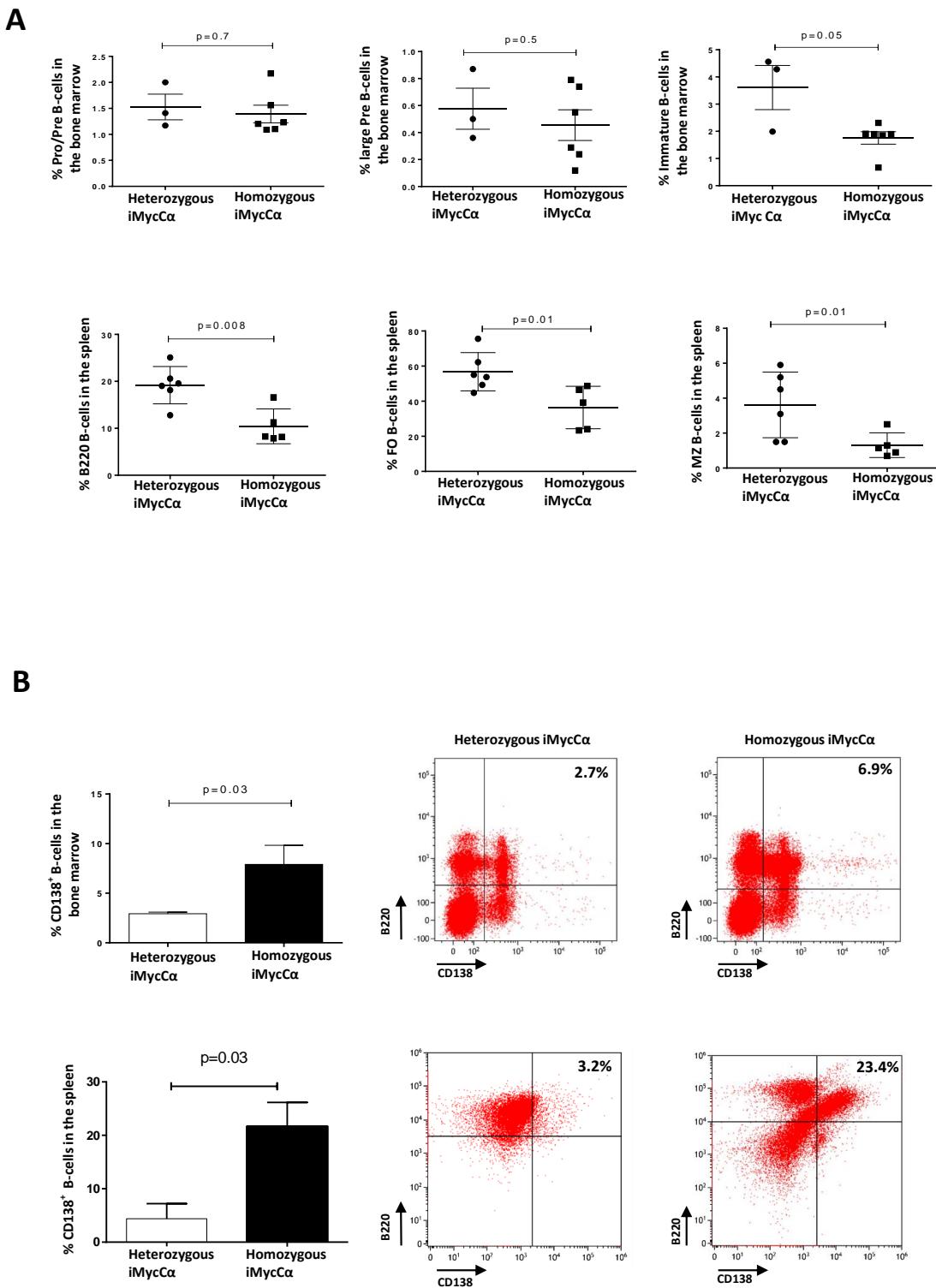
A: Principal component analysis (PCA) of RNA-Seq gene expression data from 9 CD138<sup>+</sup> (in red) and 3 CD138<sup>-</sup> (in blue) B-cell lymphomas. The location of 4 c-myc<sup>-</sup> CD138<sup>+</sup> B-cell lymphomas is indicated. B: Volcano plot of differential gene expression in CD138<sup>+</sup> and CD138<sup>-</sup> B-cell lymphoma samples. Up-regulated (in red) and down-regulated (in green) genes are shown. C: Heat map of 100 most variable gene expressions across B-cell lymphoma samples (9 CD138<sup>+</sup> and 3 CD138<sup>-</sup>); hierarchical clustering of genes/samples according to Pearson's correlation metric and Ward's method.

**Legend to Figure 6: Transcriptome analysis of CD138 B-cell lymphomas.**

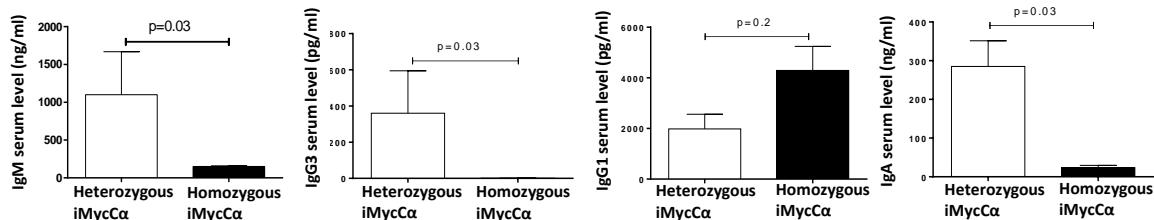
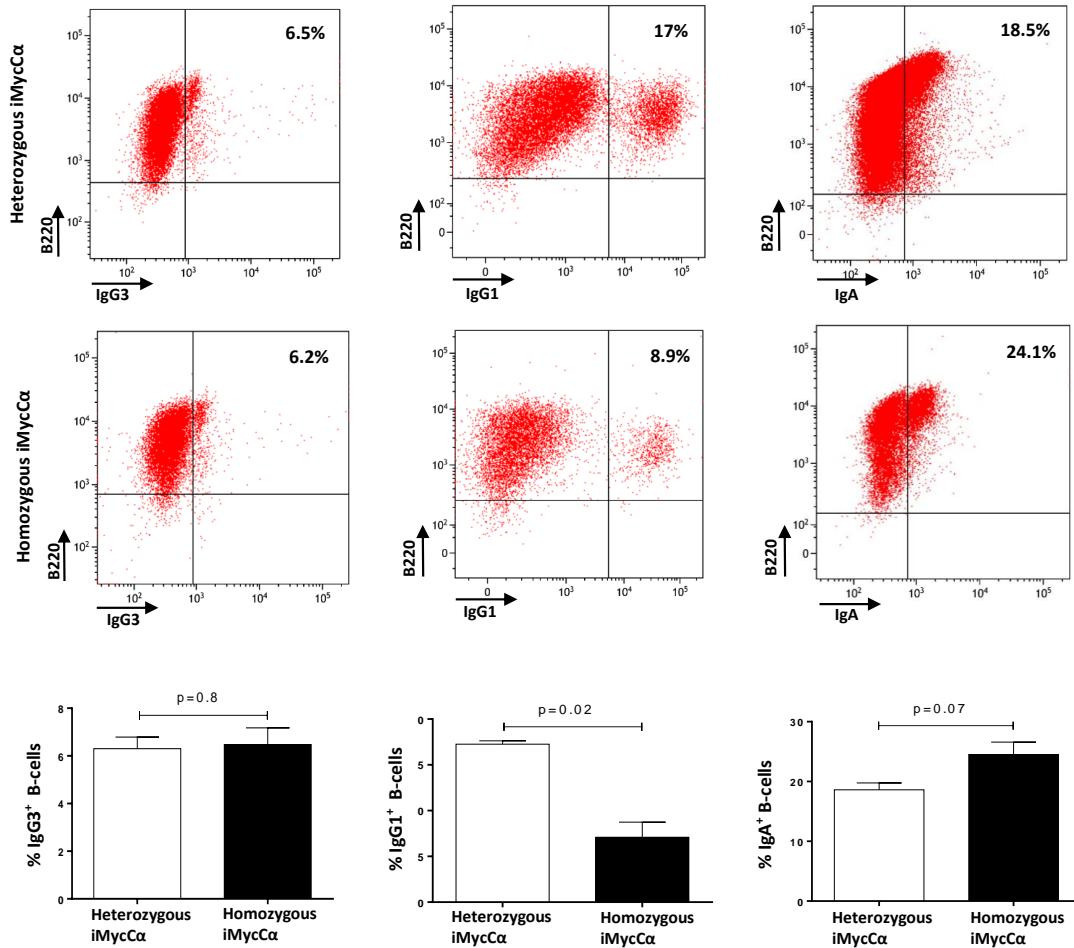
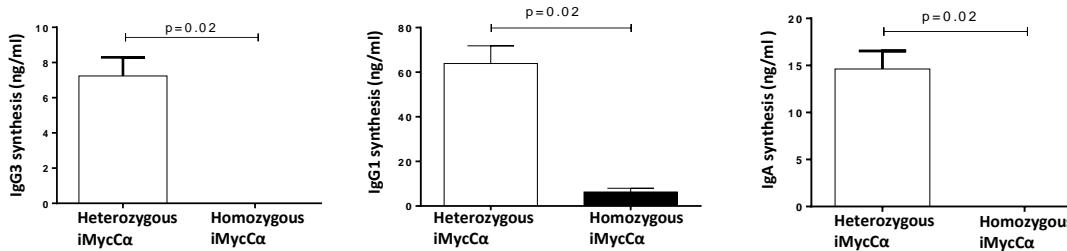
A: Differentially expressed genes implicated in several metabolic/signaling pathways in CD138<sup>+</sup> and CD138<sup>-</sup> B-cell lymphomas. The node circle size represents the number of genes in the pathway and the node circle colors (red and blue) correspond to the adjusted p-values.

B: Detailed GSEA analysis of differentially expressed genes against human BL (<http://www.informatics.jax.org/disease/DOID:8584>) and multiple myeloma (C0026764: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/medgen/10122>) signatures.

**A****B****C****D****Figure1**



**Figure 2**

**A****B****C****Figure 3**

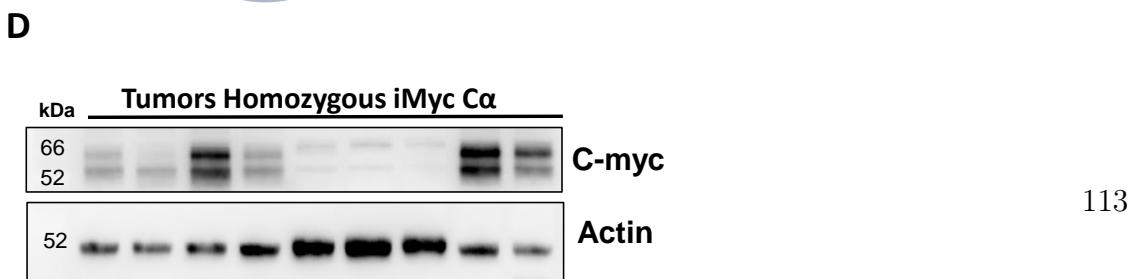
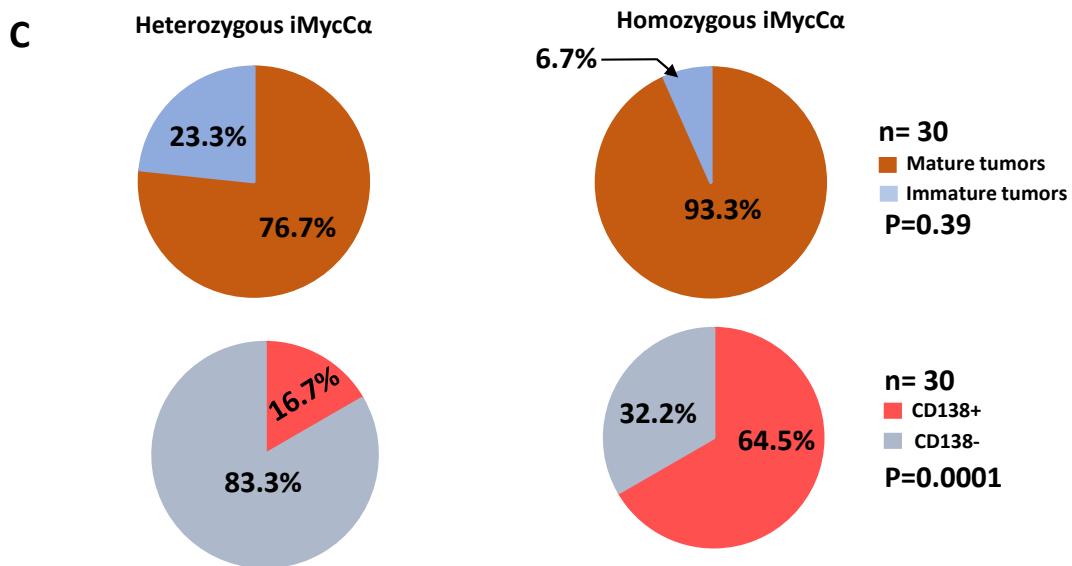
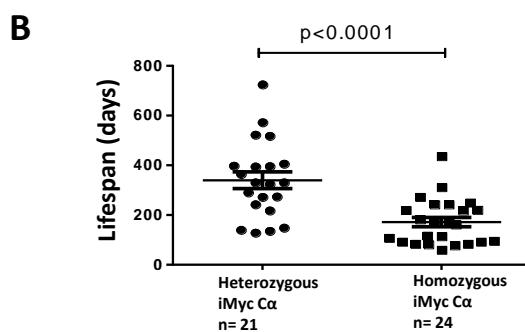
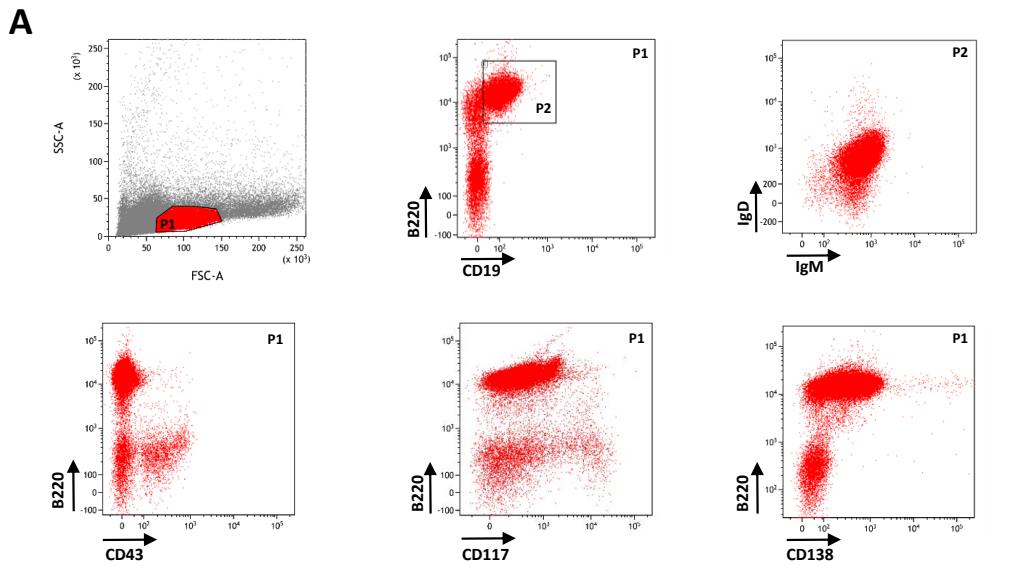
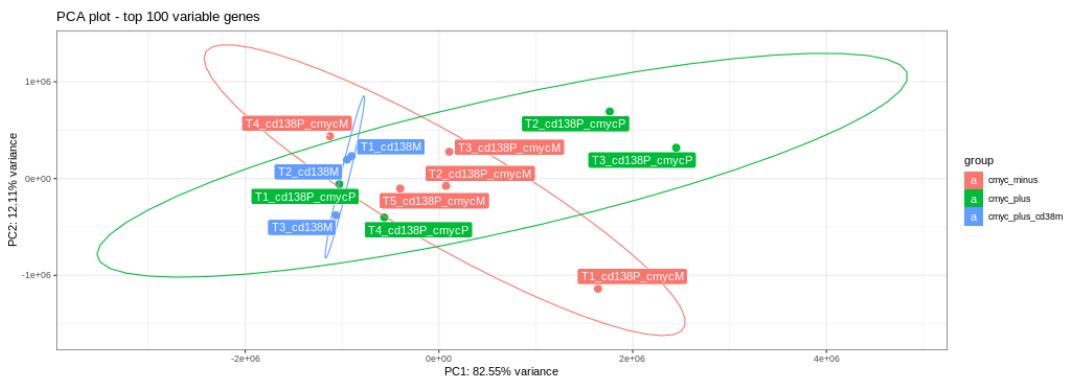
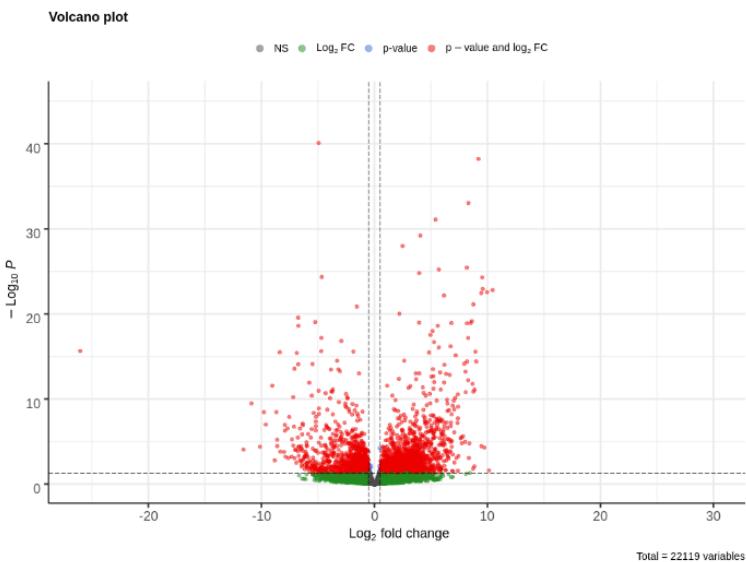
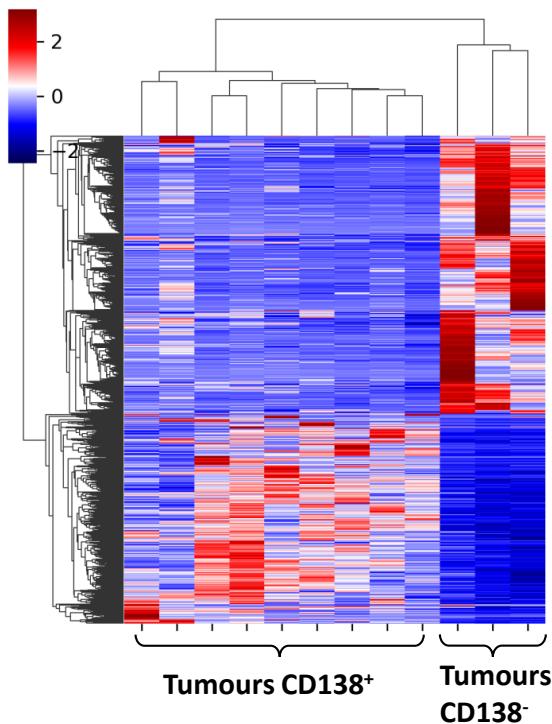
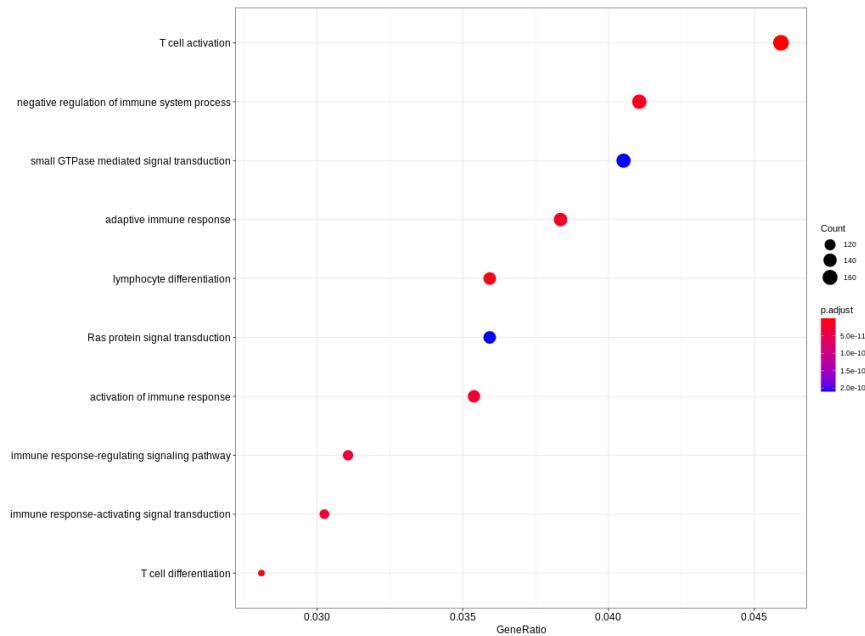
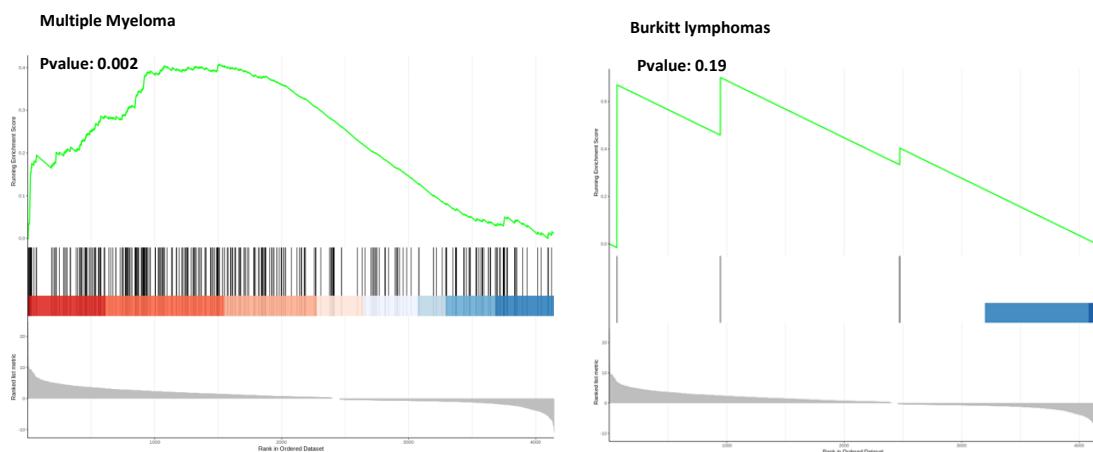


Figure 4

**A****B****C**

**A****B**

# **Quatrième partie**

## **Discussion et perspectives**



## Les enhancers E $\mu$ et 3'RR coopèrent pour promouvoir la lymphomagenèse

La translocation c-myc-IgH est observée dans de nombreux lymphomes B. Il a été montré que des souris présentant cette translocation développent souvent des lymphomes, suite à la dérégulation de c-myc par les activateurs transcriptionnels du locus IgH (Rosean et al. 2016, Park et al. 2005, Cheung et al. 2004). Cependant l’implication précise de ses 2 principaux éléments *cis*-régulateurs E $\mu$  et 3'RR et leur éventuelle coopération dans la dérégulation de cet oncogène étaient encore mal connus.

L’utilisation de souris portant une insertion de c-myc en différentes positions du locus IgH a permis de définir le rôle transcriptionnel précis d’E $\mu$  et de la 3'RR ainsi que leur coopération pour sa dérégulation et l’émergence de lymphomes. Les enhancers E $\mu$  et 3'RR vont chacun déréguler c-myc durant leur fenêtre d’activité : des stades pro-B à immature pour E $\mu$  (Pinaud et al. 2011b, Guglielmi et al. 2005) et des stades pre-B à mature pour la 3'RR. (Guglielmi et al. 2003a, Pinaud et al. 2011b) La présence de ces 2 éléments au locus IgH maintient c-myc sous l’effet transcriptionnel de l’un ou l’autre tout au long de la vie du lymphocyte B. Ceci confirme d’anciennes études visualisant leur profil d’activation *in-vivo* grâce, entre autres, à des souris transgéniques E $\mu$ -GFP-3'RR, E $\mu$ -GFP et GFP-3'RR (Guglielmi et al. 2003b).

Les souris transgéniques E $\mu$ -Cmyc montrent qu’E $\mu$  seul est capable de déréguler c-myc et d’induire la lymphomagenèse (Adams et al. 1985). L’insertion de c-myc au locus IgH, dans une condition expérimentale où E $\mu$  est absent, montre qu’il existe au moins un autre élément transcriptionnel actif sur c-myc. Cet élément est la 3'RR comme préalablement montré par l’émergence de lymphomes B chez les souris transgéniques Cmyc-3'RR. En l’absence d’E $\mu$  (souris Cmyc-C $\mu$ ) ou lorsque c-myc est inséré dans un site où E $\mu$  n’agit pas (souris Cmyc-C $\alpha$ ), les lymphomes émergent plus tardivement que dans le modèle où le KI de c-myc est sous le contrôle des deux enhancers E $\mu$  et 3'RR (Cmyc-E $\mu$ ). C’est dans ce dernier modèle que les tumeurs émergent le plus rapidement avec un index de prolifération Ki67 le plus élevé. Ces résultats suggèrent ainsi que l’action cumulée d’E $\mu$  et de la 3'RR sur c-myc, bien que non essentielle, accélère et intensifie l’émergence de lymphomes. Un dernier modèle mettant le KI de c-myc sous le contrôle exclusif d’E $\mu$  permettrait de savoir si ce dernier est capable d’induire seul le développement de lymphomes dans le contexte d’un locus IgH. Nous avons initié le développement d’un modèle de KI Cmyc-E $\mu$  sur un allèle IgH porteur d’une délétion de

la 3'RR. Un vecteur a été conçu et transfété dans des cellules embryonnaires de souris (ES) dérivées de souris 3'RR déficientes développées au laboratoire. Notre approche n'a pas été couronnée de succès suite à des recombinaisons infructueuses de notre vecteur au locus IgH. Notre questionnement demeure donc sans réponse.

C-myc possède une fonction pro-proliférative dans différents types cellulaires. Sa surexpression sous l'action des activateurs transcriptionnels du locus IgH est observée dans des splénocytes B issus des 3 lignées transgéniques utilisées. Elle est accompagnée d'une augmentation de la prolifération en réponse à diverses stimulations B spécifiques. L'analyse transcriptomique des splénocytes issus des jeunes souris transgéniques, au repos ou activés, ne montre pas de différence significative dans leur signature transcriptomique par rapport à des souris contrôles. Ceci suggère que la seule dérégulation de c-myc est insuffisante pour induire une transformation maligne des cellules B et ne constitue que l'événement initiateur de la cancérisation des cellules. C'est l'instabilité génomique, favorisée par les taux élevés de la protéine c-myc, qui va aboutir à l'accumulation de mutations affectant divers processus biologiques et à l'émergence de lymphomes.

Il a été montré au repos ou lors de la CSR, que des boucles chromatiniennes sont formées entre  $E\mu$  et la 3'RR dans des cellules B normales. Elles peuvent être expliquées par une coopération entre ces deux éléments ou simplement par la conformation spatiale du locus IgH lors de la CSR visant à rapprocher les régions S donneuses et acceptrices. Afin de savoir si de telles boucles rapprochent les promoteurs de c-myc et les activateurs  $E\mu/3'RR$  nous avons mis au point des expériences de 3C-capture. Les résultats préliminaires ont permis d'observer des interactions entre  $E\mu$  et la 3'RR avec les promoteurs de c-myc dans nos différentes lignées murines. Ces résultats suggèrent que ces éléments transcriptionnels activeraient les promoteurs de c-myc grâce à des interactions longue distance assurées par des boucles chromatiniennes.

La position de c-myc au locus IgH n'affecte pas la localisation des lymphomes, ni leurs degrés de maturité et phénotype. En effet, la majorité de ceux ci présente un profil IgM<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> de B matures. L'analyse transcriptomique de lymphomes IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> issus des 3 lignées murines a montré un groupe majoritaire présentant un profil moléculaire Burkitt-like.

En conclusion, cette étude, utilisant trois lignées transgéniques portant une insertion de c-myc à différentes positions du locus IgH, a permis de montrer :

1. Que la dérégulation de c-myc par les éléments *cis*-régulateurs du locus IgH ne constitue que l'événement initiateur de la lymphomagenèse.
2. Que la transformation maligne de la cellule nécessite l'accumulation d'autres lésions géniques affectant des fonctions liées à la prolifération, le métabolisme ou encore l'apoptose.
3. Que la coopération transcriptionnelle d'E $\mu$  et la 3'RR favorise l'émergence de lymphomes B matures.
4. Que la 3'RR est capable à elle seule de déréguler l'oncogène c-myc et d'initier la lymphomagenèse. Ainsi, son ciblage pourrait constituer une stratégie potentielle dans le traitement de certains lymphomes B matures.
5. Que la majorité des lymphomes développés par les souris c-myc-IgH présentent une signature transcriptomique Burkitt-like.

Ce sont donc des modèles d'études pertinents, notamment pour le développement et la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques visant les lymphomes B matures humains.

## **La 3'RR est impliquée dans le recrutement des voies de répartition lors de la CSR**

Trois éléments régulateurs du locus IgH ont été rapportés comme jouant un rôle possible dans le déroulement de la CSR. La délétion de l'enhancer E $\mu$  n'affecte que très faiblement la CSR indiquant un rôle mineur lors de ces recombinaisons. L'enhancer 3'E $\gamma$ 1 jouerait un rôle dans le switch vers certains isotypes. La 3'RR est, quant à elle, indispensable pour le déroulement correct de la CSR. Elle est impliquée dans le recrutement d'AID aux régions S et l'induction des DSBs. Les résultats de notre étude montrent que la 3'RR joue également un rôle dans la résolution de ces DSBs et le recrutement des voies de réparation de l'ADN.

Dans les cellules B normales, c'est la voie conventionnelle NHEJ qui est préférentiellement recrutée lors de la CSR. Les jonctions générées par cette voie sont souvent franches ou présentant des micro-homologies. La délétion de la 3'RR induit une modification de la signature moléculaire des jonctions, ce qui signifie que la résolution des cassures est perturbée et se fait *via* une autre voie de réparation.

L'analyse des jonctions résiduelles S $\mu$ -S $\gamma$ 3, S $\mu$ -S $\gamma$ 1 et S $\mu$ -S $\alpha$ , induites chez les souris

3'RR KO, montre un profil structurel différents. Elles présentent une signature se rapprochant de celle de la voie AEJ, suggérant que la délétion de la 3'RR ne permet pas efficacement le recrutement des facteurs de réparation conventionnels lors de la réparation des DSBs et que la cellule utilise une voie alternative.

## **HDACs et activation de la 3'RR dans les B normaux et tumoraux**

Nous avons précédemment montré que la 3'RR était capable, à elle seule, de déréguler l'oncogène c-myc dans des souris transgéniques et d'induire la lymphomagenèse. Dès lors, la 3'RR émerge comme une cible potentielle dans le traitement des lymphomes B matures. Cependant avant de pouvoir cibler l'activité de la 3'RR, il était impératif de décrypter son mode d'action sur l'oncogène transloqué. Nos études confirment que HDAC1 est recruté par l'élément central hs1.2 de la 3'RR dans des splénocytes B matures. Des expériences similaires réalisées sur des splénocytes issus de souris  $\Delta$ IRIS, délétés de la région 5'IRIS, montrent que la déstructuration du palindrome de la 3'RR empêche le recrutement de HDAC1 sur l'enhancer hs1.2, suggérant que cette région palindromique jouerait un rôle important et que sa perturbation impacterait négativement l'activité de la 3'RR. Ceci expliquerait notamment la préservation de cette structure palindromique au cours de l'évolution des espèces.

La transcription du locus IgH est régulée par la 3'RR ainsi que les processus de CSR et la synthèse d'Ig. Nous avons donc analysé l'effet de son ciblage par un HDACi. Le SAHA est un HDACi spécifique aux HDAC de classe I, tel que HDAC1. Il est utilisé en clinique comme traitement adjuvant de certains lymphomes. Le SAHA affecte négativement la prolifération des splénocytes B matures de façon dose dépendante et sous deux différentes conditions (LPS et LPS+IL4). Une baisse du switch vers IgG3 et une augmentation du switch vers IgG1 suite à des stimulations adaptées et en réponse au SAHA ont été observées. Les résultats obtenus sur la synthèse d'Ig suivent la même tendance que les effets sur le switch suggérant que le taux d'Ig produit dépend du taux de cellules switchées. Ainsi le taux élevé d'IgG1 produit sous l'effet du SAHA serait lié à l'augmentation du nombre de cellules IgG1<sup>+</sup> et la baisse du taux d'IgG3 correspondrait à la baisse du nombre de cellules IgG3<sup>+</sup>. Ces résultats ne correspondent pas à ce

qui a été précédemment décrit dans des splénocytes B primaires issus de souris MRL-lpr (une lignée de souris prédisposée à développer un désordre auto-immun similaire au lupus érythémateux). Dans ces souris, l'utilisation du HDACi TSA (Trichostatin A) induit un arrêt total de la transcription des gènes  $\gamma 1$  et  $\gamma 2a$  suggérant un rôle des HDACi dans la dérégulation de la transcription.

Des analyses de RNAseq montrent que la transcription des régions constantes C $\gamma$ 3 suite à une stimulation au LPS ou de la région C $\gamma$ 1 en réponse à une stimulation LPS+IL4, ne semble pas être affectée par le traitement au SAHA. La transcription sens et anti-sens de la 3'RR n'est également pas impactée par le SAHA, impliquant que ce dernier n'agit pas directement sur cette région régulatrice. Les effets observés sur la CSR seraient alors dus à d'autres mécanismes notamment l'acétylation ou la désacétylation des régions S précédant les gènes C.

Plusieurs gènes impliqués dans des processus de croissance et de prolifération sont déréglés sous l'effet du SAHA confirmant l'effet inhibiteur de prolifération des HDACi. Le SAHA induit la répression de nombreux gènes liés à des processus épigénétiques. Les translocations oncogéniques au locus IgH observées dans de nombreux lymphomes induisent souvent de tels changements. Nos résultats confirment que l'utilisation de drogues épigénétiques dans le traitement de lymphomes B matures constituerait une stratégie thérapeutique prometteuse.

Dans cette optique, nous avons analysé les effets du SAHA sur la prolifération des cellules isolées des lymphomes B matures développés par nos modèles c-myc-IgH. Les résultats montrent un effet lymphomes dépendant, avec une augmentation de la prolifération dans certains lymphomes, une baisse ou pas d'effet sur la prolifération dans d'autres. Ce n'est pas la seule différence observée avec les cellules B normales. En effet, des expériences de ChIP ont montré que dans les cellules B issus de lymphomes B matures, HDAC1 n'est pas recrutée par l'enhancer hs1.2. Au contraire, une fixation de l'HAT CBP, est observée aux éléments hs3a et hs3b bordant le palindrome. Cette fixation n'a pas lieu dans des splénocytes B normaux. Ces résultats indiquent que les processus impliqués lors de l'activation de la 3'RR dans les cellules B matures normales et dans les lymphomes B matures sont différents. Celle-ci doit être prise en compte lors de l'élaboration de stratégie ciblant l'activité de la 3'RR et son effet régulateur d'oncogènes transloqués au locus IgH. L'utilisation du SAHA ne semble pas concluant avec les souris transgéniques Cmyc-IgH. Il a recemment été montré qu'un HATi CBP

spécifique présente une activité anti-tumorale dans une variété de lignées cellulaires dérivées de plusieurs types de cancers. Les cellules issues de leucémies ou de lymphomes semblent y être les plus sensibles (Narita Takeo 2021). Il serait alors intéressant d'étudier l'effet d'HATi spécifiques ciblant le CPB dans les lymphomes développés par nos souris Cmyc-IgH.

## **Les souris Cmyc-C $\alpha$ homozygotes comme nouveau modèle de myélome**

Les jeunes souris Cmyc-C $\alpha$  utilisées dans notre précédente étude sur le rôle des éléments *cis*-régulateurs du locus IgH dans la lymphomagenèse B, présentent un taux élevé de cellules CD138 $^{+}$  dans leur moelle osseuse. Nous les avons alors mises dans un fond homozygote et nous avons observé une augmentation significative de l'expression de c-myc dans les splénocytes de jeunes souris, ainsi qu'un accroissement de la prolifération en réponse à une stimulation LPS + anti-CD40. Ces résultats sont dus à la dérégulation de c-myc dans 100% des cellules B, compte tenu de la présence de c-myc sur les deux allèles.

Nous avons analysé la capacité de ces cellules B à subir la CSR et à produire des Ig. Les résultats montrent que la présence de c-myc dans C $\alpha$  sur les deux allèles n'empêche pas la commutation vers les différentes classes d'Ig. Les taux d'Ig produits en réponse à des stimulations *in-vitro* baissent quant à eux drastiquement. Les taux d'Ig sériques sont également plus faibles (sauf pour l'isotype IgG1). Ces résultats indiquent que l'insertion de c-myc dans C $\alpha$  n'impacte pas le switch mais induit un défaut de synthèse d'Ig probablement lié à un effet isolateur de c-myc sur la transcription du locus IgH. Afin de compenser ce défaut de synthèse d'Ig, les cellules B vont donc se différencier davantage ce qui expliquerait les taux élevés de cellules CD138 $^{+}$ . Les souris Cmyc-C $\alpha$  développent à partir de l'âge de 4 mois des lymphomes assez agressifs avec, en majorité, un profil plasmocytaire CD138 $^{+}$ , contrairement à ce qui a été précédemment observé dans le modèle hétérozygote développant principalement des lymphomes matures CD138 $^{-}$ .

L'analyse transcriptomique des lymphomes CD138 $^{+}$  et CD138 $^{-}$  de ces souris montre plus de 2500 gènes difféntiellement exprimés entre ces deux groupes. La signature moléculaire des lymphomes CD138 $^{+}$  se rapproche significativement de celle du MM

humain. Il n'existe pas de modèles murins de type "myélome-like", ce qui constitue une limitation pour le développement de stratégies thérapeutiques efficaces. La majorité des modèles préexistants est basée sur des transplantations de cellules issues de myélomes humains, murins ou de lignés cellulaires. L'inconvénient de ce type de modèle est leur incapacité à reproduire les lésions génétiques rencontrées dans le MM humain contrairement au modèle Cmyc-C $\alpha$  homozygote. Certains modèles murins transgéniques exprimant la protéine de fusion NPM-ALK ou surexprimant c-myc et Bcl-xl, ou c-maf semblent également développer des expansions plasmocytaires. Là encore, les lésions permettant le développement de ces désordres ne reproduisent pas forcément ce qui est observé chez l'homme.

Cette étude a donc permis la conception d'un modèle murin capable de développer spontanément des lymphomes présentant des profils phénotypiques et moléculaires similaires au MM humain. Ces caractéristiques en font de ce modèle un outil intéressant pour des études physiopathologiques et thérapeutiques ciblées.

# Conclusions et résumé

Au cours de ma thèse, nous avons pu définir le rôle précis des deux principaux éléments régulateurs du locus IgH que sont  $E\mu$  et 3'RR lors de la lymphomagenèse B. L'analyse des lymphomes développés par trois lignées murines, portant un KI de l'oncogène c-myc à différentes positions du locus, nous ont permis de montrer que bien que la coopération transcriptionnelle de ces deux éléments permet d'accélérer et de promouvoir la lymphomagenèse, la 3'RR reste l'acteur majeur de la dérégulation de c-myc. La surexpression de c-myc ne constitue que l'événement initial de la transformation des cellules B. L'accumulation de mutations affectant la prolifération, le métabolisme ou l'apoptose est nécessaire pourachever le processus de cancérisation. Les lymphomes B développés par ces souris présentent majoritairement un profil mature IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>, présentant une signature transcriptomique similaire à celle du lymphome de Burkitt humain faisant d'elles des modèles d'étude *in-vivo* intéressants. Ce travail a fait émerger la 3'RR comme une cible potentielle dans le traitement des lymphomes B matures.

L'activation de la 3'RR dans des cellules B matures implique le recrutement d'HDAC1 par son élément hs1.2. Son ciblage avec l'HDACi SAHA induit une baisse de la prolifération B et affecte la CSR et la synthèse d'Ig de façon isotype dépendante. Cependant, le SAHA n'a aucun effet sur la transcription sens et anti-sens de la 3'RR indiquant ainsi que les effets précédemment observés ne seraient pas liés à une action directe sur l'activité de la 3'RR, mais au travers d'autres mécanismes tels que des modifications épigénétiques des régions S. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour étayer cette hypothèse. L'effet du SAHA sur la prolifération des lymphomes B matures issus des souris Cmyc-IgH est lymphome-dépendant, montrant une importante divergence avec les données obtenues chez les cellules B normales. Il a été montré que dans ces lymphomes, HDAC1 n'est plus recrutée à l'enhancer hs1.2 de la 3'RR au contraire de l'HAT CBP, présente aux deux éléments hs3a et hs3b, limitant le palindrome de la 3'RR. Il serait alors intéressant d'étudier les effets d'HATi spécifiques au CBP sur ces

lymphomes.

Enfin, les souris Cmyc-C $\alpha$  homozygotes développent des lymphomes CD138 $^{+}$  présentant un profil cellulaire et une signature transcriptomique similaires à celles de MM humain ce qui en fait un modèle d'étude à visée thérapeutique pertinent.

# Bibliographie

- Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D. & Brinster, R. L. (1985), 'The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice', *Nature* **318**(6046), 533–538.
- Adhikary, S. & Eilers, M. (2005), 'Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **6**(8), 635–645.
- Aguilera, R. J., Hope, T. J. & Sakano, H. (1985), 'Characterization of immunoglobulin enhancer deletions in murine plasmacytomas', *The EMBO journal* **4**(13B), 3689–3693.
- Alessandrini, A. & Desiderio, S. V. (1991), 'Coordination of Immunoglobulin DJH Transcription and D-to-JH Rearrangement by Promoter-Enhancer Approximation', *MOL. CELL. BIOL.* .
- Allen, C. D. C., Ansel, K. M., Low, C., Lesley, R., Tamamura, H., Fujii, N. & Cyster, J. G. (2004), 'Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5', *Nature Immunology* **5**(9), 943–952.
- Allman, D., Lindsley, R. C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S. A. & Hardy, R. R. (2001), 'Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **167**(12), 6834–6840.
- Allman, D. & Pillai, S. (2008), 'Peripheral B cell subsets', *Current Opinion in Immunology* **20**(2), 149–157.
- Allman, D., Srivastava, B. & Lindsley, R. C. (2004), 'Alternative routes to maturity :

- branch points and pathways for generating follicular and marginal zone B cells', *Immunological Reviews* **197**, 147–160.
- Alt, F. W. & Baltimore, D. (1982), 'Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments : implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(13), 4118–4122.
- Alt, F. W., Yancopoulos, G. D., Blackwell, T. K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S. & Baltimore, D. (1984), 'Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments', *The EMBO journal* **3**(6), 1209–1219.
- Arcinas, M. & Boxer, L. M. (1994), 'Differential protein binding to the c-myc promoter during differentiation of hematopoietic cell lines', *Oncogene* **9**(9), 2699–2706.
- Aymard, F., Bugler, B., Schmidt, C. K., Guillou, E., Caron, P., Briois, S., Iacovoni, J. S., Daburon, V., Miller, K. M., Jackson, S. P. & Legube, G. (2014), 'Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks', *Nature Structural & Molecular Biology* **21**(4), 366–374.
- Aziz, M., Holodick, N. E., Rothstein, T. L. & Wang, P. (2015), 'The Role of B-1 Cells in Inflammation', *Immunologic research* **63**(0), 153–166.  
**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4651765/>
- Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C. & Larsson, L. G. (2000), 'c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover', *Blood* **95**(6), 2104–2110.
- Banerji, J., Olson, L. & Schaffner, W. (1983), 'A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes', *Cell* **33**(3), 729–740.
- Batista, F. D. & Harwood, N. E. (2009), 'The who, how and where of antigen presentation to B cells', *Nature Reviews Immunology* **9**(1), 15–27. Bandiera\_abtest : a Cg\_type : Nature Research Journals Number : 1 Primary\_atype : Reviews Publisher : Nature Publishing Group.  
**URL:** <https://www.nature.com/articles/nri2454>

- Baumgarth, N. (2011), 'The double life of a B-1 cell : self-reactivity selects for protective effector functions', *Nature Reviews. Immunology* **11**(1), 34–46.
- Bentley, D. L. & Groudine, M. (1986), 'A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells', *Nature* **321**(6071), 702–706. Bandiera\_abtest : a Cg\_type : Nature Research Journals Number : 6071 Primary\_atype : Research Publisher : Nature Publishing Group.  
**URL:** <https://www.nature.com/articles/321702a0>
- Birshtein, B. K. (2014), 'Epigenetic Regulation of Individual Modules of the immunoglobulin heavy chain locus 3' Regulatory Region', *Frontiers in Immunology* **5**, 163.
- Blackwell, T. K., Huang, J., Ma, A., Kretzner, L., Alt, F. W., Eisenman, R. N. & Weintraub, H. (1993), 'Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences', *Molecular and Cellular Biology* **13**(9), 5216–5224.
- Blackwood, E. M. & Eisenman, R. N. (1991), 'Max : a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc', *Science (New York, N.Y.)* **251**(4998), 1211–1217.
- Boboila, C., Alt, F. W. & Schwer, B. (2012), 'Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks', *Advances in Immunology* **116**, 1–49.
- Boboila, C., Jankovic, M., Yan, C. T., Wang, J. H., Wesemann, D. R., Zhang, T., Fazeli, A., Feldman, L., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M. & Alt, F. W. (2010), 'Alternative end-joining catalyzes robust IgH locus deletions and translocations in the combined absence of ligase 4 and Ku70', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(7), 3034–3039.
- Bolland, D. J., Wood, A. L., Afshar, R., Featherstone, K., Oltz, E. M. & Corcoran, A. E. (2007), 'Antisense intergenic transcription precedes IgH D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer Emu', *Molecular and Cellular Biology* **27**(15), 5523–5533.
- Born, T. L., Frost, J. A., Schönthal, A., Prendergast, G. C. & Feramisco, J. R. (1994), 'c-Myc cooperates with activated Ras to induce the cdc2 promoter', *Molecular and Cellular Biology* **14**(9), 5710–5718.

- Bottaro, A., Young, F., Chen, J., Serwe, M., Sablitzky, F. & Alt, F. W. (1998), 'Deletion of the IgH intronic enhancer and associated matrix-attachment regions decreases, but does not abolish, class switching at the mu locus', *International Immunology* **10**(6), 799–806.
- Bouchard, C., Lee, S., Paulus-Hock, V., Loddenkemper, C., Eilers, M. & Schmitt, C. A. (2007), 'FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf', *Genes & Development* **21**(21), 2775–2787.
- Brandt, V. L. & Roth, D. B. (2009), 'Recent insights into the formation of RAG-induced chromosomal translocations', *Advances in Experimental Medicine and Biology* **650**, 32–45.
- Buchanan, K. L., Hodgetts, S. I., Byrnes, J. & Webb, C. F. (1995), 'Differential transcription efficiency of two Ig VH promoters in vitro.', *The Journal of Immunology* **155**(9), 4270–4277. Publisher : American Association of Immunologists.  
**URL:** <https://www.jimmunol.org/content/155/9/4270>
- Buchanan, K. L., Smith, E. A., Dou, S., Corcoran, L. M. & Webb, C. F. (1997), 'Family-specific differences in transcription efficiency of Ig heavy chain promoters.', *The Journal of Immunology* **159**(3), 1247–1254. Publisher : American Association of Immunologists.  
**URL:** <https://www.jimmunol.org/content/159/3/1247>
- Campbell, P. J., Stephens, P. J., Pleasance, E. D., O'Meara, S., Li, H., Santarius, T., Stebbings, L. A., Leroy, C., Edkins, S., Hardy, C., Teague, J. W., Menzies, A., Goodhead, I., Turner, D. J., Clee, C. M., Quail, M. A., Cox, A., Brown, C., Durbin, R., Hurles, M. E., Edwards, P. A. W., Bignell, G. R., Stratton, M. R. & Futreal, P. A. (2008), 'Identification of somatically acquired rearrangements in cancer using genome-wide massively parallel paired-end sequencing', *Nature Genetics* **40**(6), 722–729.  
**URL:** <http://www.nature.com/articles/ng.128>
- Capoulade, C., Bressac-de Paillerets, B., Lefrère, I., Ronsin, M., Feunteun, J., Tursz, T. & Wiels, J. (1998), 'Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells', *Oncogene* **16**(12), 1603–1610.

- Cariappa, A., Tang, M., Parng, C., Nebelitskiy, E., Carroll, M., Georgopoulos, K. & Pillai, S. (2001), 'The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21', *Immunity* **14**(5), 603–615.
- Cerutti, A. (2010), 'Immunology. IgA changes the rules of memory', *Science (New York, N.Y.)* **328**(5986), 1646–1647.
- Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I. (2013), 'Marginal zone B cells : virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes', *Nature Reviews. Immunology* **13**(2), 118–132.
- Chakraborty, T., Chowdhury, D., Keyes, A., Jani, A., Subrahmanyam, R., Ivanova, I. & Sen, R. (2007), 'Repeat Organization and Epigenetic Regulation of the DH-C Domain of the Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Locus', *Molecular Cell* **27**(5), 842–850.  
**URL:** <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276507004819>
- Chaudhuri, J., Khuong, C. & Alt, F. W. (2004), 'Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets', *Nature* **430**(7003), 992–998.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E. & Alt, F. W. (2003), 'Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme', *Nature* **422**(6933), 726–730.
- Chauveau, C. & Cogné, M. (1996), 'Palindromic structure of the IgH 3'locus control region', *Nature Genetics* **14**(1), 15–16.
- Chen, J., Young, F., Bottaro, A., Stewart, V., Smith, R. K. & Alt, F. W. (1993), 'Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus.', *The EMBO Journal* **12**(12), 4635–4645.  
**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413901/>
- Cheung, W. C., Kim, J. S., Linden, M., Peng, L., Van Ness, B., Polakiewicz, R. D. & Janz, S. (2004), 'Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-XL to cause plasma cell neoplasms in mice', *Journal of Clinical Investigation* **113**(12), 1763–1773.  
**URL:** <http://www.jci.org/articles/view/20369>

- Chiarle, R., Zhang, Y., Frock, R. L., Lewis, S. M., Molinie, B., Ho, Y.-J., Myers, D. R., Choi, V. W., Compagno, M., Malkin, D. J., Neuberg, D., Monti, S., Giallourakis, C. C., Gostissa, M. & Alt, F. W. (2011), 'Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B cells', *Cell* **147**(1), 107–119.
- Chung, J. B., Silverman, M. & Monroe, J. G. (2003), 'Transitional B cells : step by step towards immune competence', *Trends in Immunology* **24**(6), 343–349.
- Clark, M. R., Mandal, M., Ochiai, K. & Singh, H. (2014), 'Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling', *Nature Reviews. Immunology* **14**(2), 69–80.
- Cockerill, P. N., Yuen, M. H. & Garrard, W. T. (1987), 'The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements', *The Journal of Biological Chemistry* **262**(11), 5394–5397.
- Cole, M. D. & Cowling, V. H. (2008), 'Transcription-independent functions of MYC : regulation of translation and DNA replication', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **9**(10), 810–815.
- Cortizas, E. M., Zahn, A., Hajjar, M. E., Patenaude, A.-M., Di Noia, J. M. & Verdin, R. E. (2013), 'Alternative end-joining and classical nonhomologous end-joining pathways repair different types of double-strand breaks during class-switch recombination', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **191**(11), 5751–5763.
- Cory, S., Gerondakis, S. & Adams, J. M. (1983), 'Interchromosomal recombination of the cellular oncogene c-myc with the immunoglobulin heavy chain locus in murine plasmacytomas is a reciprocal exchange', *The EMBO journal* **2**(5), 697–703.
- Cowling, V. H., Chandriani, S., Whitfield, M. L. & Cole, M. D. (2006), 'A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest', *Molecular and Cellular Biology* **26**(11), 4226–4239.
- Crews, S., Barth, R., Hood, L., Prehn, J. & Calame, K. (1982), 'Mouse c-myc oncogene is located on chromosome 15 and translocated to chromosome 12 in plasmacytomas', *Science (New York, N.Y.)* **218**(4579), 1319–1321.

- D'Addabbo, P., Scascitelli, M., Giambra, V., Rocchi, M. & Frezza, D. (2011), 'Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1.2 within the palindrome of IgH 3'Regulatory Region', *BMC evolutionary biology* **11**, 71.
- Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R. C. & Croce, C. M. (1982), 'Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(24), 7824–7827.
- Daly, J., Licence, S., Nanou, A., Morgan, G. & Mårtensson, I.-L. (2007), 'Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion', *The EMBO journal* **26**(19), 4273–4282.
- Dang, C. V. (1999), 'c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism', *Molecular and Cellular Biology* **19**(1), 1–11.
- Dang, C. V., O'Donnell, K. A., Zeller, K. I., Nguyen, T., Osthus, R. C. & Li, F. (2006), 'The c-Myc target gene network', *Seminars in Cancer Biology* **16**(4), 253–264.  
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X06000654>
- Dariavach, P., Williams, G. T., Campbell, K., Pettersson, S. & Neuberger, M. S. (1991), 'The mouse IgH 3'-enhancer', *European Journal of Immunology* **21**(6), 1499–1504.
- Davis, A. C., Wims, M., Spotts, G. D., Hann, S. R. & Bradley, A. (1993), 'A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice', *Genes & Development* **7**(4), 671–682.
- Desiderio, S. V., Yancopoulos, G. D., Paskind, M., Thomas, E., Boss, M. A., Landau, N., Alt, F. W. & Baltimore, D. (1984), 'Insertion of N regions into heavy-chain genes is correlated with expression of terminal deoxytransferase in B cells', *Nature* **311**(5988), 752–755.
- Dickerson, S. K., Market, E., Besmer, E. & Papavasiliou, F. N. (2003), 'AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA', *The Journal of Experimental Medicine* **197**(10), 1291–1296.
- Dominguez-Sola, D., Ying, C. Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Gal-loway, D. A., Gu, W., Gautier, J. & Dalla-Favera, R. (2007), 'Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc', *Nature* **448**(7152), 445–451.

- Dudley, J. P., Mertz, J. A., Rajan, L., Lozano, M. & Broussard, D. R. (2002), 'What retroviruses teach us about the involvement of c-Myc in leukemias and lymphomas', *Leukemia* **16**(6), 1086–1098.
- Eaton, S. & Calame, K. (1987), 'Multiple DNA sequence elements are necessary for the function of an immunoglobulin heavy chain promoter.', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**(21), 7634–7638.  
**URL:** <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.84.21.7634>
- Ebert, A., McManus, S., Tagoh, H., Medvedovic, J., Salvagiotto, G., Novatchkova, M., Tamir, I., Sommer, A., Jaritz, M. & Busslinger, M. (2011), 'The distal V(H) gene cluster of the IgH locus contains distinct regulatory elements with Pax5 transcription factor-dependent activity in pro-B cells', *Immunity* **34**(2), 175–187.
- Ehrenstein, M. R. & Notley, C. A. (2010), 'The importance of natural IgM : scavenger, protector and regulator', *Nature Reviews. Immunology* **10**(11), 778–786.
- Eick, D. & Bornkamm, G. W. (1986), 'Transcriptional arrest within the first exon is a fast control mechanism in c-myc gene expression', *Nucleic Acids Research* **14**(21), 8331–8346.  
**URL:** <https://doi.org/10.1093/nar/14.21.8331>
- Eischen, C. M., Weber, J. D., Roussel, M. F., Sherr, C. J. & Cleveland, J. L. (1999), 'Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis', *Genes & Development* **13**(20), 2658–2669.
- Enders, A., Short, A., Miosge, L. A., Bergmann, H., Sontani, Y., Bertram, E. M., Whittle, B., Balakishnan, B., Yoshida, K., Sjollema, G., Field, M. A., Andrews, T. D., Hagiwara, H. & Goodnow, C. C. (2014), 'Zinc-finger protein ZFP318 is essential for expression of IgD, the alternatively spliced IgH product made by mature B lymphocytes', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**(12), 4513–4518.  
Publisher : National Academy of Sciences Section : Biological Sciences.  
**URL:** <https://www.pnas.org/content/111/12/4513>
- Engel, H., Rolink, A. & Weiss, S. (1999), 'B cells are programmed to activate kappa and lambda for rearrangement at consecutive developmental stages', *European Journal of Immunology* **29**(7), 2167–2176.

- Erikson, J., ar Rushdi, A., Drwinga, H. L., Nowell, P. C. & Croce, C. M. (1983), 'Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in burkitt lymphoma', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**(3), 820–824.
- Ernst, P. & Smale, S. T. (1995), 'Combinatorial regulation of transcription II : The immunoglobulin mu heavy chain gene', *Immunity* **2**(5), 427–438.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. & Hancock, D. C. (1992), 'Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein', *Cell* **69**(1), 119–128.
- Facchini, L. M. & Penn, L. Z. (1998), 'The molecular role of Myc in growth and transformation : recent discoveries lead to new insights', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **12**(9), 633–651.
- Felsher, D. W. & Bishop, J. M. (1999), 'Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(7), 3940–3944.
- Fischle, W., Wang, Y. & Allis, C. D. (2003), 'Histone and chromatin cross-talk', *Current Opinion in Cell Biology* **15**(2), 172–183.
- Galaktionov, K., Chen, X. & Beach, D. (1996), 'Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc', *Nature* **382**(6591), 511–517.
- Gallant, P., Shioi, Y., Cheng, P. F., Parkhurst, S. M. & Eisenman, R. N. (1996), 'Myc and Max homologs in Drosophila', *Science (New York, N.Y.)* **274**(5292), 1523–1527.
- Garrett, F. E., Emelyanov, A. V., Sepulveda, M. A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L. A., Lobanenkov, V. V. & Birshtein, B. K. (2005), 'Chromatin Architecture near a Potential 3' End of the IgH Locus Involves Modular Regulation of Histone Modifications during B-Cell Development and In Vivo Occupancy at CTCF Sites', *Molecular and Cellular Biology* **25**(4), 1511–1525.
- URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC548023/>
- Genetta, T., Ruezinsky, D. & Kadesch, T. (1994), 'Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins : implications for B-cell specificity of the

- immunoglobulin heavy-chain enhancer', *Molecular and Cellular Biology* **14**(9), 6153–6163.
- Giannini, S. L., Singh, M., Calvo, C. F., Ding, G. & Birshtein, B. K. (1993), 'DNA regions flanking the mouse Ig 3' alpha enhancer are differentially methylated and DNAase I hypersensitive during B cell differentiation', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **150**(5), 1772–1780.
- Goh, A. M., Coffill, C. R. & Lane, D. P. (2011), 'The role of mutant p53 in human cancer', *The Journal of Pathology* **223**(2), 116–126.
- Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R. N. & White, R. J. (2003), 'Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc', *Nature* **421**(6920), 290–294.
- Good-Jacobson, K. L. & Tarlinton, D. M. (2012), 'Multiple routes to B-cell memory', *International Immunology* **24**(7), 403–408.
- Gramlich, H. S., Reisbig, T. & Schatz, D. G. (2012), 'AID-targeting and hypermutation of non-immunoglobulin genes does not correlate with proximity to immunoglobulin genes in germinal center B cells', *PloS One* **7**(6), e39601.
- Grandori, C., Cowley, S. M., James, L. P. & Eisenman, R. N. (2000), 'The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior', *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**, 653–699.
- Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z. A., Ngouenet, C., Galloway, D. A., Eisenman, R. N. & White, R. J. (2005), 'c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I', *Nature Cell Biology* **7**(3), 311–318.
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., Edkins, S., O'Meara, S., Vastrik, I., Schmidt, E. E., Avis, T., Barhorpe, S., Bhamra, G., Buck, G., Choudhury, B., Clements, J., Cole, J., Dicks, E., Forbes, S., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Hinton, J., Jenkinson, A., Jones, D., Menzies, A., Mironenko, T., Perry, J., Raine, K., Richardson, D., Shepherd, R., Small, A., Tofts, C., Varian, J., Webb, T., West, S., Widaa, S., Yates, A., Cahill, D. P., Louis, D. N., Goldstraw, P., Nicholson, A. G.,

- Brasseur, F., Looijenga, L., Weber, B. L., Chiew, Y.-E., deFazio, A., Greaves, M. F., Green, A. R., Campbell, P., Birney, E., Easton, D. F., Chenevix-Trench, G., Tan, M.-H., Khoo, S. K., Teh, B. T., Yuen, S. T., Leung, S. Y., Wooster, R., Futreal, P. A. & Stratton, M. R. (2007), 'Patterns of somatic mutation in human cancer genomes', *Nature* **446**(7132), 153–158.
- URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2712719/>
- Grewal, S. S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R. N. & Edgar, B. A. (2005), 'Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during Drosophila development', *Nature Cell Biology* **7**(3), 295–302.
- Guglielmi, L., Le Bert, M., Comte, I., Dessain, M. L., Drouet, M., Ayer-Le Lievre, C., Cogné, M. & Denizot, Y. (2003b), 'Combination of 3' and 5' IgH regulatory elements mimics the B-specific endogenous expression pattern of IgH genes from pro-B cells to mature B cells in a transgenic mouse model', *Biochimica Et Biophysica Acta* **1642**(3), 181–190.
- Guglielmi, L., Le Bert, M., Truffinet, V., Cogné, M. & Denizot, Y. (2003a), 'Insulators to improve expression of a 3(')IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **307**(3), 466–471.
- Guglielmi, L., Truffinet, V., Carrion, C., Bert, M. L., Cogné, N., Cogné, M. & Denizot, Y. (2005), 'The 5HS4 insulator element is an efficient tool to analyse the transient expression of an E-GFP vector in a transgenic mouse model', *Transgenic Research* **14**(4), 361–364.
- URL:** <http://link.springer.com/10.1007/s11248-005-3239-7>
- Gunn, K. E. & Brewer, J. W. (2006), 'Evidence that marginal zone B cells possess an enhanced secretory apparatus and exhibit superior secretory activity', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**(6), 3791–3798.
- Hackney, J. A., Misaghi, S., Senger, K., Garris, C., Sun, Y., Lorenzo, M. N. & Zarrin, A. A. (2009), 'DNA targets of AID evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination', *Advances in Immunology* **101**, 163–189.
- Hakim, O., Resch, W., Yamane, A., Klein, I., Kieffer-Kwon, K.-R., Jankovic, M., Oliveira, T., Bothmer, A., Voss, T. C., Ansarah-Sobrinho, C., Mathe, E., Liang, G., Co-

- bell, J., Nakahashi, H., Robbiani, D. F., Nussenzweig, A., Hager, G. L., Nussenzweig, M. C. & Casellas, R. (2012), 'DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes', *Nature* **484**(7392), 69–74.
- Halverson, R., Torres, R. M. & Pelanda, R. (2004), 'Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens', *Nature Immunology* **5**(6), 645–650.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011), 'Hallmarks of cancer : the next generation', *Cell* **144**(5), 646–674.
- Hanson, K. D., Shichiri, M., Follansbee, M. R. & Sedivy, J. M. (1994), 'Effects of c-myc expression on cell cycle progression', *Molecular and Cellular Biology* **14**(9), 5748–5755.
- Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Riblet, R. J. & Hayakawa, K. (1989), 'A single VH gene is utilized predominantly in anti-BrMRBC hybridomas derived from purified Ly-1 B cells. Definition of the VH11 family', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **142**(10), 3643–3651.
- Hardy, R. R., Kincade, P. W. & Dorshkind, K. (2007), 'The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage', *Immunity* **26**(6), 703–714.
- Hemann, M. T., Bric, A., Teruya-Feldstein, J., Herbst, A., Nilsson, J. A., Cordon-Cardo, C., Cleveland, J. L., Tansey, W. P. & Lowe, S. W. (2005), 'Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants', *Nature* **436**(7052), 807–811.
- Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell, B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F., Dang, C. V., Sedivy, J. M., Eick, D., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (2000), 'Identification of CDK4 as a target of c-MYC', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(5), 2229–2234.
- Hoang, A. T., Cohen, K. J., Barrett, J. F., Bergstrom, D. A. & Dang, C. V. (1994), 'Participation of cyclin A in Myc-induced apoptosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(15), 6875–6879.

- Holodick, N. E. & Rothstein, T. L. (2015), 'B cells in the aging immune system : time to consider B-1 cells', *Annals of the New York Academy of Sciences* **1362**, 176–187.
- Hwang, J. K., Alt, F. W. & Yeap, L.-S. (2015), 'Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination', *Microbiology Spectrum* **3**(1), MDNA3-0037-2014.
- Issaoui, H., Ghazzaui, N., Ferrad, M., Boyer, F. & Denizot, Y. (2019), 'Class switch recombination junctions are not affected by the absence of the immunoglobulin heavy chain E enhancer', *Cellular & Molecular Immunology* **16**, 1–3.
- Ito, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M. & Honjo, T. (2004), 'Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(7), 1975–1980.
- Jankovic, M., Robbiani, D. F., Dorsett, Y., Eisenreich, T., Xu, Y., Tarakhovsky, A., Nussenzweig, A. & Nussenzweig, M. C. (2010), 'Role of the translocation partner in protection against AID-dependent chromosomal translocations', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(1), 187–192.  
**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2806756/>
- Jansen-Dürr, P., Meichle, A., Steiner, P., Pagano, M., Finke, K., Botz, J., Wessbecher, J., Draetta, G. & Eilers, M. (1993), 'Differential modulation of cyclin gene expression by MYC.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(8), 3685–3689.  
**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC46366/>
- Johnston, L. A., Prober, D. A., Edgar, B. A., Eisenman, R. N. & Gallant, P. (1999), 'Drosophila myc regulates cellular growth during development', *Cell* **98**(6), 779–790.
- Jones, J. M. & Gellert, M. (2002), 'Ordered assembly of the V(D)J synaptic complex ensures accurate recombination', *The EMBO Journal* **21**(15), 4162–4171.  
**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC126141/>
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. & Alt, F. W. (2006), 'MECHANISM AND CONTROL OF V(D)J RECOMBINATION AT THE IMMUNOGLOBULIN

- HEAVY CHAIN LOCUS', *Annual Review of Immunology* **24**(1), 541–570.
- URL: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115830>
- Kadesch, T. (1992), 'Helix-loop-helix proteins in the regulation of immunoglobulin gene transcription', *Immunology Today* **13**(1), 31–36.
- Kantor, A. B. & Herzenberg, L. A. (1993), 'Origin of murine B cell lineages', *Annual Review of Immunology* **11**, 501–538.
- Kaplan, M. H., Zong, R. T., Herrscher, R. F., Scheuermann, R. H. & Tucker, P. W. (2001), 'Transcriptional activation by a matrix associating region-binding protein. contextual requirements for the function of bright', *The Journal of Biological Chemistry* **276**(24), 21325–21330.
- Klein, I. A., Resch, W., Jankovic, M., Oliveira, T., Yamane, A., Nakahashi, H., Di Virgilio, M., Bothmer, A., Nussenzweig, A., Robbiani, D. F., Casellas, R. & Nussenzweig, M. C. (2011), 'Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B lymphocytes', *Cell* **147**(1), 95–106.
- Klein, S., Sablitzky, F. & Radbruch, A. (1984), 'Deletion of the IgH enhancer does not reduce immunoglobulin heavy chain production of a hybridoma IgD class switch variant', *The EMBO journal* **3**(11), 2473–2476.
- Kroese, F. G., Ammerlaan, W. A. & Deenen, G. J. (1992), 'Location and function of B-cell lineages', *Annals of the New York Academy of Sciences* **651**, 44–58.
- Kudo, A. & Melchers, F. (1987), 'A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes', *The EMBO journal* **6**(8), 2267–2272.
- Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W. (2015), 'Memory B cells', *Nature Reviews. Immunology* **15**(3), 149–159.
- Küppers, R. (2005), 'Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis', *Nature Reviews. Cancer* **5**(4), 251–262.
- Le Noir, S., Boyer, F., Lecardeur, S., Brousse, M., Oruc, Z., Cook-Moreau, J., Denizot, Y. & Cogné, M. (2017), 'Functional anatomy of the immunoglobulin heavy chain 3 super-enhancer needs not only core enhancer elements but also their unique DNA context', *Nucleic Acids Research* **45**(10), 5829–5837.

LeBowitz, J. H., Kobayashi, T., Staudt, L., Baltimore, D. & Sharp, P. A. (1988), 'Octamer-binding proteins from B or HeLa cells stimulate transcription of the immunoglobulin heavy-chain promoter in vitro.', *Genes & Development* **2**(10), 1227–1237. Company : Cold Spring Harbor Laboratory Press Distributor : Cold Spring Harbor Laboratory Press Institution : Cold Spring Harbor Laboratory Press Label : Cold Spring Harbor Laboratory Press Publisher : Cold Spring Harbor Lab.

**URL:** <http://genesdev.cshlp.org/content/2/10/1227>

Lenz, G. & Staudt, L. M. (2010), 'Aggressive lymphomas', *The New England Journal of Medicine* **362**(15), 1417–1429.

Li, F. & Eckhardt, L. A. (2009), 'A role for the IgH intronic enhancer E in enforcing allelic exclusion', *The Journal of Experimental Medicine* **206**(1), 153–167.

**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2626684/>

Li, F., Yan, Y., Pieretti, J., Feldman, D. A. & Eckhardt, L. A. (2010), 'Comparison of Identical and Functional *Igh* Alleles Reveals a Nonessential Role for E in Somatic Hypermutation and Class-Switch Recombination', *The Journal of Immunology* **185**(10), 6049–6057.

**URL:** <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0902992>

Li, L. H., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D. & Ziff, E. B. (1994), 'c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II', *The EMBO journal* **13**(17), 4070–4079.

Lieber, M. R. (2010), 'The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway', *Annual Review of Biochemistry* **79**, 181–211.

Limnander, A., Zikherman, J., Lau, T., Leitges, M., Weiss, A. & Roose, J. P. (2014), 'Protein kinase C promotes transitional B cell-negative selection and limits proximal B cell receptor signaling to enforce tolerance', *Molecular and Cellular Biology* **34**(8), 1474–1485.

Lin, D., Ippolito, G. C., Zong, R.-T., Bryant, J., Koslovsyky, J. & Tucker, P. (2007), 'Bright/ARID3A contributes to chromatin accessibility of the immunoglobulin heavy chain enhancer', *Molecular Cancer* **6**, 23.

- Lu, Z.-P., Ju, Z.-L., Shi, G.-Y., Zhang, J.-W. & Sun, J. (2005), 'Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **330**(1), 204–209.
- MacLennan, I. C. M. (1994), 'Germinal Centers', *Annual Review of Immunology* **12**(1), 117–139. \_eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001001>.  
**URL:** <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001001>
- Madisen, L. & 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 & Development* **8**(18), 2212–2226. Company : Cold Spring Harbor Laboratory Press Distributor : Cold Spring Harbor Laboratory Press Institution : Cold Spring Harbor Laboratory Press Label : Cold Spring Harbor Laboratory Press Publisher : Cold Spring Harbor Lab.  
**URL:** <http://genesdev.cshlp.org/content/8/18/2212>
- Maki, R., Roeder, W., Traunecker, A., Sidman, C., Wabl, M., Raschke, W. & Tonegawa, S. (1981), 'The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes', *Cell* **24**(2), 353–365.
- Mani, R.-S. & Chinnaiyan, A. M. (2010), 'Triggers for genomic rearrangements : insights into genomic, cellular and environmental influences', *Nature Reviews. Genetics* **11**(12), 819–829.
- Manis, J. P., Michaelson, J. S., Birshtein, B. K. & Alt, F. W. (2003), 'Elucidation of a downstream boundary of the 3 IgH regulatory region', *Molecular Immunology* **39**(12), 753–760.  
**URL:** <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589002002560>
- Martin, F., Oliver, A. M. & Kearney, J. F. (2001), 'Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens', *Immunity* **14**(5), 617–629.
- Matthews, A. J., Husain, S. & Chaudhuri, J. (2014), 'Binding of AID to DNA does not correlate with mutator activity', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **193**(1), 252–257.

- Matthews, A. J., Zheng, S., DiMenna, L. J. & Chaudhuri, J. (2014), 'Regulation of immunoglobulin class-switch recombination : choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair', *Advances in Immunology* **122**, 1–57.
- Matthias, P. & Baltimore, D. (1993), 'The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3' enhancer close to the alpha constant region', *Molecular and Cellular Biology* **13**(3), 1547–1553.
- McBlane, J. F., van Gent, D. C., Ramsden, D. A., Romeo, C., Cuomo, C. A., Gellert, M. & Oettinger, M. A. (1995), 'Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps', *Cell* **83**(3), 387–395.
- Mebius, R. E. & Kraal, G. (2005), 'Structure and function of the spleen', *Nature Reviews. Immunology* **5**(8), 606–616.
- Meffre, E., Casellas, R. & Nussenzweig, M. C. (2000), 'Antibody regulation of B cell development', *Nature Immunology* **1**(5), 379–385.
- Meyer, K. B., Skogberg, M., Margenfeld, C., Ireland, J. & Pettersson, S. (1995), 'Repression of the immunoglobulin heavy chain 3' enhancer by helix-loop-helix protein Id3 via a functionally important E47/E12 binding site : implications for developmental control of enhancer function', *European Journal of Immunology* **25**(6), 1770–1777.
- Meyer, N. & Penn, L. Z. (2008), 'Reflecting on 25 years with MYC', *Nature Reviews. Cancer* **8**(12), 976–990.
- Mills, F. C., Harindranath, N., Mitchell, M. & Max, E. E. (1997), 'Enhancer complexes located downstream of both human immunoglobulin Calpha genes', *The Journal of Experimental Medicine* **186**(6), 845–858.
- Miyazaki, K., M, M. & C, M. (2014), 'The establishment of B versus T cell identity', *Trends in immunology* **35**(5). Publisher : Trends Immunol.
- URL:** <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24679436/>
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S. & Papaioannou, V. E. (1992), 'RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes', *Cell* **68**(5), 869–877.

- Mostoslavsky, R., Alt, F. W. & Rajewsky, K. (2004), 'The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism', *Cell* **118**(5), 539–544.
- Mundy, C. L., Patenge, N., Matthews, A. G. W. & Oettinger, M. A. (2002), 'Assembly of the RAG1/RAG2 Synaptic Complex', *Molecular and Cellular Biology* **22**(1), 69–77.  
**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC134220/>
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. & Honjo, T. (2000), 'Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme', *Cell* **102**(5), 553–563.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O. & Honjo, T. (1999), 'Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells', *The Journal of Biological Chemistry* **274**(26), 18470–18476.
- Muto, A., Hoshino, H., Madisen, L., Yanai, N., Obinata, M., Karasuyama, H., Hayashi, N., Nakauchi, H., Yamamoto, M., Groudine, M. & Igarashi, K. (1998), 'Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer', *The EMBO journal* **17**(19), 5734–5743.
- Mårtensson, I.-L., Rolink, A., Melchers, F., Mundt, C., Licence, S. & Shimizu, T. (2002), 'The pre-B cell receptor and its role in proliferation and Ig heavy chain allelic exclusion', *Seminars in Immunology* **14**(5), 335–342.
- Nagasawa, T. (2006), 'Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development', *Nature Reviews. Immunology* **6**(2), 107–116.
- Narita Takeo, Ito Shinsuke, k. Y. K. W. N. K. W. J. S. S. L. T. W. B. M. E. G. P. S. M. I. V. M. J. A. K. K. H. C. C. (2021), 'Enhancers are activated by p300/cbp activity-dependent pic assembly, rnapii recruitment, and pause release', *Molecular Cell* **81**(10), 2166–2182.e6.
- Neel, B. G., Jhanwar, S. C., Chaganti, R. S. & Hayward, W. S. (1982), 'Two human onc genes are located on the long arm of chromosome 8', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(24), 7842–7846.

- Nepveu, A. & Marcu, K. B. (1986), 'Intragenic pausing and anti-sense transcription within the murine c-myc locus', *The EMBO journal* **5**(11), 2859–2865.
- Neuberger, M. S. & Calabi, F. (1983), 'Reciprocal chromosome translocation between c-myc and immunoglobulin gamma 2b genes', *Nature* **305**(5931), 240–243.
- Nussenzweig, A. & Nussenzweig, M. C. (2010), 'Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer', *Cell* **141**(1), 27–38.
- Okada, T. & Cyster, J. G. (2006), 'B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses', *Current Opinion in Immunology* **18**(3), 278–285.
- Osmond Denis G, Rolink Antonius, M. F. (1998), 'Murine b lymphopoiesis : towards a unified model', *Immunology Today* **19**(2), 65–8.
- Oster, S. K., Ho, C. S. W., Soucie, E. L. & Penn, L. Z. (2002), 'The myc oncogene : MarvelouslY Complex', *Advances in Cancer Research* **84**, 81–154.
- Park, S. S., Kim, J. S., Tessarollo, L., Owens, J. D., Peng, L., Han, S. S., Tae Chung, S., Torrey, T. A., Cheung, W. C., Polakiewicz, R. D., McNeil, N., Ried, T., Mushinski, J. F., Morse, H. C. & Janz, S. (2005), 'Insertion of c-Myc into IgH induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice', *Cancer Research* **65**(4), 1306–1315.
- Parslow, T. G., Blair, D. L., Murphy, W. J. & Granner, D. K. (1984), 'Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes : a novel conserved sequence.', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**(9), 2650–2654.  
**URL:** <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.81.9.2650>
- Peled, J. U., Kuang, F. L., Iglesias-Ussel, M. D., Roa, S., Kalis, S. L., Goodman, M. F. & Scharff, M. D. (2008), 'The biochemistry of somatic hypermutation', *Annual Review of Immunology* **26**, 481–511.
- Pelengaris, S., Khan, M. & Evan, G. (2002), 'c-MYC : more than just a matter of life and death', *Nature Reviews. Cancer* **2**(10), 764–776.
- Perlot, T., Alt, F. W., Bassing, C. H., Suh, H. & Pinaud, E. (2005), 'Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**(40), 14362–14367.  
**URL:** <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507090102>

- Pfisterer, P., Annweiler, A., Ullmer, C., Corcoran, L. & Wirth, T. (1994), 'Differential transactivation potential of Oct1 and Oct2 is determined by additional B cell-specific activities.', *The EMBO Journal* **13**(7), 1654–1663.  
**URL:** <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06429.x>
- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J. & Goodman, M. F. (2003), 'Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation', *Nature* **424**(6944), 103–107.
- Pierani, A. & Heguy, A. (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**, 12.
- Pike, B. L., Boyd, A. W. & Nossal, G. J. (1982), 'Clonal anergy : the universally anergic B lymphocyte', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(6), 2013–2017.
- Pillai, S. & Cariappa, A. (2009), 'The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision', *Nature Reviews. Immunology* **9**(11), 767–777.
- Pinaud, E., Aupetit, C., Chauveau, C. & Cogné, M. (1997), 'Identification of a homolog of the C alpha 3'/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH/hs1,2 enhancer downstream of the human immunoglobulin alpha 1 gene', *European Journal of Immunology* **27**(11), 2981–2985.
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y. & Cogné, M. (2011a), Chapter 2 - The IgH Locus 3 Regulatory Region : Pulling the Strings from Behind, *in* F. W. Alt, K. F. Austen, T. Honj, F. Melchers, J. W. Uhr & E. R. Unanue, eds, 'Advances in Immunology', Vol. 110, Academic Press, pp. 27–70.  
**URL:** <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123876638000028>
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y. & Cogné, M. (2011b), 'The IgH locus 3' regulatory region : pulling the strings from behind', *Advances in Immunology* **110**, 27–70.
- Pone, E. J., Zhang, J., Mai, T., White, C. A., Li, G., Sakakura, J. K., Patel, P. J., Al-Qahtani, A., Zan, H., Xu, Z. & Casali, P. (2012), 'BCR-signalling synergizes with

- TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-B pathway', *Nature Communications* **3**, 767.
- Prochownik, E. V. & Kukowska, J. (1986), 'Deregulated expression of c-myc by murine erythroleukaemia cells prevents differentiation', *Nature* **322**(6082), 848–850.
- Prochownik, E. V. & Li, Y. (2007), 'The ever expanding role for c-Myc in promoting genomic instability', *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* **6**(9), 1024–1029.
- Pérez-Durán, P., Belver, L., de Yébenes, V. G., Delgado, P., Pisano, D. G. & Ramiro, A. R. (2012), 'UNG shapes the specificity of AID-induced somatic hypermutation', *The Journal of Experimental Medicine* **209**(7), 1379–1389.
- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E. & Cogné, M. (2012), 'AID-Driven Deletion Causes Immunoglobulin Heavy Chain Locus Suicide Recombination in B Cells', *Science* **336**(6083), 931–934. Publisher : American Association for the Advancement of Science.
- URL:** <https://www-science-org.insb.bib.cnrs.fr/lookup/doi/10.1126/science.1218692>
- Qi, H., Cannons, J. L., Klauschen, F., Schwartzberg, P. L. & Germain, R. N. (2008), 'SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation', *Nature* **455**(7214), 764–769.
- Rada, C., Ehrenstein, M. R., Neuberger, M. S. & Milstein, C. (1998), 'Hot spot focusing of somatic hypermutation in MSH2-deficient mice suggests two stages of mutational targeting', *Immunity* **9**(1), 135–141.
- Ramiro, A. R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A. & Nussenzweig, M. C. (2004), 'AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo', *Cell* **118**(4), 431–438.
- Ramírez, J., Lukin, K. & Hagman, J. (2010), 'From hematopoietic progenitors to B cells : mechanisms of lineage restriction and commitment', *Current opinion in immunology* **22**(2), 177–184.
- URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2854230/>
- Rebhandl, S., Huemer, M., Greil, R. & Geisberger, R. (2015), 'AID/APOBEC deaminases and cancer', *Oncoscience* **2**(4), 320–333.

- Robbiani, D. F. & Nussenzweig, M. C. (2013), 'Chromosome translocation, B cell lymphoma, and activation-induced cytidine deaminase', *Annual Review of Pathology* **8**, 79–103.
- Rocha, P. P., Micsinai, M., Kluger, Y. & Skok, J. A. (2013), 'Response to Casellas et al', *Molecular cell* **51**(3), 277–278.  
**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3967784/>
- Rolink, A. G., Winkler, T., Melchers, F. & Andersson, J. (2000), 'Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment', *The Journal of Experimental Medicine* **191**(1), 23–32.
- Rosean, T. R., Holman, C. J., Tompkins, V. S., Jing, X., Krasowski, M. D., Rose-John, S. & Janz, S. (2016), 'KSHV-encoded vIL-6 collaborates with deregulated c-Myc to drive plasmablastic neoplasms in mice', *Blood Cancer Journal* **6**, e398.
- Rouaud-Tinguely, P., Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogne, M., Pinaud, E. & Denizot, Y. (2012), 'Enhancers Located in Heavy Chain Regulatory Region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) Are Dispensable for Diversity of VDJ Recombination', *The Journal of biological chemistry* **287**, 8356–60.
- Rowley, J. D. (1973a), 'Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia', *Annales De Genetique* **16**(2), 109–112.
- Rowley, J. D. (1973b), 'Letter : A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining', *Nature* **243**(5405), 290–293.
- Roy, A. L., Sen, R. & Roeder, R. G. (2011), 'Enhancer–promoter communication and transcriptional regulation of IgH', *Trends in Immunology* **32**(11), 532–539.  
**URL:** <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490611001189>
- Russell, D. M., Dembić, Z., Morahan, G., Miller, J. F., Bürki, K. & Nemazee, D. (1991), 'Peripheral deletion of self-reactive B cells', *Nature* **354**(6351), 308–311.
- Ryan, K. M. & Birnie, G. D. (1996), 'Myc oncogenes : the enigmatic family', *The Biochemical Journal* **314** ( Pt 3), 713–721.

- Sagaert, X. & De Wolf-Peeters, C. (2003), 'Classification of B-cells according to their differentiation status, their micro-anatomical localisation and their developmental lineage', *Immunology Letters* **90**(2-3), 179–186.
- Saintamand, A., Ghazzaui, N., Issaoui, H. & Denizot, Y. (2017), '3'RR : Docteur Jekyll et Mister Hyde de la lymphopoïèse/lymphomagenèse B', *médecine/sciences* **33**(11), 963–970.  
**URL:** <http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/20173311013>
- Saintamand, A., Rouaud, P., Garot, A., Saad, F., Carrion, C., Oblet, C., Cogné, M., Pinaud, E. & Denizot, Y. (2015b), 'The IgH 3' regulatory region governs chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate', *Oncotarget* **6**(7), 4845–4852.
- Saintamand, A., Rouaud, P., Saad, F., Rios, G., Cogné, M. & Denizot, Y. (2015a), 'Elucidation of IgH 3 region regulatory role during class switch recombination via germline deletion', *Nature Communications* **6**(1), 7084.  
**URL:** <http://www.nature.com/articles/ncomms8084>
- Saintamand, A., Vincent-Fabert, C., Garot, A., Rouaud, P., Oruc, Z., Magnone, V., Cogné, M. & Denizot, Y. (2016), 'Deciphering the importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy-chain 3' regulatory region', *Nature Communications* **7**(1), 10730.  
**URL:** <http://www.nature.com/articles/ncomms10730>
- Sakano, H., Kurosawa, Y., Weigert, M. & Tonegawa, S. (1981), 'Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes', *Nature* **290**(5807), 562–565. Bandiera\_abtest : a Cg\_type : Nature Research Journals Number : 5807 Primary\_atype : Research Publisher : Nature Publishing Group.  
**URL:** <https://www.nature.com/articles/290562a0>
- Saleque, S., Singh, M., Little, R. D., Giannini, S. L., Michaelson, J. S. & Birshtein, B. K. (1997), 'Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3'E and hs3)', *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **158**(10), 4780–4787.

- Schatz, D. G. & Spanopoulou, E. (2005), 'Biochemistry of V(D)J recombination', *Current Topics in Microbiology and Immunology* **290**, 49–85.
- Schmidt, E. V. (1999), 'The role of c-myc in cellular growth control', *Oncogene* **18**(19), 2988–2996. Bandiera\_abtest : a Cg\_type : Nature Research Journals Number : 19 Primary\_atype : Reviews Publisher : Nature Publishing Group.  
**URL:** <https://www.nature.com/articles/1202751>
- Schmidt, E. V. (2004), 'The role of c-myc in regulation of translation initiation', *Oncogene* **23**(18), 3217–3221.
- Seifert, M., Scholtysik, R. & Küppers, R. (2013), 'Origin and pathogenesis of B cell lymphomas', *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **971**, 1–25.
- Seki, M., Gearhart, P. J. & Wood, R. D. (2005), 'DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes', *EMBO reports* **6**(12), 1143–1148.
- Sen, R. & Oltz, E. (2006), 'Genetic and epigenetic regulation of IgH gene assembly', *Current Opinion in Immunology* **18**(3), 237–242.  
**URL:** <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791506000562>
- Serwe, M. & Sablitzky, F. (1993), 'V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer.', *The EMBO Journal* **12**(6), 2321–2327.  
**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413462/>
- Shaffer, C. D., Stephens, G. E., Thompson, B. A., Funches, L., Bernat, J. A., Craig, C. A. & Elgin, S. C. R. (2002), 'Heterochromatin protein 2 (HP2), a partner of HP1 in Drosophila heterochromatin', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(22), 14332–14337.  
**URL:** <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.212458899>
- Shi, Y., Glynn, J. M., Guilbert, L. J., Cotter, T. G., Bissonnette, R. P. & Green, D. R. (1992), 'Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas', *Science (New York, N.Y.)* **257**(5067), 212–214.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F. & Stall, A. M. (1992), 'RAG-2-deficient mice

- lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement', *Cell* **68**(5), 855–867.
- Stavnezer, J. & Schrader, C. E. (2014), 'IgH Chain Class Switch Recombination : Mechanism and Regulation', *The Journal of Immunology* .
- Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mittnacht, S., Bartek, J. & Eilers, M. (1995), 'Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes', *The EMBO journal* **14**(19), 4814–4826.
- Storb, U. (2014), 'Why does somatic hypermutation by AID require transcription of its target genes ?', *Advances in Immunology* **122**, 253–277.
- Sun, T. & Storb, U. (2001), 'Insertion of Phosphoglycerine Kinase (PGK)-Neo 5 of J1 Dramatically Enhances VJ1 Rearrangement'.
- Tang, H. & Sharp, P. A. (1999), 'Transcriptional regulation of the murine 3' IgH enhancer by OCT-2', *Immunity* **11**(5), 517–526.
- Tantin, D., Tussie-Luna, M. I., Roy, A. L. & Sharp, P. A. (2004), 'Regulation of Immunoglobulin Promoter Activity by TFII-I Class Transcription Factors\*', *Journal of Biological Chemistry* **279**(7), 5460–5469.
- URL:** <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820748775>
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S. & Leader, P. (1982), 'Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(24), 7837–7841.
- Thompson, A., Timmers, E., Schuurman, R. K. & Hendriks, R. W. (1995), 'Immunoglobulin heavy chain germ-line JH-C mu transcription in human precursor B lymphocytes initiates in a unique region upstream of DQ52', *European Journal of Immunology* **25**(1), 257–261.
- Tsuneto, M., Kajikhina, E., Seiler, K., Reimer, A., Tornack, J., Bouquet, C., Simmons, S., Knoll, M., Wolf, I., Tokoyoda, K., Hauser, A., Hara, T., Tani-ichi, S., Ikuta, K., Grün, J. R., Grützkau, A., Engels, N., Wienands, J., Yanagisawa, Y., Ohnishi, K. & Melchers, F. (2014), 'Environments of B cell development', *Immunology Letters* **157**(1-2), 60–63.

- Tung, J. W. & Herzenberg, L. A. (2007), 'Unraveling B-1 progenitors', *Current Opinion in Immunology* **19**(2), 150–155.
- Vaidyanathan, B., Yen, W.-F., Pucella, J. N. & Chaudhuri, J. (2014), 'AIDing Chromatin and Transcription-Coupled Orchestration of Immunoglobulin Class-Switch Recombination', *Frontiers in Immunology* **5**, 120.  
**URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3975107/>
- Victora, G. D. & Nussenzweig, M. C. (2012), 'Germinal centers', *Annual Review of Immunology* **30**, 429–457.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M. & 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**(11), 1895–1898.
- Vita, M. & Henriksson, M. (2006), 'The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer', *Seminars in Cancer Biology* **16**(4), 318–330.
- Vlach, J., Hennecke, S., Alevizopoulos, K., Conti, D. & Amati, B. (1996), 'Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc', *The EMBO journal* **15**(23), 6595–6604.
- Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (1993), 'The multistep nature of cancer', *Trends in genetics : TIG* **9**(4), 138–141.
- Wabl, M. R. & Burrows, P. D. (1984), 'Expression of immunoglobulin heavy chain at a high level in the absence of a proposed immunoglobulin enhancer element in cis', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**(8), 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., Johnstone, R. W. & Hawkins, E. D. (2015), 'Manipulation of B-cell responses with histone deacetylase inhibitors', *Nature Communications* **6**(1), 6838. Bandiera\_abtest : a Cg\_type : Nature Research Journals Number : 1 Primary\_atype : Research Publisher : Nature Publishing Group Subject\_term : Autoimmune diseases ; B cells ; Drug therapy ; Immunological memory Subject\_term\_id : autoimmune-diseases ; b-cells ; drug-

- therapy ;immunological-memory.
- URL:** <https://www.nature.com/articles/ncomms7838>
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E. & Nussenzweig, M. C. (2003), 'Predominant autoantibody production by early human B cell precursors', *Science (New York, N.Y.)* **301**(5638), 1374–1377.
- Weill, J.-C., Weller, S. & Reynaud, C.-A. (2009), 'Human marginal zone B cells', *Annual Review of Immunology* **27**, 267–285.
- Welinder, E., Ahsberg, J. & Sigvardsson, M. (2011), 'B-lymphocyte commitment : identifying the point of no return', *Seminars in Immunology* **23**(5), 335–340.
- Wilson, A. & Trumpp, A. (2006), 'Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches.', *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 93–106.
- URL:** [https://www.researchgate.net/publication/311305470\\_MorphoLibJ-manual](https://www.researchgate.net/publication/311305470_MorphoLibJ-manual)
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E. J., Mai, T. & Casali, P. (2012), 'Immunoglobulin class-switch DNA recombination : induction, targeting and beyond', *Nature Reviews. Immunology* **12**(7), 517–531.
- Yamane, A., Resch, W., Kuo, N., Kuchen, S., Li, Z., Sun, H.-w., Robbiani, D. F., McBride, K., Nussenzweig, M. C. & Casellas, R. (2011), 'Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes', *Nature immunology* **12**(1), 62–69.
- URL:** <https://europepmc.org/articles/PMC3005028>
- Yancopoulos, G. D. & Alt, F. W. (1985), 'Developmentally controlled and tissue-specific expression of unarranged VH gene segments', *Cell* **40**(2), 271–281.
- URL:** <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0092867485901412>
- Yancopoulos, G. D. & Alt, F. W. (1986), 'Regulation of the Assembly and Expression of Variable-Region Genes'.
- Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsura, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D. W., Hofmann, C. S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R., Freedman, L. P. & Sonenshein, G. E. (2001), 'Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc', *Oncogene* **20**(14), 1688–1702.

- Zaller, D. M. & Eckhardt, L. A. (1985), 'Deletion of a B-cell-specific enhancer affects transfected, but not endogenous, immunoglobulin heavy-chain gene expression', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**(15), 5088–5092.
- Zhang, Q., Iida, R., Yokota, T. & Kincade, P. W. (2013), 'Early events in lymphopoiesis : an update', *Current Opinion in Hematology* **20**(4), 265–272.
- Zhang, Y., McCord, R. P., Ho, Y.-J., Lajoie, B. R., Hildebrand, D. G., Simon, A. C., Becker, M. S., Alt, F. W. & Dekker, J. (2012), 'Spatial organization of the mouse genome and its role in recurrent chromosomal translocations', *Cell* **148**(5), 908–921.
- Zhou, J., Ashouian, N., Delepine, M., Matsuda, F., Chevillard, C., Riblet, R., Schildkraut, C. L. & Birshtein, B. K. (2002), 'The origin of a developmentally regulated IgH replicon is located near the border of regulatory domains for IgH replication and expression', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(21), 13693–13698.  
**URL:** <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.212392399>
- Zilfou, J. T. & Lowe, S. W. (2009), 'Tumor suppressive functions of p53', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**(5), a001883.
- Zong, R. T., Das, C. & Tucker, P. W. (2000), 'Regulation of matrix attachment region-dependent, lymphocyte-restricted transcription through differential localization within promyelocytic leukemia nuclear bodies', *The EMBO journal* **19**(15), 4123–4133.
- Zouali, M. & Richard, Y. (2011), 'Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity', *Frontiers in Immunology* **2**, 63.

# Appendices



## Annexe A

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





## CORRESPONDENCE

# Class switch recombination junctions are not affected by the absence of the immunoglobulin heavy chain $E_{\mu}$ enhancer

Hussein Issaoui<sup>1</sup>, Nour Ghazzaui<sup>1</sup>, Mélissa Ferrad<sup>1</sup>, François Boyer<sup>1</sup> and Yves Denizot<sup>1</sup>

*Cellular & Molecular Immunology* (2019) 16:671–673; <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0229-x>

After encountering antigen, B-cells undergo class switch recombination (CSR) that substitutes the constant ( $C_{\mu}$ ) gene with  $C_{\gamma}$ ,  $C_{\epsilon}$ , or  $C_{\alpha}$ , thereby generating IgG, IgE, and IgA antibodies with new effector functions but the same antigenic specificity.<sup>1</sup> The DNA-editing enzyme activation-induced deaminase (AID) is required for CSR by targeting specific DNA switch (S) regions preceding the C region, except  $C_{\delta}$ .<sup>2</sup>  $S_{\mu}$  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).<sup>3</sup> 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  $E_{\mu}$  enhancer.<sup>1,4</sup> Looping allows transcriptional binding activators to enhancers to facilitate CSR. However, CSR is only modestly influenced by  $E_{\mu}$  deletion.<sup>5–7</sup> 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.<sup>8,9</sup> 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.<sup>10</sup> We recently reported a new computational tool (CSReport) for the automatic analysis of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing,<sup>11</sup> and used it to analyze the rare  $S_{\mu}$ - $S_{\delta}$  junctions during IgD CSR,<sup>12,13</sup>  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma,\alpha}$  junctions in wild-type (wt) mice<sup>14</sup> and UNG-deficient mice.<sup>15</sup> Even if  $E_{\mu}$ -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 CSReport and high-throughput sequencing to analyze the molecular signature of  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_3}$ ,  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_1}$ , and  $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  junctions in  $E_{\mu}$ -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<sup>er</sup> 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'Education Nationale, de l'Enseignement

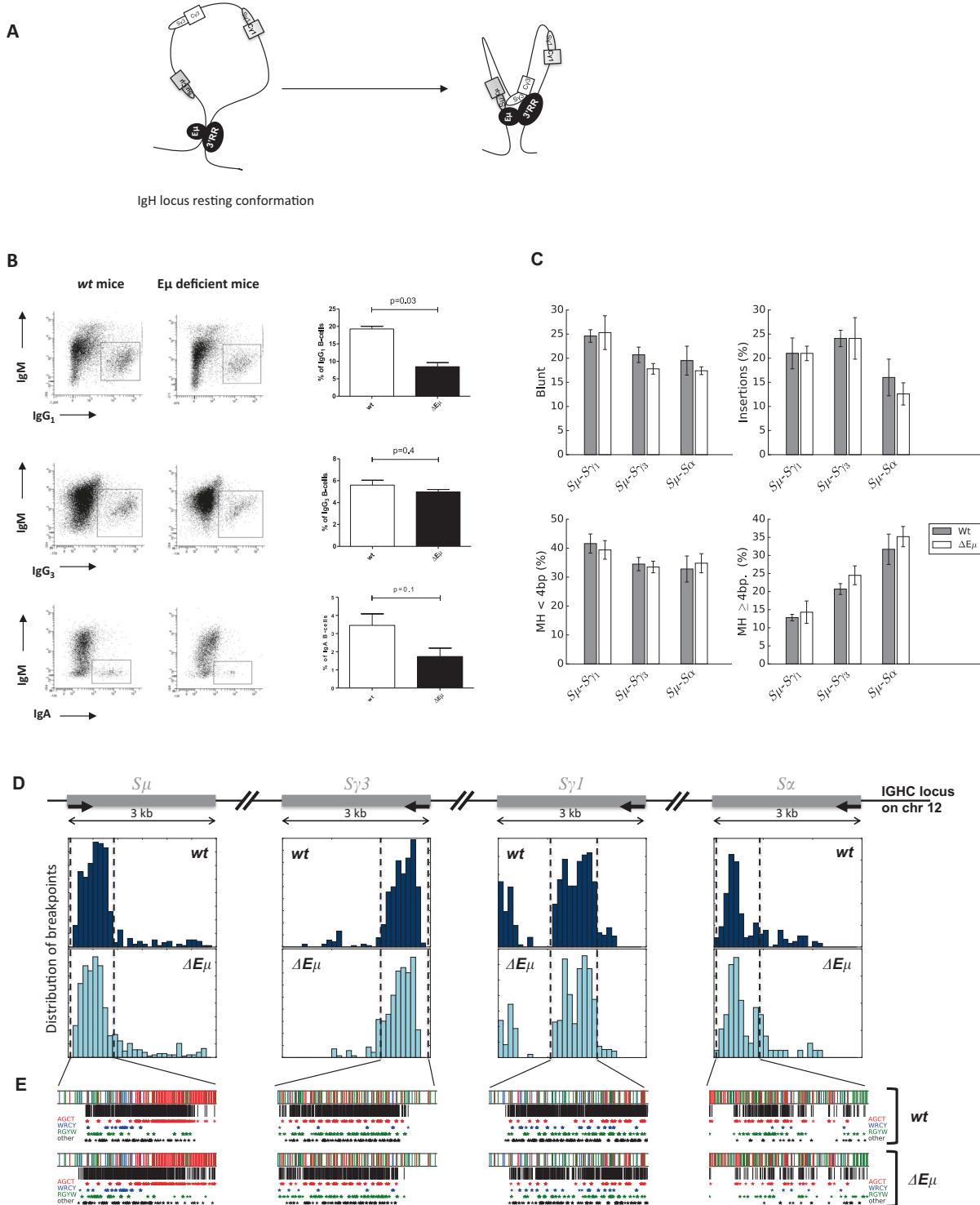
Supérieur et de la Recherche ».  $E_{\mu}$ -deficient and wt mice (housed in a conventional animal facility) were used. Single-cell suspensions of B-splenocytes were cultured for 4 days at  $1 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum and 5 µg/ml LPS, with (CSR toward IgG<sub>1</sub>) or without (CSR toward IgG<sub>3</sub>) the addition of 20 ng/ml IL-4 or 2 ng/ml TGFβ (PeproTech, Rocky Hill, NJ) (CSR toward IgA).<sup>14,16</sup> 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-IgG<sub>3</sub>-FITC (Becton Dickinson Biosciences), anti-IgG<sub>1</sub>-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  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_3}$ ,  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_1}$ , and  $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  junctions. As previously described in detail,<sup>11</sup> the junctions were PCR amplified. Libraries of 200 bp were prepared from the 1-2 kb PCR products of  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_3}$ ,  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_1}$ , and  $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  amplification for Ion Proton sequencing (“Génolim platform” of the Limoges University, France). The sequenced reads were then mapped to  $S_{\mu}$ ,  $S_{\gamma_1}$ ,  $S_{\gamma_3}$ , and  $S_{\alpha}$  regions using the BLAST algorithm. As previously reported,<sup>11</sup> the computational tool developed for experiments performs junction assembly, identifies breakpoints in  $S_{\mu}$ ,  $S_{\gamma_1}$ ,  $S_{\gamma_3}$ , and  $S_{\alpha}$ , identifies junction structure (blunt, microhomology, large homology or insertion junctions) and outputs a statistical summary of the identified junctions.

Confirming previous studies,<sup>5–7</sup> flow cytometry experiments indicated that compared to wt mice, the deletion of the  $E_{\mu}$  enhancer had only a minor impact on CSR toward IgG<sub>3</sub> (mean 5.0 vs 5.6%), IgG<sub>1</sub> (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  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_3}$  (IgG<sub>3</sub> CSR),  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_1}$  (IgG<sub>1</sub> CSR), and  $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  (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  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_3}$ , 8982  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_1}$ , and 617  $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$   $E_{\mu}$ -deficient junctions and 7209  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_3}$ , 14,700  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma_1}$ , and 2639  $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  wt junctions are reported in Fig. 1c. No significant difference (Mann-Whitney *U*-test) was found between  $E_{\mu}$ -deficient mice and wt mice. In addition to the type of junctions, the distribution of IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>1</sub>, and IgA junctions in terms of distance from the forward PCR primer in  $S_{\mu}$  and from one of the reverse primers in

<sup>1</sup>UMR 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 author contributed equally: Hussein Issaoui, Nour Ghazzaui

Received: 14 March 2019 Accepted: 16 March 2019  
Published online: 9 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** IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub>, and IgA CSR in  $E_\mu$ -deficient and *wt* mice. B-splenocytes were LPS-cultured for 4 days with (CSR toward IgG<sub>1</sub>) or without (CSR toward IgG<sub>3</sub>) the addition of IL-4 or TGF $\beta$  (CSR toward IgA). Cells gated on B220 $^+$  and/or CD138 $^+$  cells were investigated with anti-IgM, anti-IgG<sub>3</sub>, anti-IgG<sub>1</sub>, 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  $S_\alpha$  was similar in  $E_\mu$ -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,<sup>5–7</sup> the efficacy of CSR is, at most, modestly reduced by the deletion of the  $E_\mu$  enhancer. Until recently, the transcriptional enhancers located in the IgH 3'RR are the sole *cis*-regulatory elements reported to affect conventional CSR.<sup>2,3,17</sup> Compared with wt mice, the type and location of the CSR junctions in the absence of  $E_\mu$  are unaffected. This observation is highlighted with three different isotypes ( $\gamma 1$ ,  $\gamma 3$ , and  $\alpha$ ) by the analysis of a thousand independent junctions using our computational tool of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing. The  $E_\mu$  enhancer is dispensable to poise AID to S donor/acceptor regions and for the generation of double strand breaks.<sup>18</sup>  $E_\mu$  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  $E_\mu$  IgH intrachromosomal interactions have a real relevance? Are these interactions only mechanical due to the IgH location of  $E_\mu$  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).<sup>3,17</sup> 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. Wuerffel, R. et al. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* **27**, 711–722 (2007).
5. Marquet, M. et al. The  $E_\mu$  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  $E_\mu$  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  $\gamma$  and  $\alpha$  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.  $E_\mu$  and 3'RR IgH enhancers show hierarchic unilateral dependence in mature B-cells. *Sci. Rep.* **7**, 442 (2017).



## Annexe B

Molecular analysis of  $\gamma 1, \gamma 3$ , and  $\alpha$  class switch recombination junctions in APOBEC3-deficient mice using high-throughput sequencing





## CORRESPONDENCE

# Molecular analysis of $\gamma 1$ , $\gamma 3$ , and $\alpha$ class switch recombination junctions in APOBEC3-deficient mice using high-throughput sequencing

Hussein Issaoui<sup>1</sup>, Mélissa Ferrad<sup>1</sup>, Nour Ghazzaui<sup>1</sup>, Sandrine Lecardeur<sup>1</sup>, Jeanne Cook-Moreau<sup>1</sup>, François Boyer<sup>1</sup> and Yves Denizot<sup>1</sup>

*Cellular & Molecular Immunology* (2020) 17:418–420; <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0301-6>

Activation-induced deaminase (AID) is required for immunoglobulin (Ig) class switch recombination (CSR), in which the constant ( $C_{\mu}$ ) gene of IgM is substituted with  $C_{\gamma 1}$ ,  $C_{\gamma 3}$ , or  $C_{\alpha}$ , thereby generating IgG, IgE, and IgA antibodies, respectively, with new effector functions but the same antigenic specificity.<sup>1</sup> AID targets specific DNA switch (S) regions preceding C regions except for  $C_{\delta}$ .<sup>2</sup>  $S_{\mu}$  is usually the donor region, while  $S_{\gamma 1, \gamma 3, \alpha}$  are the acceptor regions. AID deaminates C into U on single-stranded DNA by targeting the WRCY (W = A/T, R = A/G, and Y = C/T) hot motif and, to a lesser extent, the SYC (S = G/C, Y = C/T) cold motif.<sup>3,4</sup> AID is a member of the apolipoprotein B editing complex (APOBEC) family. Among APOBEC genes, a family of evolutionarily conserved cytidine deaminases, APOBEC3 is implicated in diverse cell functions including innate immunity against retroviruses.<sup>4</sup> The DNA-editing APOBEC3 enzymes have recently attracted attention due to their involvement in cancer and potential applications in gene editing.<sup>5–7</sup> While a single copy of each APOBEC3 gene is present in rodents, seven copies of each APOBEC3 gene are found in humans. For example, APOBEC3A is expressed predominantly in monocytes, while high levels of APOBEC3G are found in B-cells. Both APOBEC3A and APOBEC3G expression is elevated in response to interferon- $\alpha$ .<sup>8</sup> CSR is mediated by only AID attack, but some studies have suggested the putative involvement of APOBEC in the cleavage of some  $S_{\delta}$  and  $S_{\alpha}$  DNAs.<sup>9,10</sup> Furthermore, B-cell agonists that stimulate CSR upregulated both AID and APOBEC3G.<sup>11</sup> APOBEC3G was also found to mutate  $V_H$  genes during viral infection.<sup>12,13</sup> APOBEC3 may contribute to a basal level of CSR, but its involvement was largely undetectable when a few dozen CSR junctions were reported after cloning and subsequent sequencing by the Sanger method. We recently reported a new computational tool (CSReport) for the automatic analysis of CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing.<sup>14</sup> The structural profiles (blunt, microhomology, large homology, or junctions with insertions) and locations of breakpoints within AID hotspots and other motifs can be analyzed for not just a few dozen but rather several hundreds or thousands of junctions. This computational tool has already been used to analyze the phenotypes of rare  $S_{\mu}$ - $S_{\delta}$  junctions during IgD CSR<sup>9,15</sup> and compare the structural profiles of  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 1}$ / $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 3}$ / $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  junctions in uracil DNA glycosylase-deficient mice,<sup>16</sup> IgH E $\mu$  enhancer-deficient mice,<sup>17</sup> and wild-type (wt) mice.<sup>18</sup> In this study, we used high-throughput sequencing to analyze the molecular signature of  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 1}$ / $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 3}$ / $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  junctions in mice expressing human

APOBEC3A or APOBEC3G in an APOBEC3 knockout background for the first time.

Mice were housed and procedures were conducted in agreement with European Directive 2010/63/EU on the use of animals for scientific purposes applied in France as the “Décret n°2012-118 du 1<sup>er</sup> 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’Education Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” and reviewed by the Ethics Committee of the University of Limoges (France). APOBEC3-deficient mice<sup>19</sup> expressing human APOBEC3A (hAPOBEC3A) or hAPOBEC3G<sup>20</sup> and C57BL6 wt mice (both types of mice were housed in a conventional animal facility) were used. B-splenocytes ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were cultured for 4 days in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum and 5  $\mu$ g/ml LPS with (for IgG<sub>1</sub> CSR) or without (for IgG<sub>3</sub> CSR) 20 ng/ml IL-4 or 5 ng/ml TGF $\beta$  (for IgA CSR) (PeproTech, Rocky Hill, NJ).<sup>21,22</sup> Splenocytes were stained with several labeled antibodies and analyzed on a Fortessa LSR2 (Beckman Coulter). B-cell splenocyte DNA was extracted, and  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 1}$ ,  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 3}$ , and  $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  junctions were quantified as previously reported.<sup>14</sup> Ion proton sequencing was performed in the “GénoLim platform” at the Limoges University (France). Sequenced reads were mapped to  $S_{\mu\gamma 1\gamma 3\alpha}$  regions using the BLAST algorithm. The computational tool developed for the experiments performed junction assembly, identified breakpoints in S regions, identified junction structures (blunt, microhomology, large homology, or junctions with insertions) and output a statistical summary of the identified junctions.

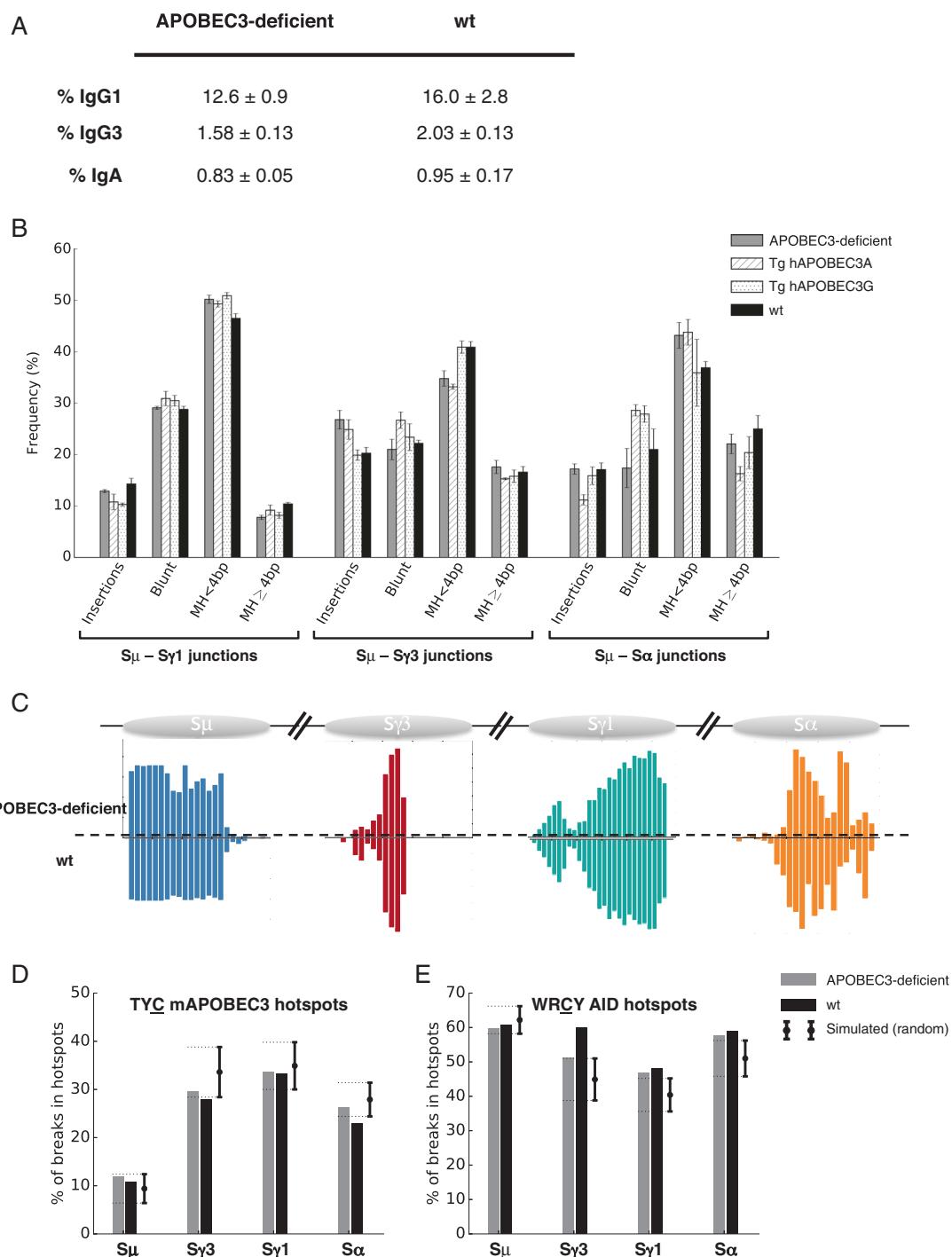
Flow cytometry experiments indicated that deletion of the APOBEC3 gene had no significant impact on *in vitro* CSR toward IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>1</sub>, and IgA compared with CSR in wt mice (Fig. 1a). Extracted stimulated B-cell DNA was then used to determine the molecular signatures of  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 3}$  (IgG<sub>3</sub> CSR),  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 1}$  (IgG<sub>1</sub> CSR) and  $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  (IgA CSR) junctions by high-throughput sequencing. The structural profiles (blunt, microhomology, large homology, or junctions with insertions) of 481  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 3}$ , 4092  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 1}$  and 225  $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  APOBEC3-deficient junctions and 1394  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 3}$ , 4163  $S_{\mu}$ - $S_{\gamma 1}$ , and 711  $S_{\mu}$ - $S_{\alpha}$  wt junctions are reported in Fig. 1b. No differences in IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>1</sub>, and IgA junctions were found between APOBEC3-deficient mice and wt mice. In addition to the types of junctions, the distributions of IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>1</sub>, and IgA junctions in terms of break positions along S regions were similar between APOBEC3-deficient and wt mice (Fig. 1c). Similar results were found for the locations

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

Correspondence: François Boyer (francois.boyer@unilim.fr) or Yves Denizot (yves.denizot@unilim.fr)

These authors contributed equally: Hussein Issaoui, Mélissa Ferrad, Nour Ghazzaui

Received: 6 September 2019 Accepted: 11 September 2019  
Published online: 8 October 2019



**Fig. 1** CSR in APOBEC3-deficient mice. **a** IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub>, and IgA CSR in APOBEC3-deficient and wt mice. B-splenocytes were cultured with LPS for 4 days with (IgG<sub>1</sub> CSR) or without (IgG<sub>3</sub> CSR) IL-4 or TGF $\beta$  (IgA CSR). Cells gated on B220 $^{+}$  and/or CD138 $^{+}$  cells were labeled with anti-IgM, anti-IgG<sub>3</sub>, anti-IgG<sub>1</sub>, and anti-IgA antibodies. The mean  $\pm$  SEM of 4 experiments is reported for each isotype. No significant differences were found (Mann–Whitney *U*-test). **b** Structural profiles of S<sub>μ</sub>–S<sub>γ3</sub>, S<sub>μ</sub>–S<sub>γ1</sub>, and S<sub>μ</sub>–S<sub>α</sub> junctions in APOBEC3-deficient, hAPOBEC3A, hAPOBEC3G, and wt mice. Junctions are classified as follows: junction with insertion, blunt junction, junction with microhomology (<4 bp) or large homology ( $\geq$ 4 bp). The results (mean  $\pm$  SEM) from two to seven mice for each isotype are pooled. No significant differences were found (chi-squared test) compared to wt mice. **c** Breakpoint locations in S<sub>μ</sub>–S<sub>γ1</sub>, S<sub>μ</sub>–S<sub>γ3</sub> and S<sub>μ</sub>–S<sub>α</sub> junctions in wt and APOBEC3-deficient mice (same junctions as in **b**). **d** Breakpoints in mouse APOBEC3 TYC hotspot motifs in S<sub>μ</sub>, S<sub>γ3</sub>, S<sub>γ1</sub>, and S<sub>α</sub> junctions (same junctions as in **b**). The theoretical levels of TYC breakpoints are highlighted. **e** Breakpoints in mouse AID WRCY hotspot motifs in S<sub>μ</sub>, S<sub>γ1</sub>, S<sub>γ3</sub>, and S<sub>α</sub> junctions (same junctions as in **b**). The theoretical levels of AID breakpoints are highlighted

of breakpoints within TYC APOBEC3 hotspot motifs<sup>23</sup> (displayed along specifically targeted segments within S regions) (Fig. 1d). The frequency of breakpoints found in  $S_{\gamma_3}$ ,  $S_{\gamma_1}$ , and  $S_\alpha$  was lower than the theoretical frequency for this motif in  $S_{\gamma_3}$ ,  $S_{\gamma_1}$ , and  $S_\alpha$  regions. In comparison, the frequency of breakpoints within WRCY AID hotspots was similar to the theoretical frequency of this motif in  $S_{\gamma_3}$ ,  $S_{\gamma_1}$ , and  $S_\alpha$  regions (Fig. 1e). Finally, the effects of hAPOBEC3A and hAPOBEC3G transgenes on murine CSR were explored. A total of 838  $S_\mu$ - $S_{\gamma_3}$ , 3154  $S_\mu$ - $S_{\gamma_1}$ , and 409  $S_\mu$ - $S_\alpha$  hAPOBEC3A junctions and 541  $S_\mu$ - $S_{\gamma_3}$ , 2910  $S_\mu$ - $S_{\gamma_1}$  and 168  $S_\mu$ - $S_\alpha$  hAPOBEC3G junctions are reported in Fig. 1b. No differences in IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>1</sub>, and IgA junctions were found between hAPOBEC3A or hAPOBEC3G mice and wt mice.

Recent studies have attracted attention to the involvement of APOBEC3 enzymes in cancer and gene editing.<sup>5–7</sup> We report in the present study that B-cell  $\gamma_1$ ,  $\gamma_3$ , and  $\alpha$  CSR was unaffected in mice following deletion of the APOBEC3 gene. Similar results were found in mice expressing hAPOBEC3A and hAPOBEC3G. Breaks in the TYC APOBEC3 hotspot motifs were not affected by APOBEC3 deficiency, suggesting AID-induced breaks (TYC is also a cold AID motif). Compared with wt mice, the types and locations of CSR junctions in the absence of APOBEC3 were no different. These results were highlighted by the analysis of thousands of independent junctions using our computational tool and CSR junctions sequenced by high-throughput sequencing. In conclusion, molecular analysis of CSR junctions demonstrated that APOBEC3 makes no obvious contribution to conventional (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>3</sub>, and IgA) CSR.

## ACKNOWLEDGEMENTS

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

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Y.D. designed the research and obtained grants and the agreement of the Ethics Committee. N.G., H.I., M.F., and S.L. performed the research. F.B., J.C.M., and Y.D. analyzed the data. N.G., H.I., M.F., J.C.M., 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., 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.* **211**, 975–985 (2014).
3. Pham, P., Afif, S. A., Shimoda, M., Maeda, K., Sakaguchi, N. & Pedersen, L. C. et al. Structural analysis of the activation-induced deoxycytidine deaminase required in immunoglobulin diversification. *DNA Repair.* **43**, 48–56 (2016).
4. Kohli, R. M., Maul, R. W., Gumiński, A. F., McClure, R. L., Gajula, K. S. & Saribasak, H. et al. Local sequence targeting in the AID/APOBEC family differentially impacts retroviral restriction and antibody diversification. *J. Biol. Chem.* **285**, 40956–40964 (2010).
5. Silvas, T. V. & Schiffer, C. A. APOBEC3s: DNA-editing human cytidine deaminases. *Protein Sci.* **28**, 1552–1566 (2019).
6. Buisson, R., Langenbucher, A., Bowen, D., Kwan, E. E., Benes, C. H. & Zou, L. et al. Passenger hotspot mutations in cancer driven by APOBEC3A and mesoscale genomic features. *Science* **364**, eaaw2872 (2019).
7. Petljak, M., Alexandrov, L. B., Brammell, J. S., Price, S., Wedge, D. C. & Grossmann, S. et al. Characterizing mutational signatures in human cancer cell lines reveals episodic APOBEC mutagenesis. *Cell* **176**, 1282–1294 (2019).
8. Koning, F. A., Newman, E. N., Kim, E. Y., Kunstman, K. J., Wolinsky, S. M. & Malim, M. H. Defining APOBEC3 expression patterns in human tissues and hematopoietic cell subsets. *J. Virol.* **83**, 9474–9485 (2009).
9. 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).
10. Arudchandran, A., Bernstein, R. M. & Max, E. E. Single-stranded DNA breaks adjacent to cytosines occur during Ig gene class switch recombination. *J. Immunol.* **173**, 3223–3229 (2004).
11. Seidl, T., Whittall, T., Babaahmady, K. & Lehner, T. B-cell agonists up-regulate AID and APOBEC3G deaminases, which induced IgA and IgG antibodies and anti-viral function. *Immunology* **135**, 207–215 (2011).
12. Guo, K., Halemano, K., Schmitt, K., Katuwal, M., Wang, Y. & Harper, M. S. et al. Immunoglobulin VH gene diversity and somatic hypermutation during SIV infection of rhesus macaques. *Immunogenetics* **67**, 355–370 (2015).
13. Halemano, K., Guo, K., Heilman, K. J., Barrett, B. S., Smith, D. S. & Hasenkrug, K. J. et al. Immunoglobulin somatic hypermutation by APOBEC3/Rfv3 during retroviral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 7759–7764 (2014).
14. Boyer, F., Boutouil, H., Dalloul, I., Dalloul, Z., Cook-Moreau, J. & Aldigier, J. C. 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).
15. 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).
16. 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).
17. Issaoui, H., Ghazzaui, N., Ferrad, M., Boyer, F. & Denizot, Y. Class switch recombination junctions are not affected by the absence of the immunoglobulin heavy chain  $E_\mu$  enhancer. *Cell Mol. Immunol.* **16**, 671–673 (2019).
18. Issaoui, H., Ghazzaui, N., Saintamand, A., Denizot, Y. & Boyer, F. High throughput sequencing reveals similar molecular signatures for class switch recombination junctions for the  $\gamma$  and  $\alpha$  isotypes. *Cell Mol. Immunol.* **16**, 90–92 (2019).
19. Okema, C. M., Lovsin, N., Peterlin, M. & Ross, S. R. APOBEC3 inhibits mouse mammary tumour virus replication in vivo. *Nature* **445**, 927–930 (2007).
20. Stavrou, S., Crawford, D., Blouch, K., Browne, E. P., Kohli, R. M. & Ross, S. R. Different modes of retrovirus restriction by human APOBEC3A and APOBEC3G in vivo. *Plos Pathog.* **10**, e1004145 (2014).
21. 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.* **6**, 7084 (2015).
22. Issaoui, H., Ghazzaui, N., Saintamand, A., Carrion, C., Oblet, C. & Denizot, Y. 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).
23. Chen, J. & MacCarthy, T. The preferred nucleotide contexts of the AID/APOBEC cytidine deaminases have differential effects when mutating retrotransposon and virus sequences compared to host genes. *PLOS Comput. Biol.* **13**, e1005471 (2017).

