



HAL
open science

Exploration des réarrangements atypiques $V_{\kappa 2}-V_{\kappa}$ dans des sous-populations B ex vivo et dans un modèle de différenciation B in vitro

Louison Collet

► **To cite this version:**

Louison Collet. Exploration des réarrangements atypiques $V_{\kappa 2}-V_{\kappa}$ dans des sous-populations B ex vivo et dans un modèle de différenciation B in vitro. Médecine humaine et pathologie. Université de Picardie Jules Verne, 2021. Français. NNT : 2021AMIE0045 . tel-03828851

HAL Id: tel-03828851

<https://theses.hal.science/tel-03828851v1>

Submitted on 25 Oct 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

Spécialité IMMUNOLOGIE

présentée à l'École Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

COLLET Louison

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

Exploration des réarrangements atypiques $V\kappa 2$ - $V\kappa$ dans des sous-populations B *ex vivo* et dans un modèle de différenciation B *in vitro*.

Soutenue le 15 avril 2021, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. ARNULF Bertrand, PU-PH, <i>Université Paris Diderot</i>	Rapporteur
M. AOUFOUCHI Saïd, CR INSERM, <i>Institut Gustave Roussy</i>	Rapporteur
M ^{me} THIEBLEMON Catherine, PU-PH, <i>Université Paris Diderot</i>	Examinatrice
M. MOREL Pierre, MCU-PH, <i>Université de Picardie Jules Vernes</i>	Examineur
M. MAROLLEAU Jean-Pierre, PU-PH, <i>Université de Picardie Jules Vernes</i>	Encadrant
M ^{me} GUBLER Brigitte, PU-PH, <i>Université de Picardie Jules Vernes</i>	Encadrante





Thèse de Doctorat

Spécialité IMMUNOLOGIE

présentée à l'École Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

COLLET Louison

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

Exploration des réarrangements atypiques $V\kappa 2$ - $V\kappa$ dans des sous-populations B *ex vivo* et dans un modèle de différenciation B *in vitro*.

Soutenue le 15 avril 2021, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

M. ARNULF Bertrand, PU-PH, <i>Université Paris Diderot</i>	Rapporteur
M. AOUFOUCHI Saïd, CR INSERM, <i>Institut Gustave Roussy</i>	Rapporteur
M ^{me} THIEBLEMON Catherine, PU-PH, <i>Université Paris Diderot</i>	Examinatrice
M. MOREL Pierre, MCU-PH, <i>Université de Picardie Jules Vernes</i>	Examineur
M. MAROLLEAU Jean-Pierre, PU-PH, <i>Université de Picardie Jules Vernes</i>	Encadrant
M ^{me} GUBLER Brigitte, PU-PH, <i>Université de Picardie Jules Vernes</i>	Encadrante



Remerciements

Remerciements :

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements à la **P^r Catherine Thieblemond** de l'Université Paris 7 IUH Saint Louis, au **P^r Bertrand Arnulf** de l'Université Paris 7 IUH Saint Louis, au **D^r Saïd Aoufouchi** chargé de recherche à l'institut Gustave Roussy de Paris et au **D^r Pierre Morel** maître de conférences à l'Université de Picardie Jules Vernes et praticien hospitalier pour m'avoir fait l'honneur d'examiner et de juger mon travail.

Je remercie le **P^r Jean-Pierre Marolleau**, directeur de ma thèse et anciennement de l'EA4666 LNPC, pour son soutien, sa confiance, sa bienveillance, sa bonne humeur et son encadrement durant mon doctorat. Je tiens également à remercier chaleureusement la **P^r Brigitte Gubler**, directrice de ma thèse, pour m'avoir permis de réaliser ce projet, pour sa patience, pour toute la confiance et l'aide et qu'elle m'a apportée durant cette thèse. Sans leur appui pour le financement de mes quatre années de thèse, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie également le **P^r Loïc Garçon**, directeur de l'unité EA4666 HematIm, qui a bien voulu m'accueillir au sein de son laboratoire et qui a toujours su être disponible et à l'écoute.

Je remercie très chaleureusement le **Dr Ouled-Haddou Hakim**, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Il a su trouver les bons mots dans les moments difficiles et me soutenir, tant sur le plan professionnel que personnel. Un immense merci également à mon ami et collègue **Nicolas Jankovsky** qui a toujours su prendre le temps de m'aider et de me remonter le moral lorsque le doute m'envahissait. J'adresse également un très grand merci à **Marie Naudot**, ma collègue et amie, toujours disponible pour écouter mes idées les plus pertinentes comme les plus farfelues. Merci à eux trois pour tous leurs précieux conseils qui me suivront durant toute ma carrière.

Je remercie aussi les membres passés et présents du laboratoire : **Hussein, Walaa, Julie, Magalie, Emilie, Marion, Cathy, Alexis, Stefán, Jessica, Aya, Benjamin, Pascal, Camille, Leslie, Julien, Alexandre, Yohann, Thomas, Laurent, Valérie, Jacques, Lydie, Chantal**, ainsi que tous les membres des autres équipes de recherches présentes au sein du CURS. Votre bonne humeur au quotidien m'a permis de travailler dans les meilleures conditions possibles.

Merci aux sages-femmes du service de maternité du CHU Amiens Picardie pour leur aide dans la récupération des prélèvements. Mes remerciements vont aussi au service de thérapie cellulaire, qui m'a procuré des échantillons précieux pour la réalisation de cette thèse.

Enfin, j'adresse ma plus grande reconnaissance à mes proches, qui m'ont épaulé tout au long de mon projet. J'aimerais commencer par remercier ma future femme **Cécile** pour sa patience légendaire, sa minutieuse relecture et le soutien infaillible dont elle a fait preuve au quotidien. Merci à mes parents d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir encouragé et soutenu durant l'intégralité de ma scolarité. Merci également à mon frère **David** et ma belle-sœur **Jane** pour leurs encouragements. Merci à **Odile, Pascal et Nicolas**, mes beaux-parents et mon beau-frère, pour leur bonne humeur et leur bienveillance à mon égard. Merci à mes amis **Cléomir, Elliott, Thomas, François et Aïda** pour l'énergie positive qu'ils ont su m'apporter.

Table des matières :

TABLE DES FIGURES	V
TABLE DES ANNEXES	IX
LISTE DES TABLEAUX	IX
ABRÉVIATIONS	X
PARTIE I : INTRODUCTION ET ETAT DE L'ART	1
I.1. ROLE ET CARACTERISTIQUES DES LYMPHOCYTES	3
I.1.a. <i>Histoire du lymphocyte B</i>	3
I.1.b. <i>Définition et structure des immunoglobulines</i>	3
I.1.c. <i>Mécanismes d'action des immunoglobulines : reconnaissance par le système immunitaire inné</i> 6	6
I.2. LA LYMPHOPOÏÈSE B CENTRALE	7
I.2.a. <i>Expression des clusters de différenciation au cours de la lymphopoïèse B</i>	10
I.2.b. <i>Cellules souches et niches hématopoïétiques</i>	12
I.2.b.i <i>Hématopoïèse fœtale et niches embryonnaires</i>	13
I.2.b.ii <i>La moelle osseuse : une niche hématopoïétique</i>	15
I.2.b.iii <i>Le cordon ombilical : une source de cellules souches</i>	20
I.2.c. <i>De la CSH au précurseur lymphoïde commun</i>	22
I.2.d. <i>Orientation vers la voie du lymphocyte B : le stade pré-pro-B</i>	23
I.2.e. <i>Du stade pro-B au stade pré-B</i>	24
I.2.f. <i>Du stade pré-B au lymphocyte B immature</i>	30
I.2.g. <i>Localisation spatiale et progression de la différenciation B</i>	35
I.3. LYMPHOCYTES B PERIPHERIQUES : REPONSES IMMUNITAIRES DIFFERENTIELLES EN AFFINITE ET DANS LE TEMPS 36	36
I.3.a. <i>Lymphocytes B2 ou conventionnels</i>	36
I.3.b. <i>Lymphocytes B1</i>	39
I.4. LE REARRANGEMENT SOMATIQUE DES GENES DES IMMUNOGLOBULINES	41
I.4.a. <i>La recombinaison conventionnelle V(D)J</i>	42
I.4.a.i <i>Organisation des loci IGH et IGL</i>	42
I.4.a.ii <i>Mécanismes moléculaires de la recombinaison V(D)J</i>	44
I.4.a.iii <i>Diversité du répertoire et modifications post-recombinaison</i>	51
I.4.b. <i>Édition, révision du répertoire et recombinaison non-conventionnelle</i>	62
I.4.b.i <i>Kappa deleting element et RSS intron</i>	62
I.4.b.ii <i>Le remplacement V_H et RSS cryptique</i>	65
I.4.b.iii <i>Recombinaison intra-V_κ : les RSS cryptiques du locus kappa ?</i>	67
I.4.c. <i>Régulation de l'accessibilité des loci à la recombinaison V(D)J</i>	68
I.4.c.i <i>Exclusion allélique</i>	70
I.4.c.ii <i>Les séquences régulatrices de l'accessibilité</i>	72

Table des matières

I.4.c.iii	Rôle de l'épigénétique	74
I.5.	LES MODELES DE DIFFERENCIATION B <i>IN VITRO</i>	76
I.5.a.	<i>Les modèles murins</i>	77
I.5.b.	<i>Les modèles humains</i>	78
I.6.	SYNTHESE : REGULATION ET CONTROLE DE LA LYMPHOPOÏESE B ET RECOMBINAISON SOMATIQUE	80
TRAVAUX ANTERIEURS DU LABORATOIRE:		82
PARTIE II : OBJECTIFS, RESULTATS ET DISCUSSION		84
II.1.	OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE.....	85
II.2.	MATERIELS ET METHODES	86
II.2.a.	<i>Cordon ombilical : origine et tri des cellules primaires</i>	86
II.2.a.i	Sang placentaire : isolement des cellules souches hématopoïétiques.....	86
II.2.a.ii	Récupération et culture des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton.....	86
II.2.b.	<i>Récupération et culture des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse</i>	87
II.2.c.	<i>Protocoles de différenciation cellulaire</i>	87
II.2.c.i	Différenciation adipocytaire in vitro.....	87
II.2.c.ii	Différenciation B in vitro.....	87
II.2.d.	<i>Viabilité, comptage cellulaire et cytométrie en flux</i>	88
II.2.d.i	Comptage cellulaire et viabilité cellulaire.....	88
II.2.d.ii	Marquage des anticorps fluorescents	88
II.2.e.	<i>Immunofluorescence</i>	90
II.2.f.	<i>Coloration May-Grünwald Giemsa</i>	90
II.2.g.	<i>Extraction d'ADN et d'ARN</i>	91
II.2.h.	<i>Fragmentation de l'ADN</i>	91
II.2.i.	<i>Quantification par PCR digitale</i>	92
II.2.j.	<i>Séquençage à haut débit</i>	92
II.2.k.	<i>Analyse in silico</i>	93
II.2.l.	<i>QRT-PCR</i>	93
II.2.m.	<i>End-point PCR, TOPOcloning et séquençage SANGER</i>	94
II.2.n.	<i>Statistiques</i>	95
II.3.	RESULTATS.....	96
II.3.a.	<i>Etude de l'avènement des réarrangements Vκ2-Vκ</i>	96
II.3.a.i	Enrichissement des sous-populations cellulaires	96
II.3.a.ii	Exploration et quantification des réarrangements V κ 2-V κ par dPCR.....	97
II.3.a.iii	Exploration et quantification des réarrangements V κ 2-V κ par séquençage à haut débit.....	100
II.3.a.iv	Analyse <i>in silico</i> d'un réarrangement atypique V κ 2-V κ	100
II.3.b.	<i>Etude des réarrangements Vκ-Vκ au sein d'un nouveau modèle d'étude de la différenciation B</i> <i>in vitro</i> 105	
II.3.b.i	Engagement de la différenciation B par l'IL-7 dans un modèle <i>in vitro stromal-free</i>	105
II.3.c.	<i>Développement d'un modèle de différenciation B en coculture</i>	109
II.3.c.i	Caractérisation des cellules de support	109
II.3.c.ii	Comparaison des trois modèles développés.....	111

Table des matières

II.3.d.	<i>Caractérisation cellulaire et moléculaire du modèle WJ-MSC</i>	117
II.3.d.i	Colocalisation du CD79a et de la chaîne μ au cours de la différenciation B <i>in vitro</i>	117
II.3.d.ii	Caractérisation des types cellulaires présents à J14 par MGG.....	117
II.3.d.iii	Expression des facteurs de transcription au cours de la différenciation.....	119
II.3.d.iv	Expression des facteurs de transcription partenaires de la recombinaison V(D)J.....	120
II.3.d.v	Analyse de réarrangements conventionnels kappa au cours de la différenciation B <i>in vitro</i>	123
II.3.d.vi	Exploration du répertoire atypique kappa au cours de la différenciation B <i>in vitro</i>	123
II.4.	DISCUSSION.....	126
II.4.a.	<i>Un nouveau modèle d'étude de la différenciation B</i>	126
II.4.a.i	Comparaison des modèles.....	126
II.4.a.ii	Un modèle très proche de la physiologie.....	127
II.4.a.iii	Une différence en termes de reproductibilité.....	128
II.4.a.iv	Les avantages du modèle WJ-MSC.....	129
II.4.a.v	Les limites du modèle WJ-MSC.....	130
II.4.b.	<i>Etude de l'avènement des réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ ex vivo et in vitro</i>	131
II.4.c.	<i>Apparition asynchrone des $V\kappa-V\kappa$: identification et rôle d'un nouvel enhancer ?</i>	133
II.4.d.	<i>Le rôle des réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$: différentes hypothèses.</i>	134
PARTIE III : CONCLUSION ET PERSPECTIVES		137
PARTIE IV : PROJET ANNEXE PROJET SIREF : EFFET DES ONDES ELECTROMAGNETIQUES DE 900MHZ SUR L'IMMUNITE DES RATS (ETUDE ANNEXE A LA THESE).		141
IV.1.	INTRODUCTION.....	145
IV.2.	MATERIAL AND METHODS.....	147
IV.2.a.	<i>Animals</i>	147
IV.2.b.	<i>RF-EMF exposure</i>	147
IV.2.c.	<i>Rat's exposition protocol, sacrifice and sample isolation</i>	147
IV.2.d.	<i>Microbiological studies</i>	148
IV.2.d.i	Culture methods.....	148
IV.2.d.ii	Bacterial Translocation.....	148
IV.2.e.	<i>Data acquisition and analysis</i>	149
IV.2.e.i	Blood.....	149
IV.2.e.ii	<i>Flow cytometry analysis</i>	149
IV.2.e.iii	<i>Serum analysis</i>	150
IV.2.e.iv	Statistical analysis.....	150
IV.3.	RESULTS.....	151
IV.3.a.	<i>Effect of RF-EMF on hematological parameters</i>	151
IV.3.b.	<i>RF-EMF induces changes of Lymphocytes B populations and products.</i>	151
IV.3.c.	<i>RF-EMF induces major modification of Lymphocytes T subpopulations</i>	151
IV.3.d.	<i>RF-EMF induces changes in intestinal microbiota composition/dysbiosis.</i>	152
IV.3.e.	<i>Enterococcus gut concentration correlates with immunological changes</i>	152
IV.4.	DISCUSSION.....	153

Table des matières

BIBLIOGRAPHIE	162
ANNEXES :	189
AUTRES COLLABORATIONS :	194

Table des figures

FIGURE 1 : ILLUSTRATION DE LA PLACE DES DEUX IMMUNITES : INNEE ET ADAPTATIVE (ABBAS AND LICHTMAN, 2010)	2
FIGURE 2 : REPRESENTATION MOLECULAIRE ET SCHEMATIQUE D'UNE IMMUNOGLOBULINE (ADAPTEE DE (LEFRANC AND LEFRANC, 2020)).....	4
FIGURE 3 : REPRESENTATION DES CHROMOSOMES 2 (A.), 22 (B.) ET 14 (C.) PORTANT RESPECTIVEMENT LES LOCI IGK, IGL ET IGH (LEFRANC AND LEFRANC, 2020)	5
FIGURE 4 : TABLEAU RECAPITULATIF DES CARACTERISTIQUES ET ROLES DES TYPES D' IMMUNOGLOBULINES (ADAPTE DE (LEFRANC AND LEFRANC, 2020))	6
FIGURE 5 : SCHEMATISATION DE LA LYMPHOPOÏESE B ET DES DIFFERENTS FACTEURS DE CROISSANCE NECESSAIRES A L'ENGAGEMENT DE LA LIGNEE B (ADAPTE DE (NAGASAWA, 2006)).....	8
FIGURE 6 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MARQUEURS DE SURFACE UTILISES POUR LA CARACTERISATION CELLULAIRE IN VITRO CHEZ L'HOMME. LES MARQUEURS EN GRAS SONT CONSIDERES COMME LES MARQUEURS MINIMAUX PAR L'AUTEUR. (KRAUS ET AL., 2014).....	10
FIGURE 7: REPRESENTATION DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS PHENOTYPIQUES PERMETTANT L'IDENTIFICATION DES STADES PRO-B ET PRE-B CHEZ L'HOMME. LES MARQUEURS EN GRAS SONT CONSIDERES COMME LES MARQUEURS MINIMAUX PAR L'AUTEUR (BENDALL ET AL., 2014).	11
FIGURE 8 : ILLUSTRATION DES DIFFERENTES ZONES HEMATOPOÏETIQUES CHEZ UN EMBRYON HUMAIN A 5 SEMAINES DE GESTATION (A.). LIEUX DES DIFFERENTES MIGRATIONS DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES AU COURS DE L'EMBRYOGENESE CHEZ LA SOURIS ET L'HOMME EN FONCTION DU TEMPS DE GESTATION (MIKKOLA AND ORKIN, 2006).....	13
FIGURE 9 : REPRESENTATION DE LA NICHE HEMATOPOÏETIQUE AU NIVEAU DU FOIE FËTAL AU COURS DE L'EMBRYOGENESE CHEZ LA SOURIS A E12.5 (GAO ET AL., 2018).....	15
FIGURE 10: SCHEMATISATION D'UN OS (A.) ET DE LA NICHE HEMATOPOÏETIQUE (B.) (MORRISON AND SCADDEN, 2014).....	16
FIGURE 11 : SCHEMATISATION DU RESEAU DES CELLULES ENDOTHELIALES ET PERIVASCULAIRES PERMETTANT L'ETABLISSEMENT D'UNE NICHE HEMATOPOÏETIQUE (SUGIYAMA ET AL., 2019).....	18
FIGURE 12 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE (A.) ET EN COUPE (B.) D'UN CORDON OMBILICAL (ADAPTEE DE (DING ET AL., 2015)).....	21
FIGURE 13 : SCHEMATISATION DE L'ALTERNANCE PROLIFERATION/DIFFERENCIATION AU COURS DE LA LYMPHOPOÏESE (A.) PROVOQUEE PAR LA DUALITE EXPRESSION/REPRESSION DES VOIES DE SIGNALISATION DU PRE-BCR ET DE L'IL-7	26
FIGURE 14 : RESEAU DE REGULATION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION PERMETTANT L'AVANCEMENT DANS LA VOIE DE DIFFERENCIATION B (ADAPTE DE (HAGMAN AND LUKIN, 2006; NUTT AND KEE, 2007)).	28
FIGURE 15 : REPRESENTATION DES DIFFERENTS SITES DE FIXATION POUR LES FACTEURS DE DIFFERENCIATION B PERMETTANT L'EXPRESSION DES GENES EBF-1 (A), PAX-5 (B), CD79A (C) ET LA SLC 15 (NUTT AND KEE, 2007)	30
FIGURE 16 : STRUCTURE D'UN PRE-BCR (MONROE, 2006).....	31

Table des figures

FIGURE 17 : REPRESENTATION DE L'OPPOSITION DES VOIES DE SIGNALISATION DU PRE-BCR ET DE L'IL-7R (CLARK ET AL., 2014)	34
FIGURE 18 : MOUVEMENT DES PROGENITEURS B A TRAVERS DES NICHES SUCCESSIVES DE MOELLE OSSEUSE (ZEHENTMEIER AND PEREIRA, 2019)	36
FIGURE 19 : SCHEMATISATION DE LA TOLERANCE CENTRALE ET PERIPHERIQUE (KIRK ET AL., 2010)	37
FIGURE 20 : SCHEMATISATION (BASSO AND DALLA-FAVERA, 2015) ET COUPE HISTOLOGIQUE (KLEIN ET AL., 2003) D'UN CENTRE GERMINATIF (DZ = DARK ZONE, LZ = LIGHT ZONE, MANTLE ZONE = ZONE DU MANTEAU, GERMINAL CENTER = CENTRE GERMINATIF)	38
FIGURE 21 : SCHEMATISATION DE LA DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES B2 (DÖRNER ET AL., 2009)	39
FIGURE 22 : THEORIE DE LA VOIE SPECIFIQUE DE DEVELOPPEMENT DES LYMPHOCYTES B1 (TRADUIT DE (MONTECINO-RODRIGUEZ AND DORSHKIND, 2012))	40
FIGURE 23 : REPRESENTATION DU LOCUS IGK HUMAIN (LEFRANC AND LEFRANC, 2020).	44
FIGURE 24 : ORGANISATION DES RSS AU SEIN DES LOCI IGH, IGK ET IGL (A) ET COMPOSITION DES RSS (B) (LITTLE ET AL., 2015)	45
FIGURE 25 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES DE RECOMBINAISONS (A), DE LA FORMATION DE LA STRUCTURE EN TETE D'EPINGLE (B) ET DE LA COUPURE EN EXTREMITES FRANCHES (C) (LITTLE ET AL., 2015).	48
FIGURE 26 : SCHEMATISATION DU ROLE DES HMGB AU COURS DE LA RECOMBINAISON (VAN GENT ET AL., 1997)	49
FIGURE 27 : SCHEMATISATION DES DEUX MECANISMES DE RECOMBINAISON PAR DELETION (A) ET INVERSION (B) (LITTLE ET AL., 2015)	50
FIGURE 28 : SCHEMATISATION DES REARRANGEMENTS V(D)J AU SEIN DES LOCI IGH (A.) ET IGK (B.) (LEFRANC AND LEFRANC, 2020)	51
FIGURE 29 : SCHEMATISATION DE L'ACQUISITION DE LA DIVERSITE DU REPERTOIRE B.	52
FIGURE 30 : SCHEMATISATION DE LA REPARATION DE L'ADN NHEJ (A) ET DE L'ACQUISITION DE LA N-DIVERSITE LORS DE LA RECOMBINAISON V(D)J	55
FIGURE 31 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE (A) ET DU MECANISME D'ACTION D'AID (LES ETOILES ROUGES REPRESENTENT LES SITES DE PHOSPHORYLATION) (CHOUDHARY ET AL., 2018)	58
FIGURE 32 : SCHEMATISATION DES HYPERMUTATIONS SOMATIQUES (CHANDRA ET AL., 2015; KEIM ET AL., 2013)	60
FIGURE 33 : SCHEMATISATION (A) ET MODELE D'ACCESSIBILITE DE LA CHROMATINE (B) LORS DE LA CMC (KINOSHITA AND HONJO, 2001; NICOLAS ET AL., 2018)	61
FIGURE 34 : SCHEMATISATION DES REARRANGEMENTS DELETES AU SEIN DU LOCUS IGK PERMETTANT LA SURVENUE DE REARRANGEMENTS VK-KDE (ADAPTEE DE (LANGERAK ET AL., 2004))	64
FIGURE 35 : REPRESENTATION DE LA RSS CRYPTIQUE AU NIVEAU DU GENE V_H4.34 (A) ET SCHEMATISATION DU MECANISME DE REMPLACEMENT V_H (B) (RAHMAN ET AL., 2006)	66
FIGURE 36 : SCHEMATISATION DES MOTIFS INTRA-Vk ET DES FRSS AU SEIN DU LOCUS IGK (SHINODA ET AL., 2019)	68

Table des figures

FIGURE 37: SCHEMATISATION D'UN NUCLEOSOME D'HISTONES ET D'UNE STRUCTURE SOLENOÏDE (A) ET DE LA LOCALISATION NUCLEAIRE DE L'HETEROCHROMATINE (B) (JANSSEN ET AL., 2018; REECE ET AL., 2012)	70
FIGURE 38 : SCHEMATISATION DE LA CONTRACTION (A) ET DE LA LOCALISATION NUCLEAIRE (B) DU LOCUS IGH LORS DES PHASES PRECOCES DE LA LYMPHOPOÏESE B (EBERT ET AL., 2015).	71
FIGURE 39 : SCHEMATISATION DE L'EXCLUSION ALLELIQUE (A) ET LOCALISATION NUCLEAIRE DU LOCUS IGK LORS DU DEVELOPPEMENT DE LA CELLULE B (B) (ADAPTE DE (JHUNJHUNWALA ET AL., 2009; LEFRANC AND LEFRANC, 2020)).	72
FIGURE 40 : SCHEMATISATION DE LA LOCALISATION DES SEQUENCES CER ET SIS AU NIVEAU DU LOCUS IGK MURIN (SHIH AND KRANGEL, 2013)	74
FIGURE 41 : CONDENSATION ET DECONDENSATION DE L'ADN PAR ACETYLATION ET METHYLATION DES HISTONES (GASPAR-MAIA ET AL., 2011).	75
FIGURE 42 : ROLE DE L'EPIGENETIQUE AU COURS DE LA LYMPHOPOÏESE B PRECOCE (CLARK ET AL., 2014; FISHER AND BASSING, 2015)	76
FIGURE 43 : ENRICHISSEMENT DES SOUS-POPULATIONS CELLULAIRES TRIEES DE SANG PLACENTAIRE PAR TECHNIQUE DE FACS ET MACS	96
FIGURE 44 : QUANTIFICATION DES REARRANGEMENTS Vκ2-Vκ AU SEIN DES SOUS-POPULATIONS TRIEES DE SANG PLACENTAIRE PAR DPCR	99
FIGURE 45 : ANALYSE DES REARRANGEMENTS Vκ2-Vκ PAR SEQUENÇAGE A HAUT DEBIT IONTORRENTS...	102
FIGURE 46 : ANALYSE DE LA DIVERSITE JONCTIONNELLE (N-DIVERSITE) AU NIVEAU DES REARRANGEMENTS Vκ2-Vκ.	103
FIGURE 47 : EXEMPLE D'ANALYSE IN SILICO DE LA STRUCTURE DES REARRANGEMENTS Vκ2-Vκ ET LEUR STRUCTURES TIGE-BOUCLE PRI-MIRNA.	104
FIGURE 48 : SUIVI DE LA PROLIFERATION ET DE LA VIABILITE CELLULAIRE AU SEIN D'UN MODELE DE DIFFERENCIATION B STROMAL-FREE EN PRESENCE OU D'ABSENCE D'IL-7/G-CSF	106
FIGURE 49 : EFFET DE L'IL-7 ET DU G-CSF SUR UN MODELE DE DIFFERENCIATION B IN VITRO STROMAL-FREE	108
FIGURE 50 : CARACTERISATION FONCTIONNELLE ET PHENOTYPIQUE DES MSC	110
FIGURE 51 : SUIVI DE LA PROLIFERATION ET DE LA VIABILITE CELLULAIRE AU SEIN DE TROIS MODELES DE DIFFERENCIATION B EN COCULTURE DE CELLULES STROMALES	111
FIGURE 52 : EXPRESSION DES MARQUEURS CD34, CD19 ET CD10 AU COURS DES MODELES DE DIFFERENCIATION B IN VITRO EN COCULTURE	113
FIGURE 53 : INDUCTION DE LA DIFFERENCIAITON B DANS 3 MODELE DE DIFFERENCIATION EN COCULTURE AVEC DES CELLULES STROMALES	114
FIGURE 54 : EXPRESSION DU PRE-BCR ET DU BCR MATURE DANS 3 MODELES DE DIFFERENCIATION B EN COCULTURE AVEC DES CELLULES STROMALES	116
FIGURE 55 : IMAGERIE ET COLORATION MGG DES CELLULES B EN DIFFERENCIAITON.	118
FIGURE 56 : CINETIQUE D'EXPRESSION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION AU COURS DU TEMPS DANS LE MODELE DE DIFFERENCIATION B EN COCULTURE AVEC DES WJ-MSC	121

Table des figures

FIGURE 57 : CINETIQUE D'EXPRESSION DES ACTEURS DE LA RECOMBIANISON AU COURS DU TEMPS DANS LE MODELE DE DIFFERENCIATION B EN COCULTURE AVEC DES WJ-MSC	122
FIGURE 58 : ETUDE DE REARRANGEMENTS CONVENTIONNELS VJ DES CHAINES LEGERES KAPPA AU COURS DE LA DIFFERENCIATION B	124
FIGURE 59 : ETUDE DE L'AVENEMENT DES REARRANGEMENTS ATYPIQUES Vk2-Vk DANS LE MODELE IN VITRO DE DIFFERENCIATION B	125
FIGURE 60 : COMPARAISON DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS MEMBRANAIRES ET DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION AU SEIN DE LA LYMPHOPOÏESE B DECRITE DANS LA LITTERATURE (A) (BENDALL ET AL., 2014; RAMIREZ ET AL., 2010)) ET AU SEIN DU MODELE DE DIFFERENCIATION B IN VITRO EN COCULTURE AVEC DES WJ-MSC (B)	128
FIGURE 61 : SCHEMATISATION DES MECANISMES D'APPARITION DES REARRANGEMENTS Vk2-Vk PHYSIOLOGIQUES (A) ET HYPOTHESE D'IDENTIFICATION D'UN ENHANCER (B)	136
FIGURE 62 : B LYMPHOCYTE SUBPOPULATION DISTRIBUTION IN CONTROL AND EXPOSED RATS IN PERIPHERAL BLOOD AND SPLEEN	157
FIGURE 63 : IMMUNOGLOBULIN REPARTITION IN CONTROL AND EXPOSED RAT'S BLOOD SERUM	158
FIGURE 64 : T LYMPHOCYTE SUBPOPULATION DISTRIBUTION IN CONTROL AND EXPOSED RAT'S IN PERIPHERAL BLOOD, SPLEEN AND THYMUS	159
FIGURE 65 : MICROBIOME POPULATION FOR GUT TISSUES SAMPLE IN CONTROL AND EXPOSED RATS	160
FIGURE 66 : RELATION BETWEEN ENTEROCOCCUS GUT CONCENTRATION AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN CONTROL AND EXPOSED RATS	161

Table des annexes

ANNEXE 1 : REPRESENTATION DES LOCI IGH (A.) ET IGL (B.) (LEFRANC AND LEFRANC, 2020).....	189
ANNEXE 2 : CONTROLE QUALITE DES EXPERIENCES DE dPCR COMPRENANT LA GENERATION DES GOUTTELETTES (A.), LE NOMBRE DE GOUTTELETTES GENEREES (B.) ET LE POURCENTAGE DE GOUTTELETTES INTACTES LORS DE L'ANALYSE (C.)	190
ANNEXE 3 : IMPACT DE LA FRAGMENTATION SUR L'EFFICACITE DE L'EMULSION EN dPCR (A) AINSI QUE LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE FRAGMENTATION DE L'ADN TESTE (B)	191
ANNEXE 4 : RECAPITULATIF DES AMORCES UTILISEES EN PCR EN EMULSION (A) ET EN NGS (C) AINSI QUE LES CONDITION D'AMPLIFICATIONS ASSOCIEES (B).....	192
ANNEXE 5 : RECAPITULATIF DES AMORCES UTILISEES EN QRT-PCR	193

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : COMBINAISON DES MARQUEURS DE SURFACE NECESSAIRES A LA CARACTERISATION DES CELLULES SOUCHES ENGAGEES DANS UNE VOIE DE DIFFERENCIATION (ADAPTE DE WILL AND STEIDL, 2010)	13
TABLEAU 2 : CONCENTRATION DES CYTOKINES LIBEREES PAR LES MSC-WJ EN CULTURE IN VITRO (FAN ET AL., 2009; KUCHROO ET AL., 2014; PARK ET AL., 2009; SHEN ET AL., 2015)	22
TABLEAU 3 : TABLEAU COMPARATIF DES REARRANGEMENTS DE L'ADN ENTRE LES COMMUTATIONS DE CLASSE, LES HYPERMUTATIONS SOMATIQUES ET LA RECOMBINAISON V(D)J (ADAPTE DE (KINOSHITA AND HONJO, 2001))	62
TABLEAU 4 : LISTE NON-EXHAUSTIVE DES PROTOCOLES DE DIFFERENCIATION B MURINS LES PLUS UTILISES DANS LA LITTERATURE. N.I = NON INDIQUE, P/S = PENICILLINE/STREPTOMYCINE (10U/ML).....	78
TABLEAU 5 : LISTE NON-EXHAUSTIVE DES PROTOCOLES DE DIFFERENCIATION B HUMAINE LES PLUS UTILISES DANS LA LITTERATURE. N.I = NON INDIQUE ; * = CELLULES SOUCHES PERIPHERIQUES RECUPEREES CHEZ UN PATIENT STIMULE AVEC DU G-CSF (GRANULOCYTE COLONY STIMULATING FACTOR) OU PLERIXAFOR.	80
TABLEAU 6 : FREQUENCE D'APPARITION DES REARRANGEMENTS Vk2-Vk PHYSIOLOGIQUES ET DANS DIFFERENTES HEMOPATHIES.....	83
TABLEAU 7 : PANELS D'ANTICORPS DE CYTOMETRIE UTILISES	89

Abréviations

7

7AAD - 7-aminoactinomycine D 90

A

Ac - anticorps..... 3
 Ag - Antigène 2
 AGM - Aorta-Gonad-Mesonephros 14
 AID - activation-induced deaminase..... 55
 APOBEC - apolipoprotein B mRNA-editing cytidine
 deaminase 56

B

BACH2 - BTB Domain And CNC Homolog 2 39
 Bcl-2 - B-cell lymphoma 2 26
 B-CLL - B chronic lymphoid leukemia 41
 BCR - B cell receptor 37
 BER - base excision repair..... 58
 Blimp1 - B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1 39
 BLNK - B cell linker protein 32
 BLP - B-cell-biased lymphoid progenitors..... 24
 bRSS - Bona fide RSS..... 67
 BTK - Bruton tyrosine kinase 32

C

CAR - CXCL-12 abundant reticular 18
 CD - Cluster de différenciation 9
 CDK - cyclin dependant kinase 25
 CDR - Complementary Determining Region 4
 c-het - hétérochromatine constitutive 69
 CJ - coding joint 48
 CLP - Common lymphoid progenitor 8
 CMC, CSR - classe switch recombinaison..... 55
 c-Myc - cellular Myelocytomatosis..... 38
 CSH - cellules souches hématopoïétiques 7

CSM - cellule souches/stromale mésenchymateuse 7
 CSM-PaS - cellules souches mesenchymateuse
 PDGFR α posSCA-1pos 18
 CXCL-12 - C-X-C motif chemokine 12 8
 CXCR4 - CXC-chimiokine 4 19

D

DNA-PK_{CS} - DNA-dependent protein kinase catalytic
 subunit..... 53
 DNMT - DNA méthyltransférase 74
 DSB - double-strain break 46
 DZ - Dark zone 38

E

E2A - helix-loop-helix proteins E12 et E47 27
 EBF-1 - Early B Cell Factor 1 24
 eEF1- α - translation elongation factor 56
 ETP - T cell lineage progenitor..... 23
 Ek3'- IGK 3' enhancer 33
 Eki - IGK intronic enhancer..... 33

F

Fab - Fraction antigen-binding 3
 Fc - Fraction cristallisable 3
 FGF-2 - Fibroblast Growth Factor-2 22
 FITC - isothiocyanate de fluorescéine 86
 Flt-3L - Fms-like tyrosine kinase 3 ligand 8
 FO - zone folliculaire 36
 FOXO-1 - forkhead box protein O-1 26
 FR - Framework..... 4
 fRSS - Flipped RSS..... 67
 FT - facteurs de transcription 38

Abréviations

G

GC - centre germinatif	25
G-CSF - granulocyte colony stimulating factor	80
GLUT1 - glucose transporter 1.....	32

H

HDM - histone déméthylase.....	75
HLA-DR - Human Leukocyte Antigen – DR isotype	20
HMGB - high mobility group box prot	46
HMS - Somatic Hypermutation.....	37
HMT - histone méthyltransférase.....	75
HSP - Heat shock protéin.....	56

I

ID3 - inhibiteur de liaison à l'ADN 3.....	33
Ig - Immunoglobuline	3
i-het - hétérochromatine facultative.....	69
<i>Ikzf1 - Ikaros zinc finger family 1</i>	<i>23</i>
<i>Ikzf3 - Ikaros zinc finger family 3</i>	<i>32</i>
IL-7R - l'Interleukin-7 receptor	23
<i>ILC - Innate lymphoïde cells</i>	<i>8</i>
IRF - Interferon regulatory factor	33

J

JAK - Janus kinase	25
--------------------------	----

K

Kde - kappa deleting element	62
KO - Knock-out	16

L

LAL-B - Leucémie aigüe lymphoblastique B.....	63
LB - Lymphocyte B	3
LCA - Leukocyte Common Antigen	9

LCK - Light chain Kappa	111
LINES - long interspersed nuclear éléments.....	69
LMPP - lymphoïd-primed multipotent progenitor	22
LT - Lymphocyte T	3
LT-CSH - Long term HSC = CSH à longue durée de vie...	12
<i>LZ - light zone</i>	<i>38</i>

M

<i>MACS - Magnetic Activated Cell Sorting</i>	<i>12</i>
MAPK - mitogen-activated protein kinase	15
MCAM - Melanoma Cell Adhesion Molecule	18
MCL 1 - myeloid-cell leukaemia sequence 1	26
MGG - May-Grünwald Giemsa	90
miRNA-17 - micro RNA 17	32
MMR - mismatch repair	59
MPP - Multipotent progenitor	22
Msh - MutS homolog	59
mTORC2 - mammalian target of rapamycin complex 2	31
MZ - zone marginale	36

N

NEMO - Nf-κB essential modulator	56
NES - Nuclear export signal	57
Nf-κB - Nuclear Factor κ B	56
NHEJ - Non-homologous End Joinin	48
NK - "Natural Killer"	2
NLS - Nuclear localization signal.....	56

P

Pax-5 - Paired box protein 5.....	39
PC - paired complexe	47
PC - phosphorylcholine	40
PDGFRα - platelet-derived growth factor receptor A ...	18
PK1 - pyruvate déshydrogénase kinase 1	31
PE - phycoérythrine.....	86
PI3K - phosphoinositide 3-kinase.....	15
PLCγ2 - phospholipase Cy2	32
PTEN - Phosphatase and TENSin homolog	32

Abréviations

PTPRC - Tyrosine Phosphatase Récepteur C 9

R

RAG - Recombinaison activating gene 24

RANKL - receptor activator of nuclear factor kappa-B
ligand 8

RPA - Replication protein A 57

RSS - Recombinaison sequence signal 44

S

SC - signal complexe 46

SCF - Stem Cell Factor 8

SLC - surrogate light chain 30

STAT5 - Signal transducer and activator of transcription 5
..... 25

ST-CSH - Short term HSC = CSH à court durée de vie 12

T

TdT - terminal desoxytransferase 25

TET - ten-eleven translocation 74

Traf - TNF α receptor-associated factors 56

TSLP - thymic stromal lymphopoietin 25

U

UNG - uracil-N-glycosylase 58

V

VCAM-1 - Vascular cell adhesion molecule-1 22

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor 22

W

WJ - Wharton Jelly = gelée de Wharton 21

X

XLF - XCCR4 like factor ou Cernunn 53

Partie I : Introduction et état
de l'art

Un organisme multicellulaire est soumis à de très nombreux stress venant de son environnement au cours de sa vie. Ces stress vont, en règle générale, déclencher différents processus de défense permettant la préservation de l'intégrité de l'organisme. Ces processus sont sous la gouvernance du système immunitaire. La fonction de ce dernier se reflète jusqu'à son étymologie. En effet, l'adjectif « immunitaire » vient de « immunisé », lui-même dérivé du latin *immunis* qui signifie « exempt ». Le rôle de ce système est de garder l'organisme exempt de tout pathogène déséquilibrant l'homéostasie interne et pouvant provoquer sa mort.

Chez l'Homme, comme chez l'ensemble des mammifères, ce système de défense repose sur la reconnaissance et la destruction des pathogènes exogènes. Cette reconnaissance est faite grâce aux différents antigènes (Ag) exprimés à la surface du pathogène permettant de déclencher une réponse immunitaire. Cette réponse peut être de deux types : **innée** ou **adaptative**.

La différence entre ces deux réponses est la rapidité de mise en place, la nature des cellules et des protéines solubles impliquées et la spécificité à lutter contre le pathogène (**Figure 1**). La réponse immunitaire innée se déclenche à l'entrée du pathogène dans l'organisme. Elle est rapide et active de nombreux effecteurs non spécifiques au pathogène (système du complément, cellules *Natural Killer*, macrophage...) permettant le plus souvent le contrôle de la primo-infection.

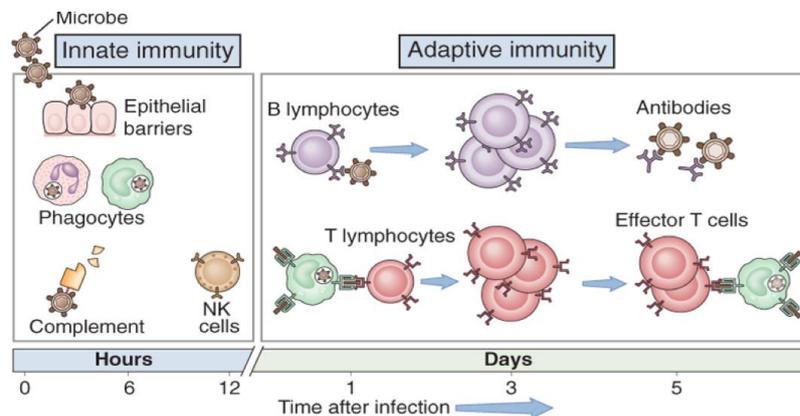


Figure 1 : Illustration de la place des deux immunités : innée et adaptative (Abbas and Lichtman, 2010)

Les effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire innée sont à l'origine du déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. Cette dernière est ainsi activée de façon retardée lors de la primo-infection (environ 6 à 12 heures) et permet le recrutement d'acteurs spécifiques des Ag du pathogène, assurant alors la mise en place d'une défense spécifique pour combattre

l'infection initiale, et réactivable lors d'infections ultérieures par le même pathogène. Les acteurs principaux de cette réponse sont les lymphocytes B et T (respectivement LB et LT).

I.1. Rôle et caractéristiques des lymphocytes

I.1.a. Histoire du lymphocyte B

La découverte du LB est relativement récente dans notre histoire. C'est en 1968 que Jacques Miller et Graham Mitchell ont mis au jour l'existence de deux types de lymphocytes (Mitchell and Miller, 1968). Leurs expériences consistaient à réaliser une ablation du thymus chez des rats, en injectant des cellules thymiques en complément (0, 10 ou 50 millions de cellules) puis à observer une réponse immunitaire après une injection d'érythrocyte de mouton. En absence de thymus et de supplémentation en thymocytes, aucune réponse immunitaire n'a été observée. Miller et Mitchell ont donc pu mettre en évidence deux types de cellules permettant l'immunité chez le rat qu'ils ont appelé les « *Thymus independant antibody-forming cells precursor* » et les « *Thymus derived antigen-reactive cells* ».

Un an plus tard, Ivan Roitt met en relation les découvertes de Miller et Mitchell et celles de Warner et al. Ces derniers reprennent les travaux de Hieronymus Fabricius émis en 1621 (Aquapendente, 1621) et démontrent une diminution de production d'anticorps (Ac) chez les oiseaux dépourvus d'un organe appelé bourse de Fabricius. Warner émettait l'hypothèse que la cellule permettant la production de ces Ac était située dans cette bourse de Fabricius (Ribatti et al., 2006; Warner et al., 1962). Ainsi, Ivan Roitt renomme les cellules « *Thymus dependant antibody-forming cells precursor* » en « *B lymphocyte* » le B signifiant « *Bursa equivalent* » (Roitt et al., 1969) facilitant ainsi son appellation.

I.1.b. Définition et structure des immunoglobulines

Les Ac ou immunoglobulines (Ig), produits par les LB, jouent un rôle capital dans la réponse immunitaire. Ils sont à la base de la majorité des stratégies d'évaluation de la vaccination et permettent une réponse rapide et spécifique lors de la rencontre avec un pathogène. Les Ig peuvent être soit fixées à la membrane d'un LB, soit libres et solubles dans le sang et dans les milieux extravasculaires. En 1959, Porter a réalisé un découpage enzymatique par la papaïne d'une Ig de type γ de souris (Porter, 1959). Il a pu identifier deux fractions précipitables : la fraction cristallisable (Fc) et la fraction « *antigen-binding* » (Fab, **Figure 2**).

Une définition plus contemporaine définit un Ac comme une molécule en forme de « Y », composée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères identiques reliées entre elles par

Partie I : Introduction et état de l'art

de nombreux ponts disulfures (Girardi et al. 2009; IMGT Education). Ces chaînes lourdes et légères possèdent une région constante (région C) à l'extrémité C-terminale et une région variable (région V) à l'extrémité N-terminale. Au niveau de la fraction Fab, on retrouve l'association des deux régions variables des chaînes lourdes et légères. Cette association forme le site de fixation de l'épitope de l'Ag, également appelé paratope. Chaque région V peut être également subdivisée en régions courtes hypervariables appelées « *Complementary Determining Region* » (CDR) et entrecoupées par des zones charnières appelées « *Framework* » (FR).

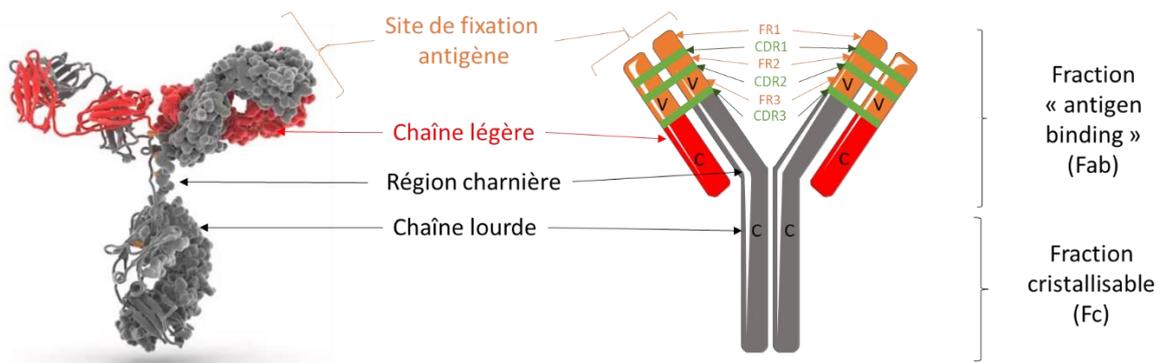


Figure 2 : Représentation moléculaire et schématique d'une immunoglobuline (adaptée de (Lefranc and Lefranc, 2020))

Ces chaînes protéiques sont codées par différents loci recombinés dans un LB mature. Concernant les chaînes légères, il en existe deux types codés par deux loci distincts : les chaînes légères kappa (κ) et les chaînes légères lambda (λ). Le locus IGK est situé sur dans la région 11.2 du bras court du chromosome 2 (2p11.2, **Figure 3A**) et le locus IGL est situé sur la bande 11.2 du bras long du chromosome 22 (22q11.2, **Figure 3B**).

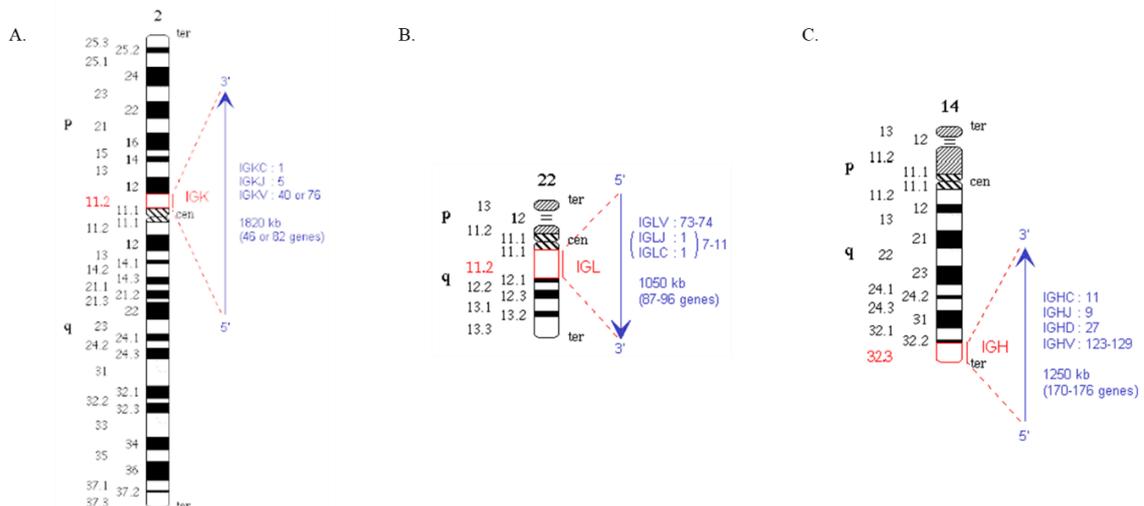


Figure 3 : Représentation des chromosomes 2 (A.), 22 (B.) et 14 (C.) portant respectivement les loci IGK, IGL et IGH (Lefranc and Lefranc, 2020)

Comme pour les chaînes légères, il existe plusieurs types de chaînes lourdes. Cependant, celles-ci ne sont codées que par un unique locus (IgH) situé au niveau de la région 14q32.33 bras long du chromosome 14 (14q32.33, **Figure 3C**). Il existe cinq grands types ou classes de chaînes lourdes définissant la nature de l'Ac : les chaînes μ (IgM), α (IgA), δ (IgD), γ (IgG), ϵ (IgE). Chaque classe d'Ig a une fréquence, un lieu d'action et un rôle au sein du système immunitaire différents. En fonction de leur classe, les Ig peuvent s'organiser sous forme de monomère (IgG, IgE, IgD et IgA), de dimère (IgA) ou de pentamère (IgM). Les Ig majoritaires sont celles de la famille des IgG (possédant une chaîne lourde γ). Ils représentent 70% du total des Ig dans le plasma humain.

Concernant les IgM, la polymérisation du pentamère d'IgM est assurée par un peptide supplémentaire appelé **chaîne J** (peptide d'environ 137 acides aminés riches en cystéine). Les IgM représentent 10% des Ig plasmatiques.

Les IgA s'organisent soit en dimère, soit en monomère en fonction du type de leur chaîne légère (dimère : κ , monomère : λ). Les IgA dimériques sont essentiellement retrouvées dans les larmes, la salive ou le mucus.

Les IgE (chaîne lourde ϵ) et IgD (chaîne lourde δ) sont très peu représentées dans le plasma humain.

En plus de ces cinq classes, certaines classes d'Ig sont également subdivisées en différentes sous-classes. C'est le cas des IgA et des IgG. On distingue donc les chaînes lourdes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ formant la sous-famille des Ig de classe IgA1 et IgA2. Pour la famille des chaînes lourdes gamma (γ), on retrouve les sous-types $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ et $\gamma 4$ formant les sous-familles des Ig de classes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

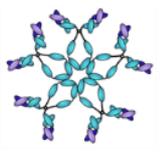
	IgG monomère	IgM pentamère	IgA dimère	IgA monomère	IgD monomère	IgE monomère
Structure						
Nombre de site de fixation antigénique	2	10	4	2	2	2
Poids moléculaire (kDA)	150 kDA	900 kDA	320 kDA	160 kDA	180 kDA	200 kDA
Fréquence dans la plasma humain	70%	10%	3%	16%	1%	<0,1%
Type chaîne lourde	γ	μ	α	α	δ	ϵ
Type chaîne légère	κ ou λ	κ ou λ	κ	λ	κ ou λ	κ ou λ
Fonction	Neutralisation et agglutination, activation du complément	Neutralisation et agglutination, activation du complément. Le monomère est liée à la membrane des lymphocytes B (BCR)	Très présent dans les larmes, la salive et le mucus. Prévient l'entrée des pathogènes dans l'organismes	Permet de déclencher la réponse inflammatoire	IgD est majoritairement membranaire. Présent a la surface des lymphocytes B à la sortie de la moelle osseuse	Intervient majoritairement dans la réponse du CMH de type I et des réaction allergique.

Figure 4 : Tableau récapitulatif des caractéristiques et rôles des types d' immunoglobulines (adapté de (Lefranc and Lefranc, 2020))

I.1.c. Mécanismes d'action des immunoglobulines : reconnaissance par le système immunitaire inné

Les Ig sont majoritairement libres et présentes dans le plasma sanguin d'un individu. Lors de la rencontre avec un pathogène, le paratope d'une Ig permet la reconnaissance de l'épitope d'une structure moléculaire, d'une cellule ou d'un organisme exogène. Cette spécificité de fixation est basée sur la propriété du système immunitaire à distinguer le « soi » du « non-soi ». La formation d'un complexe immun ou complexe Ag-Ac assure le recrutement des acteurs solubles (exemple : complément) et cellulaires (exemple : cellules phagocytaires) de la réponse immunitaire permettant l'inactivation et la destruction de l'organisme exogène (exemple : bactérie, virus circulant...) ou de cellules infectées (exemple : cellules infectées par un virus).

Ainsi, les Ig ne détruisent pas directement les organismes ou molécules exogènes auxquels elles sont associées. Elles ont deux rôles. L'un est d'opposer un obstacle physique et de favoriser la destruction des pathogènes par l'intervention de différents acteurs du système

immunitaire. L'autre est d'assurer la neutralisation pour empêcher, par exemple, l'infection d'une cellule par un virus ou d'inhiber l'action de toxines bactériennes.

Par leur capacité à se fixer à des structures exogènes, les Ig sont considérées comme des opsonines. Les opsonines sont des protéines solubles dans le sang permettant de favoriser la dégradation des pathogènes par l'activation des acteurs de l'immunité innée. En effet la reconnaissance de la partie constante des Ig par des récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules phagocytaires va ainsi favoriser la phagocytose des éléments pathogènes.

De plus, l'activité d'opsonine des Ig se caractérise par l'activation du système du complément. Le système du complément est un ensemble de facteurs humoraux (protéines solubles libres) produits par les hépatocytes, les macrocytes et les monocytes, qui sont présents sous forme inactive dans le plasma sanguin. L'activation du système du complément est réalisée par une protéolyse de ces protéines circulantes. À la suite d'une activation en cascade, les protéines acquerront une activité biologique ou enzymatique permettant la destruction du pathogène.

Certains facteurs produits au cours de la cascade d'activation du complément vont également avoir des effets chimiotactiques et activateurs des acteurs de l'immunité innée. Les protéines C3a et C5a recrutent par chimiotactisme les polynucléaires neutrophiles (cellules phagocytaires) et les protéines C3b et C5b sont des **opsonines** qui vont permettre, en se déposant à la surface du pathogène, d'amplifier sa capacité à être phagocyté (Aderem and Underhill, 1999).

I.2. La lymphopoïèse B centrale

Les LB sont des cellules lymphoïdes issues de cellules souches hématopoïétiques (CSH) présentes dans la zone trabéculaire des os longs, au niveau de l'endoste, au sein d'une zone très vascularisée appelée la niche hématopoïétique. Cette niche est composée de cellules ostéoblastiques, endothéliales et de CSM (cellules souches/stromales mésenchymateuses) qui permettent l'organisation de la niche et le renouvellement permanent des CSH à long terme.

Les cellules hématopoïétiques sont généralement séparées en deux lignées : lymphoïdes et myéloïdes. Ces deux lignées sont composées de plusieurs sous-populations cellulaires possédant différentes fonctions et distributions au sein de l'organisme. Les LB sont le sous-ensemble de lymphocytes le plus abondant produit dans la moelle osseuse (20%), suivis des

cellules NK (5%) et certains sous-ensembles de cellules lymphoïdes innées (*Innate lymphoïde cells* : *ILC* < 1%).

Les précurseurs B ont été identifiés en 1991, dans la moelle osseuse de souris, par l'expression du marqueur B220 (CD45R). Aujourd'hui, les stades sont bien mieux définis et permettent un suivi très précis de la différenciation de la cellule souche vers un LB mature. Les cellules de la lignée lymphoïde se développent à partir d'un progéniteur lymphoïde commun (CLP = *Common lymphoid progenitor*) qui a perdu partiellement la capacité de se différencier en cellules myéloïdes mais qui conserve la capacité à se différencier en plusieurs types de lymphocytes. Le CLP se différencie par la suite en lymphocyte pré-pro-B, pro-B, pré-B puis à un stade appelé LB immature exprimant une IgM membranaire. L'engagement dans la lignée B commence à partir du stade pré-pro-B et devient irréversible à partir du stade pro-B (Nagasawa, 2006) (**Figure 5**).

La diversité des cellules hématopoïétiques est régie par des facteurs et des signaux de croissance présents dans l'espace extracellulaire et à la surface des CSM. Concernant la différenciation B, et plus généralement la lignée lymphoïde, l'engagement de la CSH vers la lignée B dépend en grande partie de l'IL-7 (*Interleukin-7*), de CXCL-12 (*C-X-C motif chemokine 12*), du SCF (*Stem Cell factor*), de Flt-3L (*Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*) et de RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) (**Figure 5**).

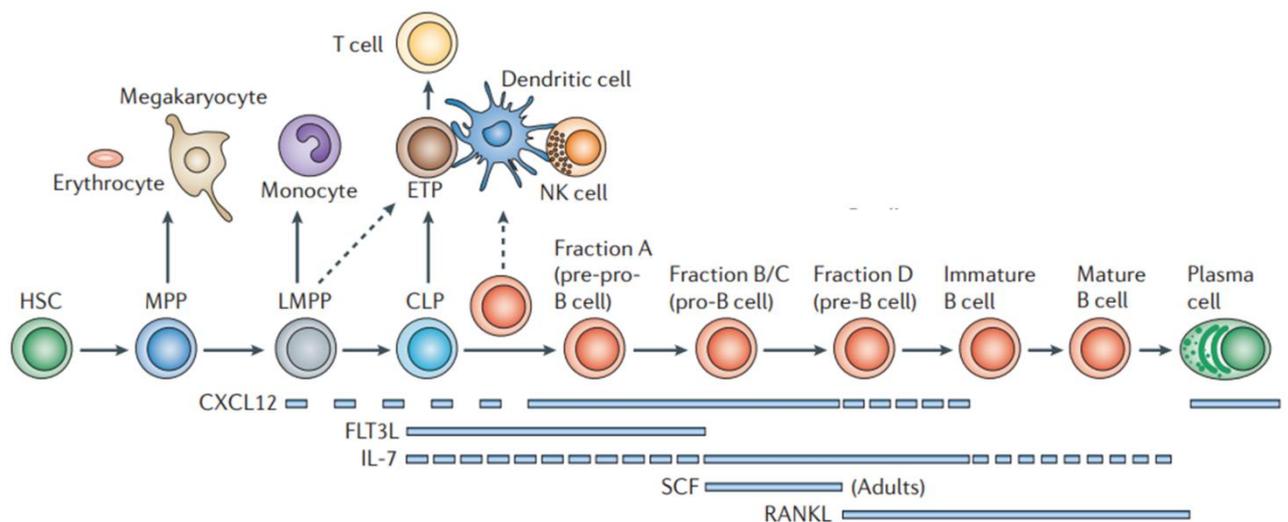


Figure 5 : Schématisation de la lymphopoïèse B et des différents facteurs de croissance nécessaires à l'engagement de la lignée B (adapté de (Nagasawa, 2006))

La majeure partie des études permettant la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires a été réalisée principalement chez la souris. Même si les études entre l'humain et

la souris montrent des similitudes au niveau de l'organisation des cellules B, les deux modèles ne sont pas identiques (Schroeder, 2006). La différence se situe notamment au niveau de l'organisation des loci des chaînes lourdes et des chaînes légères κ et λ , du réarrangement et de la diversité des gènes des Ig. Cependant, les voies de signalisation impliquées dans la mise en place de la réponse immunitaire permettant la synthèse et la sécrétion des Ig sont très proches (Schroeder, 2006). Dans cette partie, l'ensemble des populations cellulaires et des mécanismes présentés ont été décrits chez la souris puis extrapolés chez l'Homme. L'identification des sous-populations lymphocytaires B chez l'Homme et la souris a été possible grâce à l'étude de l'expression membranaire des clusters de différenciation (CD).

Classification par expression de marqueurs de surface : clusters de différenciation

Les CD sont des molécules ou des protéines présentes à la surface des cellules (Clark et al., 2016). Les premiers marqueurs de surface ont été découverts en 1975 par Köhler et Milstein (Köhler and Milstein, 1975) dans des hybridomes obtenus par fusion de cellules de myélome et de cellules isolées de rate de souris. Sur cent clones d'hybridomes différents, une protéine membranaire a été spécifiquement retrouvée grâce à un Ac unique. Ils ont alors émis l'hypothèse que toutes les sous-populations cellulaires expriment à leur surface des marqueurs spécifiques de leur lignée. Ils ont alors posé les fondations de l'immunophénotypage toujours très utilisé en diagnostic, en recherche clinique et fondamentale. Depuis 1982, l'établissement des différents CD est régi par l'ensemble de la communauté scientifique, régulièrement mis à jour et est publié lors d'une conférence tous les quatre à six ans. La dernière conférence a eu lieu en 2014 et a établi une liste de 371 marqueurs membranaires identifiés comme des CD suivi d'un numéro (Engel et al., 2015). Par exemple, le CD45 est le cluster permettant d'identifier une cellule leucocytaire. Le CD45 (*Tyrosine Phosphatase Récepteur C*, *PTPRC*) ou LCA (*Leukocyte Common Antigen*) est le cluster présent à la surface de tous les leucocytes.

Les CD sont regroupés en familles protéiques. Les membres de la même famille protéique peuvent porter le même numéro mais ils sont différenciés par l'ajout d'une ou plusieurs lettres juxtaposées à ce nombre (exemple : les CD11a, CD11b et CD11c qui sont des protéines intégrines exprimées à la surface de nombreuses cellules).

Pour identifier de façon optimale une sous-population de lymphocytes, la présence de plusieurs marqueurs et leur expression par immunophénotypage en cytométrie en flux est nécessaire. En effet, un même marqueur peut être exprimé à la surface de plusieurs sous-

populations ayant des rôles totalement différents. Par exemple, le CD45 est exprimé à la surface des lymphocytes T, B, monocytes, granulocytes, etc.

I.2.a. Expression des clusters de différenciation au cours de la lymphopoïèse B

Durant la lymphopoïèse B, de nombreux CD sont différentiellement exprimés à la surface des LB en cours de différenciation. Nous l'avons vu, deux des CD majoritaires sont l'IL-7R et le pré-BCR mais ils ne sont pas suffisants pour identifier spécifiquement et distinctement chaque stade de différenciation. Plusieurs équipes ont développé des stratégies de caractérisation phénotypique des différents stades de la lymphopoïèse B. En 2010, l'équipe de Engel et al. a défini les marqueurs minimums à la caractérisation des sous-populations pro-B, pré-B et des cellules immatures (Matesanz-Isabel et al., 2011):

- Pro-B : CD19⁺/CD10⁺/CD34⁺/IgM⁻
- Pré-B : CD19⁺/CD10⁺/CD34⁻/IgM⁻
- Immatures B : CD19⁺/CD10⁺/CD34⁻/IgM⁺

Cependant, ces marqueurs ne permettent pas totalement de caractériser l'ensemble des stades de différenciation de la lymphopoïèse B. En 2014 et 2019, différentes études ont proposé l'utilisation de nombreux marqueurs extracellulaires et/ou intracellulaires comme le CD38, le cyCD79a, la TdT, le VpréB, etc., afin de pouvoir discriminer chaque stade de la différenciation B *in vitro* et *in vivo* (Bendall et al., 2014; Kraus et al., 2014; Wentink et al., 2019). L'association des CD utilisés dans ces études est présentée **Figure 6** (*in vitro*) et **Figure 7** (*in vivo*).

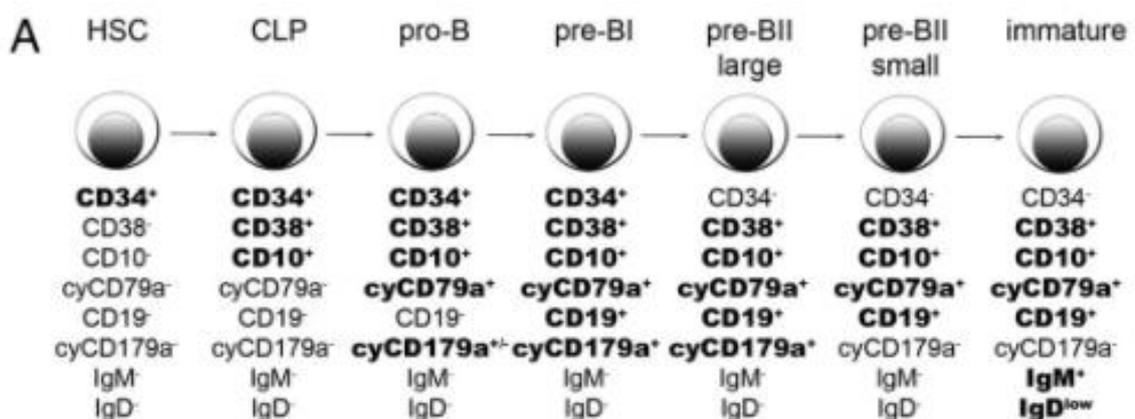


Figure 6 : Représentation schématique des marqueurs de surface utilisés pour la caractérisation cellulaire *in vitro* chez l'Homme. Les marqueurs en gras sont considérés comme les marqueurs minimums par l'auteur. (Kraus et al., 2014)

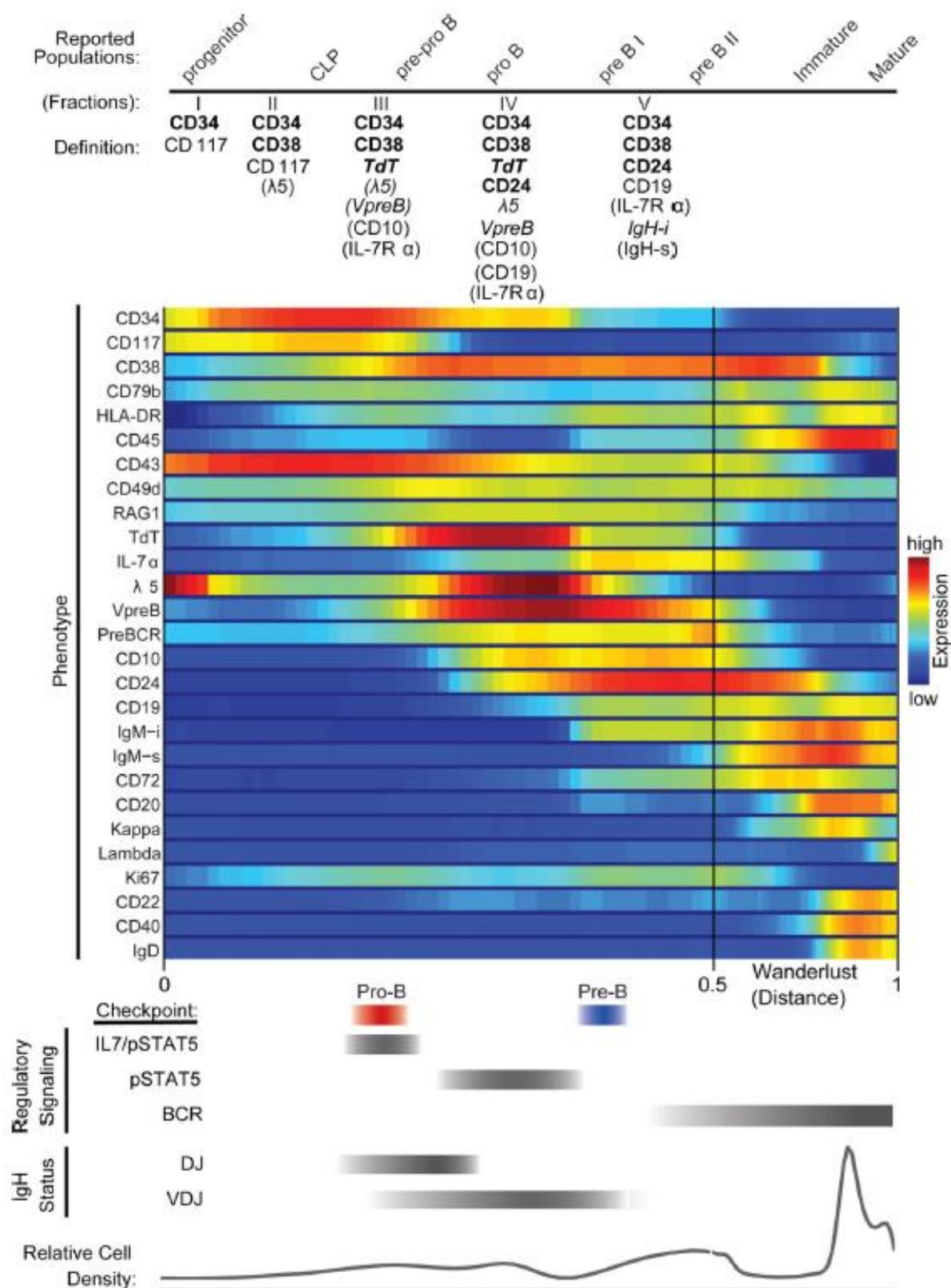


Figure 7: Représentation de l'expression des marqueurs phénotypiques permettant l'identification des stades pro-B et pré-B chez l'Homme. Les marqueurs en gras sont considérés comme les marqueurs minimaux par l'auteur (Bendall et al., 2014).

1.2.b. Cellules souches et niches hématopoïétiques

Les CSH sont des cellules rares, indifférenciées et pluripotentes. Elles permettent la reconstitution de l'ensemble des éléments figurés du sang. L'engagement de ces CSH vers une lignée cellulaire sanguine spécifique est dirigé par le microenvironnement, également appelé **niche hématopoïétique** (Orkin and Zon, 2008). Cette niche se compose de différents facteurs de différenciation présents dans l'espace extracellulaire ou à la surface des cellules de soutien.

Au sein d'une population cellulaire hétérogène en suspension, les CSH sont identifiées spécifiquement par l'expression d'une protéine transmembranaire : le CD34. C'est une phosphoglycoprotéine (Civin et al., 1984) toujours très utilisée pour la caractérisation et l'isolement des cellules souches de moelle osseuse et de sang de cordon (Majeti et al., 2007). La plupart des enrichissements d'échantillons en cellules souches sont effectués par une sélection positive magnétique des cellules exprimant ce marqueur (*MACS : Magnetic Activated Cell Sorting*). Un tri magnétique positif CD34⁺ permet d'obtenir l'ensemble des populations cellulaires précurseurs des différentes lignées hématopoïétiques. L'utilisation complémentaire d'autres CD (comme le CD10, le CD38 ou le CD90, par exemple) favorise une distinction plus précise des populations cellulaires précurseurs lors du tri.

On retrouve deux sous-populations de CSH : les LT-CSH (*long term HSC = CSH à longue durée de vie*) et les ST-CSH (*Short term HSC = CSH à courte durée de vie*). Leur différence majeure réside dans leur la capacité de renouvellement du système immunitaire chez un hôte irradié. Les LT-CSH sont capables d'un renouvellement à long terme, de plus de six mois. Les ST-CSH peuvent, quant à elles, se renouveler à court terme, c'est-à-dire entre 4 à 12 semaines (Domen and Weissman, 1999). Morphologiquement, ces cellules sont identiques. Pourtant, phénotypiquement, ces deux sous-populations se distinguent par la présence à la membrane du CD90⁺. Le CD90 est une protéine membranaire également appelée Thy.1 (**Tableau 1**), retrouvée sur les LT-CSH et absente des ST-CSH.

Le CD38 est un marqueur exprimé à la surface de la majorité des cellules immunitaires matures et immatures circulantes. Près de 90 à 99% des cellules CD34⁺ présentes dans la moelle sont CD38⁺. L'expression à la membrane de cette protéine marque l'engagement d'une CSH vers une voie de différenciation myéloïde ou lymphoïde (Novelli et al., 1998) (**Tableau 1**).

Population cellulaire	Ag de surface
LT-HSC	CD34 ⁺ CD90 ⁺ CD38 ⁻
ST-HSC	CD34 ⁺ CD90 ⁻ CD38 ⁻
Total HSC	CD34 ⁺ CD38 ⁻
Cellules engagées vers une lignée	CD34 ⁺ CD90 ⁻ CD38 ⁺

Tableau 1 : Combinaison des marqueurs de surface nécessaires à la caractérisation des cellules souches engagées dans une voie de différenciation (adapté de Will and Steidl, 2010)

I.2.b.i Hématopoïèse fœtale et niches embryonnaires

Chez les mammifères, l'hématopoïèse est d'origine mésodermique et débute au niveau du sillon primitif (ou ligne primitive). Ces CSH, formées au niveau du mésoderme, connaissent un « voyage » vers différentes zones au cours des premières semaines de vie d'un embryon (Figure 8A).

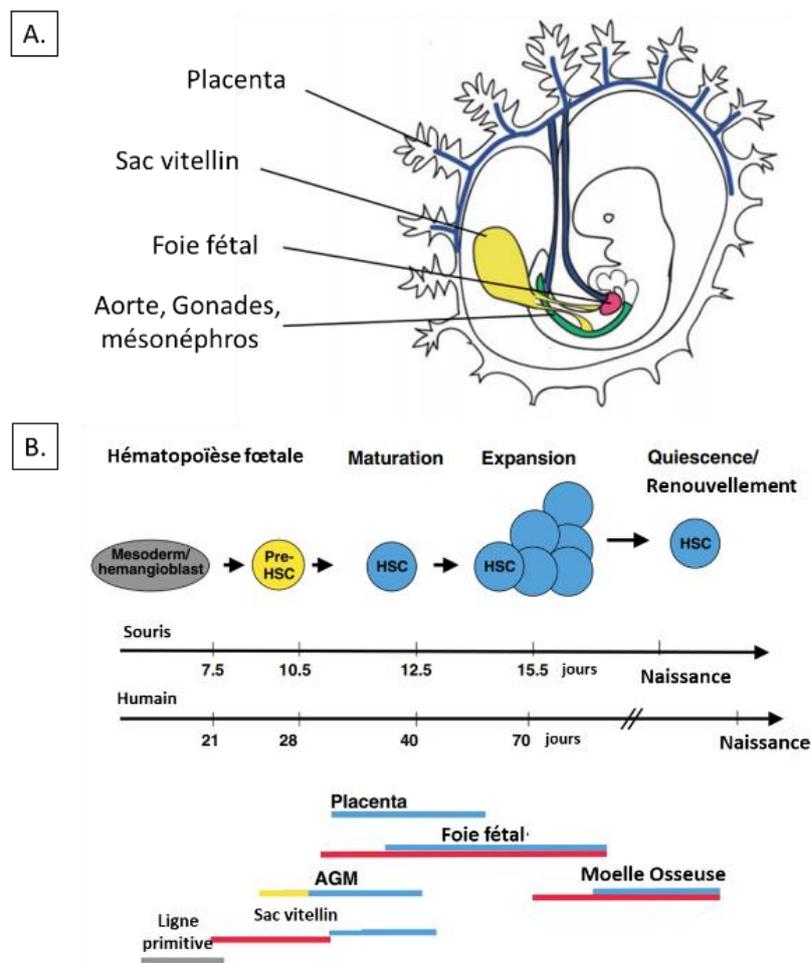


Figure 8 : Illustration des différentes zones hématopoïétiques chez un embryon humain à 5 semaines de gestation (A.). Lieux des différentes migrations des cellules souches

hématopoïétiques au cours de l'embryogenèse chez la souris et l'Homme en fonction du temps de gestation (Mikkola and Orkin, 2006)

Depuis 1961, il est convenu que le siège de l'hématopoïèse chez l'adulte est la moelle osseuse (Till and McCulloch, 2011). Cependant, au cours de l'embryogenèse, l'hématopoïèse fœtale (ou primitive) est réalisée dans différents organes permettant une réponse spécifique au besoin du fœtus en cellules sanguines (Laird et al., 2008; Orkin and Zon, 2008). Dans un premier temps, les CSH primitives migrent et prennent place dans le sac vitellin. Cette « colonisation » se déroule entre la 3^e et la 5^e semaine post-fécondation chez l'Homme (entre 7 et 12 jours chez la souris, noté E6,5 pour *embryonic day 6,5*). Les CSH primitives formeront des précurseurs érythrocytaires, mégacaryocytaires (Palis, 2014) et macrophagiques (Bertrand et al., 2006), ce qui permettra un apport en oxygène, une défense et un maintien des fonctions vasculaires de l'embryon (**Figure 8B**, ligne rouge). Les CSH matures sont capables de reconstituer l'ensemble des sous-populations représentées du sang. Ces cellules se caractérisent par la présence membranaire des marqueurs suivants : (CD34⁺/CD38⁺/CD90⁺/CD117⁺/CD135⁺/CD93⁺) (Hordyjewska et al., 2015). Le CD93 est également appelé AA4.1, est un marqueur exclusivement présent sur les CSH fœtales (Mikkola and Orkin, 2006).

Après le sac vitellin, les CSH primitives vont coloniser la zone dorsale de l'aorte entourée du mésenchyme urogénital (AGM : *Aorta-Gonad-Mesonephros*). La différenciation des CSH primitives en pré-CSH prend place au niveau de la zone AGM (**Figure 8B**, ligne jaune, Ganuza et al. 2018). Chez la souris, les CSH matures coloniseront ensuite le placenta, de nouveau le sac vitellin via, respectivement, les artères ombilicales et vitellines. À partir de E12.5 chez la souris (soit environ 5 à 6 semaines de gestation chez l'Homme), de très nombreux précurseurs coloniseront le foie fœtal qui deviendra l'organe majoritaire jusqu'à l'établissement de la moelle osseuse fœtale (Ciriza et al., 2013).

L'une des caractéristiques majeures de l'hématopoïèse du foie fœtal est la capacité d'expansion des CSH matures avant la colonisation de la moelle osseuse. Cette capacité de prolifération est très importante, avec un facteur de multiplication (*Fold change*) près de 1000 fois supérieur à des CSH adultes (Pourcher et al., 2011). L'origine de cette prolifération réside dans l'organisation spatiale, cellulaire et cytokinique de cette niche. En effet celle-ci est composée de cellules nourricières comme les péricytes (cellules contractiles à la surface des capillaires sanguins) ou des CSM (cellules composant la lame basale) qui libèrent, de façon paracrine, de nombreux facteurs cytokiniques, ce qui favorise l'expansion des CSH. Ainsi, on

retrouve diverses interleukines (Il-6 majoritairement, Gao and Liu, 2018) ou encore l'IGF-2 (*Insuline-like Growth Factor – 2*) et des cytokines pro-prolifératives comme le SCF ou encore le Flt-3L. L'IGF-2 présent à très forte concentration non physiologique (500ng/mL) *in vitro*, a été décrit comme seul responsable de l'effet prolifératif induit par les cellules nourricières. Cependant, en condition physiologique, il agit de concert avec les autres facteurs énoncés ci-dessus en suractivant la voie des tyrosines kinases : les voies RAS/MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et PI3K-AKT (*phosphoinositide 3-kinase*). Ces voies de signalisation permettent l'entrée dans le cycle cellulaire et augmentent la survie cellulaire par blocage de l'apoptose (Chou and Lodish, 2010; Gao and Liu, 2018; Zhang and Lodish, 2004).

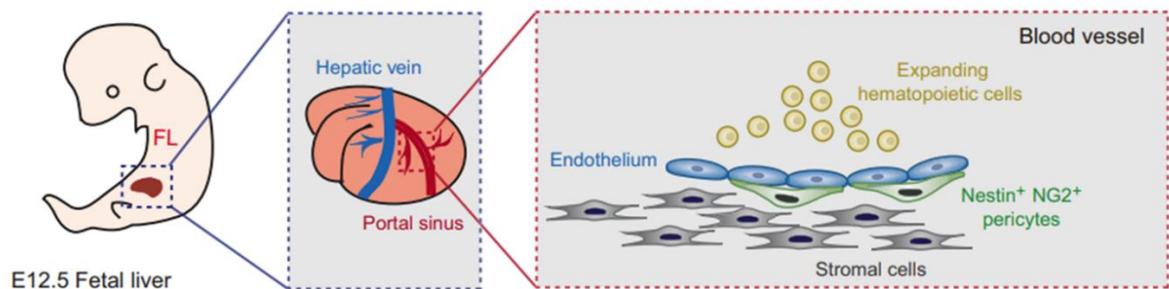


Figure 9 : Représentation de la niche hématopoïétique au niveau du foie fœtal au cours de l'embryogenèse chez la souris à E12.5 (Gao et al., 2018)

Enfin, à partir de E17.5 (à la fin du premier trimestre chez l'Homme), les os commenceront à se former. À ce stade les CSH du foie fœtal migreront vers la moelle osseuse. La moelle osseuse demeurera alors le compartiment majeur de la différenciation des cellules hématopoïétiques jusqu'à la naissance et durant toute la vie de l'individu (Coşkun et al., 2014).

I.2.b.ii La moelle osseuse : une niche hématopoïétique

Nous savons que plusieurs zones du fœtus peuvent supporter l'hématopoïèse au cours de l'embryogenèse. Chez l'adulte, les cellules qui composent le sang sont issues de CSH présentes dans la moelle osseuse.

Dans les os, la plupart des CSH sont retrouvées au niveau de la région trabéculaire (**Figure 10A**), proche de l'endoste. L'endoste est la couche de tissu conjonctif qui recouvre la surface interne des os longs. Cette localisation suggère que les CSH interagissent directement ou indirectement avec des facteurs proches de la surface des os. De plus, dans cette zone trabéculaire, les CSH sont adjacentes aux vaisseaux sanguins. La niche hématopoïétique englobe donc les régions périvasculaires, qui comprennent, elles-mêmes, les cellules osseuses, les cellules endothéliales et périvasculaires (Sugiyama et al., 2006) (**Figure 10B**).

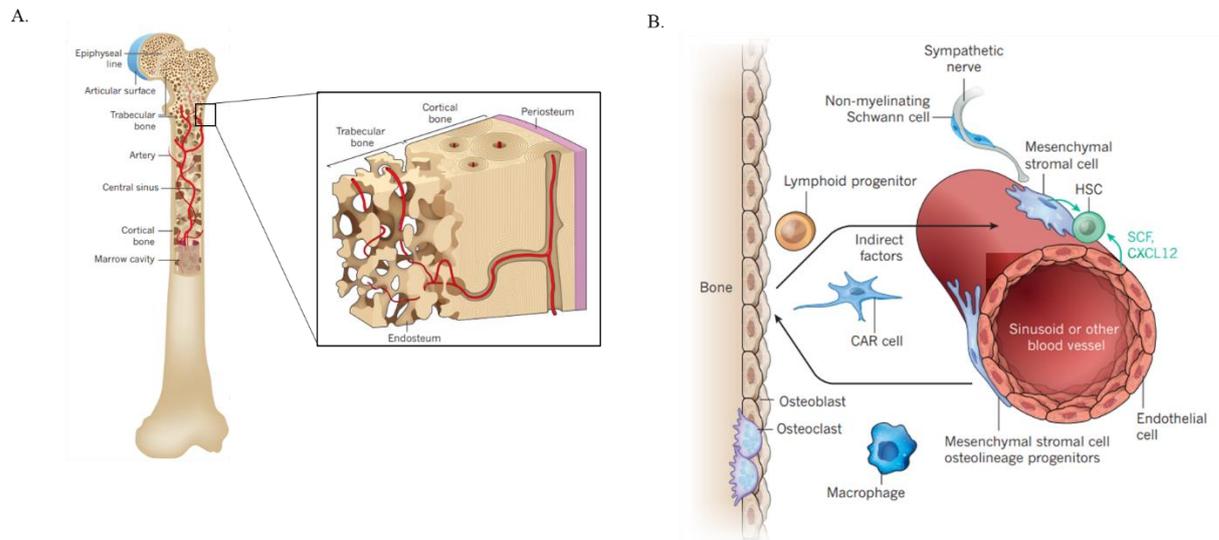


Figure 10: Schématisation d'un os (A.) et de la niche hématopoïétique (B.) (Morrison and Scadden, 2014)

Rôle des cellules osseuses dans la niche hématopoïétique

La composition cellulaire du microenvironnement est très complexe et fait intervenir de nombreux acteurs. Les cellules osseuses sont le premier acteur supposé et identifié. Les ostéoblastes (cellules responsables de l'ostéogenèse, formation de l'os) ont été décrits comme influençant la fréquence des CSH et des précurseurs hématopoïétiques *in vivo* (Calvi et al., 2003). De plus, de nombreuses cellules souches, ainsi que des précurseurs B, ont été retrouvées en contact direct avec des ostéoblastes (Nombela-Arrieta et al., 2013). Cependant, la déplétion (chimique ou à partir d'un modèle KO, *knock-out*) ou l'inactivation (modèle génétique) des ostéoblastes matures chez la souris n'ont montré aucune modification de la fréquence des CSH (Lymeri et al., 2008; Morrison and Scadden, 2014; Raaijmakers et al., 2010).

De ce fait, le rôle des ostéoblastes sur le renouvellement et la différenciation des cellules souches a été remis en question. Plus particulièrement, ce sont les travaux de l'équipe de Toshido Suda concernant l'exploration du couple N-cadhérine/caténine dans l'interaction ostéoblaste-CSH qui ont été discutés. Leur postulat était que le couple protéique cadhérine/caténine jouait un rôle important dans l'établissement des jonctions serrées intercellulaires. Les cadhérines permettent l'adhésion et la communication directe entre les ostéoblastes et les CSH. Leurs recherches ont également montré que l'établissement d'une interaction N-cadhérine/caténine entre les CSH et les ostéoblastes permet une sortie de la quiescence par l'activation du cycle cellulaire et de l'activité d'autorenouvellement des CSH (Hosokawa et al., 2010a). De plus, ils ont démontré qu'une inhibition de la N-cadhérine dans

des ostéoblastes matures empêche la reconstitution à long terme des CSH après greffe (Hosokawa et al., 2010b). Dans cette étude, ils ont par ailleurs montré qu'une surexpression de la N-cadhérine a un effet protecteur de la niche hématopoïétique.

Cependant, selon Zhou et al, les ostéoblastes auraient un rôle indirect dans la régulation de l'hématopoïèse (Zhou et al., 2010). En effet, il a été démontré que les progéniteurs ostéoblastiques permettent l'organisation morphologique et spatiale des niches hématopoïétiques en favorisant le remodelage osseux (celui de la matrice extracellulaire) et induisent une angiogenèse localisée (Chan et al., 2009; Sacchetti et al., 2007). Le rôle des ostéoblastes est donc d'établir des niches hématopoïétiques optimisées. L'organisation spatiale de ces niches permettra une accessibilité accrue des cellules périvasculaires, qui elles, permettront la quiescence, le renouvellement et la différenciation cellulaire des CSH.

Cellules périvasculaires et endothéliales

L'endoste est composé de nombreux éléments anatomiques dont un grand nombre de vaisseaux sanguins artériolaires et sinusoïdaux. Ainsi, les artères, permettant l'apport vasculaire sanguin, se poursuivent dans des capillaires spécialisés, appelés sinusoïdes de la moelle osseuse, qui forment un réseau complexe dans toute la moelle. Les cellules endothéliales composent la surface interne (appelée tunique interne ou intima) des vaisseaux sanguins. Elles contrôlent le trafic des cellules hématopoïétiques.

Rafii et al. ont montré que les cellules endothéliales de la moelle osseuse humaine soutiennent la prolifération des cellules hématopoïétiques pendant 2 mois en culture *in vitro*, suggérant le rôle des cellules endothéliales dans le maintien des progéniteurs hématopoïétiques (Rafii et al., 1995). De surcroît, il a été montré que les cellules endothéliales présentes au sein de la moelle osseuse libèrent localement deux cytokines pro-prolifératives permettant la rétention des CSH au niveau de la moelle osseuse : le SCF et le CXCL-12 (Ding et al., 2012; Greenbaum et al., 2013). La déplétion de ces deux facteurs spécifiquement par invalidation des gènes au niveau des cellules endothéliales diminue fortement le nombre de CSH retenues au sein de la moelle osseuse (Ding et al., 2012).

Les vaisseaux sanguins, majoritairement composés de cellules endothéliales, sont entourés par des cellules périvasculaires (Morrison and Scadden, 2014). Ces cellules sont également CSM. Bien que les CSM soient hétérogènes, et que les relations précises entre les cellules exprimant différents marqueurs restent à définir, plusieurs marqueurs majoritaires sont retrouvés à la surface de ces cellules *in vivo*, ce qui permet leur distinction : le CD133 (nestine),

le CD105 (endogline) (Méndez-Ferrer et al., 2010), le PDGFR α (*platelet-derived growth factor receptor A*, (Sugiyama et al., 2019), ou encore le CD146 (MCAM = *Melanoma Cell Adhesion Molecule*, Sacchetti et al., 2007). Les rôles de deux de ces sous-populations dans l'hématopoïèse ont cependant été caractérisés : ceux des cellules subendothéliales appelées CSM PDGFR α ^{pos}SCA-1^{pos} (CSM-P α S) et ceux des cellules CXCL-12 *abundant reticular* (CAR) (Figure 11).

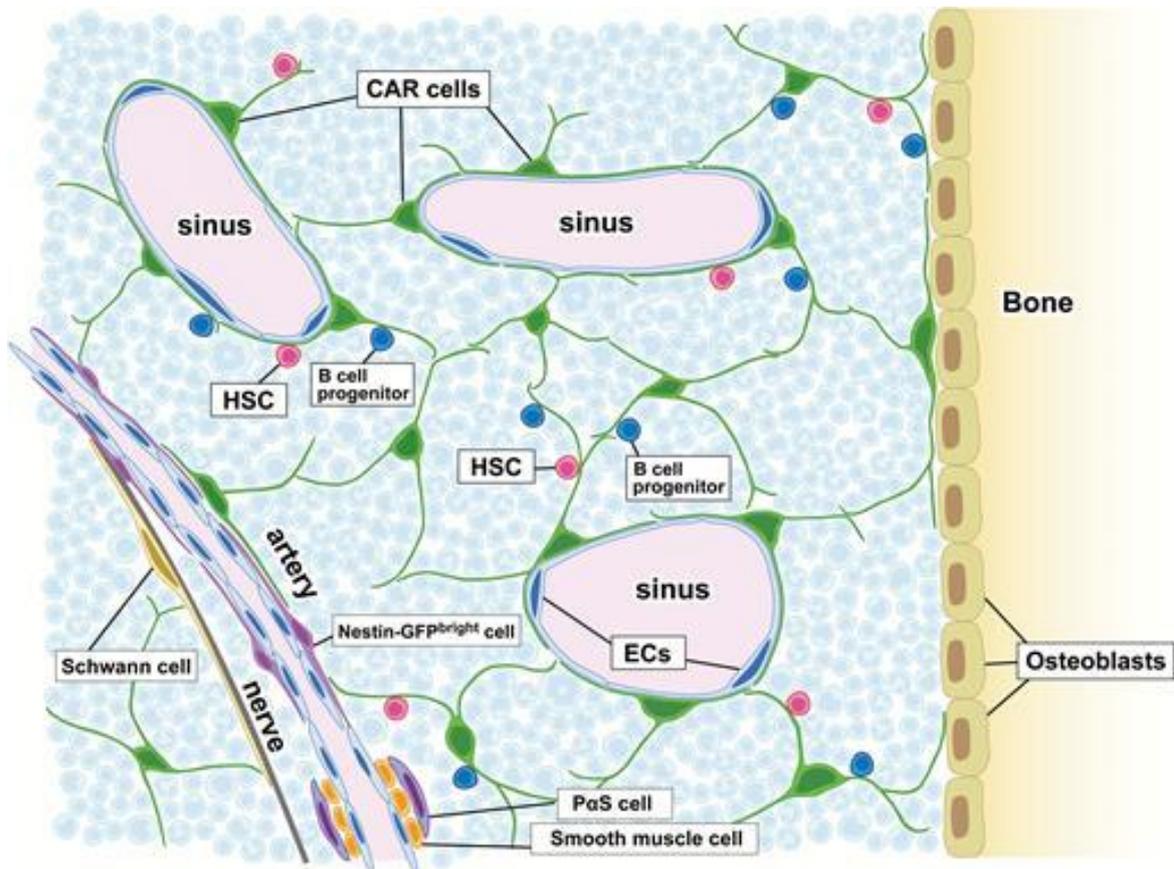


Figure 11 : Schématisation du réseau des cellules endothéliales et périvasculaires permettant l'établissement d'une niche hématopoïétique (Sugiyama et al., 2019)

La possibilité que les CSM-P α S fassent partie de la niche hématopoïétique a été supportée par leur localisation autour des vaisseaux sanguins dans toute la moelle osseuse (Méndez-Ferrer et al., 2010). Parallèlement, des études ont montré une proximité entre des CSH et des cellules exprimant la nestine et sécrétant des niveaux élevés de SCF et CXCL-12 (SDF-1) ; deux facteurs sécrétés par les CSM-P α S (Sacchetti et al., 2007). Une inhibition totale de l'expression du CXCL-12 a pour conséquence une déplétion de la moelle osseuse en CSH, effet similaire déjà observé au niveau des cellules endothéliales (Pinho et al., 2013).

Le SCF (*Stem Cell Factor*), également connu sous le nom de ligand c-Kit, est un FT à quatre hélices qui existe sous la forme d'un homodimère non covalent (Jiang et al., 2000; Zhang et al.,

2000)). Le SCF se lie et active son récepteur apparenté, un proto-oncogène et un récepteur tyrosine kinase de type III, connu sous le nom de c-Kit ou Kit (Liu et al., 2007; Yuzawa et al., 2007). Plusieurs voies de signalisation sont impliquées par l'activation du c-Kit induite par SCF, en particulier les voies des tyrosines kinases (MAPK ou PI3K/AKT) (Rönstrand, 2004). L'axe SCF/c-Kit agit comme un signal clé de survie et de renouvellement au sein de la niche hématopoïétique, des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques (Ding et al., 2012; Li and Johnson, 1994).

Le CXCL-12 fait partie d'une grande famille de cytokines chimioattractives initialement caractérisée comme un facteur de stimulation de la croissance pour le clone précurseur des cellules B (Nagasawa et al., 1994). Le récepteur de CXCL-12 est CXCR4 (CXC-chimiokine 4), un récepteur heptahélicoïdal couplé à des protéines de guanosine triphosphate (GTP). Des études sur des souris mutantes, provoquant un déficit d'expression de CXCR4, ont révélé que la signalisation CXCL-12/CXCR4 est essentielle pour l'hématopoïèse, y compris pour le développement des cellules B et pour la colonisation de la moelle osseuse par des progéniteurs hématopoïétiques (Ara et al., 2003; Nagasawa et al., 1996; Sugiyama et al., 2006).

Une dernière sous-population composant la niche hématopoïétique a pu être identifiée : les cellules CAR. Les cellules CAR sont une population de CSM, qui expriment des niveaux élevés de facteurs de niche hématopoïétique : CXCL-12 et SCF. Cette libération est environ 10 à 100 fois supérieure aux CSM-P α S. De plus, une nouvelle approche d'imagerie de la moelle osseuse a montré que la majorité des LT-HSC était en contact avec les cellules CAR (Acar et al., 2015). Une inhibition conditionnelle de la sécrétion du SCF par les cellules CAR a également montré une réduction de près de 95% du nombre de LT-CSH au niveau de la moelle osseuse (Ding et al., 2012). Cependant, lorsqu'une inhibition conditionnelle d'environ 70 à 90% de CXCL-12 au sein des cellules CAR est réalisée, le nombre de CSH, de précurseurs lymphoïdes et des populations B n'est pas modifié (Ding and Morrison, 2013). Mais selon Sugiyama et al, les 10 à 30% de cellules CAR non inhibées permettraient une sécrétion de CXCL-12 suffisante à l'établissement d'une hématopoïèse normale (Sugiyama et al., 2019).

Il est important de préciser que l'ensemble de ces résultats et des mécanismes présentés dans cette partie ont été réalisés dans des modèles murins. Des études très récentes ont cependant identifié des CSM subendothéliales qui expriment la protéine PDGFR α et qui présentent un niveau d'expression de CXCL-12 et SCF similaire aux cellules CAR identifiées chez la souris (Li et al., 2014a).

Partie I : Introduction et état de l'art

Nous l'avons vu, diverses cellules composent la niche hématopoïétique chez l'adulte. Chaque type cellulaire possède ses propres caractéristiques morphologiques et occupe un rôle distinct dans l'établissement d'un microenvironnement propice à l'hématopoïèse. Le SCF et le CXCL-12 permettent respectivement le renouvellement et le maintien des CSH dans la moelle osseuse. Le CXCL-12 permet également l'initiation de la différenciation B. Cet aspect sera développé dans la partie I.2.d.

À partir des études *in vitro*, la société internationale de thérapie cellulaire a défini des critères minimaux permettant la caractérisation des CSM *in vitro* (Aung et al., 2019; Dominici et al., 2006) :

- La capacité à adhérer sur des supports plastiques ;
- L'expression à la membrane de marqueurs spécifiques (CD90, CD105, CD73) et la non-expression des marqueurs hématopoïétiques (CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR = Human Leukocyte Antigen – DR isotype) ;
- La capacité de différenciation vers l'une des trois lignées suivantes : ostéoblastique, adipocytaire ou chondrogénique.

I.2.b.iii Le cordon ombilical : une source de cellules souches

Le cordon ombilical humain est une source très utilisée pour la récolte de cellules souches employées pour la thérapie cellulaire. Les raisons, souvent réitérées, sont : l'accessibilité des prélèvements, la récolte non invasive de tissus considérés comme déchets biologiques, les rendements cellulaires relativement élevés et un phénotype similaire à celui des cellules souches médullaires de l'adulte.

Le cordon ombilical est une annexe embryonnaire générée par le fœtus entre la 4^e et la 6^e semaine de gestation. Il permet l'interaction entre le fœtus et le placenta qui constitue l'interface fœto-maternelle. Le cordon ombilical mesure environ 40 à 60 cm à la naissance pour une épaisseur de 1 à 2 cm. Ces deux artères et sa veine permettent un échange gazeux et des nutriments entre la mère et le fœtus. Les apports se font par la veine ombilicale et les rejets par les artères ombilicales (**Figure 12A.** et **Figure 12B.**). Le cordon ombilical, et plus particulièrement le sang et la gelée de Wharton sont des sources importantes de cellules souches (Ding et al., 2015; Knudtson, 1974).

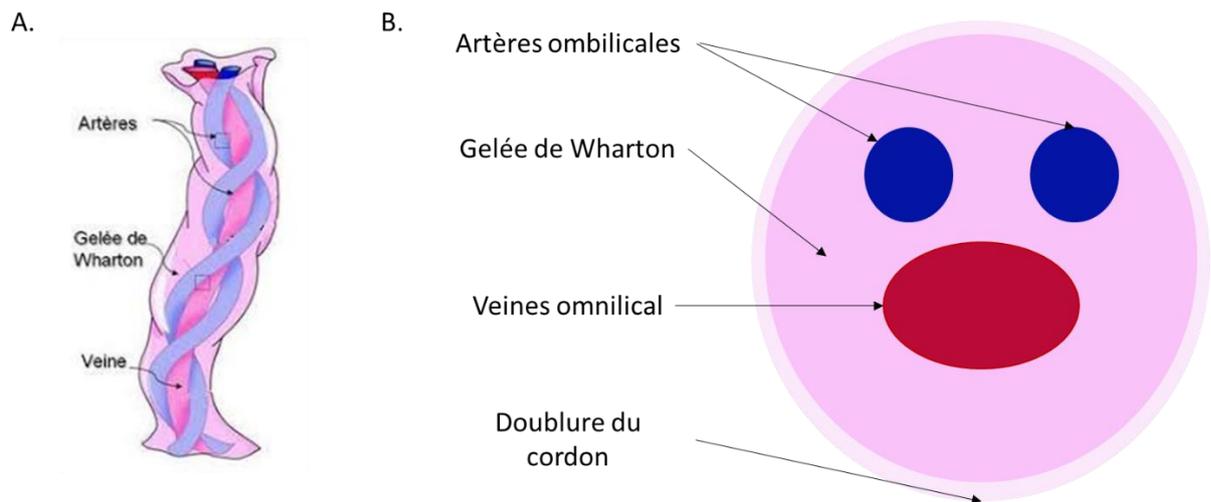


Figure 12 : Représentation schématique (A.) et en coupe (B.) d'un cordon ombilical (adaptée de (Ding et al., 2015))

Le sang de cordon contient des CSH matures, qui sont capables de s'autorenouveler (Ademokun et al., 1997; Brown and Boussiotis, 2008) et de reconstituer l'ensemble des sous-populations immunitaires (Zheng et al., 2018). Ces CSH présentent des marqueurs souches similaires aux cellules souches fœtales ($CD34^+/CD38^-/CD90^+/CD117^+/CD135^+$), à l'exception du CD93. Cependant, trois marqueurs sont majoritairement utilisés pour les identifier : le $CD34^+$, $CD38^{+/-}$, le $CD90$.

Au sein du cordon ombilical, on trouve une zone blanche caractéristique identifiée en 1656 par Thomas Wharton. Il postulait que cette zone avait un rôle contractile et permettait le transport de la lymphe. Cette zone riche en CSM a été appelée la gelée de Wharton (WJ : *Wharton Jelly*). En réalité, aucune cellule sanguine, aucun vaisseau lymphatique et aucune fibre innervante n'ont été identifiés dans cette zone.

Les WJ-MS (Wharton Jelly human Mesenchymal Stem Cells) sont rapidement devenues des candidates idéales pour une utilisation en thérapie cellulaire. En effet, elles sont facilement récoltables sans intervention invasive. De plus, les WJ-MS possèdent une capacité de prolifération *in vitro* deux fois supérieure à leur équivalent de la moelle osseuse (Li et al., 2014b). Elles présentent cependant une capacité de différenciation réduite vers la lignée adipocytaire et chondrogénique (Li et al., 2015). D'un point de vue phénotypique, les WJ-MS ont toutes les caractéristiques des CSM décrites par Dominici et al (Aung et al., 2019; Dominici et al., 2006; Li et al., 2014b). En outre, plusieurs études ont montré que ces cellules sécrètent de nombreuses cytokines *in vitro* pouvant permettre la prolifération des CSH ainsi que leur

orientation vers la lignée lymphoïde (Fan et al., 2009; Kuchroo et al., 2014; Park et al., 2009; Shen et al., 2015) (**Tableau 2**).

Cytokines	Concentration (pg/mL)
SDF-1 (CXCL-12)	770,63
IGF	871,28
IL-6	Faible (non indiquée)
IL-3	500
IL-8	225, 33
VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	224,06
VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule-1)	549,44
FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2)	59,55

Tableau 2 : Concentration des cytokines libérées par les MSC-WJ en culture in vitro (Fan et al., 2009; Kuchroo et al., 2014; Park et al., 2009; Shen et al., 2015)

I.2.c. De la CSH au précurseur lymphoïde commun

Les premières étapes de la différenciation B permettant l'engagement de la CSH vers la lignée B restent incertaines, en particulier l'identité des cellules précurseurs intermédiaires. Des études utilisant des approches *in vitro* et *in vivo* ont évalué le potentiel de différenciation de cellules présentant des marqueurs membranaires spécifiques, ce qui a permis d'isoler plusieurs sous-ensembles de cellules précurseurs entre les CSH et les précurseurs de cellules B (positives au B220). Grâce à un phénotypage membranaire très fin, deux sous-populations exprimant les marqueurs CD34⁺/FLT3⁻/CD117⁺/B220⁻/Sca1⁺/Lin⁻ (Lineage) et CD34⁺/FLT3⁺/CD117⁺/B220⁻/Sca1⁺/Lin⁻ ont pu être identifiées comme conservant un potentiel de différenciation vers la lignée myéloïde et lymphoïde (Adolfsson et al., 2005). Ces cellules ont été nommées respectivement les *Multipotent progenitor* (MPP) et *lymphoid-primed multipotent progenitor* (LMPP). Entre la population MPP et LMPP, l'acquisition du Flt-3 a fait perdre la possibilité de différenciation de ces cellules vers la voie érythroïde et mégacaryocytaire (Adolfsson et al., 2005). De ces résultats, il a été conclu que les MPP sont en amont des LMPP dans la chronologie de différenciation B.

Emergeant des LMPP, on retrouve une sous-population cellulaire exprimant le Lin⁻ CD117^{low}Sca1^{low} présentant le récepteur à l'Interleukine-7 à leur surface (IL-7R⁺ = *l'Interleukin-7 receptor*). Cette sous-population, appelée progéniteur lymphoïde commun (CLP), est capable de s'engager vers la lignée T et B mais ne peut s'engager vers la lignée myéloïde. Les mécanismes moléculaires conduisant à la différenciation de la CSH à la cellule CLP sont encore très méconnus mais plusieurs équipes supposent que ceux-ci seraient sous le contrôle du microenvironnement au sein de la niche hématopoïétique (Clark et al., 2014; Nagasawa, 2006; Zehentmeier and Pereira, 2019). Dans un modèle de souris KO pour le FT Ikaros (*Ikzf1 : Ikaros zinc finger family 1*), indispensable à l'engagement de la CLP vers une différenciation en LB), une étude a montré qu'il n'y a aucun impact de l'inhibition de ce facteur sur la fréquence des précurseurs de la lignée T (ETP = *T cell lineage progenitor*) dans le thymus (Allman et al., 2003). L'engagement vers la lignée T utilise donc des voies de différenciation différentes de celles activées dans les cellules LMPP et CLP. Ces dernières représenteraient alors la première population engagée vers la voie du LB.

Une piste de réflexion expliquant l'orientation des MPP vers la lignée lymphoïde ou myéloïde par le FT de PU.1 a également été décrite. En effet, il a été montré que PU.1 est impliqué dans la régulation de l'expression de l'IL-7R (DeKoter et al., 2002). DeKoter et al ont montré que l'inhibition de PU-1 au niveau des progéniteurs hématopoïétiques empêche l'expression à la membrane de l'IL-7R. Cependant, en restaurant l'expression de l'IL-7R, la cellule est capable de progresser normalement dans la voie de différenciation B. PU.1 permettrait alors l'engagement de la cellule vers la lignée lymphoïde mais pas spécifiquement vers la lignée B. De plus, d'autres études récentes prouvent qu'une forte expression de PU.1 conditionne l'expression du FT GATA1 et favorise l'engagement de la cellule vers la lignée érythroïde et mégacaryocytaire (Hoppe et al., 2016). L'expression de PU.1 permet de décider du destin des cellules MPP vers leur devenir lymphoïde ou myéloïde (Imperato et al., 2015).

I.2.d. Orientation vers la voie du lymphocyte B : le stade pré-pro-B

Le lymphocyte pré-pro-B est le premier stade d'engagement vers la voie du LB. Cette orientation est médiée par l'intervention de plusieurs cytokines pro-différenciatrices libérées au sein de la niche hématopoïétique : le CXCL-12, le Flt-3L et l'IL-7. Phénotypiquement, ce stade se caractérise majoritairement par l'expression à la membrane du CD34⁺/CD38⁺/CD45R⁺(souris)/IL-7R⁺/CD4⁺/CD19⁻. Le lymphocyte pré-pro-B présente également à sa surface des récepteurs pour le CXCL-12 (le récepteur CXCR4) et pour le Flt3L.

Le CXCL-12 est une cytokine chimioattractante essentielle à l'engagement de la cellule vers la lignée B. Elle assure le maintien du progéniteur B proche de la niche hématopoïétique et permet ainsi une meilleure accessibilité aux autres cytokines pro-différenciatrices.

Génotypiquement, certains FT spécifiques de la lignée B présentent une expression plus importante au stade de la CLP par rapport au stade pro-B : EBF-1 (*Early B Cell Factor 1*) et Ikaros (Allman et al., 1999). De plus, le stade pré-pro-B voit l'initiation d'une activité recombinatoire des gènes du locus IgH qui s'achève à la fin du stade pro-B. Cette recombinaison est initiée sous l'activation de l'enhancer E_{μ} (recombinaison D_H-J_H). Ainsi, les lymphocytes pré-pro-B présentent un locus IgH encore en configuration germinale et une expression des enzymes RAG-1 et RAG-2 (*Recombinaison activating gene 1 and 2*) très faibles (contrairement au stade pro-B). Les enzymes RAG-1 et RAG-2 sont responsables, entre autres acteurs, de la recombinaison des segments géniques des loci codant les chaînes lourdes des gènes des Ig.

Bien que les cellules pré-pro-B aient été identifiées comme étant les premiers précurseurs des cellules B, plusieurs études récentes ont montré que la fraction pré-pro-B est hétérogène et peut donner naissance à des lignées hématopoïétiques autres que les cellules B. Dans la littérature, les lymphocytes pré-pro-B sont également retrouvés sous le terme de *B-cell-biased lymphoid progenitors* (BLP) (Welinder et al., 2011). En effet, il a été démontré que les cellules pré-pro-B possèdent la capacité de s'orienter vers des précurseurs de la lignée T (Martin et al., 2003) et la lignée NK (Rolink et al., 1996). Ces résultats ont été expliqués par la faible expression (peu détectable en QRT-PCR) du FT Pax-5 (*Paired box protein 5*). Au niveau des cellules pré-pro-B, Pax-5 permet de rendre irréversible l'engagement vers la lignée B. Cependant, il est important de souligner que toutes ces expériences ont été réalisées *in vitro* et permettent peut-être une différenciation T ou NK dans des configurations expérimentales particulières, qui, *in vivo*, seraient rendues impossibles par le microenvironnement médullaire.

D'après tous ces résultats, le stade pré-pro-B pourrait être considéré comme une étape de préparation à l'avancée de la cellule vers le stade pro-B.

I.2.e. Du stade pro-B au stade pré-B

À la suite du stade pré-pro-B, la cellule continue sa différenciation vers le stade pro-B. Ce stade est majeur dans l'engagement de la cellule vers la lignée B. Cette phase peut être divisée en deux stades distincts : le stade pro-B précoce (également appelé pro-B) et le pro-B tardif (également appelé pro-pré-B).

De façon générale, le stade pro-B précoce se caractérise par une phase de prolifération intensive et une répression temporaire de la différenciation. Au cours de sa différenciation, le LB connaît trois grandes phases de prolifération : une en phase pro-B, une en phase large pré-B et une dernière au niveau du centre germinatif (GC: *Germinal Center*) (**Figure 13A**). La prolifération et la survie de progéniteurs B sont sous la dépendance du récepteur à l'IL-7. Ce récepteur est composé de la chaîne IL-7R α (permettant la spécificité de fixation de l'IL-7) et de la chaîne commune γ (γ c). Chez la souris, une délétion de la chaîne IL-7R α perturbe sévèrement la lymphopoïèse B au niveau de la moelle osseuse (Peschon et al., 1994). L'IL-7R fixe également la cytokine *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP). L'hypothèse que le TSLP peut partiellement restaurer la lymphopoïèse B en cas d'inhibition de l'IL-7 a été émise (Clark et al., 2014). Cependant, aucune étude n'a démontré cette restauration *in vivo*. À ce stade de la différenciation, on note également l'expression importante de la TdT (*terminal deoxytransferase*). Des études similaires ont également repéré l'expression de la Tdt dans une zone sous-endostéale. L'expression de la TdT est détectable faiblement au début du stade pré-pro-B, puis augmentent fortement durant le stade pro-B et diminue jusqu'à devenir non détectable en fin de phase pré-B (Bendall et al., 2014).

Induction de la prolifération des cellules pro-B par l'IL-7R

La voie de l'IL-7 est une voie d'activation très bien décrite au cours de la lymphopoïèse B mais essentiellement chez la souris. Bien que les mécanismes de la lymphopoïèse B soient très proches entre l'Homme et la souris, et que l'IL-7 soit très importante au cours de la différenciation B humaine, certaines études suggèrent que, par rapport aux souris, le développement des cellules B humaines est moins affecté par une perte d'activité de l'IL-7R (Jensen et al., 2008).

Lors de la fixation de l'IL-7 sur l'IL-7R, ce dernier est phosphorylé. Cependant, le récepteur à l'IL-7 ne dispose pas d'activité kinase constitutive. Cette phosphorylation est assurée par les enzymes kinases JAK 3 et JAK1 (*Janus kinase 3 et 1*). Cette phosphorylation permet de recruter les FT STAT5a et STAT5b (*Signal transducer and activator of transcription 5*) (O'Shea and Plenge, 2012). À la suite de l'activation par IL-7, STAT5 stimule la transcription du gène *Ccnd3*, qui code pour la cycline D3 (**Figure 13B**) (Cooper et al., 2006). Cette cycline favorise l'entrée dans le cycle cellulaire et permet la réplication de l'ADN et la mitose. La cycline D3 a été décrite comme indispensable à la prolifération des cellules pro-B (Cooper et al., 2006). La cycline D3 forme un complexe d'initiation du cycle cellulaire avec les CDK4 et CDK6 (*cyclin*

dependant kinase) qui entraîne la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome, résultant à l'entrée en phase G1 du cycle cellulaire.

En plus de stimuler la prolifération, STAT5 améliore la survie des progéniteurs B. En effet, il a été montré que STAT5 est requis pour l'expression du facteur de survie MCL 1 (*myeloid-cell leukaemia sequence 1*) (Malin et al., 2010). De plus, associé à l'activation des enzymes JAK, STAT5 permet également la transcription du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Jiang et al., 2004).

La deuxième voie de signalisation activée par l'IL-7 récepteur est celle de la PI3K-AKT (Milne and Paige, 2006). L'activation de la voie PI3K-AKT permet la phosphorylation du FT FOXO-1 (forkhead box protein O-1) (**Figure 13B**). Physiologiquement, cette protéine permet l'activation de l'apoptose par expression de protéines pro-apoptotiques comme Bim (Essafi et al., 2005) ou BAD (Danial and Korsmeyer, 2004). La phosphorylation de FOXO-1 par l'activation de la voie AKT permet son export du noyau et sa dégradation, favorisant encore l'effet anti-apoptotique. Enfin, l'inhibition de la protéine FOXO-1 permet également la répression de gènes RAG-1 et RAG-2 (Amin and Schlissel, 2008). Cette inhibition est réalisée par l'intermédiaire du FT Ikaros (Alkhatib et al., 2012). Il est prouvé qu'une inhibition de Ikaros provoque un arrêt de la différenciation cellulaire en stade pro-B et pré-B, par un blocage de la recombinaison des gènes de la chaîne lourde (au stade pro-B) et de la chaîne légère (au stade pré-B) (Heizmann et al., 2018; Reynaud et al., 2008).

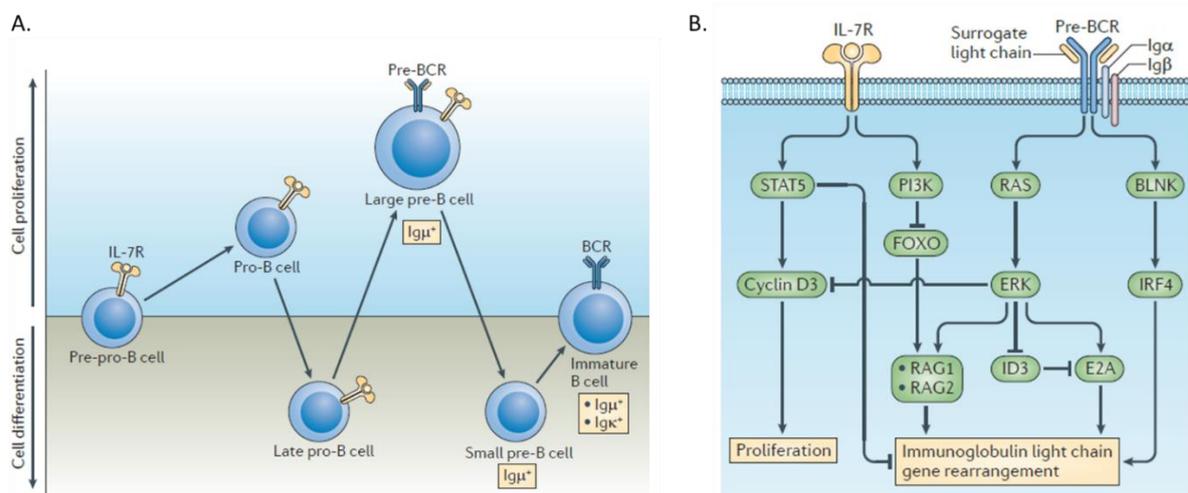


Figure 13 : Schématisation de l'alternance prolifération/différenciation au cours de la lymphopoïèse (A.) provoquée par la dualité expression/répression des voies de signalisation du pré-BCR et de l'IL-7

Induction de la différenciation des cellules pro B par l'IL-7R

Partie I : Introduction et état de l'art

L'IL-7R déclenche une série de cascades de signalisation permettant la survie et la prolifération des lymphocytes pro-B. Les voies de signalisation impliquées permettent également un blocage de la différenciation.

Il faut maintenant définir comment les cellules progressent dans la voie de différenciation. L'IL-7R permet l'avancée des cellules B vers la phase pré-B. Certaines expériences ont démontré que les cascades de signalisation de l'IL-7R α permettent la synthèse du FT EBF-1 (Kikuchi et al., 2005; Roessler et al., 2007). EBF-1 est un FT très décrit qui permet l'expression du FT Pax-5 au cours de la différenciation B (**Figure 14** et **Figure 15**). De ces résultats, le rôle de l'IL-7 dans le suivi de la différenciation des cellules B a été largement pris en considération.

Par technique d'analyse de mutation KO, plusieurs FT, dont E2A (*helix-loop-helix proteins* E12 et E47), EBF-1 et Pax-5, ont été identifiés comme étant impliqués dans la progression des progéniteurs lymphoïdes dans la lignée B. Ces FT ne sont pas tous sous la dépendance d'IL-7R mais ils sont régulés majoritairement par EBF-1 (**Figure 14**), lui-même régulé par l'IL-7R.

Au cours de la lymphopoïèse B, il a été prouvé que les souris dépourvues d'EBF-1 ne parviennent pas à exprimer la plupart des gènes des cellules B, y compris CD79a, CD79b, les chaînes légères de substitution λ 5 et VpréB, et ne subissent aucune recombinaison du locus IgH dans la moelle osseuse (Lin and Grosschedl, 1995). Par ailleurs, l'expression EBF-1 restaure la différenciation B des cellules pro-B issues de souris présentant une invalidation pour le gène du récepteur à l'IL-7 α . Cependant, cette compensation ne corrige pas la capacité proliférative déclenchée par la voie de l'IL-7 précédemment décrite (Kikuchi et al., 2005). Une autre étude a montré qu'une expression exogène de Pax-5 dans un modèle de souris KO IL-7^{-/-} ne restaure pas la lymphopoïèse B (Dias et al., 2005). Ce dernier résultat nous indique qu'EBF-1 possède d'autres fonctions majeures dans l'induction de la lymphopoïèse B et n'a pas uniquement pour rôle l'induction de Pax-5.

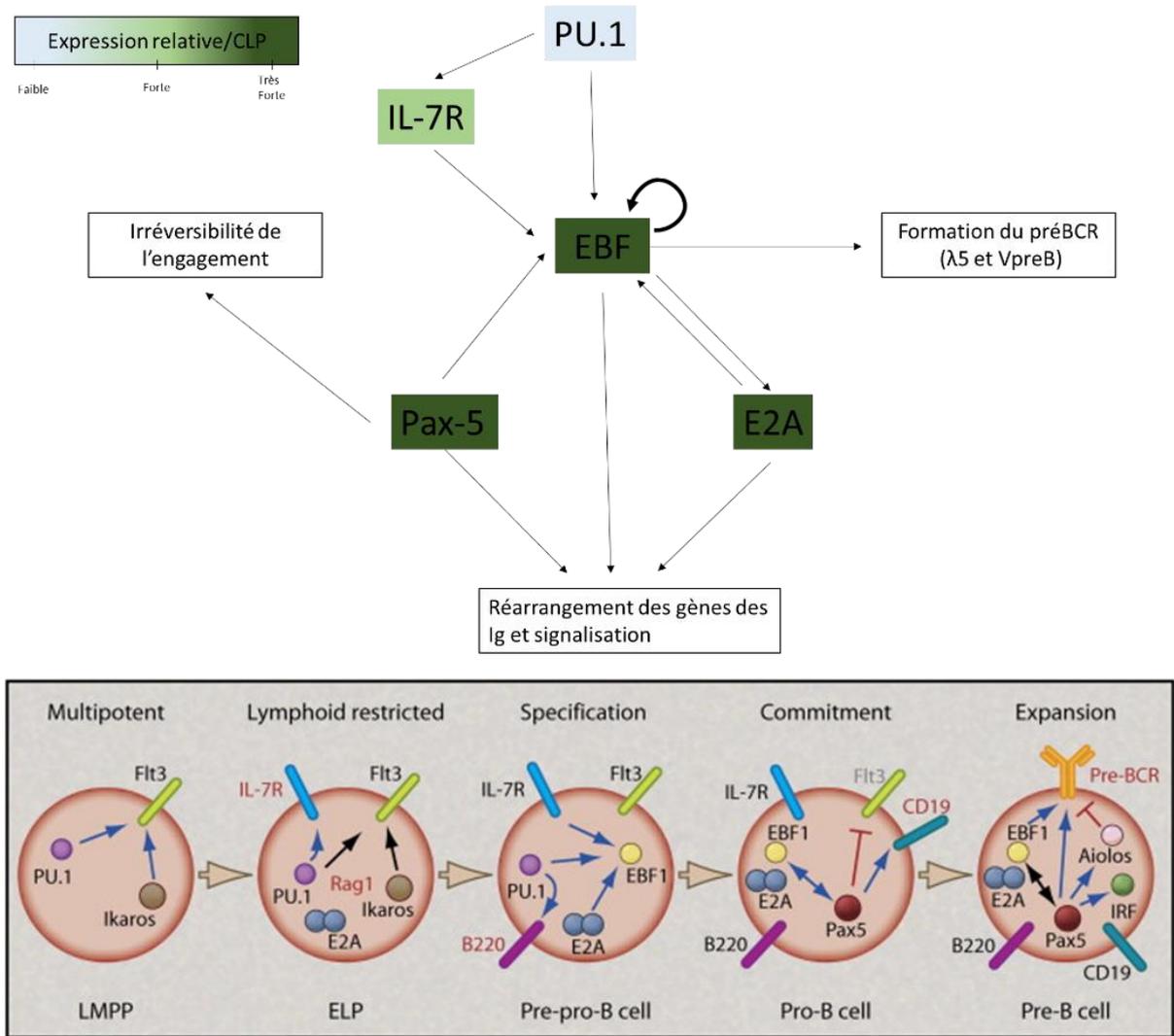


Figure 14 : Réseau de régulation des facteurs de transcription permettant l'avancement dans la voie de différenciation B (adapté de (Hagman and Lukin, 2006; Nutt and Kee, 2007)).

Le rôle central d'EBF-1 dans la différenciation de la lignée B pose la question de sa régulation. L'un des premiers régulateurs d'EBF-1 à être identifié est E2A, qui induit EBF-1 dans une lignée de macrophages. Ensemble, ces protéines régulent la plupart des gènes spécifiques de la lignée B, entraînant la conversion des macrophages en cellules B (Kee and Murre, 1998). En étudiant les séquences des promoteurs régulant l'expression d'EBF-1, des sites de fixation pour E2A ont été identifiés (Smith et al., 2002). On retrouve également des sites de fixation pour le FT STAT5 et pour EBF-1 lui-même (Smith et al., 2002) (**Figure 15A**). Une étude *in vivo* a montré que l'inhibition de E2A ne provoque pas d'extinction complète de la synthèse de l'ARNm d'EBF-1 (Lazorchak et al., 2006). Cette inhibition partielle est cependant suffisante pour dépler totalement la souris en progéniteurs lymphoïdes. Ce résultat paradoxal trouve une réponse dans l'étude complète du gène EBF-1 (Roessler et al., 2007). En effet, l'induction d'EBF-1 peut être réalisée par deux promoteurs : le promoteur EBF-1 α ,

dépendant à E2A et de STAT5 (et donc à l'IL-7R), et le promoteur EBF-1 β , dépendant d'autres FT comme Pax-5 ou PU.1 (**Figure 15A**). Roessler et al vont plus loin dans l'identification des promoteurs d'EBF-1. Le promoteur EBF-1 α permettrait la première induction de la différenciation B en phase pré-pro-B et pro-B, et EBF-1 β permettrait le maintien de son expression tout au long de la différenciation B. Les données sont ainsi cohérentes avec une fonction transitoire de signalisation par l'IL-7 qui favorise l'expression de EBF-1 et, à son tour, Pax-5.

L'absence d'E2A dans un modèle *in vivo* provoque une déplétion des progéniteurs de cellules B (Nutt and Kee, 2007). Ce mécanisme est lié à la diminution importante d'expression d'EBF-1 dans la cellule.

Pax-5 est un FT majeur pour la différenciation B, régulé directement par EBF-1 et indirectement par E2A (qui régule EBF-1) (**Figure 14**). Pax-5 est exprimé de façon importante et son expression est stable tout au long de la différenciation B, du stade pro-B jusqu'à sa régulation négative dans les cellules plasmablastiques. Dans un modèle *in vivo* KO pour Pax-5^{-/-}, le développement des cellules B est arrêté avant le stade pré-B précoce, caractérisé par l'expression de nombreux transcrits spécifiques des cellules B et des réarrangements de D_H-J_H au locus IgH (Nutt and Kee, 2007). Curieusement, bien que les cellules pro-B Pax-5^{-/-} soient incapables de se différencier en cellules B matures, elles peuvent être cultivées indéfiniment *in vitro* en présence d'IL-7 et d'un support de cellules stromales. On peut alors définir que l'expression importante de Pax-5 est un marqueur moléculaire d'entrée dans la phase pré-B précoce. De plus, il a été montré que les cellules pro-B Pax-5^{-/-} expriment de nombreux gènes associés à une différenciation non B (Delogu et al., 2006). La réexpression de Pax-5 dans ces cellules pro-B Pax-5^{-/-} réprime l'expression des gènes non B. De ce fait, Pax-5 oriente la différenciation cellulaire B en réprimant les gènes associés à une autre lignée cellulaire. Il cible majoritairement des gènes associés à la signalisation cellulaire et à des composants du pré-BCR et du BCR (CD19, CD79a ou λ 5) (**Figure 14**).

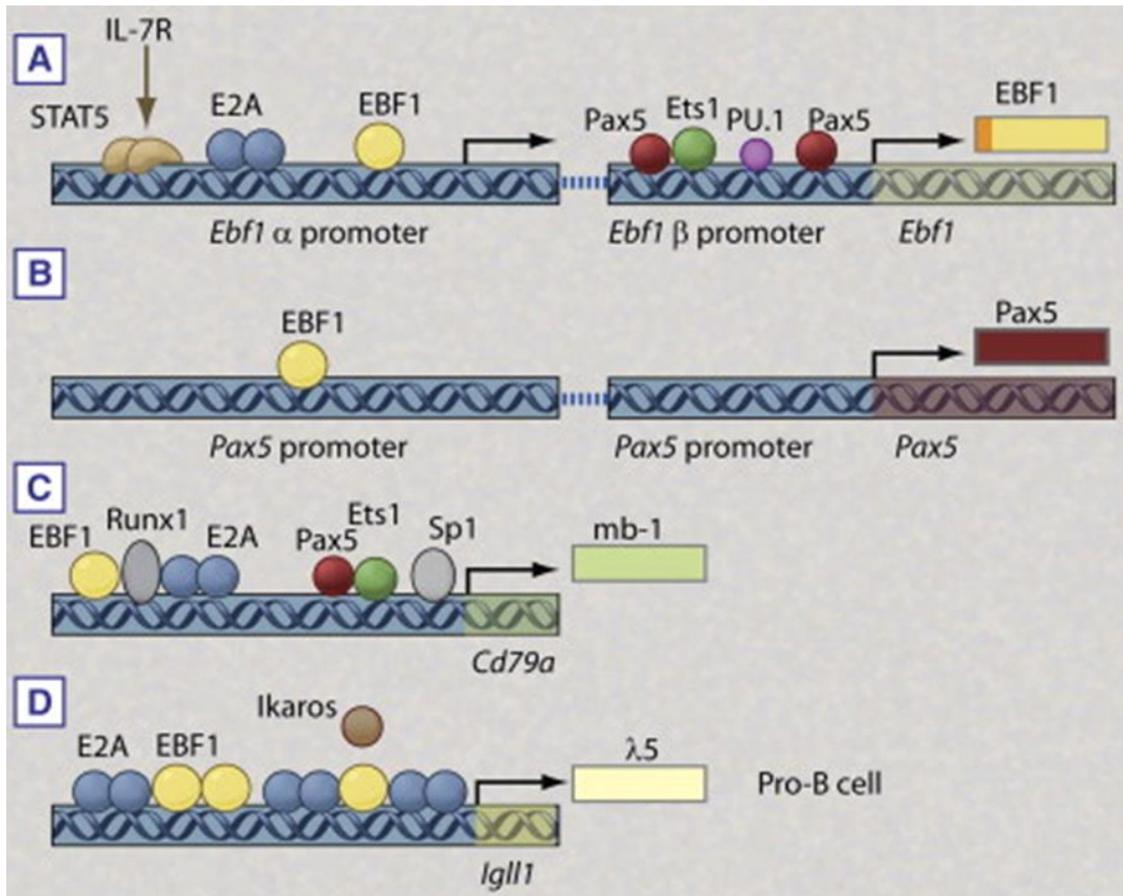


Figure 15 : Représentation des différents sites de fixation pour les facteurs de différenciation B permettant l'expression des gènes EBF-1 (A), Pax-5 (B), CD79a (C) et la SLC $\lambda 5$ (Nutt and Kee, 2007)

La différence entre le stade pro-B tardif et pré-B précoce est l'expression à la membrane du pré-BCR. Cette expression membranaire déclenche de nombreux processus intracellulaires.

I.2.f. Du stade pré-B au lymphocyte B immature

Le stade du lymphocyte pré-B est caractérisé par l'expression à la membrane d'un pré-BCR, composé des chaînes $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ (également appelées CD79a et CD79b), de la chaîne lourde d'Ig, $Ig\mu$, et des chaînes légères de substitution (SLC : *surrogate light chain*) : $\lambda 5$ et V_{preB} (Figure 16). Le pré-BCR permet d'établir la signalisation conduisant aux réarrangements des chaînes légères des Ig et à l'expression de l'IgM fonctionnelle à la surface du LB.

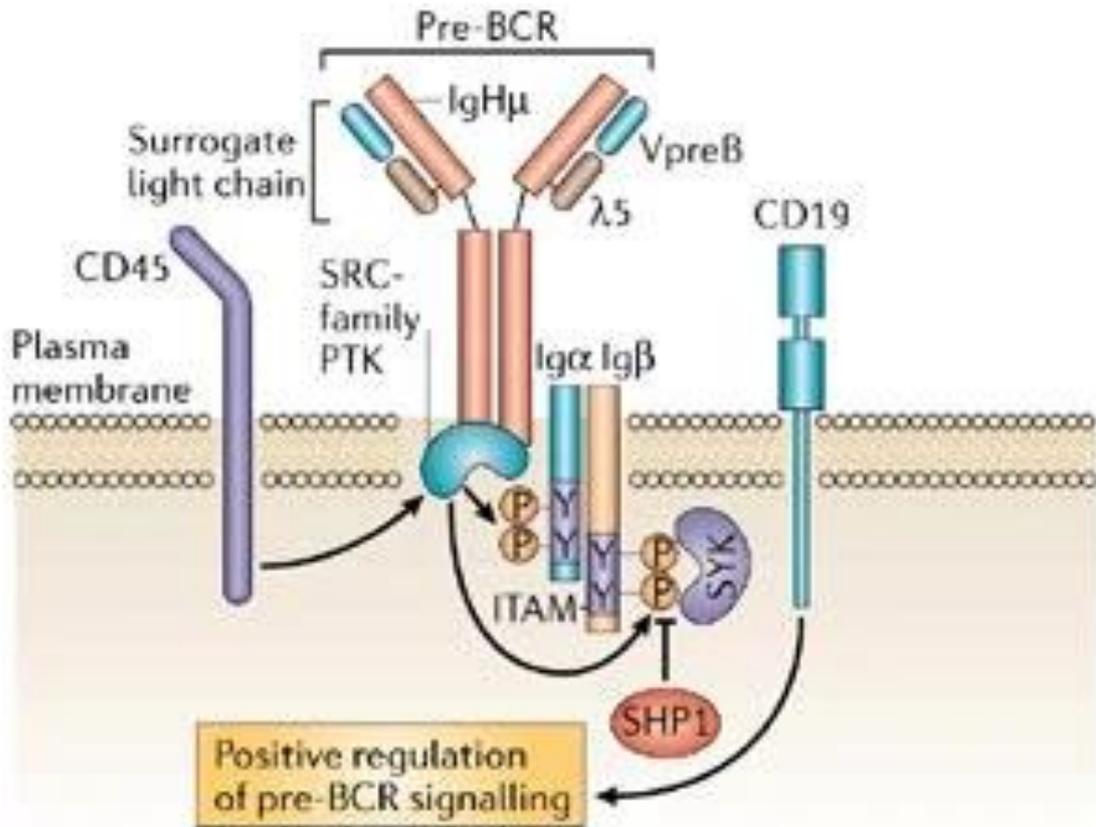


Figure 16 : Structure d'un pré-BCR (Monroe, 2006)

Cependant, préalablement à cette voie de signalisation, à la sortie du stade pro-B, les cellules entrent dans une nouvelle phase de prolifération. Cette phase est similaire à celle observée en phase pro-B précoce et fait intervenir les mêmes acteurs à l'exception de la voie STAT5. La phase de prolifération pré-B est en revanche plus importante et plus « rapide » que celle réalisée en phase pro-B. Elle entraîne un changement morphologique de la cellule (augmentation de la taille) et un changement métabolique. Ce changement fait écho au nom attribué lors de leur caractérisation : large pré-B. Voyons maintenant les principaux mécanismes impliqués dans l'établissement de cette phase de prolifération ainsi que la signalisation et le rôle du pré-BCR dans l'émergence d'un LB mature.

Prolifération intensive : la phase large pré-B

Similairement à la prolifération en phase pro-B précoce, la prolifération en phase large pré-B fait intervenir la voie PI3K-AKT. Cependant, au cours de cette phase, la voie de signalisation déclenche en partie les modifications morphologiques et métaboliques observées. Dans un premier temps, PI3K active la croissance cellulaire et la machinerie bioénergétique nécessaires pour soutenir la division cellulaire rapide. En aval de PI3K, l'activation coordonnée de AKT par les deux protéines PDK1 (*pyruvate déshydrogénase kinase 1*) et mTORC2 (*mammalian*

target of rapamycin complex 2) aboutit à une augmentation d'expression du transporteur de glucose 1 (GLUT1 = *glucose transporter 1*, également connu sous le nom de SLC2A1) et favorisant ainsi l'absorption cellulaire de glucose (Ward and Thompson, 2012).

Cependant, un acteur joue un rôle majeur dans la phase de prolifération pré-B : le FT c-Myc. En effet, il a été démontré que l'induction de c-Myc au sein d'un modèle cellulaire de progéniteur B chez la souris entraîne une augmentation de la taille et de la synthèse protéique de la cellule (Iritani and Eisenman, 1999). La voie d'action de c-Myc agit en synergie avec celle de PI3K-AKT. En effet, c-Myc inhibe le gène PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), et induit la synthèse de la cycline D3. L'inhibition de PTEN est réalisée par le complexe miRNA-17 (*micro RNA 17*) activé par c-Myc (Dang, 2012). PTEN participe à la régulation du cycle de division cellulaire en empêchant les cellules de se diviser trop rapidement et de façon incontrôlée par l'activation de la protéine pro-apoptotique Bim.

Contrairement à la phase pro-B, cette phase de prolifération pré-B est très importante mais aussi très rapide. Elle ne compte au maximum que 4 ou 5 divisions (Clark et al., 2014). En effet, l'activation du pré-BCR et des cascades de signalisation associées interviennent peu de temps après le début de la phase de prolifération.

Le pré-BCR est composé d'une chaîne lourde, appelée chaîne I μ , qui est associée aux SLC et aux récepteurs CD79a et CD79b. L'activation de la signalisation du pré-BCR n'est pas clairement élucidée. Les récepteurs CD79a et CD79b possèdent des régions ITAM, qui seront phosphorylées par une enzyme kinase de la famille des SRC. Cette phosphorylation entraîne l'activation de la cascade de signalisation du pré-BCR en recrutant les protéines BLNK (*B cell linker protein*), BTK (*Bruton tyrosine kinase*) et la PLC γ 2 (phospholipase C γ 2) (Clark et al., 2014; Xu et al., 2006). Le rôle de cette voie de signalisation a pour but de limiter la prolifération et d'engager la cellule vers la reprise de la différenciation (**Figure 13**).

En parallèle, l'activation du pré-BCR permet également l'activation de la voie RAS/MAPK. L'activation de cette voie permet, à ce stade très précisément, l'induction de la protéine Aiolos (également appelée *Ikaros zinc finger family 3*), une protéine en doigts de zinc de la famille d'Ikaros. La protéine Aiolos renforce l'effet initié par les protéines BLNK, BTK et PLC γ 2 en inhibant l'expression de *c-Myc* et de *Ccdn3* (Nutt and Kee, 2007). Aiolos et Ikaros, en fin de phase pré-B tardif, permettent l'arrêt de la signalisation du pré-BCR et la répression de son expression à la membrane du lymphocyte pré-B.

La voie du pré-BCR : de la phase pré-B tardive au lymphocyte immature

La voie du pré-BCR s'oppose directement à celle de l'IL-7R α : elle permet la différenciation terminale du lymphocyte pré-B tandis que celle de l'IL-7R permet sa prolifération. Après avoir décrit toutes les cascades de signalisation permettant la répression de la prolifération, voyons maintenant les voies permettant le réarrangement des chaînes légères et l'expression à la surface d'une IgM membranaire.

De nouveau, la poursuite de la différenciation est sous la gouvernance de la voie RAS/MAPK, qui permet l'expression importante du FT E2A tout en réprimant l'expression de son inhibiteur ID3 (inhibiteur de liaison à l'ADN 3) (Mandal et al., 2009). La protéine E2A est alors disponible pour se fixer au niveau des sites d'ouverture du locus codant les chaînes légères kappa : E κ i (*IGK intronic enhancer*) et E κ 3' (*IGK 3' enhancer*) (Bl et al., 2000).

En plus de E2A, la voie du pré-BCR, par l'intermédiaire de la protéine BLNK, induit l'expression de deux FT : IRF4 et IRF8 (*Interferon regulatory factor*) (Johnson et al., 2008). Ces deux FT permettent une reconnaissance accrue du site d'ouverture du locus E κ 3'. Ils ont un rôle synergique avec E2A. IRF4 et IRF8 se lient également aux sites d'ouverture du locus E λ et sont des régulateurs cruciaux de la transcription et de la recombinaison du locus IGL au sein des cellules pré-B (**Figure 17**).

L'induction de la protéine BLNK permet également l'inhibition de la voie PI3K/AKT (activée par l'IL-7R). Cette voie inhibe l'expression de la protéine FOXO, réprimant ainsi l'inhibition de l'expression du FT Ikaros (Heizmann et al., 2013; Reynaud et al., 2008) et donc des enzymes RAG-1 et RAG-2 (Amin and Schlissel, 2008). L'inhibition de la voie PI3K/AKT permet alors de rétablir l'expression de FOXO et donc l'expression des recombinases. Les recombinases sont alors disponibles pour la recombinaison V κ -J κ du locus kappa ou V λ -J λ du locus lambda (**Figure 17**) (Johnson et al., 2008).

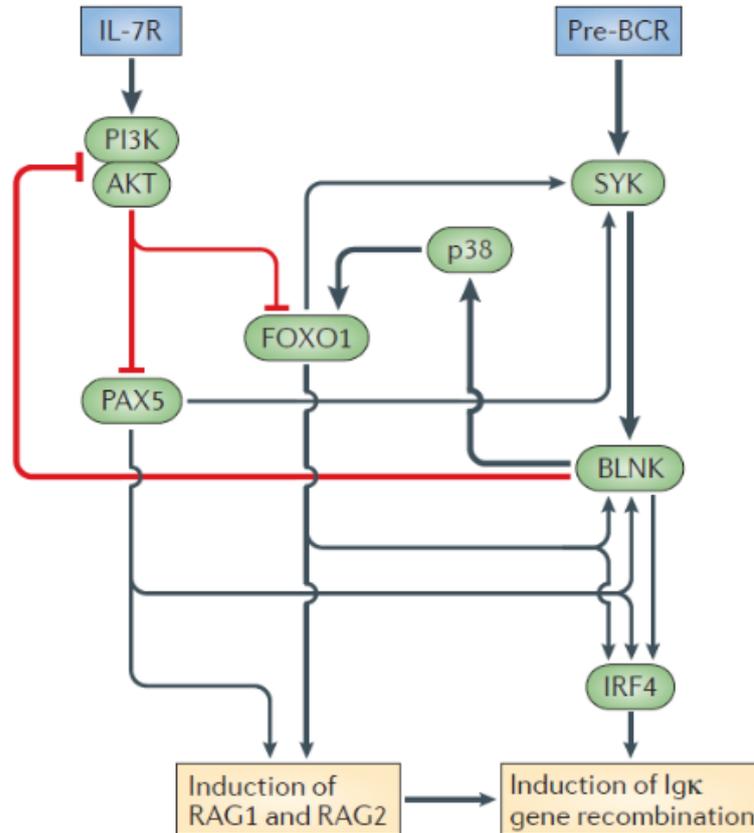


Figure 17 : Représentation de l'opposition des voies de signalisation du pré-BCR et de l'IL-7R (Clark et al., 2014)

Dès l'obtention d'une recombinaison du locus IGK fonctionnelle et l'expression de chaînes légères kappa associées à la chaîne lourde I μ , la cellule est appelée LB immature. À ce stade, les FT IRF4 et IRF8 activent les protéines aux doigts de zinc Ikaros et Aiolos. Ces protéines répriment les voies de signalisation du pré-BCR et son expression à la membrane (Ma et al., 2008, 2010). Les chaînes légères associées aux chaînes lourdes forment le BCR mature. Celui-ci est alors exprimé à la membrane. La cellule B peut alors quitter le compartiment médullaire pour rejoindre la circulation sanguine puis migrer vers un organe lymphoïde secondaire afin de devenir une cellule sécrétrice d'Ac ou une cellule B mémoire.

Dans le compartiment des cellules B immatures, le destin des cellules est déterminé par la spécificité antigénique du répertoire naïf du BCR. Contrairement au pré-BCR qui base sa cascade de signalisation sur la voie RAS/MAPK, celle du BCR est basée sur celle de la voie PI3K/AKT (comme pour IL-7R) (Tze et al., 2005). Comme décrit précédemment, la voie PI3K/AKT réprime l'expression de la protéine FOXO et donc de l'expression d'Ikaros et des enzymes RAG-1 et RAG-2 (Amin and Schlissel, 2008). Lors de la reconnaissance des auto-Ag avec une intensité trop importante, il y a modulation à la baisse de l'expression de surface du

BCR, ce qui conduit à une inhibition de la voie PI3K/AKT. Par conséquent, l'inhibition de RAG est levée et les cellules reprennent certaines caractéristiques des cellules pré-B, dont celle de pouvoir procéder aux réarrangements des gènes des loci des chaînes légères. Ce mécanisme permet donc le réarrangement des loci IGK et IGL restants disponibles et la perte de reconnaissance aux Ag du soi.

I.2.g. Localisation spatiale et progression de la différenciation B

Au cours de la lymphopoïèse B, la cellule B se différencie dans plusieurs zones. Comme décrit dans la partie I.2.b.ii, les cellules composant la niche hématopoïétique n'ont pas le même rôle et n'ont pas le même sécrétome. Au cours de la différenciation, les cellules B vont donc migrer vers différentes niches optimisées pour leur stade de différenciation. Ces dernières fourniront les cytokines nécessaires à l'évolution dans leur voie de différenciation.

Ce positionnement est capital et très bien décrit au stade pré-B. En effet, les CSM exprimant l'IL-7 renforce la transition d'un destin dirigé par l'IL-7R vers un autre déterminé par le pré-BCR (Ochiai et al., 2012). En effet, la moelle osseuse contient, au sein de niches distinctes, des cellules exprimant fortement l'IL-7 (IL-7^{hi}) et d'autres faiblement (IL-7^{low}) (Zehentmeier and Pereira, 2019). En aval de la voie du pré-BCR, l'IRF4 induit l'expression du CXCR4, qui confère une réactivité au CXCL-12 (Johnson et al., 2008). Les CSM exprimant le CXCL-12 sont éloignées de celles exprimant l'IL-7. Le facteur CXCL-12 étant chimioattractant, l'expression de CXCR4 faciliterait donc le déplacement des cellules pré-B vers les niches IL-7^{low} permettant l'atténuation de la voie de l'IL-7R (**Figure 18**).

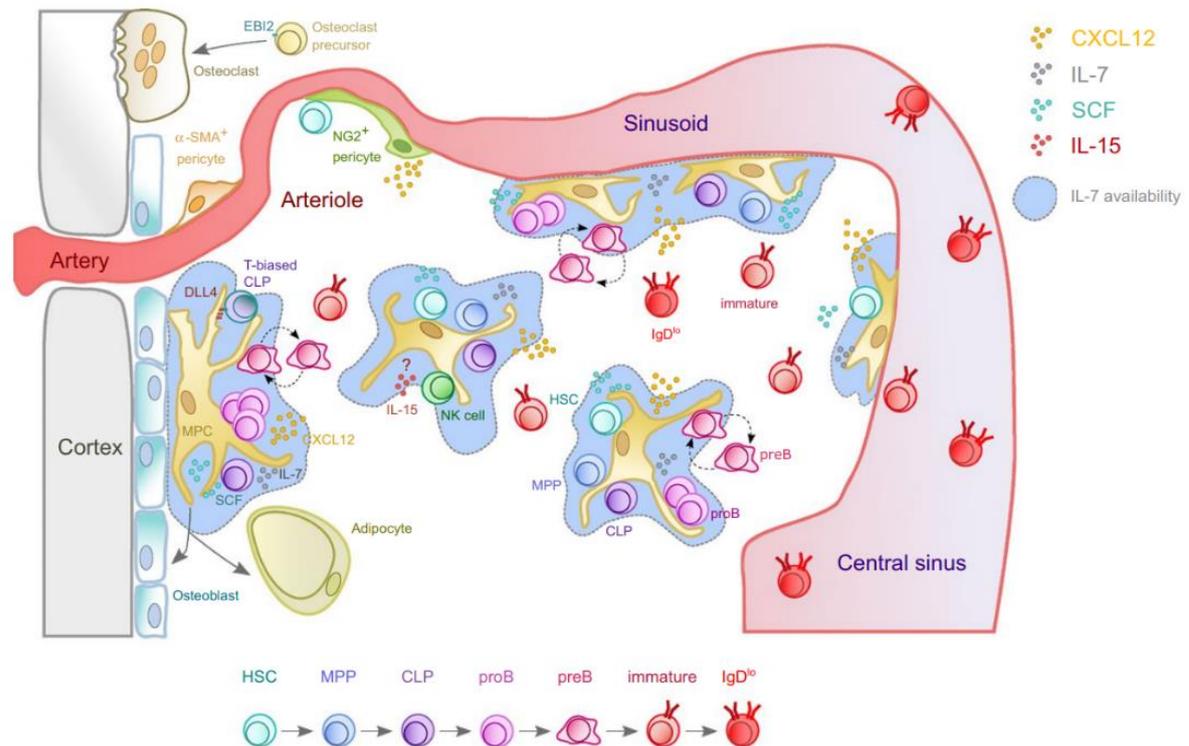


Figure 18 : Mouvement des progéniteurs B à travers des niches successives de moelle osseuse (Zehentmeier and Pereira, 2019)

I.3.Lymphocytes B périphériques : réponses immunitaires différentielles en affinité et dans le temps

Après sa maturation au sein de la moelle osseuse, le LB immature migre vers un organe lymphoïde secondaire où il termine sa différenciation vers trois grands types de LB : les lymphocytes B1, les lymphocytes de la zone marginale (MZ) et les lymphocytes de la zone folliculaire (FO). Les lymphocytes MZ et FO sont communément appelés lymphocytes B2 ou lymphocytes conventionnels. Les lymphocytes B2 représentent 90 à 95% des LB présents au sein d'organes lymphoïdes secondaires (15 % pour les MZ et 75 à 80% pour les FO) (Baumgarth, 2011). La très grande majorité des lymphocytes est retrouvée dans le compartiment vasculaire. Ces sous-groupes sont hétérogènes et peuvent être encore subdivisés en fonction de leurs rôles, de leur immunophénotypage ou encore de leurs localisations anatomiques (Vale et al., 2015).

I.3.a. Lymphocytes B2 ou conventionnels

Les lymphocytes B2 sont générés dans la moelle osseuse et poursuivent leur maturation au sein des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate). À la sortie de la moelle osseuse, les lymphocytes B2 sont testés pour évaluer leur auto-réactivité : c'est **la**

tolérance centrale. Ce processus a pour but de réduire le risque de réaction auto-immunitaire (dirigée contre les cellules du soi). Pour ce faire, plusieurs mécanismes sont mis en place : la délétion clonale, le *genome editing* et l'anergie cellulaire (**Figure 19**).

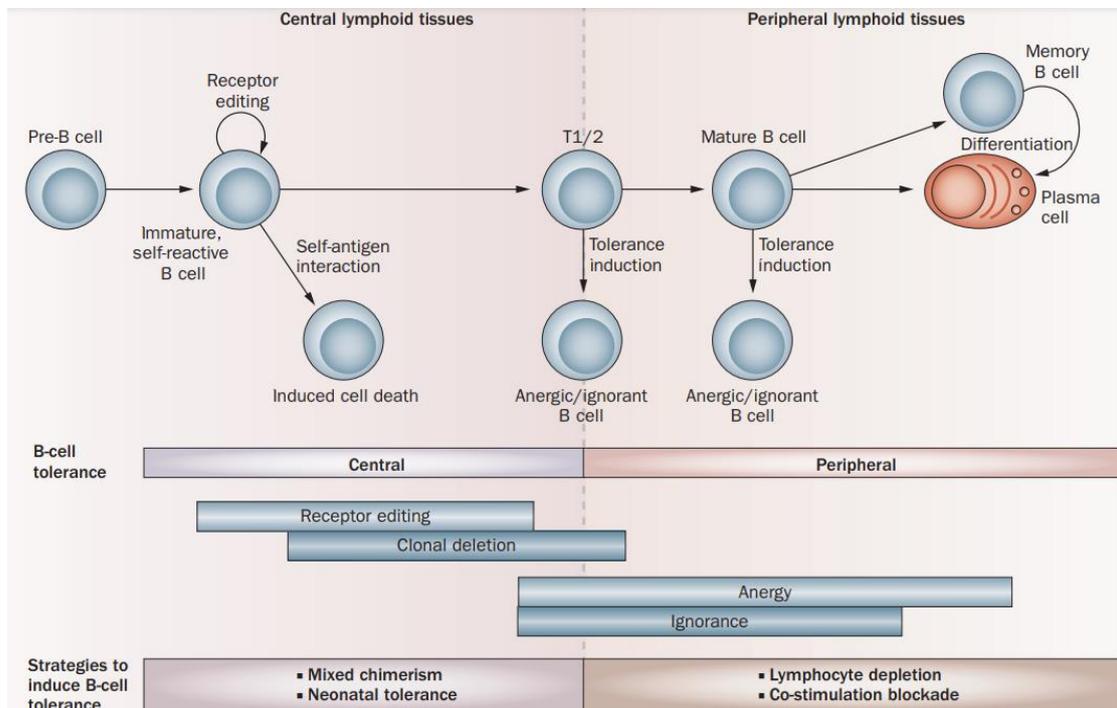


Figure 19 : Schématisation de la tolérance centrale et périphérique (Kirk et al., 2010)

Ces trois processus reposent sur la sensibilité du récepteur des cellules B (BCR, Ig membranaire présente à la surface des LB) avec les Ag du soi. Si la réponse à ce stimulus est forte alors le BCR sera internalisé. Ensuite, soit la cellule sera guidée vers son élimination par apoptose (délétion clonale), soit elle renouvellera les chaînes légères de son BCR (*genome editing*). Si la réponse est faible ou inexistante, la cellule ne sera pas non plus sélectionnée et sera guidée vers son anergie. De ce fait, une sensibilité médiane est nécessaire à la cellule B pour être sélectionnée et pouvoir migrer vers un organe lymphoïde secondaire (Goodnow et al., 2005; Kirk et al., 2010).

À la suite de cette migration, la cellule B intermédiaire (*transitional B cell* ou *T1/T2/T3*) fixera un Ag pathogène à son BCR. La cellule B naïve sera alors activée par l'interaction avec un *LT helper* ($CD4^+$). Les LB entrent alors en phase de prolifération et s'agrègent pour former un GC (**Figure 20**) proche d'une zone riche en LT. Au niveau de ce GC, les cellules B activées procéderont à un remodelage de leurs gènes codant pour les Ig. On appelle ce processus les hypermutations somatiques (HMS, en anglais SHM = *Somatic HyperMutation*). Il a pour but

de générer des cellules capables de sécréter des Ac très sensibles, très sélectifs, et de différents types (IgG, IgA...) envers l'Ag détecté (Berek et al., 1991).

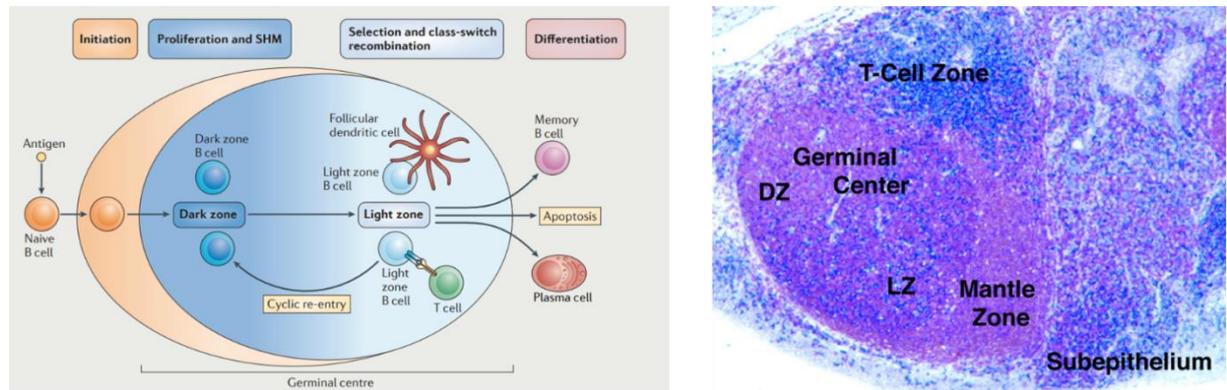


Figure 20 : Schématisation (Basso and Dalla-Favera, 2015) et coupe histologique (Klein et al., 2003) d'un centre germinatif (DZ = dark zone, LZ = light zone, mantle zone = zone du manteau, germinal center = centre germinatif)

D'un point de vue histologique, le GC contient deux zones distinctes : la zone obscure (DZ = dark zone) et la zone claire (LZ = light zone). La DZ comprend exclusivement des LB prolifératifs. En revanche, la LZ est un lieu d'interaction entre les LB activés et des cellules du système immunitaire comme les macrophages, les cellules dendritiques ou les LT.

La formation de ce GC dépend de l'activation de nombreux facteurs de transcription (FT) comme *c-Myc* (*cellular Myelocytomatosis*) et *Bcl-6*. Le FT *c-Myc* est très exprimé dans les premiers jours de formation d'un GC. Cependant, il est réprimé par la suite au sein des lymphocytes de la DZ puis réexprimé de manière transitoire au sein des cellules de la LZ. Son rôle au sein du GC est de déclencher toutes les cascades de signalisation conduisant à la prolifération cellulaire, incluant la réplication de l'ADN et la stimulation du métabolisme cellulaire. Son inhibition au sein du GC est régulée par *Bcl-6* (Dominguez-Sola et al., 2012).

Bcl-6 est également un FT très important dans l'établissement et le maintien du GC (Basso and Dalla-Favera, 2012). *Bcl-6* permet l'inhibition de l'arrêt du cycle cellulaire, l'inhibition partielle de l'apoptose et la différenciation B. Il permet également l'établissement des HMS en réduisant la sensibilité des LB à la détection des cassures de l'ADN (Basso et al., 2010). La dérégulation du FT *Bcl-6* est à l'origine de nombreuses pathologies comme l'apparition de certains lymphomes (Ci et al., 2009).

On peut également noter l'importance de nombreux autres FT, comme BACH2 (*BTB Domain And CNC Homolog 2*) ou Pax-5, qui jouent un rôle très importants dans l'activation et la prolifération cellulaires au sein du GC (Nutt et al., 2015).

Après cette prolifération intensive médiée principalement par les FT précédemment cités, la cellule B s'oriente vers la LZ où elle rentre en contact avec de nombreux acteurs de l'immunité (macrophages, LT...). La poursuite de sa différenciation est médiée par la signalisation du BCR et l'expression du FT Blimp1 (*B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1*). Ce facteur permet l'inhibition de Bcl-6, Pax-5, ou encore c-Myc. Il permet la différenciation en plasmablaste puis, après interaction avec une cellule stromale (*homing*), en plasmocyte mature sécrétant des Ac libres (Nutt et al., 2015) (**Figure 21**). Enfin, l'activation lymphocytaire entraîne la différenciation de cellules B activées en cellules B mémoires, ce qui permet une réponse immunitaire plus rapide à la suite d'une nouvelle rencontre avec cet Ag (**Figure 21**).

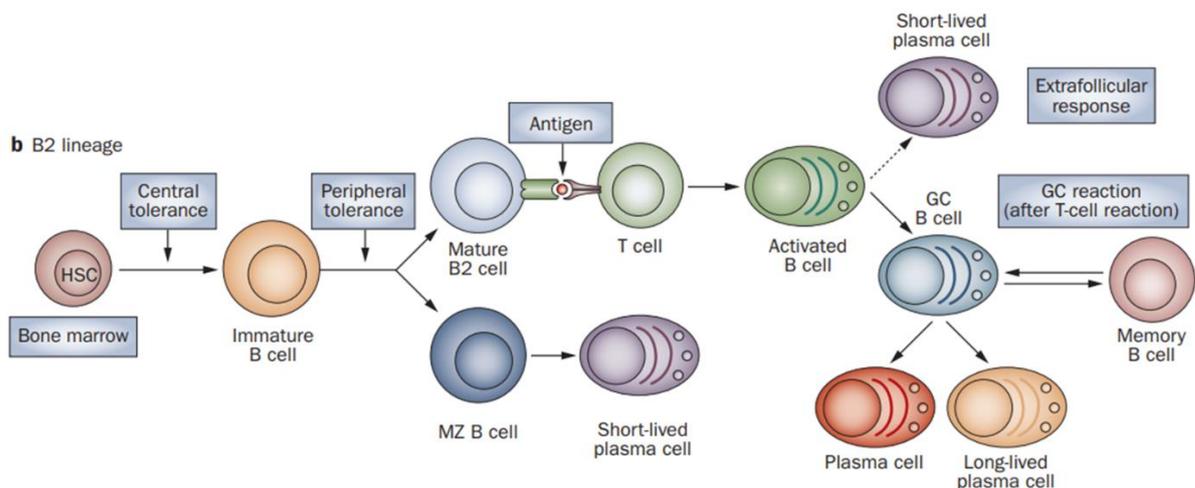


Figure 21 : Schématisation de la différenciation des lymphocytes B2 (Dörner et al., 2009)

I.3.b. Lymphocytes B1

Les lymphocytes B1 peuvent être subdivisés en deux sous-populations : les lymphocytes B1a et B1b. Chez la souris, les cellules B1a et B1b possèdent le même phénotype d'Ag de surface ($CD19^+/CD1d^+/CD23^-/CD43^+/IgM^+/IgD^{low}$) mais se différencient par l'expression du CD5 (les lymphocytes B1a sont $CD5^+$ et les lymphocytes B1b sont $CD5^-$). La différenciation des cellules B1 prend place au sein du péritoine, de la cavité pleurale et de la rate. Elles sont également retrouvées avec une fréquence très faible dans le sang périphérique, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques (Prieto and Felipe, 2017). Ces cellules sont décrites comme « *T-indépendant* », elles ne nécessitent donc pas d'activation par les LT. Les

lymphocytes B1 sont activés par des molécules pathogènes comme le LPS (Moon et al., 2012) ou la phosphorylcholine (PC, (Wilson et al., 2003)).

L'origine hématopoïétique des cellules B1 est indépendante de la voie conventionnelle de différenciation des cellules B2. Il existe deux théories expliquant l'émergence des lymphocytes B1 : la théorie de la lignée spécifique et la théorie de sélection par réactivité du BCR. Une voie de différenciation spécifique de la lignée B1 a été identifiée à partir du progéniteur lymphoïde commun, soit très tôt dans l'engagement de la cellule souche hématopoïétique dans la voie du LB. Les précurseurs B1 ont été décrits comme étant capables de se différencier spécifiquement en cellules B1 (principalement B1b) et MZ chez la souris adulte (**Figure 22**, (Esplin et al., 2009; Montecino-Rodriguez et al., 2006)).

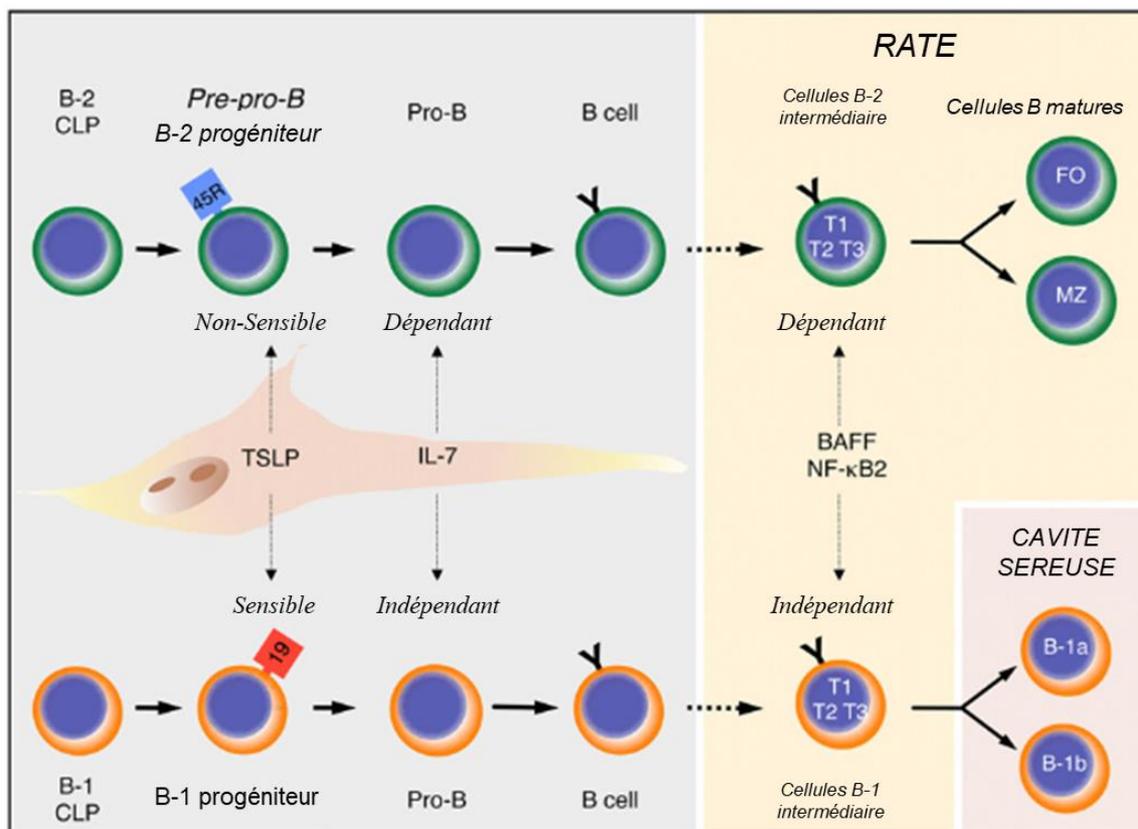


Figure 22 : Théorie de la voie spécifique de développement des lymphocytes B1 (traduit de (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012))

Les lymphocytes B1b ont un rôle qui est très peu connu et très peu détaillé. On suppose que leur rôle est similaire à celui des LB mémoires mais avec une sensibilité et une protection accrues pour certains pathogènes (Prieto and Felipe, 2017). Les seuls rôles actuellement décrits sont ceux de réponses à une infection et à une vaccination (Cunningham et al., 2014) et de défense « T-indépendant » contre les bactéries *Borrelia hermsii* (pathogène bactérien

provoquant une forte fièvre chez l'Homme, (Alugupalli et al., 2004)) et *Streptococcus pneumoniae* (bactérie responsable d'apparition de pneumonie, (Haas et al., 2005)).

L'existence des lymphocytes B1 chez l'Homme n'a été découverte que très récemment et est encore contestée par de nombreux scientifiques (Descatoire et al., 2011; Perez-Andres et al., 2011). L'identification des lymphocytes B1 par le CD5 n'est pas suffisante pour caractériser la sous-population. Ce marqueur est majoritairement utilisé pour l'identification des formes chroniques des leucémies lymphoïdes (B-CLL) (Wang et al., 1980) et de la plupart des lymphomes B (Lanier et al., 1981). En effet, contrairement à la souris, le CD5 est exprimé chez l'Homme sur les cellules B immatures dans la moelle osseuse, dans le sang et dans la rate. En 2011, Griffin et al ont identifié une population B présentant des caractéristiques similaires aux lymphocytes B1 murins dans le sang de cordon et le sang périphérique humain adulte (Griffin et al., 2011). Cette population est caractérisée par l'expression à la surface des marqueurs CD19⁺/CD20⁺/CD27⁺/CD43⁺/CD70⁻. Cette population sécrète de manière spontanée des IgM, possède très peu de HMS, et une utilisation peu diversifiée du répertoire des gènes des Ig (Griffin et al., 2011).

En résumé, les lymphocytes B1 sont une population bien décrite chez la souris. Cette sous-population cellulaire est au carrefour de l'immunité innée et adaptative. Elle permet également la sécrétion d'Ac naturels, peu spécifiques, indépendamment d'une infection par un pathogène. Leur identification chez l'Homme fait débat au sein de la communauté scientifique mais de nombreux arguments sont avancés pour expliquer leur implication dans la physiologie immunitaire humaine (Do et al., 2011; Rodriguez-Zhurbenko et al., 2019).

I.4. Le réarrangement somatique des gènes des immunoglobulines

À la fin des années 1950, Nossal et Lederberg (Nossal et Lederberg 2009, réédition 1958) ont identifié la genèse d'un Ac unique suite à l'infection d'un rat par une bactérie *Salmonelle*. Cette découverte a confirmé l'hypothèse du rôle des Ac dans la réponse immunitaire spécifique. Dans le même temps, elle a amené une autre problématique : comment l'organisme fait-il pour générer un nombre aussi important d'Ac ? En effet, si chaque infection provoque la génération d'Ac spécifiques, cela signifie qu'il y a potentiellement autant d'Ac que de d'épitopes antigéniques.

En 1976, Susumu Tonegawa et Nobumichi Hozumi ont mis en évidence la recombinaison somatique des gènes des Ig. Au cours de leur étude, ils ont comparé l'ADN cloné de cellules lymphoïdes cancéreuses murines (myélome) et l'ADN extrait d'embryon de souris par

fragmentation, migration sur gel d'agarose, et hybridation des ARNm codant les chaînes légères kappa sur l'ADN. Sur cet ADN d'embryon de souris, ils ont retrouvé les segments variables (V) et la partie constante (C) des chaînes lourdes des Ig. Ces deux segments étaient associés sur l'ADN des cellules myélomateuses. Ils ont conclu que les réarrangements somatiques des gènes sont un processus fondamental à l'acquisition de la diversité des Ig. Cette découverte a valu à Susumu Tonegawa le Prix Nobel de médecine en 1986.

Nous l'avons vu, la réponse immunitaire adaptative repose sur la reconnaissance spécifique de l'Ag par le BCR ou Ig de surface. La diversité du répertoire des BCR a pour origine la recombinaison de segments de gènes qui, en s'associant, codent la partie variable des chaînes lourdes et légères des Ig. L'association des deux chaînes légères et chaînes lourdes permet la formation du paratope spécifique d'un épitope antigénique.

I.4.a. La recombinaison conventionnelle V(D)J

Au cours de sa différenciation, la cellule B en devenir subit des modifications morphologiques et physiologiques ainsi que des réarrangements des gènes codants pour les chaînes lourdes et légères des Ig. Une série d'événements recombinatoires spécifiques, appelés recombinaison V(D)J, assemble les segments géniques permettant *in fine* l'expression des récepteurs pour Ag à partir d'un nombre restreint de segments de gènes. Le processus de recombinaison V(D)J peut être divisé en deux étapes hautement coordonnées : le clivage et la réparation de l'ADN. La recombinaison V(D)J est le mécanisme moléculaire permettant l'acquisition de la diversité du répertoire des BCR des LB néoformés.

I.4.a.i Organisation des loci IGH et IGL

La majorité des études concernant l'exploration du répertoire des gènes des Ig est réalisée sur modèles murins. Bien que les loci IGH, IGL et IGK soient similaires sur de nombreux points, principalement en ce qui concerne les mécanismes de recombinaison, l'organisation des gènes des Ig est très différente entre les espèces. Chez l'Homme, le locus IGH est situé sur le chromosome 14 et code pour la chaîne lourde des Ig, le locus IGK est situé sur le chromosome 2 et code pour la chaîne légère κ , et le locus IGL est situé sur le chromosome 22 et code pour la chaîne légère λ . Ces loci sont composés de segments géniques de variabilité, de diversité (uniquement pour le locus IgH), de jonction et de segments codant la partie constante.

Le locus IGH s'étend sur 1250 kbp et se compose de 123 à 129 segments de variabilité dont seuls 36 à 49 sont fonctionnels (regroupés en 7 familles de V_{H1} à V_{H7}), de 27 segments de

Partie I : Introduction et état de l'art

diversité (regroupés en 7 familles de D_{H1} à D_{H7}), de 9 segments de jonction (J_H) et de 11 gènes codant la partie constante (C_H) (**Annexe 1A**) (Lefranc and Lefranc, 2020).

Le locus IGL s'étend sur 1050 kbp et se compose de 73-74 gènes de variabilité dont seuls 29 à 33 sont fonctionnels (regroupés en 11 familles de $V_{\lambda 1}$ à $V_{\lambda 11}$) puis de 11 gènes de jonction (J_{λ}) et de 11 gènes codant pour la partie constante (C_{λ}), dans un motif $J_{\lambda} - C_{\lambda} - J_{\lambda} - C_{\lambda} \dots$ (**Annexe 1A**) (Lefranc and Lefranc, 2020).

Le locus IGK s'étend sur 1820 kbp et se compose de 76 gènes de variabilité dont seuls 37 à 41 sont fonctionnels (regroupés en 7 familles de $V_{\kappa 1}$ à $V_{\kappa 7}$, **Figure 23**), de 5 gènes de jonction ($J_{\kappa 1}$ à 5, **Figure 23**) et d'une partie constante (C_{κ} , **Figure 23**). Les gènes IGKV sont organisés en deux régions distinctes, séparées par environ 800 kbp : le locus distal et le locus proximal. Le locus distal, à l'extrémité 5' (centromérique), est composé de 36 gènes, nommés par un chiffre représentant leur famille (de 1 à 7), de la lettre D (pour distal), suivi d'un chiffre permettant l'identification du gène au sein de la famille (exemple : IGKV2D-40). À l'extrémité 3' (télomérique), le locus proximal est composé de 40 gènes de variabilité (possédant une nomenclature similaire au locus distal, à l'exception du D), de gènes de jonction et de l'unique gène codant la partie constante. De part et d'autre du gène de la partie constante se trouvent les deux enhancers conventionnels $E_{\kappa 1}$ et $E_{\kappa 3'}$ régulant l'accessibilité du locus en phase pré-B (voir I.4.c) (Lefranc and Lefranc, 2020).

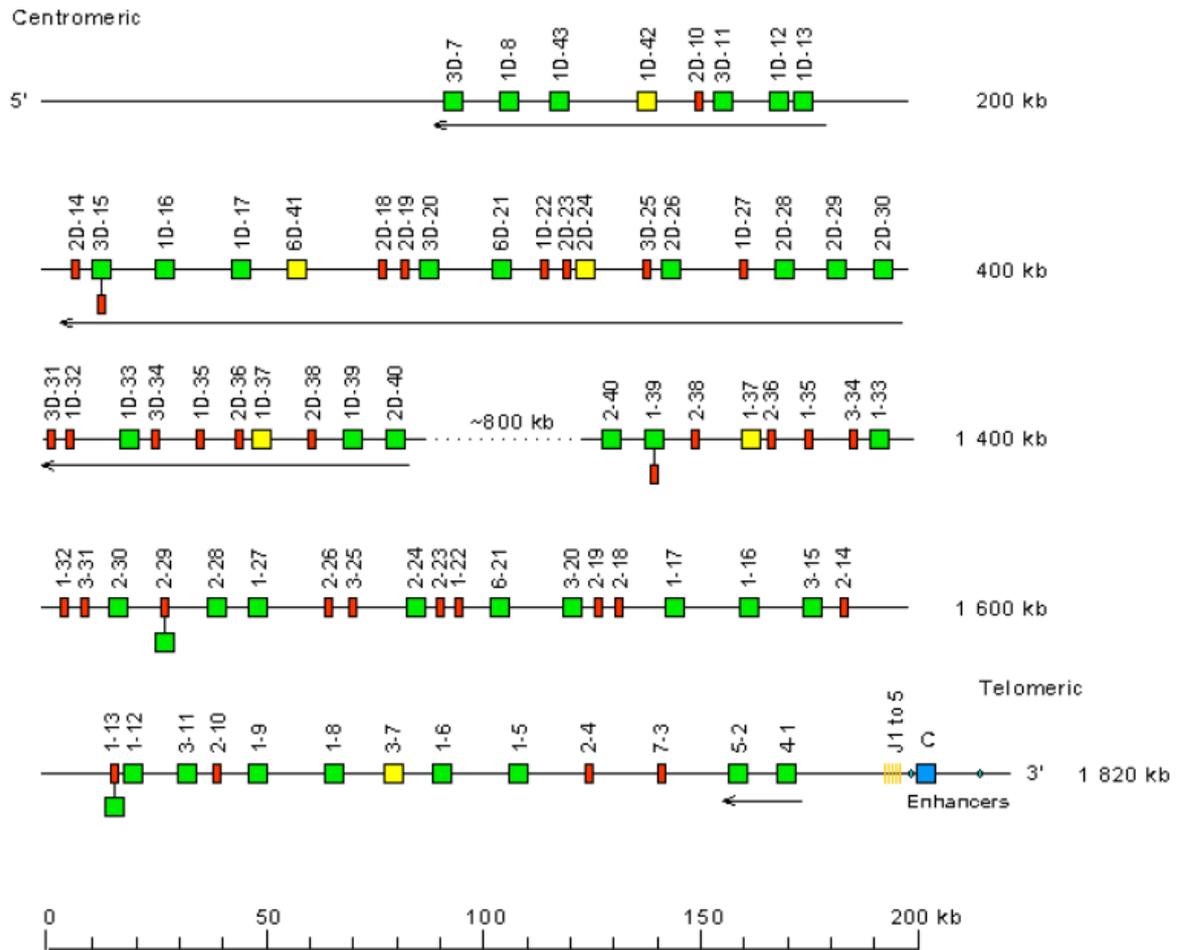


Figure 23 : Représentation du locus IGK humain (Lefranc and Lefranc, 2020).

Les carrés verts représentent les gènes V fonctionnels, les rouges sont des pseudogènes (non fonctionnels), et les jaunes ne sont pas encore déterminés.

I.4.a.ii Mécanismes moléculaires de la recombinaison V(D)J

L'organisation des différents loci permet la synthèse des chaînes lourdes (IGH) et légères (IGK et IGL) des Ig. Ces loci sont composés de fragments géniques de variabilité, de diversité (uniquement pour le locus IGH), de jonction et codant la partie constante. Voyons maintenant les mécanismes moléculaires qui rendent possibles l'expression d'un ARNm complet codant pour les chaînes lourdes et légères κ .

Les acteurs de la recombinaison V(D)J

Au sein d'un locus vierge de toutes recombinaisons (également appelé en conformation germinale), les différents segments géniques sont suivis (V), précédés (J) ou encadrés (D) par des séquences signal de recombinaisons (RSS : *Recombination sequence signal*). Une RSS est composée de deux séquences hautement conservées : une séquence héptamérique (séquence consensus 5'-CACAGTG -3') et une séquence nonamérique (séquence consensus 5'-

ACAAAACC-3'), séparée par une séquence d'acides nucléiques (également appelée *spacer*) dont la longueur de 12 ou 23 paires de bases est conservée mais dont la séquence est très variable. La taille du *spacer* définit son appellation : 12RSS et 23RSS respectivement (Little et al., 2015). Des études *in vitro* étudiant l'effet de ces séquences sur la recombinaison ont montré qu'une recombinaison optimale associait exclusivement une 12RSS avec une 23RSS (Nadel et al., 1998) : c'est la règle 12/23 d'appariement des RSS. Par exemple, au sein du locus IGK tous les segments IGKV sont suivis d'une 12RSS et tous les segments IGKJ sont précédés d'une 23RSS. De fait, l'assemblage IGKV-IGKJ est beaucoup plus efficace que de potentiels assemblages entre deux segments IGKV ou deux segments IGKJ (**Figure 24**). Cette spécificité des RSS en fonction des segments génétiques est similaire pour les loci IGH et IGL. Concernant le locus IGH, les segments D sont encadrés à leurs extrémités 5' et 3' de 12RSS alors que les segments géniques IGHV et IGHJ sont respectivement suivis et précédés d'une 23RSS.

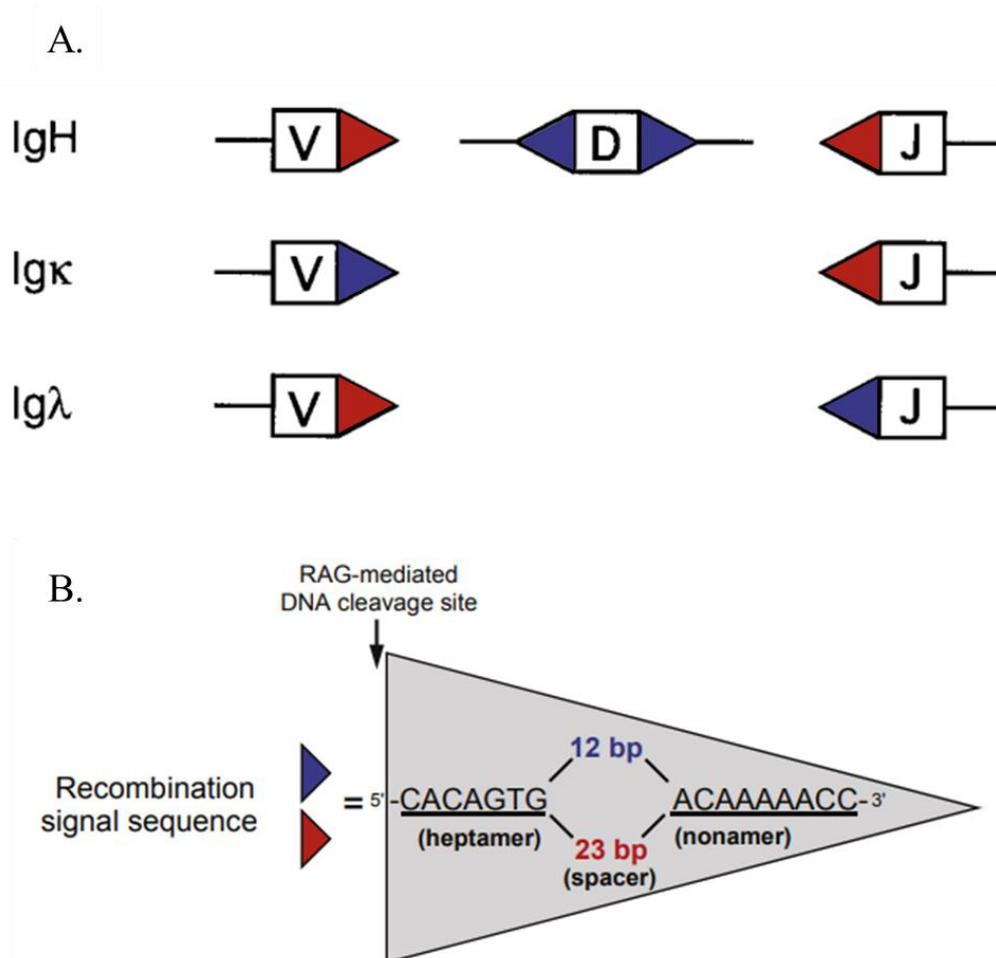


Figure 24 : Organisation des RSS au sein des loci IGH, IGK et IGL (A) et composition des RSS (B) (Little et al., 2015)

Les enzymes RAG-1 et RAG-2 (*Recombination activating gene 1* ou *2*) sont des protéines spécifiques de la lignée lymphoïde assurant le réarrangement des segments géniques après reconnaissance et appariement des séquences consensus heptamériques. L'effet biologique de ce complexe enzymatique est très important. En effet, l'expression transitoire de ces deux enzymes dans une lignée fibroblastique permet l'avènement de réarrangements *de novo* (Oettinger et al., 1990). De plus, l'inhibition de l'une des deux enzymes dans un modèle murin KO conduit à une inhibition de l'expression d'un pré-BCR ou d'un BCR fonctionnel à la surface des LB. En effet, dans un modèle de souris RAG-1^{-/-}, une inhibition de l'enzyme RAG-1 provoque un blocage de la différenciation en phase pro-B (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992). La fonction enzymatique des protéines RAG est d'assurer l'appariement des RSS puis de couper l'ADN double brin (DSB : *double-strain break*) entre la séquence héptamérique et la séquence codante du segment génique. Il a été démontré que seuls les 3 premiers nucléotides de la séquence héptamérique (CAC) sont conservés dans près de 100% des séquences étudiées. Ces 3 nucléotides sont indispensables à la fixation des enzymes RAG et donc au clivage (Ramsden et al., 1994).

Les autres acteurs de la recombinaison V(D)J sont les protéines HMGB-1 et HMGB-2 (*high mobility group box protein 1* et *2*). Les HMGB interagissent avec les nucléosomes, les FT et les histones. Elles organisent l'ADN et régule la transcription. Après liaison, elles modifient la conformation de l'ADN et contribuent à le faire plier ce qui facilite la liaison d'autres protéines comme RAG.

Les mécanismes de recombinaison

La recombinaison V-(D)-J nécessite la présence des enzymes RAG-1 et RAG-2, d'ions divalents (Mg²⁺ ou Mn²⁺) et d'un segment d'ADN contenant une RSS. Il a été démontré qu'une source d'énergie extérieure n'est pas nécessaire au clivage de l'ADN lors d'une recombinaison portée par les enzymes RAG (McBlane et al., 1995). La recombinaison V(D)J s'initie par la formation d'un complexe de recombinaison, également appelé complexe signal (SC : *signal complexe*, **Figure 25A**), composé des protéines HMGB1, HMGB2, RAG-1 et RAG-2 au niveau d'une RSS (12 ou 23 bp en fonction du locus recombinaison).

Deux modèles s'opposent concernant la reconnaissance du second fragment génique : le modèle par capture et le modèle par association. Le premier modèle décrit que le SC reconnaît une RSS complémentaire non occupée par un complexe et s'y associe. Par exemple, dans le cas d'une fixation du SC sur une 12RSS, il y aura reconnaissance d'une 23RSS par ce même

complexe permettant la formation d'un complexe apparié (PC : *paired complexe*, **Figure 25A**). Le modèle par association émet l'hypothèse que deux SC seront générés de manière indépendante : un SC se forme autour d'une 12RSS et un second SC autour d'une 23RSS. Par la suite, ces deux complexes s'apparient pour former le PC. En proposant ce modèle en 2001, Landree et al. (Landree et al., 2001) ont observé la présence de dimères RAG-1/RAG-2 permettant deux cassures spécifiques au niveau des RSS appariées. Dans les deux modèles, l'appariement des RSS favorise la formation d'une synapse de recombinaison (**Figure 25A**).

Le clivage de l'ADN par les enzymes RAG-1 et RAG-2 se déroule en deux étapes. Premièrement, il y a une coupure à l'extrémité 5' du brin sens, au niveau de la jonction entre la partie codante et l'heptamère ; elle génère en extrémité 3' du joint codant un groupement hydroxyle (OH) et en extrémité 5' de la RSS un groupement phosphate (**Figure 25B**). Ensuite, le groupe hydroxyle de l'extrémité 3' du joint codant clive le brin antisens par transestérification (clivage du groupement phosphate de l'ADN), ce qui permet l'apparition d'une DSB avec formation d'une structure terminale en épingle à cheveux (*hairpin end coding formation*, **Figure 25B**) et d'extrémités de coupures franches (*Blunt signal end*, **Figure 25C**).

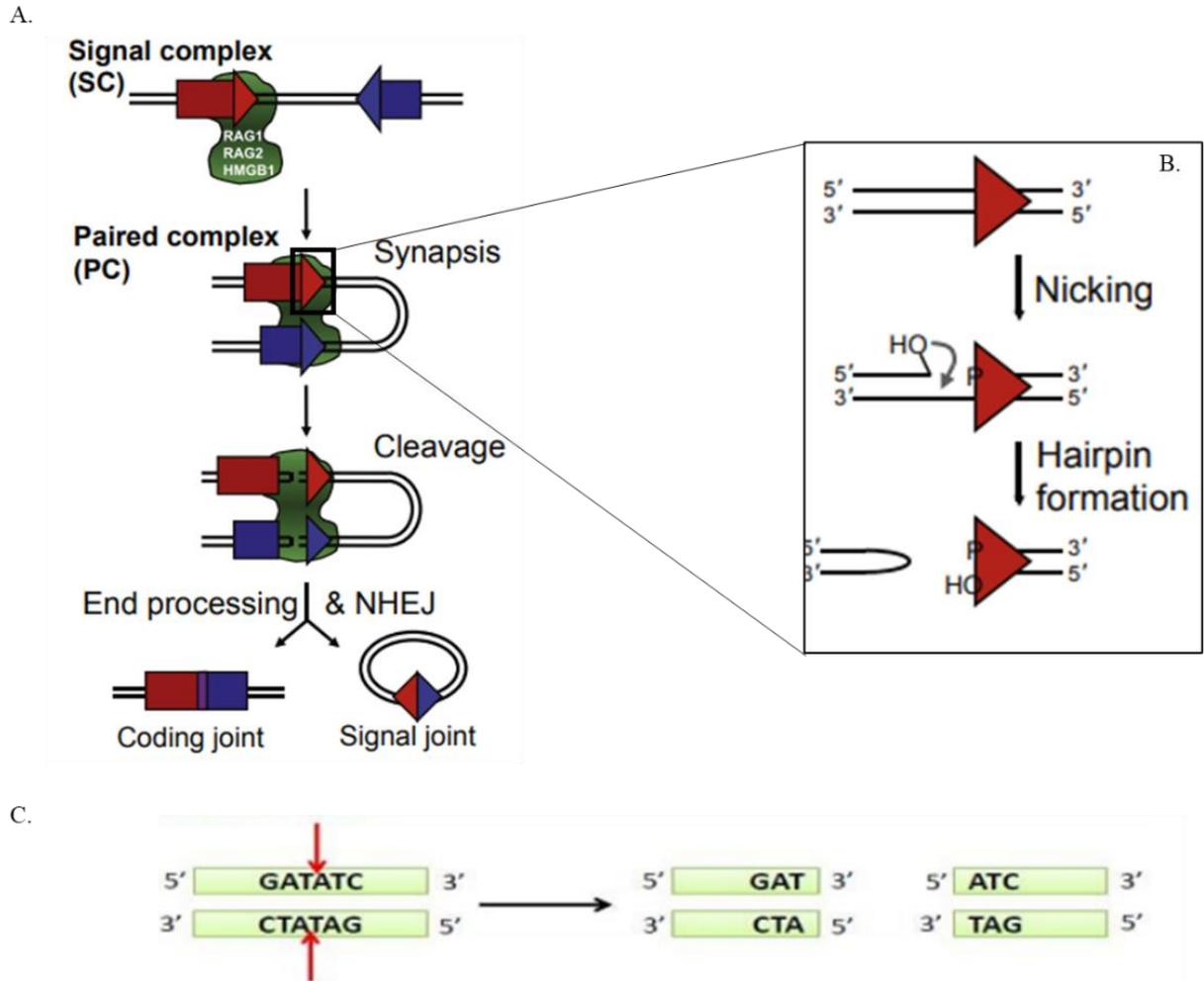


Figure 25 : Représentation schématique des mécanismes de recombinaisons (A), de la formation de la structure en tête d'épingle (B) et de la coupure en extrémités franches (C) (Little et al., 2015).

Après le clivage, les complexes enzymatiques de recombinaison et les deux sections de l'ADN double brin (une section correspondant aux RSS et au segment intergénique, et la seconde correspondant aux gènes réarrangés) s'associent à un complexe ubiquitaire de résolution des cassures double brin de l'ADN, le complexe NHEJ (*Non-homologous End Joining*). Il permet alors la réparation de l'ADN et la formation du joint codant (CJ : *coding joint*) et du joint signal (SJ : *signal joint*). Le CJ correspond à l'association des segments géniques recombines. Le SJ correspond aux RSS et aux segments intergéniques qui seront excisés de l'ADN génomique.

Le rôle des protéines HMGB1 et HMGB2 au cours de la recombinaison V(D)J est connu depuis plusieurs années. Des expériences de détection de clivage par marquage de l'ADN par l'isotope Phosphate 32 (^{32}P) a permis de mettre en évidence, dans un modèle KO pour les

protéines HMGB1/2 (HMGB1/2^{-/-}), que l'absence des protéines HMGB1 et 2 inhibait presque complètement le clivage médié par le complexe RAG-1/RAG-2 sur un substrat d'ADN 23RSS (van Gent et al., 1997; Sawchuk et al., 1997). Ces résultats ont également montré que les HMGB facilitent la reconnaissance et le clivage par le complexe RAG au niveau des 23RSS. Cependant, la fixation, la cassure et la formation de la structure en épingle à cheveux de l'ADN double brin sont possibles en présence uniquement des enzymes RAG sur un substrat d'ADN 12RSS (McBlane et al., 1995). L'équipe de Gellert et al a prouvé qu'aucune structure en épingle à cheveux n'est retrouvée lors de l'inhibition de HMGB1 (van Gent et al., 1997). HMGB1 a un rôle synergique près de 100 fois supérieur lors du clivage au niveau des 12RSS et 23 RSS au sein d'un PC (van Gent et al., 1997). Le rôle de HMGB1 et 2 au cours de la recombinaison V(D)J permet d'améliorer la formation du SC au niveau des 23RSS. HMGB1 et 2 sont des protéines non spécifiques de liaison et de flexion de l'ADN, ils déforment l'ADN au niveau des 23RSS facilitant la liaison des RAG (Gellert, 2002) (**Figure 26**). De ces résultats, il peut être conclu que les protéines HMGB1 et 2 facilitent le clivage au niveau d'un PC en « rapprochant » les sites de clivage des enzymes RAG.

À ce jour, il n'existe pas de preuve génétique qui démontrerait que HMGB1 et HMGB2 sont essentiels pour la recombinaison V(D)J *in vivo* (Swanson, 2004). En effet, un modèle KO HMGB1^{-/-} ou HMGB2^{-/-} ne provoque pas un déficit de recombinaison chez la souris (Me and A, 2005). Cependant, un double KO HMGB^{-/-} est létale, ce qui suppose ainsi de leur rôle clé au niveau de la physiologie cellulaire (Me and A, 2005). Autrement dit, seul un modèle KO conditionnel permettrait de répondre à cette hypothèse.

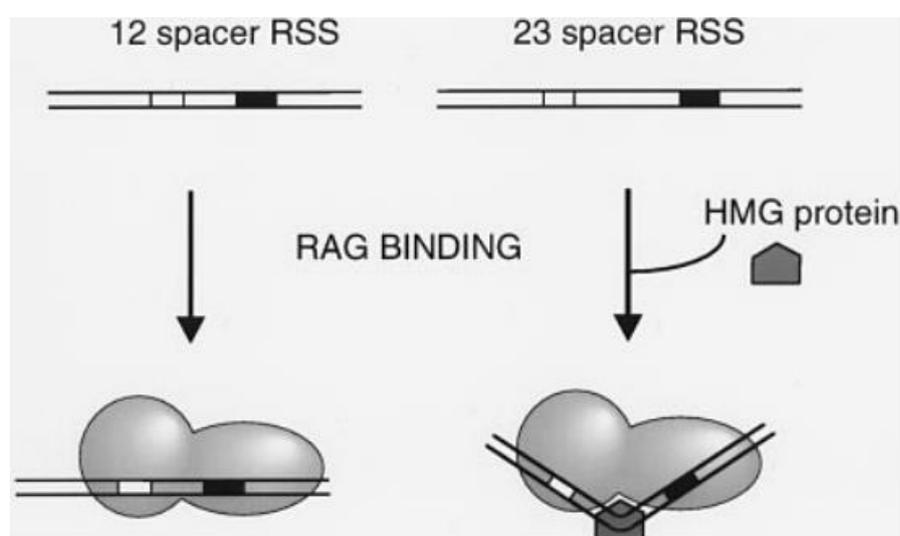
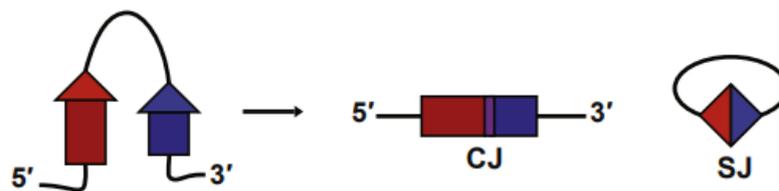


Figure 26 : Schématisation du rôle des HMGB au cours de la recombinaison (van Gent et al., 1997)

Les RSS sont l'unique élément permettant de rendre l'ADN substrat de la recombinaison. L'orientation des RSS les uns par rapport aux autres détermine le processus et le résultat de la recombinaison. Une recombinaison par délétion se produit quand l'une des RSS est orientée dans le sens de lecture 5'-3' tandis que l'autre est orientée dans le sens opposé. Ce phénomène entraîne la rétention du joint codant sur le chromosome et la suppression de l'ADN circulaire contenant le joint signal. Alternativement, la recombinaison peut conduire à l'inversion du segment intergénique entre les RSS avec rétention du SJ et le CJ sur le chromosome. Cette inversion a lieu lorsque les deux RSS se trouvent dans le même sens de lecture (Cortes et al., 1996).

(A) Deletional V(D)J recombination



(B) Inversional V(D)J recombination

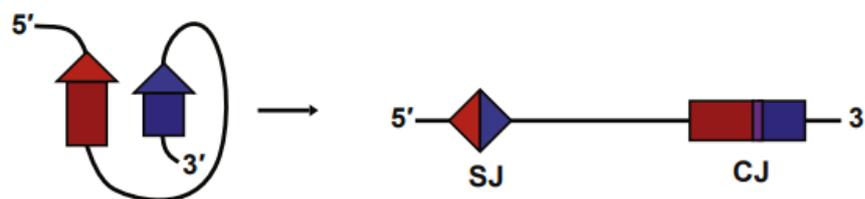


Figure 27 : Schématisation des deux mécanismes de recombinaison par délétion (A) et inversion (B) (Little et al., 2015).

Synthèse protéique de la chaîne lourde et de la chaîne légère

Au cours des différents stades de la lymphopoïèse, les voies de signalisation rendent accessibles les loci à différents stades et permettent leurs recombinaisons. La recombinaison du locus IGH commence en phase pré-pro-B et s'achève en fin de phase pro-B, induisant l'expression du pré-BCR à la membrane. La recombinaison du locus IGK s'initie en phase pré-B permettant l'expression d'un BCR mature.

La différence majeure que l'on peut observer entre le locus IGH et IGK/IGL est le nombre de réarrangements nécessaires à l'obtention d'une chaîne lourde ou légère. Le réarrangement du locus IGH débute avec l'association d'un segment génique IGHD avec un IGHJ formant un ADN réarrangé D_HJ_H. Ce segment réarrangé est associé par la suite à un segment génique IGHV

Partie I : Introduction et état de l'art

permettant la formation d'un segment exonique $V_H D_H J_H$. L'ADN réarrangé est ensuite transcrit en ARN pré-messager, puis épissé en ARNm. Après export du noyau et traduction en protéine, le peptide leader (L) est clivé et conduit à l'expression d'une chaîne lourde fonctionnelle (**Figure 28A**).

Le processus de réarrangement est similaire pour le locus IGK, à ceci près qu'une seule phase de réarrangement est observée entre un segment IGKV et un segment IGKJ pour permettre l'établissement d'un ADN exonique réarrangé $V_K J_K$ (**Figure 28B**). L'ensemble de ces mécanismes recombinatoires permet de générer la diversité du répertoire B indispensable à la reconnaissance spécifique des éléments exogènes.

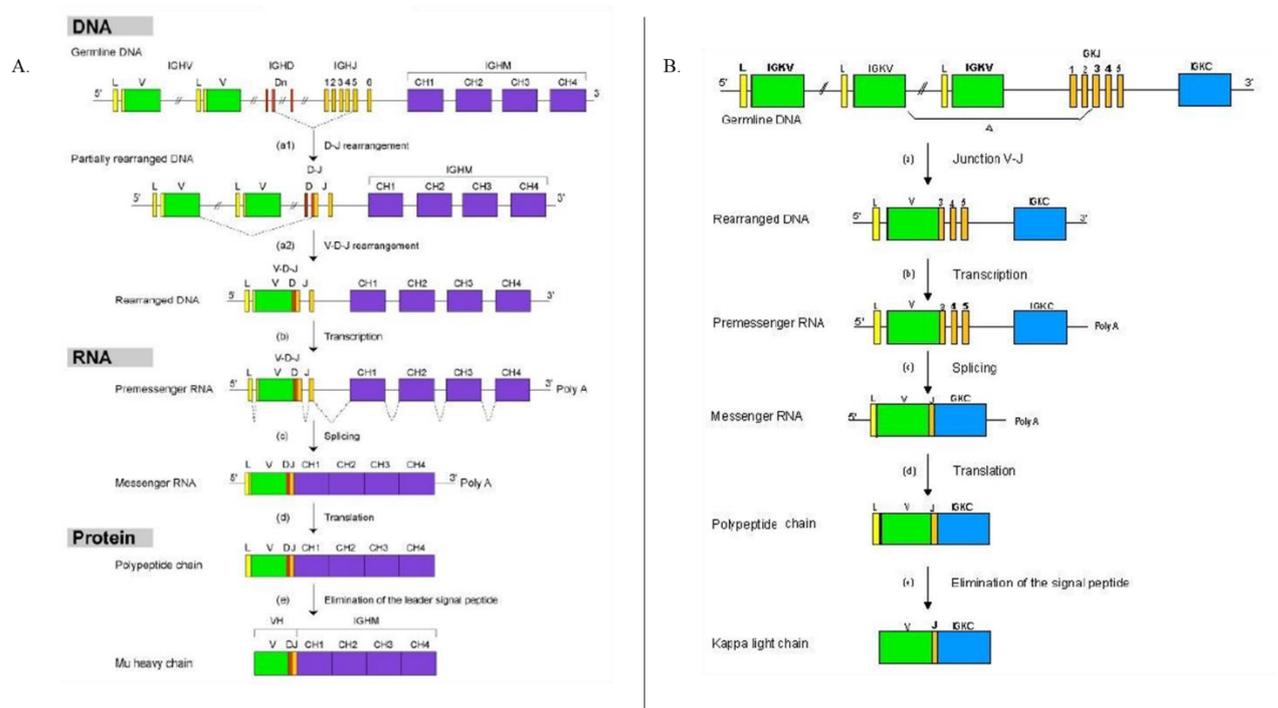


Figure 28 : Schématisation des réarrangements V(D)J au sein des loci IGH (A.) et IGK (B.) (Lefranc and Lefranc, 2020)

I.4.a.iii Diversité du répertoire et modifications post-recombinaison

En moyenne, on estime à environ 2×10^{12} le nombre de BCR unique pouvant être généré au cours de la vie d'un individu (Lefranc and Lefranc, 2020) (**Figure 29**). D'autres études statistiques avancent que ce chiffre est sous-estimé et montrent que le nombre de BCR unique généré tend vers 10^{26} possibilités (Saada et al., 2007). Cette diversité prend son origine dans deux mécanismes distincts : **la diversité combinatoire et la diversité jonctionnelle**.

La diversité combinatoire est le mécanisme d'association aléatoire des segments géniques entre eux. Les loci présentent près de 150 gènes fonctionnels répartis en plusieurs types et familles. Le nombre de possibilités de réarrangements possibles est de 6300 pour le locus IGH, 185 pour le locus IGK et 165 pour le locus IGL (Collins and Jackson, 2018; Lefranc and Lefranc, 2020). La diversité combinatoire permet donc elle seule l'établissement de $2,2 \times 10^6$ BCR différents. La diversité jonctionnelle permet l'acquisition de la N-diversité lors de la recombinaison de 2 segments géniques. Cette N-diversité correspond à l'addition aléatoire de 2 à 15 nucléotides entre deux segments géniques recombinaisonés par la *Terminal deoxynucleotidyl Transferase* (TdT). Certaines mutations somatiques spontanées au niveau de segments géniques peuvent également augmenter les possibilités d'apparition d'un BCR unique.

La combinaison de ces deux diversités permet d'émettre l'hypothèse que la probabilité que deux BCR générés par deux cellules B distinctes soient identiques est presque nulle. En sachant que le nombre de LB générés par un être humain est inférieur à 10^{12} cellules (Bianconi et al., 2013), chaque cellule B possède donc un unique BCR permettant une reconnaissance spécifique d'un unique Ag (Collins and Jackson, 2018).

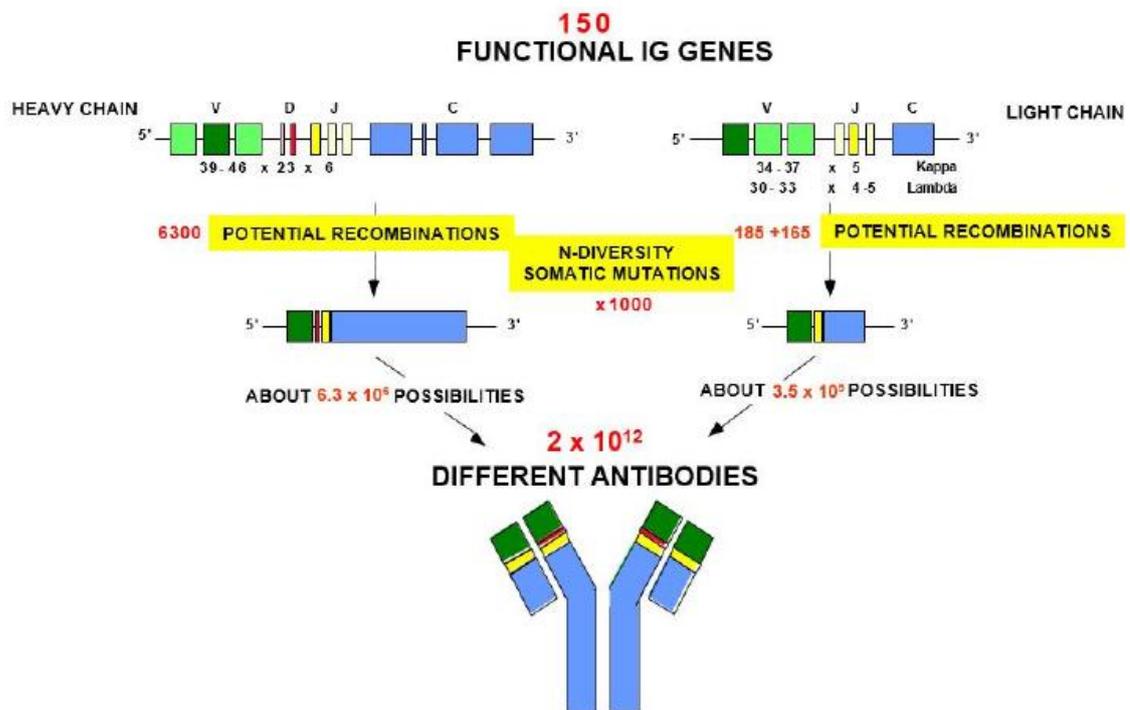


Figure 29 : Schématisation de l'acquisition de la diversité du répertoire B.

NHEJ et acquisition de la N-diversité jonctionnelle

La diversité jonctionnelle est un processus important pour augmenter la diversité du répertoire B. Ce mécanisme est induit par le complexe NHEJ de réparation de l'ADN, qui permet de lier les segments géniques réarrangés entre eux au sein du PC. Le NHEJ assure la réparation de l'ADN endommagé de manière non-conservative. Il ne restaure pas la séquence initiale de l'ADN mais permet la continuité de l'ADN endommagé. Ce système fait intervenir de nombreuses protéines comme Ku70/80, DNA-PK_{cs} (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), Artémis, XRCC4, la ligase IV et XLF (*XCCR4 like factor ou Cernunnos*) (**Figure 30**).

Au cours de la recombinaison V(D)J, les enzymes RAG induisent des cassures double brin de l'ADN. Comme ces cassures sont franches, elles devraient permettre une ligation sans problème. Cependant, la transestérification génère une structure en épingle à cheveux qui rend impossible une ligation directe et qui nécessite l'intervention d'une endonucléase et l'intervention du complexe ubiquitaire des réparation des cassures double brin de l'ADN, le complexe NHEJ.

La première étape commence par la reconnaissance de l'ADN double brin intact clivé par les protéines Ku70/80. Cet hétérodimère forme un anneau autour des deux segments d'ADN et recrute les protéines DNA-PK_{cs} et Artémis (**Figure 30A**). Par autophosphorylation, la DNA-PK_{cs} entraîne l'association avec les protéines Ku70/80 et la formation du complexe DNA-PK. Ce complexe s'associe ensuite avec la protéine Artémis, qui a une activité endonucléase et qui est responsable de l'ouverture de la structure en épingle à cheveux, linéarisant l'ADN double brin et formant une extrémité cohésive (**Figure 30B**). Avant ligation, la TdT complète par homologie des bases des extrémités cohésives (P-diversité) et poursuit par l'addition aléatoire de nucléotides pour former une séquence de 2 à 15 nucléotides : c'est l'acquisition de la N-diversité. Dès lors que les séquences sont complétées, la protéine ligase IV lie les segments géniques entre eux, grâce à l'intervention des protéines XRCC4 et XLF qui stabilisent le complexe de ligation. Une fois la ligation réalisée, la recombinaison V(D)J est achevée.

Une étude structurale de la protéine Ku70 a rendu possible l'identification d'un domaine SAP (le nom SAP vient des initiales des trois protéines composant ce domaine : SAF-A/B, Acinus et PIAS), dont le rôle, non encore démontré, serait la fixation de l'ADN double brin (Hu et al., 2012).

La protéine Ku80 possède un domaine C-terminal dont la mutation inhibe complètement la recombinaison V(D)J. Il a été montré que les 12 derniers acides aminés de ce domaine sont

impliqués dans l'interaction avec la protéine DNA-PK_{CS} (Weterings et al., 2009). Une mutation au niveau de ces 12 derniers acides aminés ne permet donc plus la formation du complexe DNA-PK et donc le clivage de structure en épingle à cheveux par Artémis (Weterings et al., 2009).

La protéine DNA-PK_{CS} a une région C-terminale qui contient un domaine catalytique de type serine/thréonine protéine kinase (Kurimasa et al., 1999), qui permet l'autophosphorylation du complexe DNA-PK et donc son activation. Comme attendu, une inactivation de cette activité kinase empêche complètement la recombinaison V(D)J (Kurimasa et al., 1999).

Une mutation des protéines XRCC4 et ligase IV provoque également une inhibition de la recombinaison V(D)J ainsi que la mort de souris nouveau-né par apoptose neuronale massive (van Gent et al., 1997).

L'inhibition des protéines XLF et Artémis provoque un effet moins franc sur la recombinaison V(D)J. Un modèle KO pour la protéine XLF provoque un ralentissement des réactions de ligation (Li et al., 2008). En effet, il a été montré que XLF forme un complexe stable XRCC4 stimulant l'activité XRCC4 / ligase IV (Hammel et al., 2011). Concernant Artémis, il a été démontré qu'elle est très impliquée avec le complexe DNA-PK dont on connaît la capacité kinase (Goodarzi et al., 2006). Cet article a également montré que Artémis n'est pas activé par phosphorylation. Une inhibition d'Artémis chez l'homme et au sein d'un modèle *in vivo* provoque un déficit immunitaire sévère combiné (SCID = *Severe Combined ImmunoDeficiency*) en lymphocytes T, B et NK chez l'homme (Moshous et al., 2001; Schuetz et al., 2014). Ce syndrome SCID est provoqué par une non-réparation des coupures de l'ADN double brin médiée par le complexe RAG. Cependant, dans un modèle *in vitro*, l'inhibition d'Artémis n'empêche pas la ligation des segments géniques. L'hypothèse d'un autre acteur encore inconnu qui pourrait substituer l'action de la protéine Artémis a été émise (Goodarzi et al., 2006).

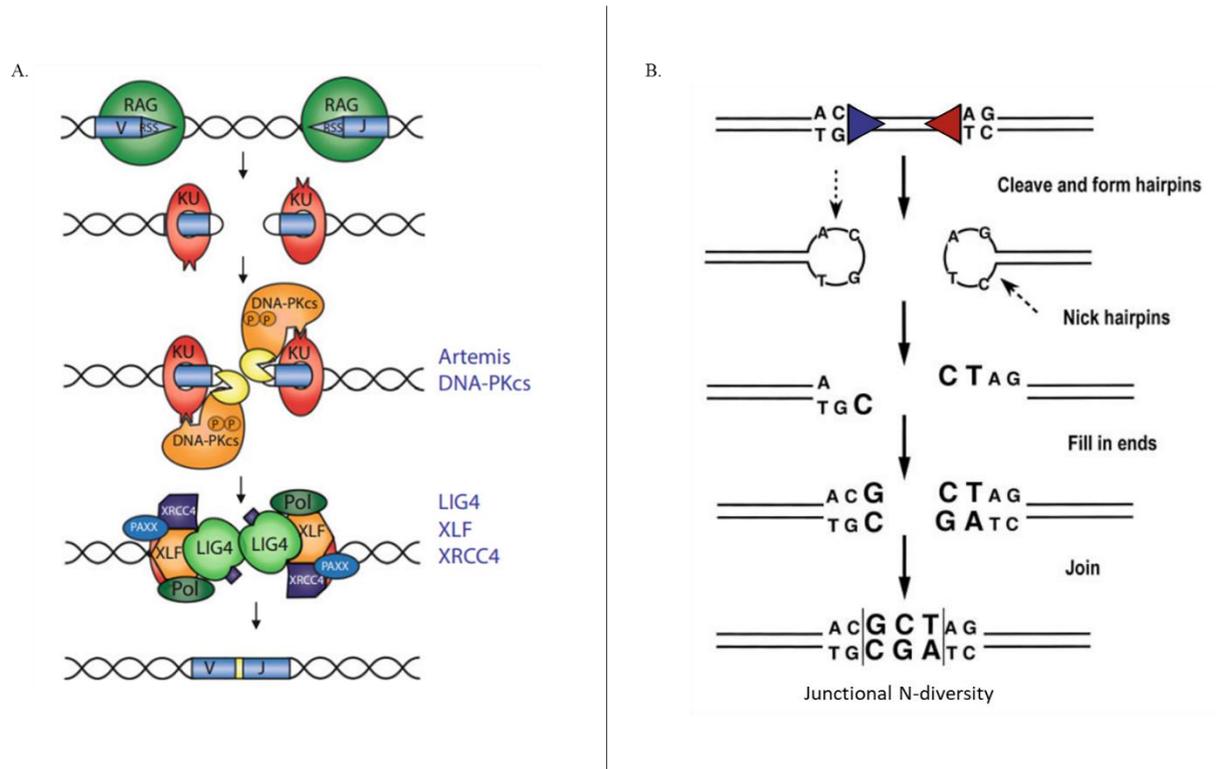


Figure 30 : Schématisation de la réparation de l'ADN NHEJ (A) et de l'acquisition de la N-diversité lors de la recombinaison V(D)J.

Les hypermutations somatiques et commutation de classe

Une fois les recombinaisons des chaînes lourdes et légères fonctionnelles effectuées, la cellule peut sortir du compartiment médullaire et migrer via la circulation sanguine vers un organe lymphoïde secondaire en vue de sa maturation au sein d'un GC. Après la rencontre avec un Ag spécifique de son BCR, de nombreuses modifications ont lieu et permettent d'augmenter l'affinité et la fonction de l'Ac. Ces deux processus sont appelés : hypermutations somatiques et commutation de classe (CMC, CSR : *classe switch recombinaison*). Ils sont initiés par une cytidine désaminase : AID (*activation-induced deaminase*).

AID a été découverte en 1999 par l'équipe de Honjo, suite à l'inhibition de la CMC au niveau d'une lignée cellulaire (CH12F3-2) induite avec un cocktail de cytokines (IL-4, TGF-β, CD40L). Ces travaux ont par ailleurs montré que le processus de CMC est totalement inhibé en présence de cycloheximide (Muramatsu et al., 1999). Il a alors été observé que l'inhibiteur par la cycloheximide empêche partiellement l'expression d'AID. Dans un modèle murin KO pour AID^{-/-}, se développe une forme autosomale récessive d'un syndrome d'hyper IgM (Revy et al., 2000). Cette pathologie se caractérise par la présence exclusive d'Ac de type IgM chez la souris et l'impossibilité de celle-ci de générer les autres isotypes d'Ig. L'inhibition d'AID est aussi corrélée à l'absence de survenue des HMS *in vitro* (Muramatsu et al., 2000). L'ensemble de ces

résultats a permis de prouver qu'AID est indispensable aux modifications de l'ADN des chaînes lourdes et légères des Ig lors de la maturation des cellules B dans les GC.

Physiologiquement, AID est étroitement contrôlée aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. Elle n'est exprimée que de manière transitoire au niveau des LB matures pour permettre les HMS et la CMC. Le gène permettant l'expression d'AID est *aidca* ; il est régulé par de nombreux FT (Muramatsu et al., 1999).

Ainsi, le promoteur d'*aidca* comprend, entre autres, des sites de fixation pour les membres de la famille NF- κ B (*Nuclear Factor κ B*) (Lee-Theilen and Chaudhuri, 2010). Cinq protéines de cette famille sont impliquées dans l'expression basale du gène *aidca* : p50 (Nf- κ B1), p52 (Nf- κ B2), Rel A (p65), Rel B et c-Rel (Dedeoglu et al., 2004; Xu et al., 2007). La mobilisation des membres de la famille NF- κ B est initiée lors de l'interaction B-T dans les organes lymphoïdes secondaires, avec l'engagement de CD40 (cellule B) avec CD40L (cellule T) indispensable à la poursuite de la prolifération et de la différenciation des LB. En effet, la partie intracellulaire de CD40 fixe la protéine Traf2 (*TNF α receptor-associated factors*) et l'active. Il est démontré qu'une inhibition de Traf2 diminue de manière importante le développement du GC (Jabara et al., 2002). Cet effet est similaire à une inhibition complète du CD40 (Jabara et al., 2002). La protéine Traf2 permet la phosphorylation et la dégradation du complexe inhibiteur NEMO (*Nf- κ B essential modulator* aussi appelée *I κ B*) séquestrant le FT Nf- κ B dans le cytosol. La signalisation du CD40 et de l'IL4 permet également l'expression des FT Pax-5, IRF4, IRF8, IFN (Interferon), STAT6 activant l'expression d'AID de manière très importante (Xu et al., 2007). En regard, l'inhibition d'AID est principalement médiée par le FT Blimp1. La repression de Blimp1 par Bcl6 favorise l'expression du gène *aidca* (Basso and Dalla-Favera, 2012). De nombreux autres régulateurs d'AID existent ; ils ne seront pas détaillés. Néanmoins, précisons que deux microARN (miR-155 et miR-93) sont des répresseurs importants de l'expression d'AID (Borchert et al., 2011). La protéine mature AID est de nouveau soumise à une régulation post-traductionnelle. En effet, la protéine eEF1- α (*translation elongation factor*) interagit avec AID, provoquant sa séquestration dans le cytoplasme (Häsler et al., 2011). *A contrario*, la protéine HSP70/90 (*Heat shock protéin 70 et 90*) permet de stabiliser la protéine tout en empêchant sa dégradation par le protéasome. Enfin, à son export vers le noyau, AID est phosphorylée au niveau de différents acides aminés qui permettent son activation.

La protéine AID est composée de 198 acides aminés et possède un long domaine enzymatique de la famille des APOBEC (*apolipoprotein B mRNA-editing cytidine deaminase*). Elle possède également d'autres domaines comme un signal de localisation nucléaire (NLS :

Nuclear localization signal), un domaine catalytique et un signal d'export nucléaire (NES : *Nuclear export signal*). La région C-terminale est indispensable à l'avènement des HMS (Choudhary et al., 2018) (**Figure 31A**).

Le signal de localisation nucléaire permet à AID de se fixer spécifiquement à l'ADN (**Figure 31A**). Comme son nom l'indique, AID est une désaminase : elle modifie donc le complexe amine d'une désoxycytosine (dC) (base azotée de l'ADN) qu'elle transforme en dU (désoxyuracile), sur un seul des deux brins (**Figure 31B**) (Chaudhuri et al., 2007; Choudhary et al., 2018). L'activité désaminase est majoritaire au niveau des *hotspot* de mutation, sur le motif nucléotidique suivant : $WRCW/RGYW$ (R = A ou G ; Y = C ou T ; W = A ou T) (Han et al., 2011). Comme évoqué précédemment, AID est également la cible de différentes phosphorylations dont trois ont été identifiées comme majeur dans l'induction d'AID : la phosphorylation de la thréonine 27 (p-T27), thréonine 140 (p-T140) et de la sérine 38 (p-S38). La p-T27 et p-S38 permettent l'interaction d'AID avec la protéine RPA (*Replication protein A*). La présence de p-T140 a été identifiée comme cruciale au cours des mécanismes HMS mais son effet sur l'activité biologique d'AID est encore inconnue (McBride et al., 2008) (**Figure 31A**). D'autres phosphorylations ont été décrites, comme celles de la sérine 53 (p-S53) ou de la tyrosine 184 (p-Y184) mais leurs conséquences ne sont pas élucidées car la déphosphorylation de ces acides aminés ne semblent pas perturber l'apparition des HMS (Choudhary et al., 2018; McBride et al., 2008).

La propriété unique d'AID de désaminer des dC en dU entraîne un mésappariement U: G, qui peut conduire à différentes conséquences dans la cellule. Ce mésappariement et sa capacité de fixation à la protéine RPA est à l'origine des HMS.

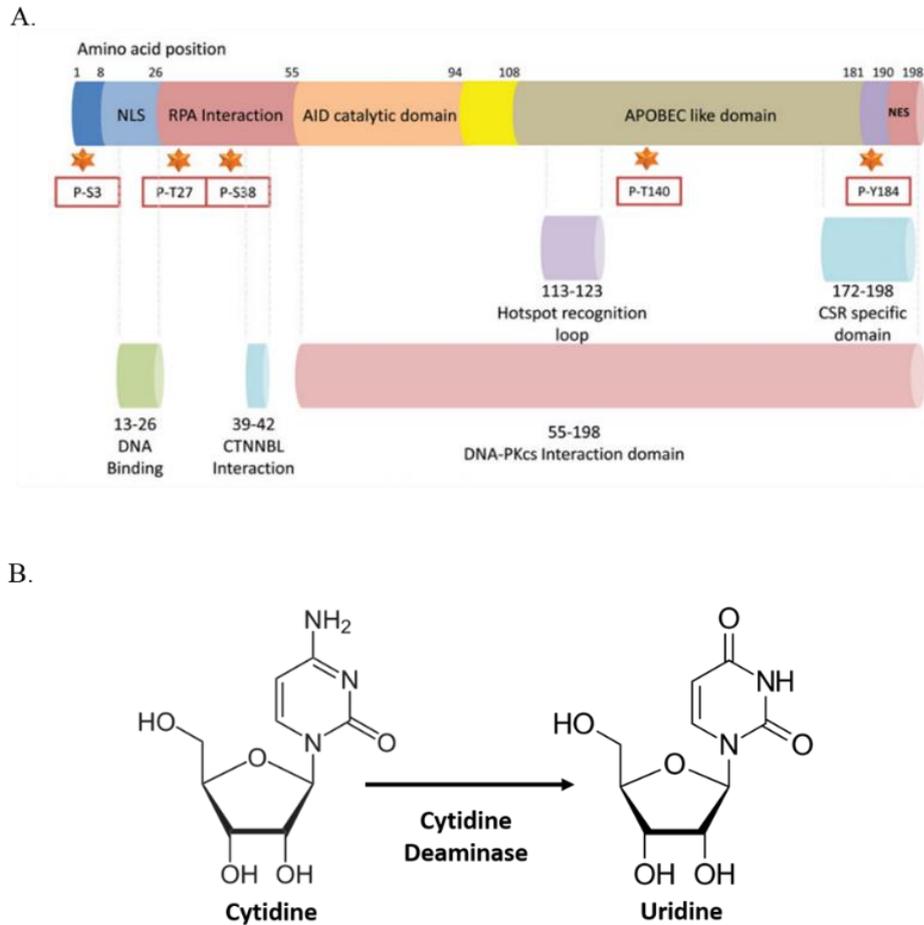


Figure 31 : Représentation schématique de la structure (A) et du mécanisme d'action d'AID (les étoiles rouges représentent les sites de phosphorylation) (Choudhary et al., 2018)

Au cours de la phase S du cycle cellulaire, l'ADN polymérase réplique les deux brins d'ADN identiques. Les mutations induites par AID sur l'ADN simple brin entraînent, par plusieurs voies, les systèmes de réparation de l'ADN qui peuvent corriger ou garder les erreurs produites par AID. Ces mutations provoquent donc des délétions, additions ou substitutions qu'on appelle les hypermutations somatiques.

Si une mutation induite par AID se produit avant même la réparation des paires de bases non concordantes, l'ADN polymérase insère un A opposé à U, ce qui conduit à une transition de C à T et de G vers A. Alternativement, les résidus d'uracile vont recruter l'enzyme UNG (*uracil-N-glycosylase*) intervenant au sein du complexe BER (*base excision repair*). Ensuite, cette enzyme excise l'uracile (créant alors un site abasique) et permet le recrutement des polymérases Rev-1, Pol ζ ou Pol η (Masuda et al., 2009). Ces polymérases interviennent dans le processus de réparation de l'ADN tronqué mais elles sont sujettes à de forts taux d'erreurs, ce qui résulte à l'apparition d'une mutation (**Figure 32**). Enfin, le mésappariement U/G peut

recruter le complexe MMR (*mismatch repair*) par l'intervention des protéines Msh2 et Msh6 (*MutS homolog 2 et 6*). Ces protéines permettent la resynthèse du fragment de l'ADN présentant le mésappariement favorisant ainsi l'apparition d'une mutation sur la région désaminée.

Dans une analyse des HMS chez la souris et l'Homme, les mutations apparaissent 100–200 bp en aval du site de début de transcription (TSS) et diminuent progressivement au fur et à mesure que la distance du promoteur augmente. Le pic de mutations est observé à 400-500 pb en aval du TSS, restreignant ainsi l'avènement de mutations aux régions variables, laissant les régions constantes vierges de toutes mutations (Rada and Milstein, 2001).

Il a également été démontré qu'AID s'associe avec l'ARN polymérase en tant que facteur mutateur, et fait partie intégrante du complexe de transcription (Kodgire et al., 2013). Cette même étude suggère que AID a un meilleur accès à son ADN cible lorsque la RNA polymérase est en phase d'élongation. En effet, l'accessibilité à l'ADN est facilitée lors de la décondensation de la chromatine pendant la transcription. AID provoque des mutations en aval de l'avancement de la RNA polymérase. Ce modèle peut expliquer également la désamination d'AID sur un brin unique. En effet, la matrice de transcription n'étant présente que sur un seul brin, le second est libre et disponible à l'effet d'AID (Li et al., 2004).

En résumé, AID permet l'avènement des HMS par désamination d'une cytosine en uracile sur l'ADN simple brin, ce qui provoque un mésappariement. Ce dernier entraîne le recrutement des polymérases par différents systèmes de réparations. Néanmoins, ces polymérases sont sujettes aux erreurs et sont à l'origine de mutations *in fine* sur les deux brins de l'ADN : le nucléotide U/G désaminé peut devenir A/T, T/A, G/C ou redevenir initialement C/G (**Figure 32**). Nous allons voir que AID permet également l'avènement des CMC des Ig.

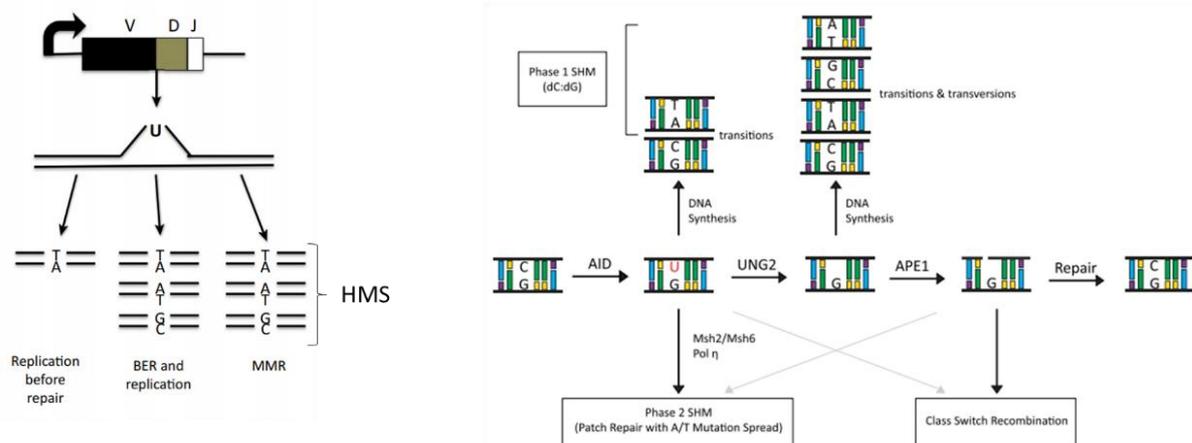


Figure 32 : Schématisation des hypermutations somatiques (Chandra et al., 2015; Keim et al., 2013)

Les CMC sont des recombinaisons intrachromosomiques délétant certains segments géniques présents au niveau des chaînes lourdes des Ig. Nous avons vu que les Ig sont de différents types : $Ig\mu$, $Ig\gamma$ ($Ig\gamma3$, $Ig\gamma1$, $Ig\gamma2a$, $Ig\gamma2b$), $Ig\alpha$, $Ig\epsilon$ et $Ig\delta$. C'est l'expression de la partie constante qui définit un type d'Ig. Chaque isotype est associé à un unique segment génique constant appelé $C\mu$, $C\gamma$ ($C\gamma3$, $C\gamma1$, $C\gamma2a$, $C\gamma2b$), $C\alpha$, $C\epsilon$ et $C\delta$. De façon similaire aux RSS, chaque segment constant est précédé d'une région Switch, hautement répétitive. Seul le segment $C\delta$ ne possède pas de région S. Ces régions sont appelées respectivement $S\mu$, $S\gamma$ ($S\gamma3$, $S\gamma1$, $S\gamma2a$, $S\gamma2b$), $S\alpha$ et $S\epsilon$ (**Figure 33**). La CMC correspond au remplacement du segment génique $C\mu$ (exprimé par une IgM) associé au fragment recombiné V_HCH_H par un segment génique d'un autre type. Ce phénomène spécialise l'Ac pour sa future fonction.

La CMC est un mécanisme complexe qui utilise l'activité désaminase d'AID. Au sein des régions S, on retrouve de nombreuses régions cibles 5'-AGCT-3' présentes de façon symétrique et répétées sur le brin sens et antisens. La surexpression de certains FT comme Bcl-6 permet l'accessibilité du locus au niveau des régions $S\mu$ et d'autres régions S spécifiquement (par exemple $S\alpha$) (**Figure 33B**) (Basso et al., 2010). Les nombreux mésappariements U/G induisent le recrutement du complexe BER (Robbiani et al., 2009) ou du complexe MMR (Stavnezer and Schrader, 2006), conduisant dans ce cas, non pas à une résolution individuelle de chaque mésappariement mais à l'avènement de coupures de l'ADN double brin au niveau des régions S accessibles. Cette double cassure de l'ADN provoque le recrutement du complexe NHEJ, et, par recombinaison non-homologue, lie les régions S accessibles (par exemple $S\mu$ et $S\alpha$) en délétant le segment intrachromosomique appelé « cercle excisé ». Lors d'une nouvelle transcription de la chaîne lourde, la partie variable V(D)J va alors de pair avec la nouvelle partie constante associée (ici $C\alpha$) et forme ainsi une Ig mature d'isotype différent de l' $Ig\mu$ (ici $Ig\alpha$) (**Figure 33A**).

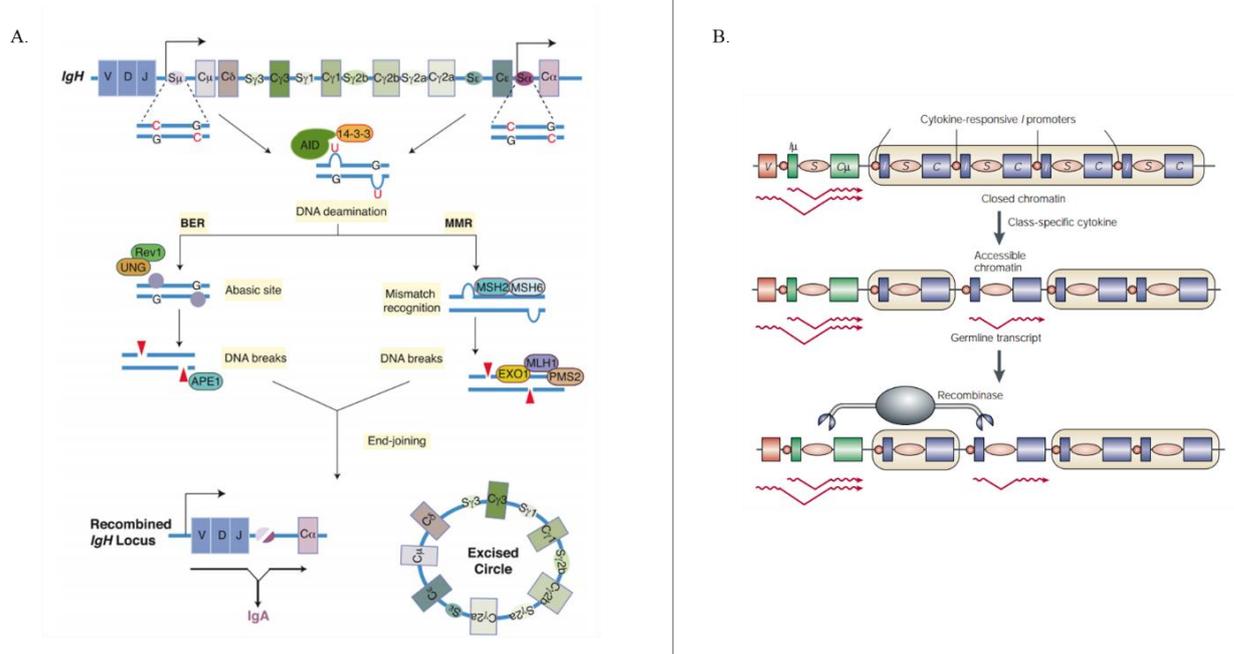


Figure 33 : Schématisation (A) et modèle d'accessibilité de la chromatine (B) lors de la CMC (Kinoshita and Honjo, 2001; Nicolas et al., 2018)

Au cours de la vie du LB, de nombreux processus immunogénétiques surviennent au sein des loci codant pour les chaînes lourdes et légères des Ig. Ces processus divergent dans leur temporalité d'apparition et dans leur mécanistique mais certains acteurs sont identiques entre les trois évènements majeurs conduisant à un LB mature post-GC. Voici un tableau résumant ces ressemblances et ces divergences.

	Recombinaison V(D)J	Hypermutation somatique	Commutation de classe
Cible	Segments génique V(D)J	Exon Variable recombiné	Région S
Transcription	Non requis	Requis	Requis
AID	Dispensable	Requis	Requis
Clivage d'ADN associées à des mutations (ou diversité)	Oui	Oui	Oui
Séquences primaires spécifiques	Heptamère et nonamère	WRCW/RGYW	AGCT
NHEJ	Requis	Non requis	Requis

Tableau 3 : Tableau comparatif des réarrangements de l'ADN entre les commutations de classe, les hypermutations somatiques et la recombinaison V(D)J (adapté de (Kinoshita and Honjo, 2001))

I.4.b. Édition, révision du répertoire et recombinaison non-conventionnelle

Au cours de la lymphopoïèse B conventionnelle, la cellule B teste régulièrement son BCR afin de limiter une réaction auto-immunitaire avec les Ag du soi. Les loci IGH, IGK et IGL sont présents en deux exemplaires dans les cellules B (diploïdie). Au cours des recombinaisons V(D)J, de nombreux réarrangements générés ne sont pas productifs. De ce fait, des recombinaisons successives peuvent avoir lieu au sein du même locus ou sur le second haplotype.

I.4.b.i Kappa deleting element et RSS intron

Au sein du locus IGK, en plus des segments géniques IGKV, IGKJ, IGKC et des enhancers, on trouve également deux éléments inhibiteurs, qui rendent caduque la majorité des réarrangements les impliquant. Il s'agit de la RSS intron et du Kde (*kappa deleting element*). La RSS intron est une 12-RSS cryptique située entre l'extrémité 3' du gène IGKJ5 et l'extrémité 5' de l'enhancer Eki. Le Kde est positionné en aval du segment IGKC et est impliqué dans des réarrangements de type IGKV-KDE retrouvés dans des LB exprimant une chaîne légère IGL (Siminovitch et al., 1985). Ce type de recombinaisons est constaté dans près de 70% des cellules B ayant réalisées plusieurs réarrangements au cours de leur maturation (Feddersen et al., 1990).

Les réarrangements entre les gènes IGKV ou la RSS intron et le Kde peuvent se produire en différentes occasions (Feddersen et al., 1990). Un réarrangement est possible entre un segment génique IGKV en amont d'un réarrangement $V\kappa J\kappa$ déjà formé et le Kde, ce qui a pour conséquence une délétion du segment intergénique, comprenant le réarrangement $V\kappa J\kappa$ néoformé ($V\kappa$ -Kde, **Figure 34-1**) ainsi que la partie constante IGKC et les enhancers $E\kappa_i$ et $E\kappa_{3'}$. Le Kde peut également se recombiner avec la RSS intron déléant à nouveau les enhancers $E\kappa_i$ et $E\kappa_{3'}$ (RSSintron-Kde, **Figure 34-2**). Enfin, avant même l'avènement d'un réarrangement $V\kappa J\kappa$, un réarrangement entre le Kde et un gène IGKV induit l'excision de l'intégralité des gènes IGKJ et IGKC et des enhancers (**Figure 34-3**). Ces trois processus induisent une perte de fonctionnalité de l'haplotype IGK par élimination des enhancers et d'IGKC et induisent une recombinaison sur le second allèle IGK ou au niveau des allèles de l'haplotype IGL. Ces réarrangements délétères sont à l'origine de la régulation et de l'exclusion allélique au sein des LB (Langerak et al., 2004).

L'étude des réarrangements du locus IGK a également mis en évidence un réarrangement associant la RSS d'un segment génique IGKJ et la RSS intron (RSS $J\kappa$ -RSSIntron, **Figure 34-4**). Ce réarrangement peut avoir lieu avant ou après une recombinaison $V\kappa J\kappa$. Un réarrangement RSS $J\kappa$ -RSSintron n'empêche pas totalement l'établissement d'un réarrangement conventionnel fonctionnel (Feddersen et al., 1990). Cependant, un réarrangement $V\kappa J\kappa$ n'est pas possible dans le cas d'une recombinaison $J\kappa_1$ -RSS-intron car cette dernière provoque la perte de l'intégralité des segments géniques jonctionnels au niveau du locus (**Figure 34-5**). De plus, un réarrangement RSS $J\kappa$ -RSSintron conserve, au sein du locus, les deux RSS, qui sont donc disponibles pour d'autres recombinaisons atypiques (**Figure 34-6**). Il s'agit des réarrangements RSS $J\kappa$ -Kde et IGKV-Kde, retrouvés dans des cellules B de patients atteints de LAL-B (Leucémie aiguë lymphoblastique B, cohorte de 115 patients, données personnelles du laboratoire). Les recombinaisons $V\kappa$ -RSSintron ont pour conséquence la délétion de l'ensemble des segments géniques IGKJ alors que les recombinaisons RSS $J\kappa$ -Kde induisent la perte d'IGKC et des enhancers. Ces deux types de recombinaisons contribuent ainsi à l'exclusion allélique de l'haplotype kappa concerné (**Figure 34**).

Partie I : Introduction et état de l'art

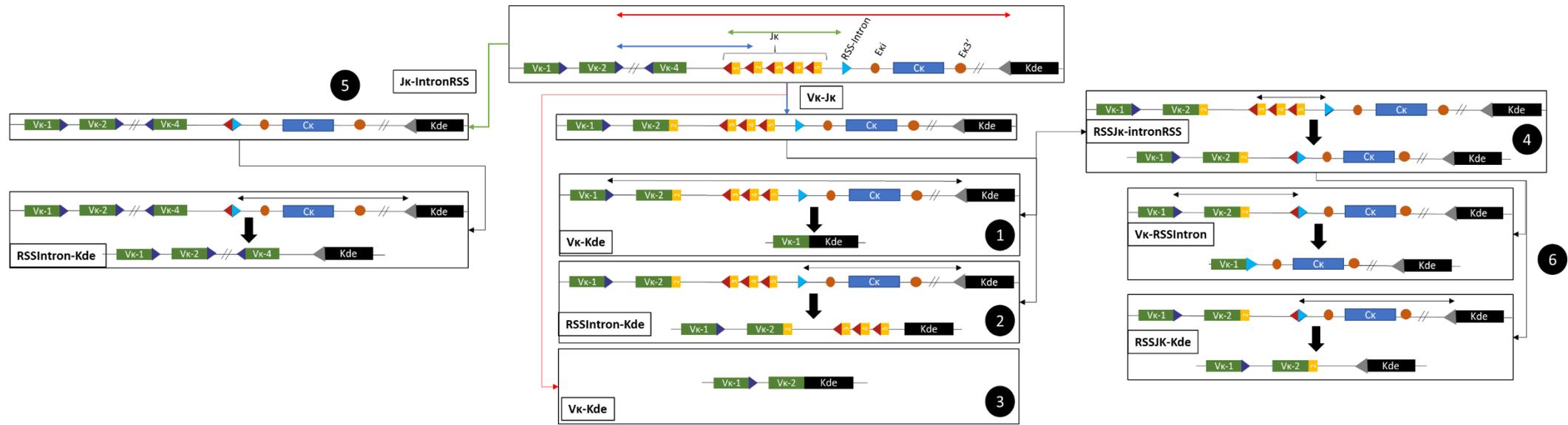


Figure 34 : Schématisation des réarrangements délétères au sein du locus IGK permettant la survenue de réarrangements Vκ-Kde (adaptée de (Langerak et al., 2004))

I.4.b.ii Le remplacement V_H et RSS cryptique

La nature aléatoire de la recombinaison V(D)J est essentielle pour générer un répertoire d'Ac diversifiés. Cependant, certaines recombinaisons peuvent générer une rupture précoce du cadre de lecture (non-fonctionnelles) ou être à l'origine d'Ig réactive vis-vis d'auto-Ag. D'autres mécanismes permettent cependant de sauvegarder des cellules B dont les réarrangements initiaux seraient délétères. Il s'agit de l'édition des récepteurs qui fait intervenir les enzymes RAG, de la même façon que pour les réarrangements initiaux. Certains réarrangements au niveau du locus IGK sont préjudiciables à la survie de la cellule et contraignent cette dernière à procéder à un deuxième, troisième ou quatrième réarrangement permettant l'acquisition d'une chaîne légère fonctionnelle. Des mécanismes similaires existent-ils au niveau du locus IGH ?

L'existence d'autres réarrangements associant un nouveau gène V_H avec un segment génique D_HJ_H est conceptuellement très compliquée. En effet, tous les segments génique IGHD sont éliminés lors de la première recombinaison $V_H-D_HJ_H$, ne laissant aucune possibilité d'un second réarrangement $V_HD_HJ_H$. En 1986, Reth et al ont mis en évidence, dans des cellules B d'une lignée cellulaire murine, qu'une chaîne lourde fonctionnelle pouvait être générée à partir d'une recombinaison $V_HD_HJ_H$ initiale en associant un nouveau segment génique IGHV (Reth et al., 1986). Une étude de l'ensemble des segments géniques IGHV a révélé des séquences similaires aux heptamères et nonamères des RSS, séparées par 13 bp, présentes au sein de 40 sur 44 des segments géniques IGHV chez l'Homme et au sein de 2/3 des segments géniques IGHV murins (Zhang et al., 2004). Ces séquences sont fortement similaires aux RSS conventionnelles et permettent la fixation des enzymes RAG. Ces séquences ont été appelées RSS cryptiques (cRSS) (**Figure 35A**).

Dans des LB de souris transgéniques présentant deux loci IGH réarrangés portant des réarrangements $V_HD_HJ_H$ non productifs, Lutz et al ont démontré qu'une chaîne lourde pouvait être générée *de novo* après association d'un nouveau segment génique IGHV à la partie D_HJ_H (Lutz et al., 2006). Ces travaux ont permis de prouver que, grâce au remplacement du segment génique IGHV, une synthèse d'une chaîne lourde fonctionnelle est possible au sein de LB possédant deux loci IGH réarrangés et non productifs. Ce type d'évènement recombinatoire secondaire a été baptisé remplacement de type I.

Ce sont les travaux de Zhixin Zheng qui ont permis de démontrer le mécanisme permettant d'expliquer les modifications de la partie variable V_H lors des évènements secondaires de

recombinaison prenant place au niveau du GC. Le processus de recombinaison permettant un remplacement du V_H prend comme substrat de recombinaison la 23RSS (segment génique IGHV non recombiné) et la 12cRSS (segment génique IGHV déjà associé dans un réarrangement $V_H D_H J_H$). Après recrutement, clivage par les enzymes RAG et réparation par le NHEJ, le nouveau segment génique IGHV remplace le segment génique IGHV préalablement réarrangé. Le segment intergénique, contenant le segment génique IGHV initialement réarrangé, est délété par le cercle d'excision. Cependant, la cRSS étant présente au sein de la région CDR3, une partie du segment génique IGHV initialement réarrangé est conservé au sein de la nouvelle recombinaison et laisse une empreinte qui augmente la taille de la région CDR3 (**Figure 35B**). Par technique de LM-PCR (*ligation mediated PCR*) ciblant la partie CDR3 d'un segment génique IGHV, il est alors possible de dénombrer le nombre de remplacements V_H et la nature des gènes remplacés (Zhang, 2007).

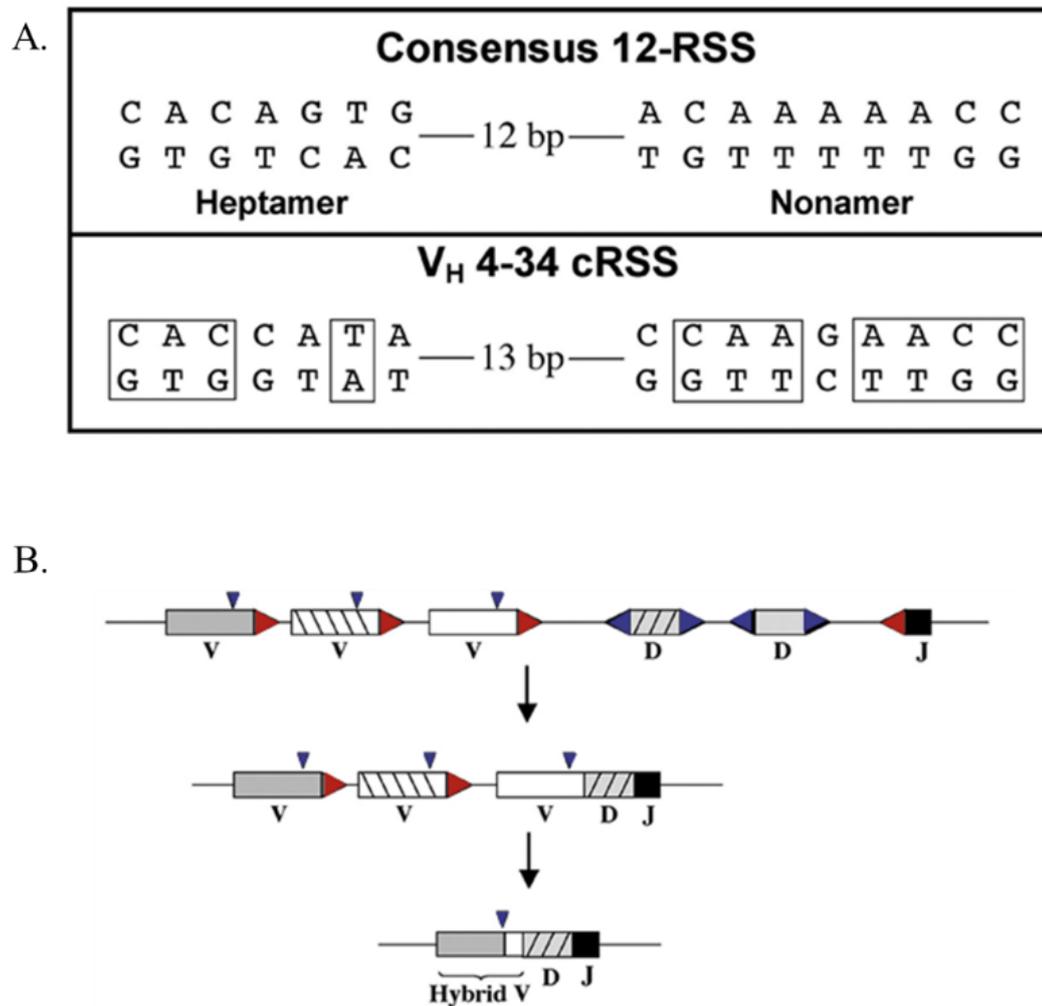


Figure 35 : Représentation de la RSS cryptique au niveau du gène V_H 4.34 (A) et schématisation du mécanisme de remplacement V_H (B) (Rahman et al., 2006)

I.4.b.iii Recombinaison intra-V κ : les RSS cryptiques du locus kappa ?

En 2019, Shinoda et al ont identifié un nouvel aspect de la réorganisation du locus IGK au cours de la recombinaison V(D)J : les recombinaisons Intra-V κ (Shinoda et al., 2019). Leur étude montre que 37% des gènes IGKV2-28 (humain) et 24% des gènes IGKV1-117 (souris) au sein des PBMC (*Peripheral Blood mononuclear cells*) sont impliqués dans des recombinaisons Intra-V κ (Shinoda et al., 2019). Dans un modèle de souris humanisée, l'équipe a prouvé que les gènes de la famille IGKV2 sont parmi les plus utilisés au sein de la recombinaison V κ J κ humaine : ils représentent 30% de réarrangements productifs et 60% de réarrangements non-productifs (Longo et al., 2017). Chez la souris, des résultats similaires ont été trouvés : 43% des réarrangements V κ J κ murins utilisent un groupe de 7 gènes IGKV dont le gène IGKV1-117 (Aoki-Ota et al., 2012). Ainsi, les gènes majoritairement utilisés lors des réarrangements conventionnels V κ J κ en phase pré-B sont également ceux qui interviennent lors de réarrangements Intra-V κ en phase pro-B. Mais comment ces réarrangements Intra-V κ sont-ils possibles alors que l'ensemble des segments géniques IGKV sont suivis d'une 12RSS à leur extrémité 3' ? Les réarrangements Intra-V κ ne suivent-ils pas la règle 12/23 d'appariement des RSS ?

Shinoda et al ont identifié la présence de deux RSS opposées à l'extrémité 3' des segments géniques IGKV majoritairement utilisés. L'une de ces RSS est la 12RSS naturelle (*Bona fide RSS* ou bRSS) ; l'autre est une RSS inversée possédant un spacer de 23 nucléotides (*Flipped RSS* ou fRSS). Cette dernière se compose de la même séquence héptamérique (5'-CACTGTG-3') que la bRSS qui est inversée sur le brin complémentaire et d'une séquence nonamérique au niveau du brin antisens de la région CDR3 du gène V κ (5'-ACAG(/A)TAATA-3') (**Figure 36**). La séquence héptamérique palindromique conserve sa structure consensus et par conséquent sa capacité à fixer les enzymes RAG. En effet, Shinoda et al ont observé que l'affinité de fixation des RAG est équivalente entre les bRSS et les fRSS (Shinoda et al., 2019). Une association 12/23 est alors possible entre la bRSS d'un segment génique IGKV et la fRSS d'un second segment génique IGKV (réarrangement bRSS-fRSS). Cette recombinaison induit un clivage en extrémité 5' de la fRSS. Comme la séquence héptamérique est partagée, un clivage en extrémité 5' de fRSS provoque une inactivation de la bRSS du même segment génique IGKV.

D'après ces résultats, l'équipe a déduit qu'un réarrangement bRSS-frRSS peut être considéré comme un réarrangement d'exclusion pour les deux segments géniques impliqués dans la recombinaison. En effet, les réarrangements bRSS-frRSS délètent la séquence heptamérique et entraîne donc une impossibilité pour le gène utilisant la bRSS d'effectuer une recombinaison de type $V\kappa$ - $J\kappa$. Ces réarrangements permettent donc la suppression d'un ou plusieurs segments génique IGKV présents sur un locus IGK vierge de toutes recombinaisons (**Figure 36**). Selon les auteurs, les réarrangements intra- $V\kappa$ permettraient « l'exclusion » des segments géniques IGKV les plus utilisés et faciliteraient l'accès des segments géniques IGKV distaux peu utilisés en les rapprochant spatialement des segments géniques IGKJ pour les rendre ainsi disponibles à la recombinaison. Les auteurs discutent également l'hypothèse que les réarrangements bRSS-frRSS peuvent être réalisés par délétion ou par inversion en fonction de l'orientation de bRSS partenaire. Quoi qu'il en soit, dans les deux cas de recombinaison, la conséquence reste une inactivation des deux gènes participant à la recombinaison.

En résumé, les réarrangements intra- $V\kappa$ réduisent l'utilisation des segments géniques IGKV qui interviennent avec une fréquence importante lors des réarrangements $V\kappa$ - $J\kappa$ conventionnels et permettent la génération d'un répertoire IGK plus diversifié.

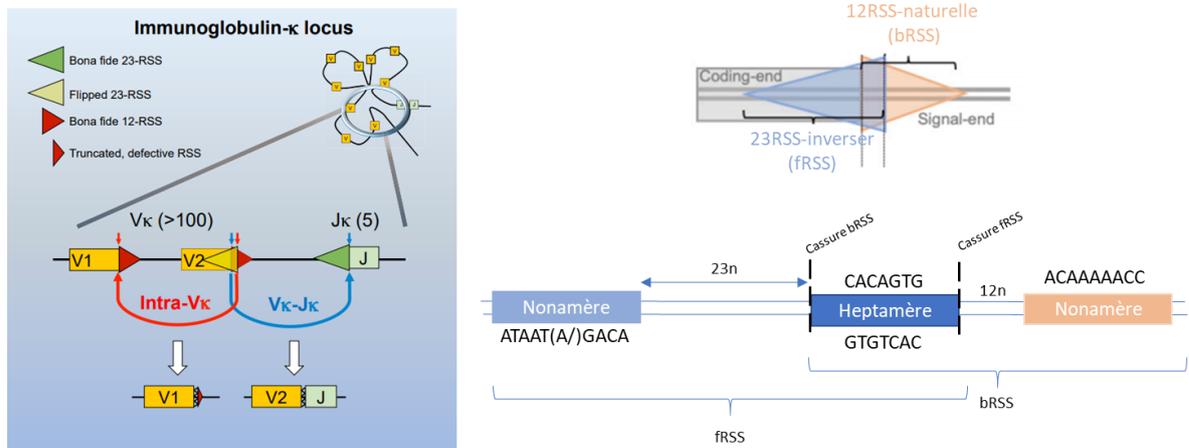


Figure 36 : Schématisation des motifs intra- $V\kappa$ et des fRSS au sein du locus IGK (Shinoda et al., 2019)

I.4.c. Régulation de l'accessibilité des loci à la recombinaison V(D)J

La recombinaison V(D)J est régulée à différents niveaux au sein d'une cellule. Au sein du LB, différents mécanismes sont mis en place afin d'assurer la régulation séquentielle des réarrangements des segments géniques D_H - J_H , V_H - D_H - J_H et $V\kappa$ - $J\kappa$. Cette régulation permet aux enzymes RAG l'accessibilité aux loci IGH, IGK et IGL à différents stades de la lymphopoïèse.

Il a été démontré que la recombinaison d'un locus est étroitement liée à deux aspects fondamentaux : la localisation au sein du noyau (Kosak et al., 2002) et la contraction du locus (Roldán et al., 2005). Ces deux mécanismes synergiques permettent la modification de la structure de la chromatine.

La chromatine, présente dans le noyau, est composée de l'ADN double brin associé à des protéines structurales, les histones. La chromatine est dynamique et permet la contraction ou le relâchement de l'ADN pour former respectivement l'hétérochromatine et l'euchromatine. Ce mécanisme est régulé par un polymère de protéines appelé nucléosome. Chaque nucléosome est composé de 146 pb d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones cœur : H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 relie l'ensemble des nucléosomes entre eux permettant de former des fibres d'ADN de 30nm d'épaisseur appelées solénoïdes (Reece et al., 2012) (**Figure 37A**).

L'hétérochromatine peut être subdivisée en deux catégories : l'hétérochromatine constitutive (c-het) et facultative (i-het) (Guillemain and Francastel, 2010).

La c-het est une zone chromosomique composée de nombreuses séquences satellites répétitives non codantes et de très peu de gènes codants (Deniaud and Bickmore, 2009). Elle entoure majoritairement les zones centromériques (appelées hétérochromatine péricentromérique) et télomériques (**Figure 37B**). Chez l'homme, la c-het est retrouvée à l'enveloppe nucléaire ou sous forme de chromocentre (également appelé corps péricentromérique) au centre du noyau (Minc et al., 1999). Au sein du LB murin, il a été prouvé qu'une colocalisation de la c-het et d'un locus codant inhibe la transcription et la recombinaison des gènes de ce dernier (Skok et al., 2001).

L'i-het est l'état condensé de l'euchromatine. Dans cette zone riche en gènes, on retrouve des séquences répétées non codantes présentes entre ces derniers : les séquences LINES (*long interspersed nuclear elements*). Ces séquences permettent une condensation réversible de la chromatine (Guillemain and Francastel, 2010) (**Figure 37B**).

L'ensemble de ces mécanismes de remodelage des nucléosomes est sous la gouvernance des acétylations et méthylations des histones qui vont permettre l'activation ou l'inhibition de la transcription et de la recombinaison. Ce sont les mécanismes de remodelages épigénétiques à la base de la contraction ou du relâchement du locus.

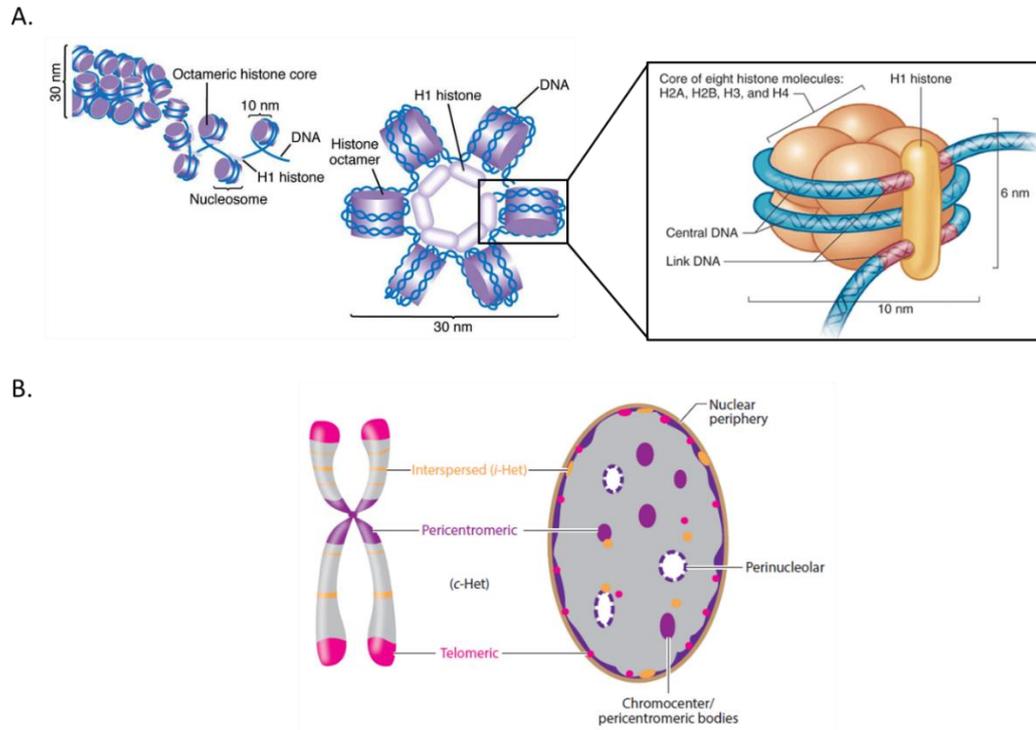


Figure 37: Schématisation d'un nucléosome d'histones et d'une structure solénoïde (A) et de la localisation nucléaire de l'hétérochromatine (B) (Janssen et al., 2018; Reece et al., 2012)

I.4.c.i Exclusion allélique

L'exclusion allélique est un processus initié, établi et maintenu pendant le développement des cellules B. Ce processus correspond à une inhibition séquentielle de l'accessibilité des loci des chaînes lourdes et légères.

Lors de la phase pré-pro B, le locus IGH engage la recombinaison D_H-J_H au niveau de ses deux loci. Quand le locus est relâché et que les segments géniques IGHV sont situés au niveau de l'enveloppe nucléaire, les segments géniques IGHV sont réprimés et indisponibles à la recombinaison. Seuls les segments géniques IGHD et IGHJ sont alors accessibles par les enzymes RAG pour une recombinaison (**Figure 38A**). En effet, les segments IGHD et IGHJ sont espacés des segments IGHV et donc non soumis à l'inhibition de la zone subnucléaire (Kosak et al., 2002) (**Figure 38B**). Suite à la recombinaison D_HJ_H , le locus IGH subit, en phase pro-B, une relocalisation nucléaire hors de la périphérie du noyau ainsi qu'une contraction importante réorganisant les segments géniques IGHV distaux (**Figure 38A**) (Fuxa et al., 2004; Pichugin et al., 2017; Roldán et al., 2005). La relocalisation et la contraction s'effectuent au niveau des deux loci recombinaison D_HJ_H . Une fois qu'un réarrangement productif de $V_H D_H J_H$ s'est produit au niveau d'un des loci, s'ensuit une décontraction du locus recombinaison. Le second locus

non recombiné, IGH subit une relocalisation supplémentaire vers un chromocentre, répresseur de la recombinaison (Hewitt et al., 2008; Roldán et al., 2005) (**Figure 38B**). Il se décontracte à son tour et seuls ses segments IGHV restent réprimés (Hewitt et al., 2008; Roldán et al., 2005). Ce mécanisme est appelé modèle de régulation par accessibilité (Yancopoulos et al., 1986).

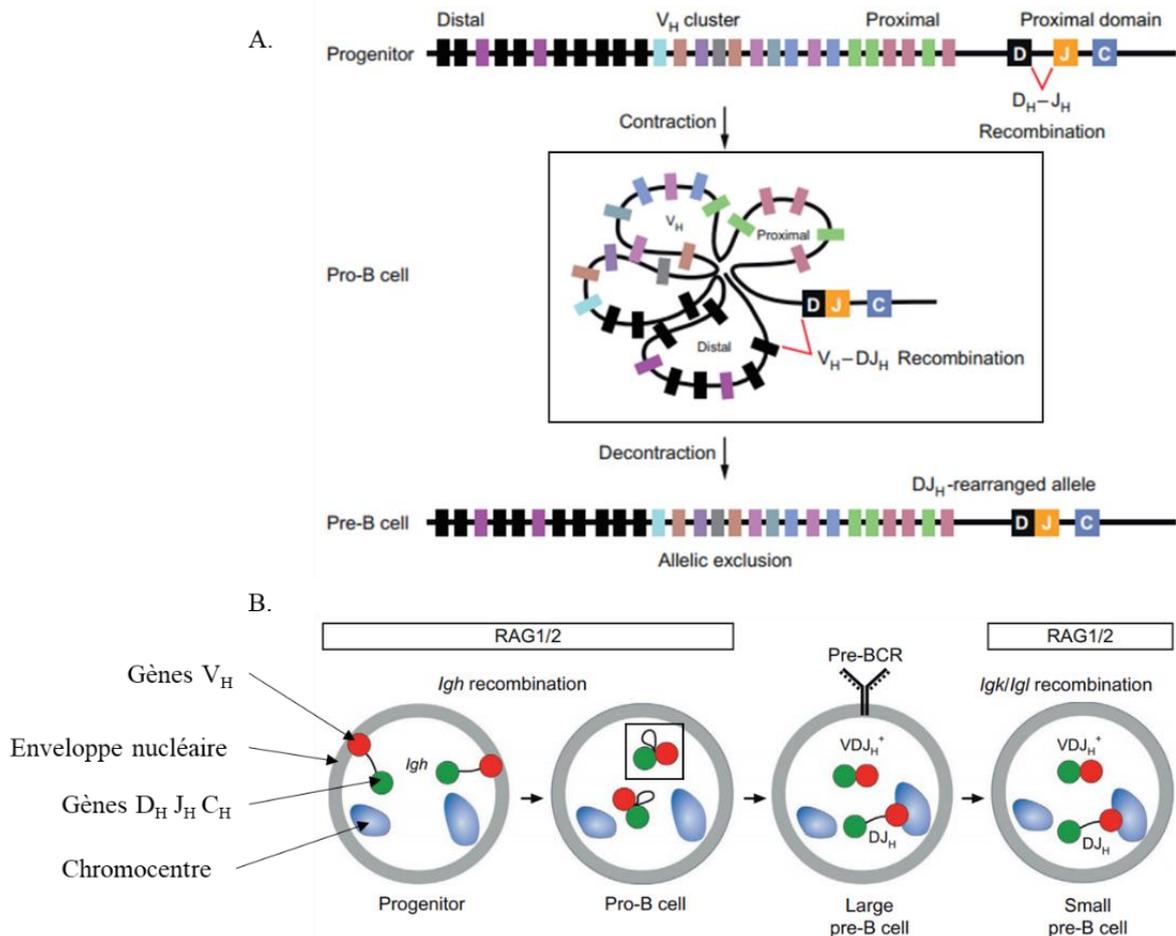


Figure 38 : Schématisation de la contraction (A) et de la localisation nucléaire (B) du locus IGH lors des phases précoces de la lymphopoïèse B (Ebert et al., 2015).

Concernant les chaînes légères, le mécanisme est similaire mais n'autorise pas une recombinaison simultanée sur les deux loci (Jhunjhunwala et al., 2009). Lors des réarrangements des chaînes légères, le LB recombine dans un premier temps un haplotype IGK. En phase pré-pro-B et pro-B, le locus IGK décontracté est situé au niveau de la périphérie du noyau. En phase pré-B, les deux loci se contractent et se relocalisent à l'intérieur du noyau. Cependant, un des loci s'oriente vers un chromocentre, répresseur de la recombinaison. Le second est libre de toute inhibition et peut alors se recombinaison. Si cette recombinaison est non productive, ce locus non fonctionnel s'oriente vers un autre chromocentre tandis que l'haplotype IGK initialement inhibé sort de sa zone répressive pour pouvoir se réarranger. Si

Partie I : Introduction et état de l'art

de nouveau, le réarrangement est non productif, il y a recombinaison des loci IGL, qui suivent les mêmes procédés de déplacement et de contraction que les loci IGK. Après le réarrangement de ces quatre loci, si aucun réarrangement V_LJ_L fonctionnel n'a pu être généré, la cellule B entre alors en apoptose (van der Burg et al., 2001; Lefranc and Lefranc, 2020). Lors des mécanismes de tolérance, un réarrangement V_LJ_L peut être à nouveau initié si celui initialement généré a une trop forte auto-réactivité. Il y a alors levée de l'exclusion allélique et reprise de la recombinaison par inhibition de la voie du BCR.

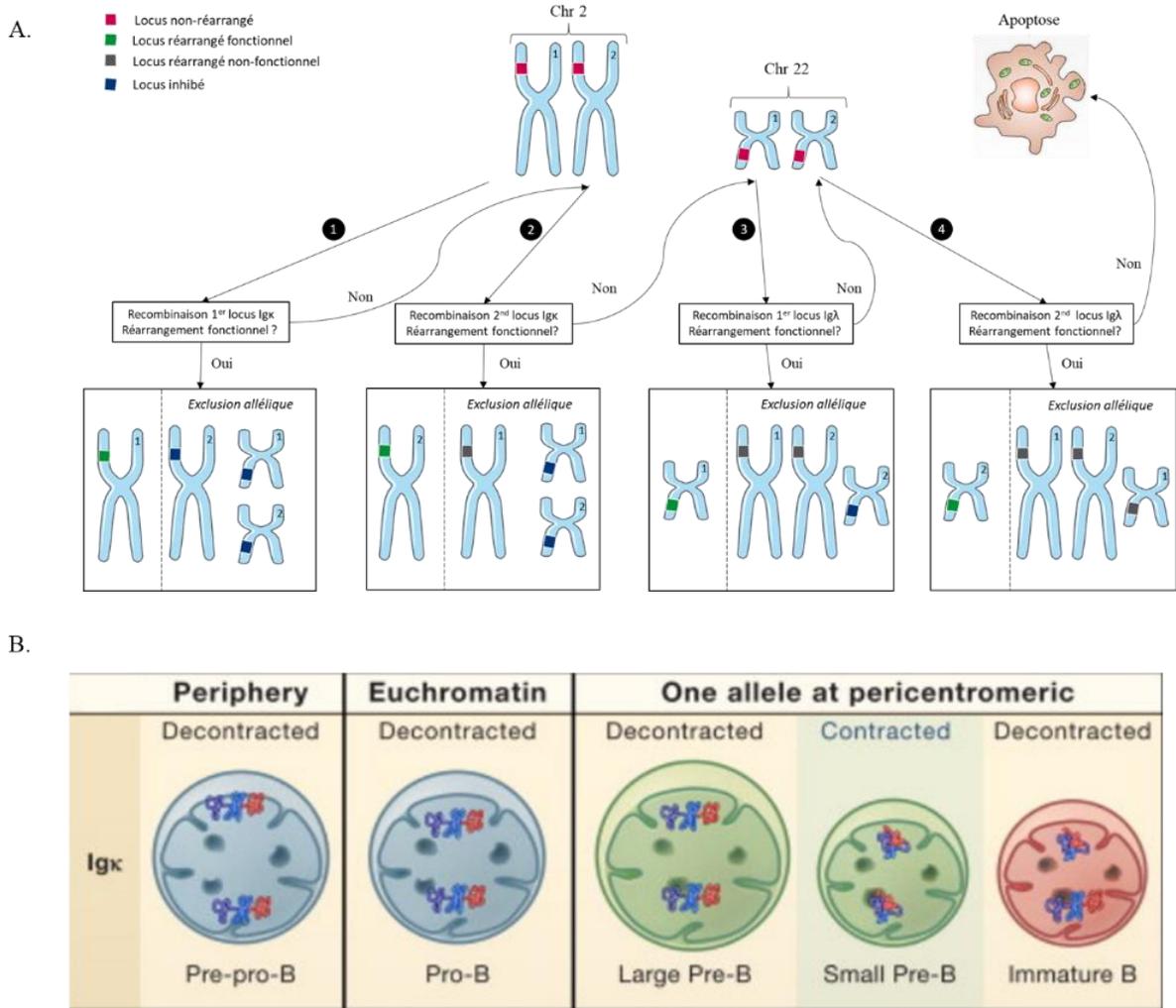


Figure 39 : Schématisation de l'exclusion allélique (A) et localisation nucléaire du locus IGK lors du développement de la cellule B (B) (adapté de (Jhunjhunwala et al., 2009; Lefranc and Lefranc, 2020)).

I.4.c.ii Les séquences régulatrices de l'accessibilité

Au niveau des loci codant les chaînes lourdes et légères des Ig, il existe des régions d'ADN non codantes responsables de l'activation, de la transcription et de l'accessibilité du locus à différentes étapes de la différenciation : les enhancers (McMurry et al., 1997). Les locus IGH

et IGK contiennent de très nombreux enhanceurs majoritairement situés entre les segments géniques J et la (ou les) partie constante. L'enhancer majoritaire pour le locus IGH est E μ , et pour IGK il s'agit de E κ i et E κ 3' (Inlay et al., 2006) (**Figure 23**, **Figure 40**, **Annexe 1A**). Les enhanceurs régulent également la méthylation et l'acétylation des histones, le recrutement de FT ainsi que la transcription en ARNm des gènes réarrangés (Almeida et al., 2015). L'inactivation des enhanceurs *in vitro* inhibent partiellement voire totalement la recombinaison des gènes (Chen et al., 1993; Inlay et al., 2002).

Des éléments régulateurs isolants (*insulator*) ayant un rôle opposé aux enhanceurs ont été découverts. Ces séquences empêchent la condensation de la chromatine et régulent négativement l'activation des enhanceurs (Gaszner and Felsenfeld, 2006). Le facteur CCCTC-binding factor (CTCF) est la protéine « isolante » la plus représentée chez les mammifères (Almeida et al., 2015). Elle est impliquée dans l'inhibition du repliement tridimensionnel du génome (**Figure 37A**) et empêche l'accès aux gènes distaux durant la recombinaison (Ong and Corces, 2014).

De manière analogue aux éléments d'isolement, la région Sis (*Silencer in Intervening Sequence*), inhibitrice de la recombinaison et la décondensation de l'ADN au niveau du locus, a été mise au jour (Liu et al., 2006). Cette séquence se situe dans la région intergénique séparant les segments géniques IGKV des segments géniques IGKJ (**Figure 40**). Une délétion de cette région favorise les recombinaisons V κ -J κ et inhibe partiellement la relocalisation du locus au niveau du chromocentre (Liu et al., 2006). Chez la souris, il a été démontré que la séquence Sis est également un site de fixation pour la protéine CTCF (Degner et al., 2009). Ce résultat suppose d'un effet synergique de ces acteurs dans la répression de la recombinaison VJ au niveau du locus IGK. La séquence Sis joue également un rôle dans la diversité du répertoire B. En effet, son inhibition favorise l'utilisation de gènes proximaux durant la recombinaison au détriment des gènes distaux au niveau du locus IGK (Almeida et al., 2015).

En 2013, Xiang et al ont identifié une séquence au sein du locus IGK, responsable de sa contraction : la séquence Cer (*Contracting element for recombination*) (Xiang et al., 2013). Cette séquence se situe entre la séquence Sis et l'extrémité 3' du dernier segment génique IGKV (**Figure 40**). C'est la seule séquence qui, si elle est délétée, inhibe totalement la contraction du locus IGK chez la souris (Hewitt et al., 2008; Xiang et al., 2013). La séquence Cer est également un site de fixation pour la protéine CTCF. Cependant, l'effet de la fixation de ce facteur au niveau de la séquence Cer n'est pas encore élucidé. Selon Xiang et al, les séquences Cer et Sis

auraient des rôles complémentaires. Cer permet la contraction du locus et l'accès aux gènes distaux tandis que Sis favorise l'utilisation des gènes distaux en inhibant l'utilisation des gènes proximaux (Xiang et al., 2013).

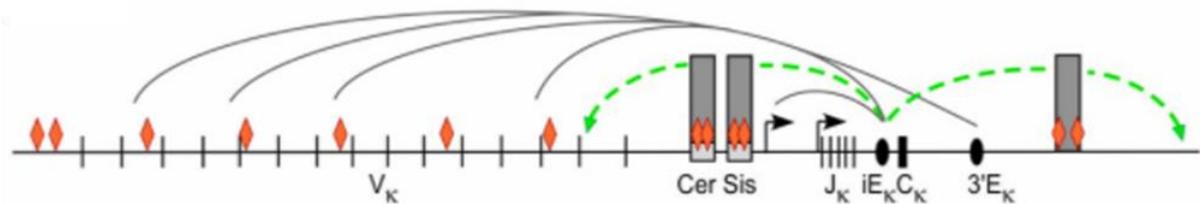


Figure 40 : Schématisation de la localisation des séquences Cer et Sis au niveau du locus IGK murin (Shih and Krangel, 2013)

I.4.c.iii Rôle de l'épigénétique

En 1942, Conrad Hal Waddington a découvert des modifications du phénotype sans modifications du génotype (Waddington, 1942). Il nomme ces changements « épigénétique ».

Aujourd'hui, l'épigénétique est définie par l'ensemble des modifications dynamiques de la structure de la chromatine permettant l'expression des gènes sans changements au niveau de la séquence d'ADN. Les modifications moléculaires identifiées et décrites sont majoritairement la méthylation de l'ADN (Bergman and Cedar, 2013). D'un point de vue biochimique, il s'agit de l'ajout ou de l'excision de groupement méthyl (CH_3) au niveau de cytosines, présentes notamment au sein d'îlots CpG. Ces îlots sont, en grande partie, retrouvés au niveau des sites promoteurs de la transcription et au sein des séquences exoniques (Saxonov et al., 2006). Ces îlots peuvent être méthylés ou déméthylés, favorisant ainsi l'expression ou l'extinction d'un gène. La méthylation et la déméthylation des cytosines sont assurées par deux types d'enzymes : respectivement les DNMT (*DNA méthyltransférase*) et les déméthylases. L'une des familles enzymatiques les plus décrites dans les processus de déméthylation de l'ADN est la famille TET (*ten-eleven translocation*) avec TET1, TET2 et TET3. Ces enzymes sont des désaminases (comme AID) et permettent la déméthylation de l'ADN par désamination d'une cytosine en uracile induisant les mécanismes de réparation de l'ADN MMR et BER. *In fine*, la cytosine méthylée est remplacée par une cytosine déméthylée (Wu and Zhang, 2017). De façon générale, la méthylation de l'ADN induit une répression de l'expression génique (Martin-Subero and Oakes, 2018).

De façon similaire à l'ADN, la structure de la chromatine peut également être la cible de modifications biochimiques de méthylation/déméthylation ou acétylation/désacétylation. Quatre groupes d'enzymes sont impliqués dans ces processus : les HMT (histone méthyltransférase), les HDM (histone déméthylase), les HAT (histone acétyltransférase) et les HDAC (histone désacétylase). La majorité du remodelage des histones est effectuée sur l'histone H3. Les HMT peuvent ajouter un ou plusieurs groupements méthyl (deux ou trois) au niveau de l'histone H3, on parle alors de di ou tri méthylation (me₂, me₃). Concernant les HAT, seule une monoacétylation est décrite au niveau des histones (ac). Ces modifications ciblent la plupart du temps les lysines présentes à différentes positions dans la séquence d'acides aminés de l'histone H3 (K4, K9, K27, K36). Un consortium international en 2015 a défini une carte épigénétique globale de modifications de la chromatine permettant de relier la méthylation ou l'acétylation d'un histone à une fonction biologique (Kundaje et al., 2015) (**Figure 41**):

- H3K4me₃ : activation des promoteurs
- H3K4me₁ : activation des enhanceurs
- H3K9me₃ : marqueur de la condensation de la chromatine
- H3K27ac : activation d'une séquence régulatrice
- H3K27me₃ : répression par le complexe PRC2 (*polycomb-mediated répression*)
- H3K36me₃ : marqueur d'inhibition de la transcription

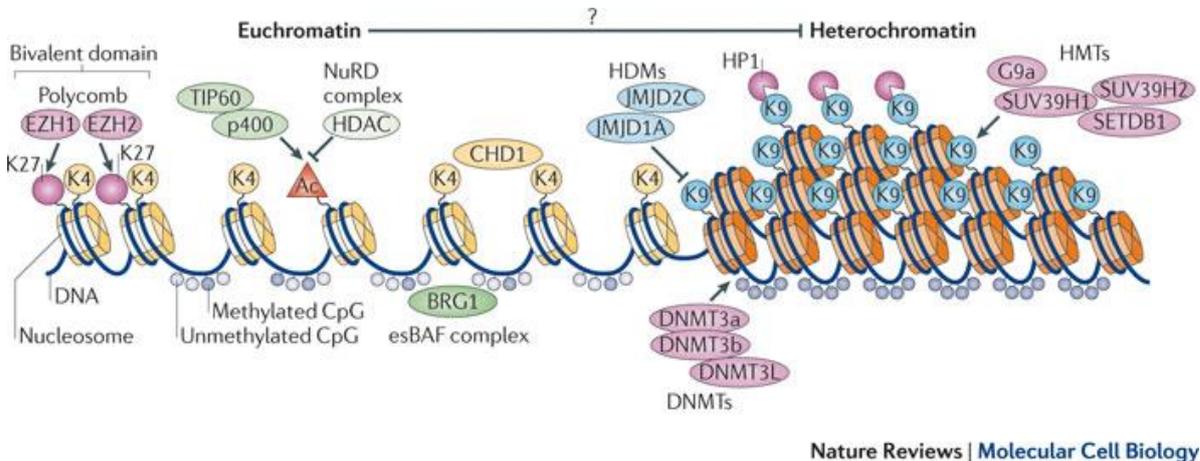


Figure 41 : Condensation et décondensation de l'ADN par acétylation et méthylation des histones (Gaspar-Maia et al., 2011)

Ce n'est que très récemment que les marqueurs épigénétiques ont été identifiés comme jouant un rôle majeur dans la maturation des LB, principalement au niveau du locus IGK. En 2011, l'équipe de Marcus R. Clark a identifié que l'induction de STAT5 par la voie de l'IL-7R α entraîne le recrutement du complexe PRC2 par l'activation de l'enzyme HMT Ezh2

(*enhancer of zeste homolog 2*) (Mandal et al., 2011). Ezh2 permet la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). Cette triméthylation réprime l'accessibilité de l'enhancer Eki, des segments géniques IGKJ et de la partie constante Cκ (**Figure 42A**). Comme discuté dans le chapitre 1.2.f (Localisation spatiale et progression de la différenciation B), au cours de la lymphopoïèse B, la voie de l'IL-7 s'atténue progressivement, levant par conséquent, l'effet de STAT5. En phase pré-B, E2A recrute les enzymes HAT et HMT, qui entraînent une acétylation de H3K9 (H3K9ac) et une méthylation d'H3K4 (H3K4me1, H3K4me3) au niveau des enhancers Eki et Ek3' et des segments géniques IGKJ, ce qui favorise l'activation du locus, l'activation des promoteurs et l'accès aux segments géniques IGKJ et IGKC (Mandal et al., 2011) (**Figure 42A**). Mandal et al ont également identifié le rôle important de la protéine Brwd1, un *histone reader* qui reconnaît les sites d'acétylation, favorisant l'effet synergique d'accès aux segments IGKJ. (Mandal et al., 2015) (**Figure 42B**)

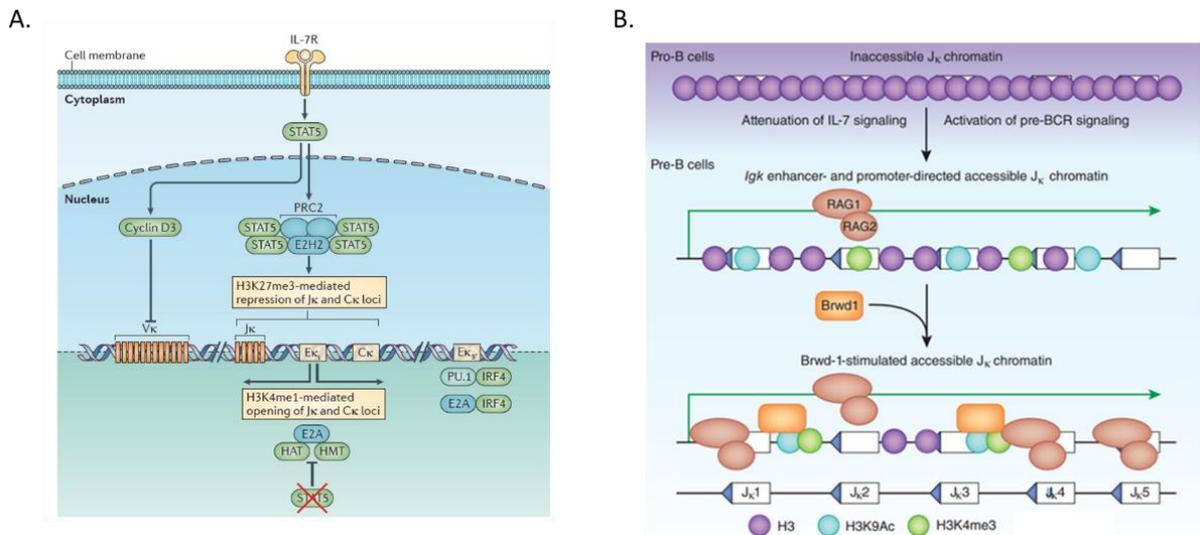


Figure 42 : Rôle de l'épigénétique au cours de la lymphopoïèse B précoce (Clark et al., 2014; Fisher and Bassing, 2015)

1.5. Les modèles de différenciation B *in vitro*

Depuis les dernières décennies, avec l'essor des règles éthiques et des réglementations qui en découlent, l'utilité des méthodes de culture *in vitro* pour identifier les facteurs nécessaires à la lymphopoïèse B a connu un important développement. Même si les modèles murins restent un modèle de choix pour les études immunologiques et hématologiques, de nombreux modèles de culture et de différenciation B humaine *in vitro* émergent.

I.5.a. Les modèles murins

La plupart des systèmes *in vitro* permettant l'étude des LB et le développement des progéniteurs hématologiques murins utilise des systèmes de cocultures sur lignées de cellules stromales, comme la lignée OP9 (Nakano et al., 1994) ou S17 (Collins and Dorshkind, 1987). Ces cellules stromales, en libérant de nombreux facteurs de croissance et de différenciation dans le milieu de culture, supportent la différenciation B précoce ou l'activation B tardive (Baird et al., 1999; Billips et al., 1992). Cela permet de limiter l'apport exogène de ces molécules par l'expérimentateur. De plus, ces cellules stromales expriment la majorité des molécules d'adhésion et/ou de costimulation qui, *in vivo*, sont exprimées par les CSM au sein des niches hématopoïétiques médullaires (Nakano et al., 1994). Ainsi, les modèles murins de différenciation B *in vitro* ont permis d'identifier de nombreuses voies de signalisation B, comme celle de l'IL-7 ou du SCF (Billips et al., 1992). Des protocoles n'utilisant pas de cellules stromales comme supports ont été décrits mais avec le constat qu'ils ne permettent pas une survie des cellules au-delà de 14 jours (Holl et al., 2010).

De nombreux protocoles de lymphopoïèse B sont décrits dans la littérature. Voici une liste non-exhaustive de ceux qui sont les plus utilisés pour le modèle murin :

Source de cellules	Milieu et cellules de support utilisées	Durée du protocole	% de cellules B obtenus en fin de protocole	Références
ProB/PreB	Opti-MEM + 10% SVF+ P/S + IL-7 (<i>n.i</i>)	5 à 7 jours	90% de cellules B220 ⁺ dont 15% d'IgM positive	(Guilbert et al., 2020)
LB immature	IMDM + 10% SVF + P/S + BAFF (20-100ng/mL) + IL-7 (10ng/mL)	8 jours (IL-7 4j + BAFF 4j)	100% cellules B220 ⁺ dont 50% FO/MZ	(Holl et al., 2010)
CLP	Milieu (<i>n.i</i>) + IL-7 (10ng/mL) + Flt3-L (10ng/mL) + OP9	14 jours	90% de cellules B220 ⁺ dont 28% Immature/preB	(Zandi et al., 2008)
Cellules embryonnaires	IMDM + 15% SVF en condition hypoxique	15 jours puis 160j chez la souris	50% à 80 jours et 15% à 160 jours	(Potocnik et al., 1997)

CSH	Opti-MEM + 15% SVF + P/S + Il-7 (n.i) + Flt-3L (n.i) + SCF (n.i) + MCSF (n.i) + S17	12-14 jours	35% CD19 ⁺ à J14	(Vieira and Cumano, 2004)
Cellules embryonnaire	Opti-MEM + 10 SVF + P/S + SCF (100ng/mL) + IL-11 (100ng/mL) + CSF-1 (10ng/mL) + IL-7 (10ng/mL) + S17	14 jours	52% de cellules IgM ⁺ à J14	(Kee et al., 1994)
CLP	Opti-MEM + 10% SVF + SCF (25ng/mL) + Flt-3L (25 ng/mL) + IL-3 (5ng/mL) + CSF1/2/3 (5ng/mL chaque) + OP9	14 jours	30% de cellules B	(Mansson et al., 2008)

Tableau 4 : Liste non-exhaustive des protocoles de différenciation B murins les plus utilisés dans la littérature. N.i = non indiqué, P/S = pénicilline/streptomycine (10U/mL)

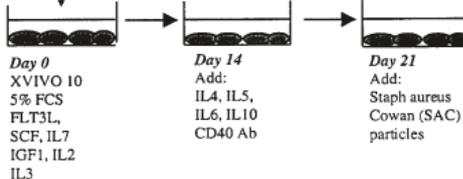
I.5.b. Les modèles humains

Une étude comparant la lymphopoïèse B humaine et murine a démontré que le modèle murin est imparfait car la différenciation B chez l'Homme et chez la souris diverge sur plusieurs points : les marqueurs de surfaces (Zhang et al., 2013), la signalisation moléculaire (S et al., 2005) et le rôle du pré-BCR et du BCR (Espeli et al., 2006). De fait, certains résultats obtenus dans un modèle murin sont compliqués à transposer chez l'Homme. Par exemple, il a été prouvé que, chez la souris, le compartiment B est maintenu par une prolifération intense des CSH, de CLP, des pro-B et des pré-B (Min et al., 2006). Chez l'Homme, une étude a montré que les LB immatures prolifèrent dans la moelle avant la migration vers un organe lymphoïde secondaire, mécanisme non-décrit chez la souris (van Zelm et al., 2007).

En raison de la difficulté d'accès aux prélèvements de moelle osseuse chez l'Homme, de nombreux systèmes *in vitro* de différenciation ont été développés afin de comprendre la biologie de la lymphopoïèse B humaine. A la différence de la souris, les protocoles permettant l'étude de la différenciation B humaine ne sont pas définitivement établis. La majorité des

systèmes de différenciation utilisent des cellules stromales murines comme microenvironnement (Ichii et al., 2008; Nishihara et al., 1998; Rossi et al., 2003). Les lignées majoritairement utilisées sont MS-5, AFT1080 et OP9. Certains protocoles ont également été développés sur tapis des cellules primaires humaines (Ichii et al., 2008) ou en condition *stromal-free* (sans cellules de support) (Ichii et al., 2010; Kraus et al., 2014). Cette dernière condition est généralement supplémentée avec du milieu ayant été en contact quelques jours avec des CSM. Cependant, il est important de souligner que ces modèles *in vitro* ont des limites. Celle-ci dépendent de l'objectif initial de l'étude, du protocole développé et de la source de cellules utilisées. Par exemple, dans l'article de Hirose et al, le protocole a été développé pour une étude de la sous-population pré-B et n'a donc pas été prévu pour reproduire la totalité de la différenciation B (Hirose et al., 2001). Bien qu'il existe différents modèles décrits, il semble donc inévitable qu'en fonction de l'objectif, chaque étude nécessite le développement d'un nouveau modèle *in vitro* spécifique mais qui s'inspire des modèles déjà publiés.

De nombreux protocoles de lymphopoïèse B sont décrits dans la littérature. Voici une liste non-exhaustive de ceux qui sont les plus utilisés pour le modèle humain :

Source de cellules	Milieu et cellules supportrices utilisées	Durée du protocole	% de cellules obtenus en fin de protocole	Références
CD34 ⁺ sang de cordon	QBSF60 + 10% SVF + P/S + IL-7 (n.i) + G-CSF (n.i) + SCF (n.i) + Flt-3L (n.i) + <i>stromal-free</i>	4 semaines	7% CD19 ⁺	(Ichii et al., 2010)
CD34 ⁺ sang de cordon + moelle	IMDM + 10% SVF + P/S + IL-7 (25 ng/mL) + IL-6 (25 ng/mL) + SCF (25 ng/mL) + Flt-3L (25 ng/mL) + <i>stromal-free</i> À J7, IL-6 est retiré	49 jours	- Sang de Cordon : 64.29% CD19 ⁺ /cyCD79a ⁺ dont 12,27% IgM ⁺ - MO : 23.06% CD19 ⁺ /cyCD79a ⁺ dont 1,49% IgM ⁺	(Kraus et al., 2014; Troilo et al., 2020)
Sous-populations triées de MO	 <p>Day 0 XVIVO 10 5% FCS FLT3L, SCF, IL7 IGF1, IL2 IL3</p> <p>Day 14 Add: IL4, IL5, IL6, IL10 CD40 Ab</p> <p>Day 21 Add: Staph aureus Cowan (SAC) particles</p>		À partir de CD34 ⁺ /CD38 ⁺ /CD10 ⁺ :	(Barker and Verfaillie, 2000)

	Protocole utilisée pour ce modèle (FCS = SVF)		58% CD19 ⁺ dont 25% IgM et 10% IgD	
CD34 ⁺ sang de cordon + CD34 ⁺ CSP*	MEM- α + 10% SVF + P/S + SCF (100ng/mL) + G-CSF (10ng/mL) + MS-5	28 jours	CD10 ⁺ /CD19 ⁺ : CB : 20.9 Cytaph : 27.4	(Hirose et al., 2001)
CD34 ⁺ cord blood	MSC Growth medium + SCF (10ng/mL) + Flt3-L (5ng/mL) + Il-7 (10ng/mL) + G-CSF (25 ng/mL) + BM-MSC (CSM de MO)	42 jours	CD10 ⁺ /CD19 ⁺ : 76.2% don't 82,6% de CD34 ⁺	(Ichii et al., 2008)
Cellules fœtales	MEM- α + 20% SVF + P/S + IL-7 (10ng/mL) + TSLP (10ng/mL) + OP9	9 jours	TSLP : CD34 ⁻ /CD19 ⁺ : 96% dont 36% IgM et 19% IgD IL-7 : CD34 ⁻ /CD19 ⁺ : 92% dont 7% IgM et 4% IgD	(Scheeren et al., 2010)

Tableau 5 : Liste non-exhaustive des protocoles de différenciation B humaine les plus utilisés dans la littérature. N.i = non indiqué ; * = cellules souches périphériques récupérées chez un patient stimulé avec du G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) ou plérixafor.

I.6. Synthèse : régulation et contrôle de la lymphopoïèse B et recombinaison somatique

Les Ac ou Ig produits par les LB jouent un rôle capital dans la réponse immunitaire. Au cours du processus de maturation d'un LB, ce dernier acquiert à sa surface une Ig fonctionnelle permettant la reconnaissance d'un pathogène. L'origine hématopoïétique du LB est la CSH. Cette cellule se différencie sous l'action de nombreux facteurs solubles libérés (comme l'IL-7, par exemple) au sein de niches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse. Ces facteurs activent de nombreuses cascades de signalisation permettant l'engagement et la différenciation de la CSH en LB mature. Des événements recombinatoires spécifiques V(D)J assemblent les segments géniques des loci IGH et IGL de façon aléatoire permettant l'acquisition, au cours de la différenciation, d'un répertoire de BCR diversifié. Ces recombinaisons sont sous la gouvernance d'éléments régulateurs tels que les enhancers. Cependant, certains réarrangements

ne sont pas productifs. En effet, lors de la recombinaison du locus IGK, l'utilisation du KDE ou de la RSS intron entraîne des recombinaisons non productives intervenant dans le processus d'exclusion allélique. Plus récemment, l'équipe de Shinoda et al a identifié en 2019 un nouvel aspect de la réorganisation du locus IGK au cours de la recombinaison V(D)J : les recombinaisons Intra- $V\kappa$. Elle postule qu'elles faciliteraient l'accès des gènes IGKV distaux peu utilisés en les rapprochant spatialement des gènes IGKJ (Shinoda et al., 2019).

Travaux antérieurs du laboratoire:

En explorant les réarrangements du locus IGK chez 115 patients atteints de forme pédiatrique de leucémie aiguë lymphoblastique B (LAL-B), le P^r Brigitte Gubler a identifié et caractérisé chez 8 de ces patients (soit 7,5 %) des réarrangements singuliers associant deux gènes IGKV. Cette association impliquait de façon systématique un gène de la famille IGKV2, qui aboutissait à des réarrangements de type Vκ2-Vκ. Cinq gènes IGKV2 sont impliqués dans ces réarrangements : les gènes IGKV2-24/IGKV2D-24, IGKV2-26/IGKV2D-26, IGKV2-28/IGKV2D-28, IGKV2-29/IGKV2D-29 et IGKV2-30/IGKV2D-30. Ils s'associent indifféremment à un gène de n'importe quel autre gène des 6 familles (IGKV1, IGKV3, IGKV4, IGKV5, IGKV6 et IGKV7).

Nous avons étudié ces réarrangements afin de savoir s'ils étaient présents physiologiquement ou seulement chez les patients atteints d'hémopathies (**Tableau 6**). Il apparaît que les réarrangements Vκ2-Vκ sont retrouvés dans les LAL pédiatriques et avec une très faible fréquence dans la moelle osseuse de donneurs sains. Dans les LAL, la persistance de ces réarrangements au cours et décours du traitement a été corrélée à la quantification de la maladie résiduelle, permettant ainsi de faire de ce réarrangement un marqueur de prédiction des rechutes au même titre que les autres réarrangements des différents loci chez les patients atteints de ce type d'hémopathies.

Proliférations	Nombre de cas testés	Présence des recombinaisons Vκ2-Vκ
LAL pédiatrique	115	Oui avec une fréquence de 8%
LAL de l'adulte	50	Non
LLC	60	Non
Physiologique (PBMC de moelle osseuse)	30	Oui avec une fréquence de 0,25%

Tableau 6 : Fréquence d'apparition des réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ physiologiques et dans différentes hémopathies

Par ailleurs, les travaux de thèse du D^r Hakim Ouled-Haddou ont conduit à l'identification d'une région à proximité des gènes IGKV2 comportant des sites de fixation pour NF-KB et E2A qui s'apparenterait à un enhancer. De plus, il a montré qu'il était possible d'obtenir, *in vitro* dans différentes lignées cellulaires B, des réarrangements du locus IGK en l'absence des éléments régulateurs $E\kappa i$ et $E\kappa 3'$, considérés comme indispensables au processus de recombinaison du locus IGK. En effet, par stimulation de ces lignées cellulaires B dépourvues des éléments régulateurs conventionnels par la présence sur chacun des haplotypes kappa de réarrangements impliquant le Kde (délétion du segment IGKC et $E\kappa i/E\kappa 3'$), il a été possible d'induire des réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ et $V\kappa-J\kappa$ *de novo* (Ouled-Hadou et al., 2014). Ainsi, ces résultats sont en faveur de la présence d'une région régulatrice des recombinaisons au niveau du locus κ permettant l'activation du locus indépendamment des enhancers conventionnels.

Enfin, grâce à une collaboration avec l'équipe du P^r Bertrand Nadel (l'UMR 631 Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, CIML) et l'utilisation de substrats extrachromosomiques de recombinaison, le P^r Brigitte Gubler a montré que ces réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ sont sous la dépendance du complexe RAG et se réalisent à l'encontre de la règle 12/23 d'appariement des RSS.

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

II.1. Objectifs des travaux de thèse

L'objectif de ce travail était d'acquérir une meilleure connaissance des événements recombinatoires qui se produisent au cours de la maturation du LB. Pour ce faire, deux axes d'étude ont mis en place. Dans un premier temps, une quantification des réarrangements $V\kappa 2$ - $V\kappa$ physiologique au sein des sous-populations cellulaires triées de sang placentaire sain a été réalisée par PCR digitale (dPCR) et la nature des segments géniques impliqués a été étudiée par technique de séquençage à haut débit (NGS). Dans un second temps, l'étude de ces réarrangements a nécessité le développement de plusieurs modèles dynamiques de lymphopoïèse B à partir de CSH. Ils ont été comparés par cytométrie en flux, ce qui nous a permis de sélectionner le modèle le plus approprié à notre étude : il s'agit d'un modèle de différenciation B à partir de CSH de cytophérèse en coculture avec des WJ-MSK. Une fois validé, nous avons poursuivi la caractérisation de ce modèle par différentes approches : une analyse cytologique par coloration au MGG, l'expression de marqueurs membranaires et intracytoplasmiques par cytométrie en flux, l'exploration des facteurs de transcription par qRT-PCR, et de réarrangements au locus IGK. L'avènement de réarrangements $V\kappa 2$ - $V\kappa$ a alors pu être exploré par dPCR à différents points de la différenciation *in vitro*

II.2. Matériels et méthodes

II.2.a. Cordon ombilical : origine et tri des cellules primaires

Une récolte de cordon ombilical de femmes parturientes consentantes saines a été réalisée au sein du service maternité du CHU Amiens Picardie (CPP Nord Ouest II, Amiens, France ; référence Janvier 22, 2015). Le sang a été récupéré par purge du cordon dans un tube stérile comprenant 2,5mL d'une solution d'EDTA à 40mM.

II.2.a.i Sang placentaire : isolement des cellules souches hématopoïétiques

Après isolation des PBMC par gradient de densité (Ficoll Pacques© Plus (Ge HealthCare, CHICAGO, Illinois, USA)), les cellules CD34⁺ ont été isolées en utilisant le kit CD34 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Allemagne) sur AutoMACS© pro separator (Miltenyi Biotec ; programme Posseld2) en suivant les recommandations du fournisseur. La fraction positive a ensuite été incubée avec les Ac couplés avec un fluorophore CD19-FITC (isothiocyanate de fluorescéine, clone AC136, dilution 1/20, Miltenyi Biotec) et CD34-PE (phycoérythrine, clone LT19, dilution 1/20, Miltenyi Biotec). Les sous-populations CD34⁺/CD19⁺ et CD34⁺/CD19⁻ ont été isolées sur FACS Aria II (BD biosciences, Franklin lakes, New Jersey, USA). La sous-population CD34⁻/CD19⁺ a été isolée par tri magnétique sur la fraction négative du tri CD34⁺, après incubation avec un Ac anti-CD19 couplé à des billes magnétiques (CD19 Microbeads, Miltenyi).

II.2.a.ii Récupération et culture des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton

La récupération des cordons ombilicaux a été réalisée chez des femmes parturientes consentantes saines au sein du service maternité du CHU Amiens Picardie (CPP Nord Ouest II, Amiens, France ; référence Janvier 22, 2015). Des biopsies de 3mm de diamètre de gelée de Wharton ont été récupérées à partir de coupes de cordons ombilicaux d'environ 1cm d'épaisseur puis cultivées une semaine dans une plaque 6 puits (2 punch/puits) dans un **milieu de prolifération des CSM** composée de : milieu minimum essentiel de Eagle avec modification alpha (α -MEM, Biotech, Dutscher, Bernolsheim, France) supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau foetal, Eurobio, Les Ulis, France), 2mM de L-glutamine (Sigma Aldrich - Merck, Lyon, France) et 10U/mL de solution antibiotique Pénicilline-Streptomycine (Sigma Aldrich - Merck). Après une semaine, les punches de gelée de Wharton ont été retirés et le milieu de prolifération a été renouvelé afin de permettre l'amplification des cellules. De nouveau une semaine après, les cellules sont détachées par incubation 5 minutes à 37°C d'une solution de

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

trypsine 0,25 + EDTA (Éthylènediaminetétraacétique, Sigma Aldrich - Merck). L'inactivation de la trypsine est réalisée par ajout de milieu avec un volume minimum de 3 fois celui de la trypsine.

II.2.b. Récupération et culture des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse

Les prélèvements de moelle osseuse ont été récupérés auprès du service de thérapie cellulaire du CHU Amiens Picardie, après obtention du consentement des patients. L'échantillon est mis à adhérer dans une flasque T175 en milieu de prolifération des CSMs supplémenté avec du β -FGF (*β -fibroblaste Growth factor*, Sigma Aldrich - Merck) à 2ng/mL. Après une semaine, le milieu est renouvelé. De nouveau une semaine après, les cellules sont détachées par incubation 5 minutes à 37°C d'une solution de trypsine 0,25 + EDTA (Sigma Aldrich - Merck). L'inactivation de la trypsine est réalisée par ajout de milieu avec un volume minimum de 3 fois celui de la trypsine.

II.2.c. Protocoles de différenciation cellulaire

II.2.c.i Différenciation adipocytaire *in vitro*

Les MSC ont étéensemencées à 20000 cellules/puits dans une plaque 6 puits et cultivées durant 21 jours en présence de milieu de prolifération des CSM ou de milieu de différenciation constitué de : milieu de Eagle avec modification de Dulbecco appauvrie en glucose (*DMEM-low glucose*, Sigma Aldrich - Merck) supplémenté avec 10% de SVF (Eurobio), 2mM de L-glutamine (Sigma Aldrich - Merck), 10U/mL de solution antibiotique Pénicilline-Streptomycine (Sigma Aldrich - Merck), 0,5 mM IBMX (Isobutylmethyl xanthine, Sigma Aldrich - Merck), 60 μ M d'indométhacine (Sigma Aldrich - Merck) et 1nM de dexaméthasone Sigma Aldrich - Merck). L'identification des vacuoles lipidiques, marqueurs d'une différenciation adipocytaire, a été réalisée par coloration RedOil© (Sigma Aldrich - Merck) en suivant les recommandations du constructeur. Des photos ont été prises aux grossissements x4, X10 et x20 sur un microscope inversées Nikon Eclipse TS100 équipée d'une caméra Nikon 1v2.

II.2.c.ii Différenciation B *in vitro*

Les cellules souches hématopoïétiques ont été isolées à partir de prélèvements de cytophère après isolement des PBMC par gradient de densité. L'anneau de PBMC est obtenu par centrifugation à 1800 rpm pendant 30 min sans frein à partir de l'échantillon dilué au demi dans une solution saline de phosphate (PBS, Biotech, Dutscher) et déposé sur une solution de

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

Ficoll®Paque-Plus (Ge Healthcare, Chicago, Illinois, USA) en suivant le rapport de volume 1/3 de Ficoll pour 2/3 d'échantillon. Après rinçage de l'échantillon de PBMC avec du PBS, une sélection cellulaire de la sous-population CD34⁺ a été réalisée par technique de tri cellulaire MACS en utilisant le kit CD34 MicroBeads (Miltenyi Biotec), en suivant les recommandations du constructeur sur autoMACS pro separator®.

Une fois comptées, les cellules triées CD34⁺ ont été ensemencées en coculture directe dans des plaques 6 puits préalablement coatées avec 10000 cellules nourricières (WJ-MSC, BM- MSC ou MS-5). Le milieu de différenciation B est composé du milieu Iscove avec modification Dulbecco (IMDM, Biochrome, France) supplémenté avec 2,5% d'une alternative au sérum humain (H2B, Dutscher, France), 2mM de L-Glutamine (Sigma Aldrich – Merck), 10U/mL de solution antibiotique Pénicilline-Streptomycine (Sigma Aldrich – Merck), 100ng/mL de SCF (Miltenyi-Biotec), et 10ng/mL de FMS-like receptor tyrosine kinase-3 ligand (Flt-3L, Miltenyi-Biotec). De l'IL-7 (IL-7, Miltenyi Biotec) à 10ng/mL ou du G-CSF (Miltenyi Biotec) a été ajouté au milieu en fonction des conditions de culture. En condition *stromal-free* (sans cellules de support), le milieu de différenciation B a été supplémenté avec 10% de surnageant de milieu de BM- MSC cultivé durant 3 jours. Le protocole de culture a duré 14 jours, avec un renouvellement de moitié du milieu de culture tous les 3 jours et un renouvellement des cellules nourricières toutes les semaines.

II.2.d. Viabilité, comptage cellulaire et cytométrie en flux

II.2.d.i Comptage cellulaire et viabilité cellulaire

Aux différents points de différenciation, les cellules ont été comptées sur lame de Malassez en présence de Bleu trypan (Sigma Aldrich – Merck) dilué au 1/8ème dans un volume final de 20µL. Les cellules vivantes (non bleues) ont été comptées sur un microscope optique Olympus CH-2 au grossissement x40.

La viabilité cellulaire a également été estimée par marquage cellulaire au 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, ThermoFisher) diluée au 1/1000ème dans 200µL de suspension cellulaire. Les données ont été acquises sur le cytomètre MACSQuantify (Miltenyi Biotec), avec une acquisition de 20000 évènements par tubes. Les analyses cytométriques ont été réalisées sur le logiciel FlowJo v10.2.

II.2.d.ii Marquage des anticorps fluorescents

Les cellules ont été récupérées, comptées, puis incubées dans le tampon MACS et en présence des Ac conjugués à un fluorophore en suivant les recommandations du fournisseur.

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

Un bloqueur de la fraction constante (FcR block buffer, Miltenyi Biotec) a été dilué au 1/100 afin d'empêcher la capture des Ac par des cellules myéloïdes (monocytes, macrophages...).

Les différents Ac et panels utilisés sont décrits ci-après :

Panel		Vioblue	Viogreen	FITC	PE	PerCP	PEVio	APC-Vio
LB1	Ac		CD10		CD34	7AAD	CD19	CD43
	Clone		HI10a		8G12		J3-119	1G10
	Dilution		1/100		1/100	1/100	1/40	1/100
	Fourn.		BD		BD	Miltenyi	BC	BD
LB2	Ac	CD179a	Anti- μ chain			7AAD	Kappa-LC	
	Clone	R3	MHM-88				G20-193	
	Dilution	1/100	1/100			1/100	1/100	
	Fourn.	BD	BL			Miltenyi	BD	
SgC	Ac		CD20	CD19	CD34	7AAD		CD10
	Clone		LT20	LT19	AC136			HI10a
	Dilution		1/20	1/40	1/40	1/100		1/100
	Fourn.		Milteyni	Milteyni	Miltenyi	Miltenyi		BD

Tableau 7 : Panels d'anticorps de cytométrie utilisés

Fourn. = fournisseur, FITC = Isothiocyanate de fluorescéine, PE = phycoerythrine, PerCP = Peridinin-Chlorophyll-protein, APC = Allophycocyanine, BD = (BD Biosciences, Pont de Claix, France), BL = (BioLegend, Paris, France), BC = (Becton Coulter, Villepinte, France)

La caractérisation des MSC a été réalisée en monomarquage avec les marqueurs suivants : CD90-FITC (clone 5E10, dilution 1/100, BD Biosciences), CD105-PE (clone 266, dilution 1/100, BD Biosciences), CD73-APC (clone AD2, dilution 1/100, BD Biosciences), CD44-PE (clone 515, dilution 1/100, BD Biosciences), CD166-APC (clone 3A6, dilution 1/100, BD Biosciences), CD34-PE (clone 8G12, dilution 1/100, BD Biosciences), CD45-FITC (clone 5E10, dilution 1/100, BD Biosciences), CD14-FITC (clone HI30, dilution 1/100, BD Biosciences), HLA-DR-APC (clone L243, dilution 1/100, BD Biosciences).

Lors de la réalisation des tris de sang placentaire ou de prélèvements de cytophère, les cellules de chaque fraction ont été récupérées, comptées et marquées pour une analyse en

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

cytométrie en flux. Pour ce faire, les cellules ont été incubées en présence d'Ac conjugués à un fluorophore dans le tampon MACS en suivant les recommandations du fournisseur. Les Ac utilisés sont le CD34-PE (clone LT19, Miltenyi Biotec) et le CD19-FITC (clone AC136, Miltenyi Biotec).

À la suite du marquage, deux lavages dans le tampon MACS ont été réalisés afin de retirer l'intégralité des Ac non fixés. Le 7AAD (7-aminoactinomycine D, Miltenyi Biotec), un marqueur de viabilité, a été ajouté juste avant le passage au cytomètre afin d'exclure les cellules mortes de l'analyse cytométrique.

II.2.e. Immunofluorescence

Les cellules surnageantes ont été récupérées, comptées puis fixées sur lame à l'aide du Cytospin 3 (Shandon, FisherScientific). La fixation et la perméabilisation ont été réalisées à l'aide de Paraformaldéhyde (Sigma Aldrich – Merck) diluée à 2% dans la solution finale de PBS pendant 15 min à 4°C. Après trois rinçages avec du PBS, les cellules ont été perméabilisées avec une solution de Triton-X100 (Sigma Aldrich – Merck) diluée à 0,2% dans du PBS. Une saturation à 20% de SVF a été réalisée suite à cette perméabilisation et une incubation de 30 minutes dans le noir a été effectuée en présence des Ac monoclonaux anti-IgM-APC (clone MHM-88, BioLegend, San Diego, Californie, USA) et mouse-anti-CD79 α (clone JCB117, dilution 1/1000, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni). Après rinçage, l'Ac secondaire goat anti-mouse-488 (dilution 1/20000, Thermofisher, Villebon sur Yvette, France) a été incubé en suivant le même protocole. En fin de marquage, un marqueur nucléaire, le DAPI, a été ajouté à l'échantillon avant analyse sur le microscope à fluorescence Apotome©Imager (Zeiss, Marly-le-Roi, France). Les photos ont ensuite été observées sur le logiciel Zen-2©Blue (Zeiss, version 2.1).

II.2.f. Coloration May-Grünwald Giemsa

Une coloration May-Grünwald Giemsa (MGG) a été réalisée sur des cellules en suspension à J14 de différenciation. Les cellules surnageantes ont été récupérées, comptées puis fixées sur lame à l'aide du Cytospin 3 (Shandon) dans une solution 50% PBS + 50% SVF. La lame a ensuite été plongée dans un bain de solution de May-Grünwald pur (Sigma Aldrich – Merck) pendant 2 minutes, puis dans un bain de MG1/2 (dilution dans du tampon phosphate pH 7,2) pendant 5 minutes. À la suite des incubations, la lame a ensuite été plongée dans un bain de solution de Giemsa (Sigma Aldrich – Merck) pendant 12 minutes.

II.2.g. Extraction d'ADN et d'ARN

Les cellules à extraire ont été récupérées, comptées puis congelées à -80°C dans une solution de PBS (pour extraction d'ADN) ou dans le tampon de lyse RLT (pour extraction d'ARN, Qiagen). L'ADN et l'ARN ont été extraits respectivement avec les kits QIAamp DNA Micro Kit et RNeasy Mini kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. L'ADN et l'ARN extraits ont ensuite été stockés respectivement à -20°C et -80°C jusqu'à utilisation. La concentration et la pureté des ADN et ARN ont été vérifiées sur spectromètre NanoDrop en observant les rapports 280/260 ou 260/230.

II.2.h. Fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN a été réalisée selon deux méthodes : fragmentation par méthode enzymatique et par sonication. La fragmentation par méthode enzymatique a été réalisée sur $2\mu\text{g}$ d'ADNg en utilisant le kit NEBNext® dsDNA Fragmentase® ($1\text{U}/\mu\text{g}$ d'ADNg, New England BioLabs) pendant sept minutes à 37°C dans un volume final de $20\mu\text{L}$. Une purification de l'ADN fragmenté a été faite en utilisant les colonnes du kit QIAquick gel extraction kit (Qiagen) en suivant la recommandation du fournisseur. Cette dernière étape permet d'éliminer le tampon et l'enzyme, qui pourraient interférer avec les futures réactions d'amplification.

La fragmentation par sonication a été réalisée par deux techniques distinctes : sonication dans un bain de sonication ou à l'aide d'un sonicateur à tige analogique. La première technique a été réalisée sur le Covaris® M220 en utilisant les colonnes blue-minitube® (Covaris) sur $1,3\mu\text{g}$ d'ADNg dans un volume de $150\mu\text{L}$. L'intensité a été fixée à 0,1 en cycle continu pendant 10 minutes.

La seconde technique a été réalisée sur le sonicateur homogénéisateur à ultrason Sonic Dismembrator (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) : $1,3\mu\text{g}$ d'ADNg dans un volume de $200\mu\text{L}$ a été placé sur la glace et soumis à une sonication à une amplitude de 25 (environ 7W) durant 8 secondes avec un pulse de 1 seconde toutes les 2 secondes (2sec ON, 1sec OFF). La taille des produits de fragmentation a été vérifiée par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1% en présence d'un marqueur de l'ADN au 1/10000 (SybrSafe, ThermoFisher, Villebon-sur-Yvette, France). Les produits de fragmentation dilués au $4/5^{\text{ème}}$ avec un tampon de charge (Loading Dye, Qiagen) et $10\mu\text{L}$ a été déposé sur le gel. Le marqueur de taille moléculaire utilisé est le Quick-Load® 1 kb DNA Ladder (NEB, Évry-Courcouronnes, France).

II.2.i. Quantification par PCR digitale

La dPCR est réalisée sur 1,3 μ g d'ADN génomique fragmenté dans un volume réactionnel final de 50 μ L. Le mix est composé de MaxterMix Taqman Gene Expression 1X (Applied Biosystem, USA), de Droplet Stabilizer 1X (RainDance, Boston USA), des amorces et sondes respectivement à 500nM et 125nM (**Annexe 4A séquences des amorces et sondes confidentielles**). Les sondes V κ 2 sont couplées aux fluorophores FAM (fluorescein, λ_{ex} = 494 nm / λ_{em} = 518 nm) en 5' et TAMRA (5-Carboxytétraméthylrhodamine (λ_{ex} = 552 nm / λ_{em} = 578 nm) en 3'. Le couple primer/sonde TaqMan® Copy Number Reference Assay RNase P (ThermoFisher, France) associé en 5' à un fluorophore VIC (λ_{ex} = 538 nm / λ_{em} = 554 nm) et TAMRA en 3' a également été ajouté au mix afin de quantifier le nombre de copies du génome présent dans chaque puits de dPCR.

Le mix contenant les cibles ADN est alors déposé sur une puce 8 puits (SourceChip, RainDance, USA) pour le passage sur RainDance Source® (RainDance, USA) qui permet la réalisation de l'émulsion et la génération de millions de gouttelettes. Après cette première phase, l'émulsion est soumise à une réaction de PCR sur le thermocycler C1000 Touch® (Bio-rad, USA) en suivant les conditions d'amplifications détaillées en **Annexe 4B** mais avec la particularité d'être réalisées avec des incréments et décréments lents de températures entre chaque phase des cycles afin de ne pas perturber l'émulsion. Une fois la réaction d'amplification réalisée, les émulsions sont transférées sur le RainDance Sense (RainDance, USA) qui permet d'analyser la fluorescence individuelle de chacune des gouttelettes. Une fois tous les échantillons analysés, les données sont compensées spectralement et retraitées à l'aide du logiciel RainDrop Analyst, conformément aux procédures standards. Un contrôle négatif d'ADN de lignée fibroblastique HT1080 a été utilisé et permet de définir les fenêtres d'analyses pour la quantification des réarrangements V κ 2-V κ et d'exclure les gouttelettes non-spécifiques. Cette stratégie a été appliquée à l'ensemble des échantillons. Le rapport (nombre de gouttelettes FAM)/(nombre de gouttelettes VIC) permet d'obtenir la fréquence du réarrangement V κ 2-V κ étudié en fonction du nombre de copies de génomes analysées.

II.2.j. Séquençage à haut débit

Un séquençage à haut débit par séquenceur Ion torrent a été réalisé sur les ADN d'échantillons de cellules triées de sang placentaire. L'ADNg a été amplifié en utilisant 19 amorces ciblant l'ensemble des gènes IGKV du locus Kappa dans un mix comprenant AmpliTaq Gold DNA Polymerases (ThermoFisher, France) selon le protocole biomed-2 (van Dongen et al., 2003).

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

Les tampons associés et les amorces utilisées sont décrits dans l'**Annexe 4C** (*séquences des amorces confidentielles*). Quatre mix d'amplification ont été réalisés :

- mix Vκ1 (6 primers) / mix Vκ2 reverse (4 primers)
- mix Vκ2 (3 primers) / mix Vκ2 reverse
- mix Vκ3 (2 primers) / mix Vκ2 reverse
- mix Vκ4 -Vκ5-Vκ6-Vκ7 / mix Vκ2 reverse

Les conditions d'amplifications sont décrites à l'**Annexe 4B**. Les amplicons ont ensuite été poolés volume à volume, puis 79 µl de ce mélange ont été digérés avec une enzyme End repair du kit Ion Plus Fragment Library kit (Ion Torrent) selon le protocole du fournisseur. Ensuite, le pool a été lié à un adaptateur Ion P1/ code barre Ion Express (ThermoFisher, France). La ligation a été réalisée dans les conditions suivantes : 15 minutes à 25 °C, 5 minutes à 72 °C. La librairie a ensuite purifiée avec les billes AmPure (Agencourt™ AMPure™ XP Kit). La librairie a été dosée par fluorimétrie au Qubit pour être diluée à 100 pM. Une étape d'amplification clonale par PCR en émulsion sur l'instrument IonChef avec le kit Ion 520™ & Ion 530™ ExT Kit-Chef. Pour cela, 25 µL du pool ont été utilisés pour l'amplification clonale. La librairie a été séquencée sur puce Ion chip 520, sur séquenceur IonGene Studio S5 (Ion Torrent) avec le kit Ion 520™ & Ion 530™ ExT Kit-Chef, conformément au protocole du fabricant. Les données de séquençage ont été obtenues à partir du serveur Torrent Suite (torrent browser). Les fichiers .FASTQ ont ensuite été analysés sur le logiciel Vidjil (High-Throughput Analysis of V(D)J Immune Repertoire). Vidjil est une plateforme open-source pour l'analyse des données de séquençage à haut débit des réarrangements des lymphocytes, développée par le laboratoire de bioinformatique Bonsai et le consortium VidjilNet.

II.2.k. Analyse *in silico*

Les séquences des réarrangements Vκ2-Vκ ont été alignées avec les séquences présentes dans la base de données IMGT (V-Quest/Align,) (Lefranc and Lefranc, 2020) à l'aide du logiciel VIDJIL. La prédiction de la structure du pri-miRNA a été réalisée sur le logiciel miRNAFold (https://tanuki.ibisc.univ-evry.fr/evryrna/mirnafold/mirnafold_form) et l'alignement des séquences des pri-miR avec celles déjà décrites dans la littérature a été réalisé sur le logiciel miRBase (<http://www.mirbase.org/>) (Kozomara et al., 2019).

II.2.l. QRT-PCR

La réaction d'amplification est réalisée sur 50ng d'ADN complémentaire dans un volume réactionnel final de 20µL. Le mix se compose de Master Mix PCR Power SYBR™

Green (ThermoFisher) avec UNG, 500nM des amorces sens et antisens (**Annexe 5**). La réaction d'amplification est réalisée sur le Thermocycler quantitatif QS7 (Applied Biosystem) en suivant les conditions d'amplifications détaillées dans l'**Annexe 4B**. Toutes les Q-PCR sont réalisées en triplicatas.

II.2.m. End-point PCR, TOPOcloning et séquençage SANGER

À différents points d'analyses (J0, J5, J11 et J14), 100 ng d'ADN génomique a été amplifié par PCR dans un volume final de 50µL. Le mix se compose de AmpliTAQ Gold Buffer 1X (ThermoFisher), MgCl₂ (dichlorure de magnésium, ThermoFisher), 2µM de dNTP (ThermoFisher), 500nM des amorces sens V κ et antisens J κ Biomed-2 (van Dongen et al., 2003) (Eurogentec) en multiplex et 0,02U d'enzyme TAQGold (ThermoFisher).

À la suite de l'amplification, une migration électrophorétique a été réalisée sur gel d'agarose à 1%. Un morceau de gel de taille comprise entre 400 et 200 bp a été récupéré sur plaque UV. L'ADN a été extrait du gel en utilisant le kit QIAquick gel extraction kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. Les produits d'amplification purifiés ont ensuite été intégrés au vecteur pCRTM-Blunt II-TOPO par le kit Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (ThermoFisher) en suivant les recommandations de clonage du constructeur. Des bactéries compétentes One Shot® TOP10 Competent Cells (ThermoFisher) ont été par la suite transformées par heat shock (30 min sur glace, 30 sec à 42°C, puis de nouveau sur glace) avec le vecteur TOPO. Les bactéries ont ensuite été étalées sur une gélose de milieu LB contenant de l'ampicilline (Sigma-Aldrich-Merck) à 100ng/mL. Après 24h, 10 colonies ont été repiquées dans 10 tubes indépendants contenant du milieu LB + ampicilline pour l'amplification des bactéries. Chaque tube a été centrifugé puis les vecteurs ont été extraits des bactéries par le kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) en respectant les recommandations du fournisseur.

Préalablement au séquençage, l'intégration des vecteurs au sein des clones sélectionnés a été vérifiée par digestion des plasmides par l'enzyme de restriction EcoRI (NewEngland Biolabs). L'apparition d'une bande correspondant à l'insert a été vérifiée par migration électrophorétique sur gel d'agarose à 1%.

La réaction de séquençage a été réalisée à partir de 100ng de vecteur intégrer avec un clone en utilisant le kit BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher) en suivant les recommandations du fournisseur. Les réactions de séquences ont ensuite été purifiées en utilisant le kit DyeEx 2.0 Spin kit (Qiagen).

II.2.n. Statistiques

Un test Agostino-Pearson a été réalisé et a défini si nos échantillons suivaient une distribution normale ou non. En fonction des résultats de ce test, afin de comparer les différents groupes entre eux, les données ont été analysées avec le test T (t-test/Mann-Withney) et le test d'analyse de variance (ANONVA/Kruskal-Wallis). Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel GraphPad Prism (Version 8.4.0, GraphPad Software, San Diego, USA). Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM (écart moyen à la moyenne) et le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

II.3. Résultats

II.3.a. Etude de l'avènement des réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$

II.3.a.i Enrichissement des sous-populations cellulaires

Les sous-populations cellulaires triées ont été isolées à partir de sang placentaire (n=40) en trois échantillons ($CD34^+/CD19^-$, $CD34^+/CD19^+$, $CD34^-/CD19^+$) permettant deux enrichissements successifs (MACS et FACS). Les sous-populations obtenues correspondent aux CSH ($CD34^+/CD19^-$), aux précurseurs pro/pré-B ($CD34^+/CD19^+$) et aux LB matures ($CD34^-/CD19^+$) (**Figure 43A**). Le marquage $CD34^+$ sur les populations pré et post-tri montre un enrichissement de la population en cellules souches qui passent de 2,31% à 95.6% de cellules $CD34^+$ (**Figure 43B**). La pureté des tris $CD34^+$ MACS est de $95,28\% \pm 2,49\%$ (max = 99,5%, min = 89,9%, n=40). En marquant avec les Ac $CD34-PE$ et $CD19-FITC$, cette sous-population enrichie permet d'identifier $85,86\% \pm 2,82\%$ (max = 94%, min = 81,05%, n=40) de CSH et $7,81\% \pm 2,49\%$ (max = 11,56%, min = 2,1%) de précurseurs B (**Figure 43B**). Ces deux sous-populations ont été isolées par FACS Aria avec une pureté supérieure à 98%.

Concernant l'enrichissement en cellules B matures ($CD34^-/CD19^+$), il est de $74,86\% \pm 5,10\%$ (max = 88%, min = 65,4%, n=40), et $98,38\% \pm 1,01\%$ (max = 99,8%, min = 95,3%) des cellules isolées sont $CD20^+$. Cette population contient également $74,96\% \pm 2,28\%$ (max = 79%, min = 70,27%, n=40) de cellules $CD10^+$ (**Figure 43C**).

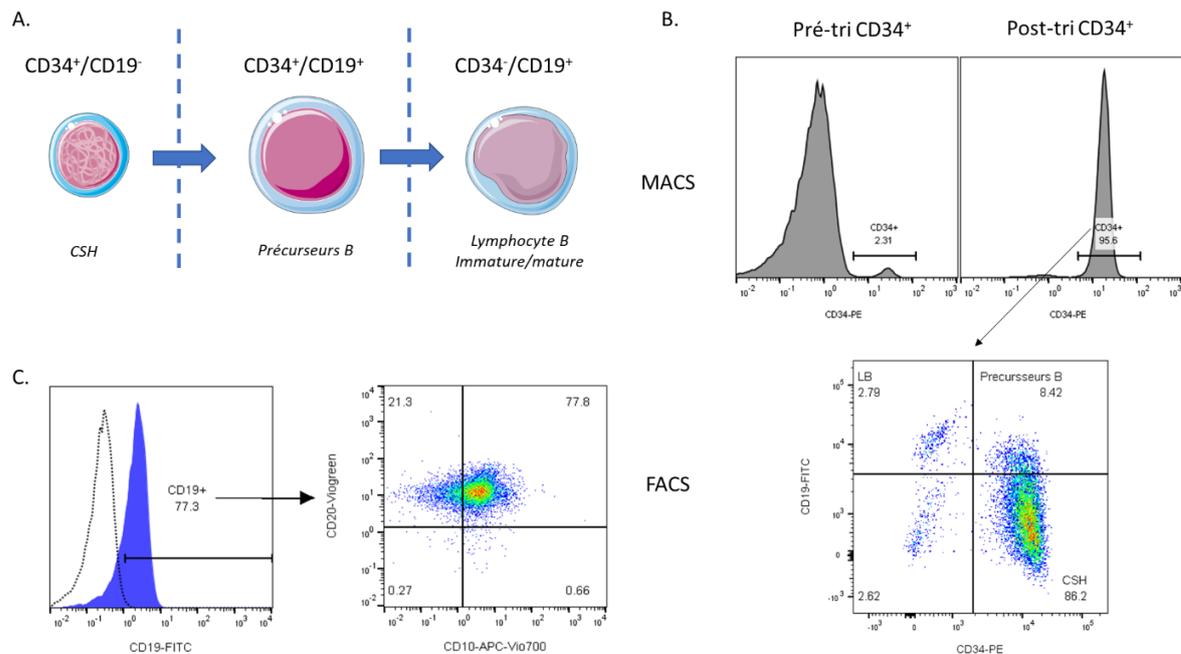


Figure 43 : Enrichissement des sous-populations cellulaires triées de sang placentaire par technique de FACS et MACS

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

Les CSH, précurseurs B et lymphocytes B matures ont été isolés par sélection positive en fonction de l'expression des marqueurs CD34 et CD19 (A.) par méthode MACS et FACS (B). Une vérification de la pureté du tri CD19⁺ a été réalisée par cytométrie en flux. Le pic en pointillés correspond à l'isotype.

II.3.a.ii Exploration et quantification des réarrangements V κ 2-V κ par dPCR

Fragmentation des échantillons d'ADN

Préalablement à la réaction de dPCR, une comparaison des techniques de fragmentation de l'ADN a été réalisée. En effet, avec un fort input d'ADN sans fragmentation, la génération des gouttelettes n'est pas uniforme, et des « trains de gouttelettes » ou des résidus lipidiques peuvent perturber l'émulsion (**Annexe 3A**). Pour remédier au problème, trois techniques de fragmentation des ADNg à 3kb ont été testées : à l'aide d'un sonicateur à tige, dans un système de bain de sonication (Covaris©), et par digestion enzymatique. Les résultats montrent que la fragmentation par Covaris et la fragmentase semblent plus reproductibles que la fragmentation à l'aide du sonicateur à tige. À 7 minutes de fragmentation, la traînée d'ADN se situe autour des 3kb, taille souhaitée.

En comparant la fragmentation par fragmentase à 7 min et Covaris©, nous pouvons voir que les résultats sont similaires. Cependant la fragmentation semble plus homogène dans le système Covaris© qu'avec la fragmentase.

Exploration des réarrangements V κ 2-V κ physiologiques : contrôle qualité et quantification

Les réarrangements V κ 2-V κ ont été quantifiés au sein de chacune des sous-populations CD34⁺/CD19⁻, CD34⁺/CD19⁺ et CD34⁻/CD19⁺. Les gènes V κ 2 observés sont les V κ 2.24/26/29 (regroupés en une quantification), V κ 2-28 et V κ 2-30 et les gènes partenaires sont les V κ 3, V κ 1 et V κ 4.

La quantification des réarrangements V κ 2-V κ au sein des sous-populations lymphocytaires B triées montrent une fréquence totale de 0,59% dans la population CD34⁺/CD19⁻, 1,1% dans la population CD34⁺/CD19⁺ et de 0,84% dans la population CD34⁻/CD19⁺ (**Figure 44A**). Concernant l'utilisation des gènes partenaires, les résultats montrent que la fréquence des réarrangements V κ 2-24/26/29-V κ 3 est supérieure dans les cellules CD34⁺/CD19⁻ par rapport aux autres sous-populations (**Figure 44B**, 0,12% vs 0,0016 et 0%). Il est important de noter que la population mature CD34⁻/CD19⁺ ne présente pas de réarrangements V κ 2-V κ , utilisant un gène de la famille IGKV3 (**Figure 44B-D**). Concernant les réarrangements V κ 2-24/26/29-V κ 1, la fréquence est plus importante dans la population CD34⁺/CD19⁺ que dans les sous-

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

populations CD34⁺/CD19⁻ et CD34⁻/CD19⁺ (**Figure 44B**, 0,73% vs 0,12% et 0,43% respectivement). La quantification des réarrangements V κ 2-24/26/29 – V κ 4 est plus importante dans la population mature CD34⁻/CD19⁺ que dans les deux populations plus immatures (**Figure 44B**, 0,14% vs 0,10% et 0,02%). Concernant l'utilisation des gènes IGKV2, les quantifications des réarrangements V κ 2-28-V κ 3/1/4 et V κ 2.30-V κ 3/1/4 montrent une augmentation de l'utilisation des gènes IGKV2-28 et IGKV2-30 dans les populations cellulaires CD34⁺/CD19⁺ et CD34⁻/CD19⁺ (**Figure 44D**).

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

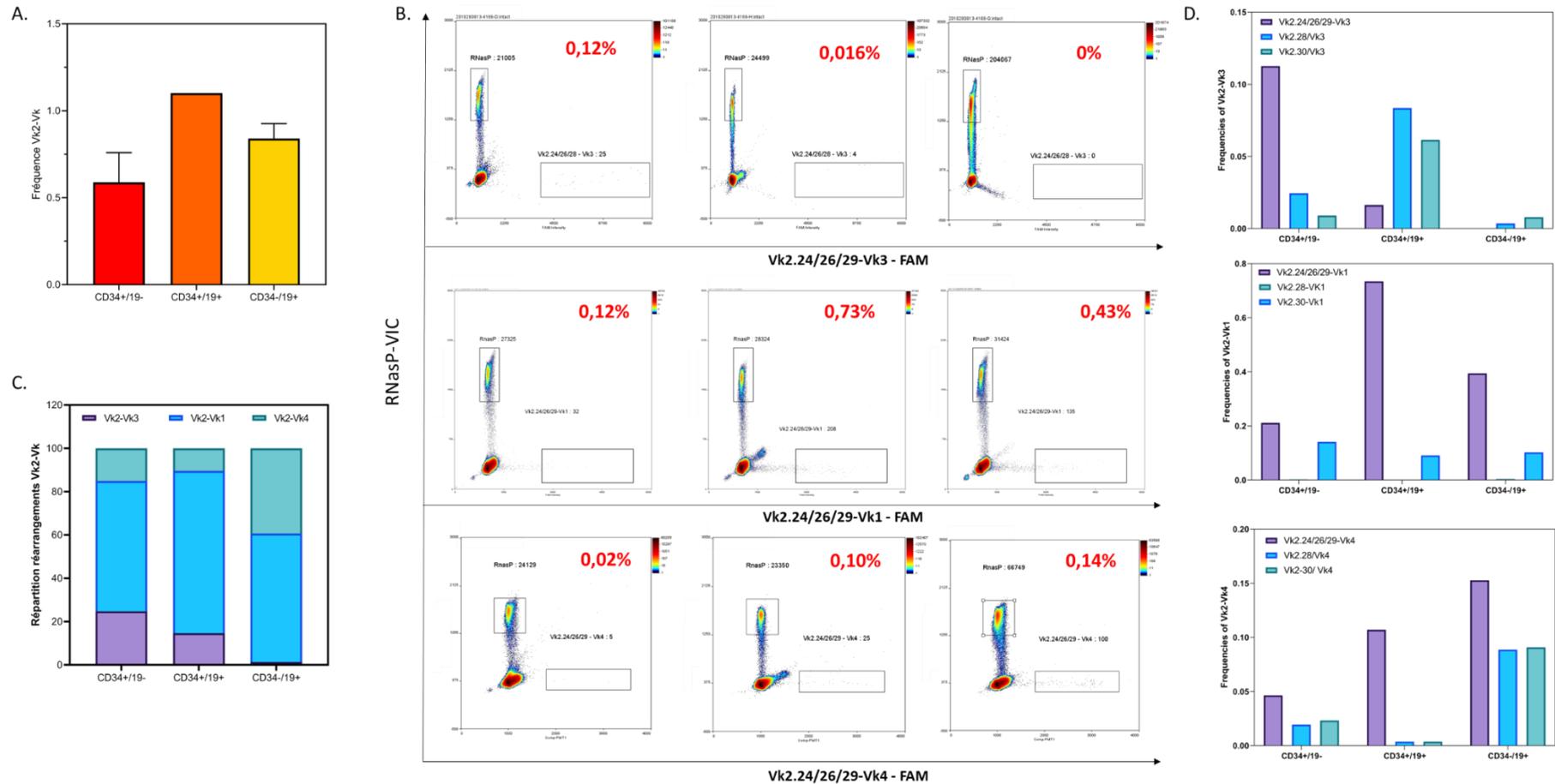


Figure 44 : Quantification des réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ au sein des sous-populations triées de sang placentaire par dPCR
 Les réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ totaux (A.), $V\kappa 2-24/26/29-V\kappa 3/1/4$ (B., C.) et $V\kappa 2-28-V\kappa 3/1/4$ et $V\kappa 2-30-V\kappa 3/1/4$ ont été quantifiés par dPCR dans les sous-populations de sang placentaire triées $CD34^+/CD19^-$, $CD34^+/CD19^+$ et $CD34^-/CD19^+$.

II.3.a.iii Exploration et quantification des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} par séquençage à haut débit

Un séquençage NGS a été réalisé sur les sous-populations triées de sang placentaire $CD34^+/CD19^-$, $CD34^+/CD19^+$ et $CD34^-/CD19^+$ (**Figure 45**). Dans un premier temps, la fréquence des gènes V_{κ} impliqués a été observée. Dans la sous-population $CD34^+/CD19^-$, la majorité des gènes partenaires sont de la famille des gènes IGKV3 et IGKV1. Près de 10% des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} utilisent un gène partenaire IGKV3-15 ou IGKV3-20 (**Figure 45A**). Dans la sous-population $CD34^+/CD19^+$, la diversité des gènes impliquée est plus faible : seulement cinq gènes sont utilisés et la fréquence d'utilisation reste très grande pour les gènes de la famille IGKV3. Enfin, dans la sous-population $CD34^-/CD19^+$, les gènes partenaires utilisés sont très diversifiés, avec une perte d'utilisation des gènes de la famille IGKV3, et parallèlement, l'utilisation majoritaire des gènes de la famille IGKV1, IGKV4 et IGKV5.

La fréquence d'utilisation des gènes IGKV2 a également été étudiée et les résultats montrent que le gène IGKV2-30 et IGKV2-29 et IGKV2-24 sont les gènes exclusivement associés à un IGKV partenaire dans les phases précoces de la différenciation (**Figure 45B**). Dans la sous-population mature $CD34^-/CD19^+$, la diversité des gènes IGKV2 associés est plus importante et l'ensemble des gènes IGKV2 étudiés est utilisé. Nous notons que IGKV2-30 est utilisé à plus de 40%.

L'analyse des données du séquençage NGS nous a également permis d'étudier la taille de la diversité jonctionnelle dans les sous-populations $CD34^+/CD19^-$ et $CD34^-/CD19^+$ (**Figure 46**). Les résultats montrent que la taille de diversité est plus importante dans la population immature que dans la population mature. Dans les deux populations, le pourcentage de réarrangements ne présentant aucun ajout de nucléotides est similaire (18%).

II.3.a.iv Analyse *in silico* d'un réarrangement atypique $V_{\kappa 2}$ - V_{κ}

Les réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} , par leur structure partiellement complémentaire, s'apparentent à des pri-miRNA (**Figure 47**). Dans cette dernière partie, nous présentons un exemple d'analyse *in silico* de deux réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} dont les séquences ont été obtenues à partir des sous-populations cellulaires de sang placentaire. Les deux séquences sont $V_{\kappa 2}$ -30- $V_{\kappa 1}$ -27 (**Figure 47A**) et $V_{\kappa 2D}$ -29- $V_{\kappa 1D}$ -8 (**Figure 47B**). Il s'agit de réarrangement impliquant des segments géniques soit du locus proximal ($V_{\kappa 2}$ -30- $V_{\kappa 1}$ -27), soit du locus distal ($V_{\kappa 2D}$ -29- $V_{\kappa 1D}$ -8) et dont la N-diversité est de taille variable, respectivement 9 et 18 nucléotides.

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

Ces séquences ont été soumises à un logiciel de prédiction de structures des pri-miRNA, permettant l'identification de deux structures distinctes. Ces structures présentent une caractéristique commune car les nucléotides correspondant à la N-diversité sont impliqués dans la boucle caractéristique de la structure des pri-miRNA. Le logiciel attribue un score indiquant le pourcentage de caractéristiques vérifiées pour que les séquences soumises correspondent à un pri-miRNA. Les scores obtenus V κ 2-30-V κ 1-27 et V κ 2D-29-V κ 1D-8 sont respectivement de 89% et 91%, ce qui est relativement élevé et conforte l'hypothèse que les réarrangements V κ 2-V κ peuvent coder des miRNA.

De plus, lors d'une recherche sur le site miRBase (www.mirbase.org) permettant l'identification de miRNA à partir de séquences potentielles de pri-miRNA, différentes séquences de réarrangements V κ 2-V κ indépendants ont été alignées de façon récurrente avec un miRNA décrit dans la base de données : le miR-12132.

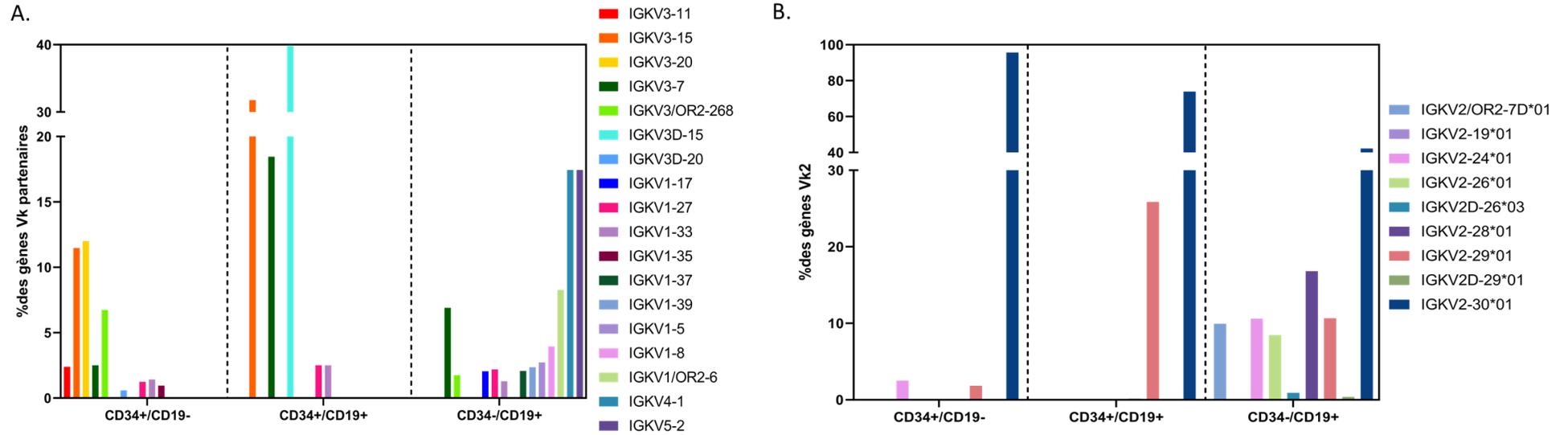


Figure 45 : Analyse des réarrangements Vκ2-Vκ par séquençage à haut débit IonTorrents

Les réarrangements Vκ2-Vκ ont été séquencés par NGS dans les sous-populations de sang placentaire triées CD34⁺/CD19⁻, CD34⁺/CD19⁺ et CD34⁻/CD19⁺. Les gènes Vκ partenaires (A) et Vκ2 impliqués (B) ont été représentés sous forme d'histogramme.

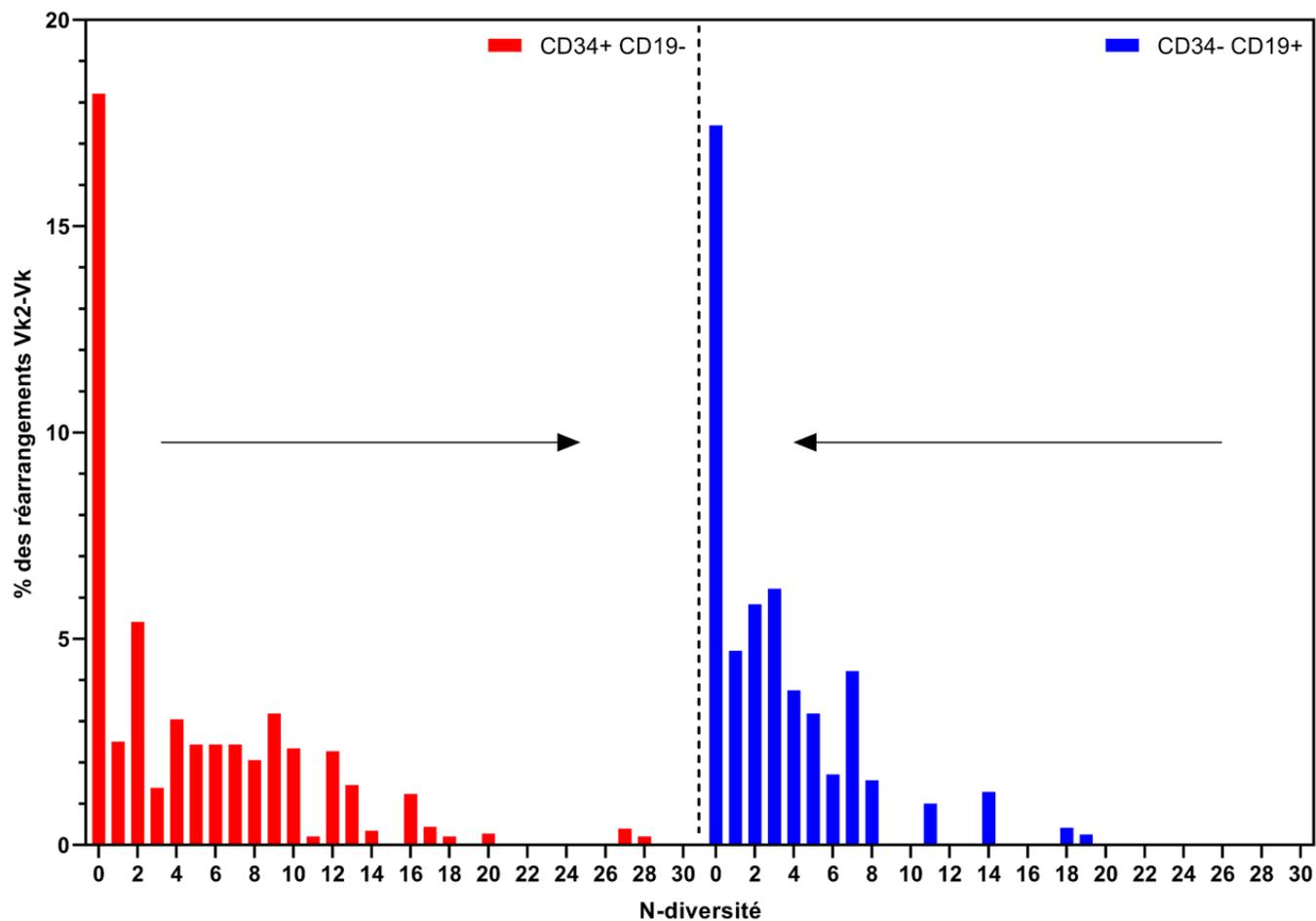
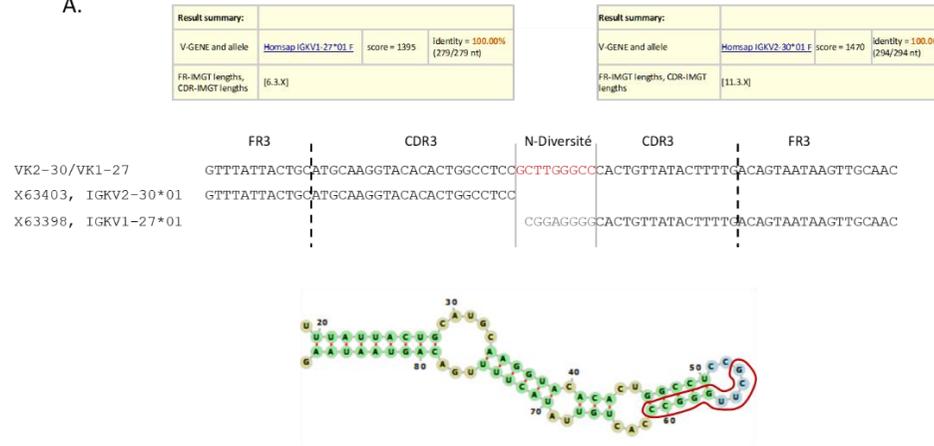


Figure 46 : Analyse de la diversité jonctionnelle (N-diversité) au niveau des réarrangements Vκ2-Vκ

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

A.



B.

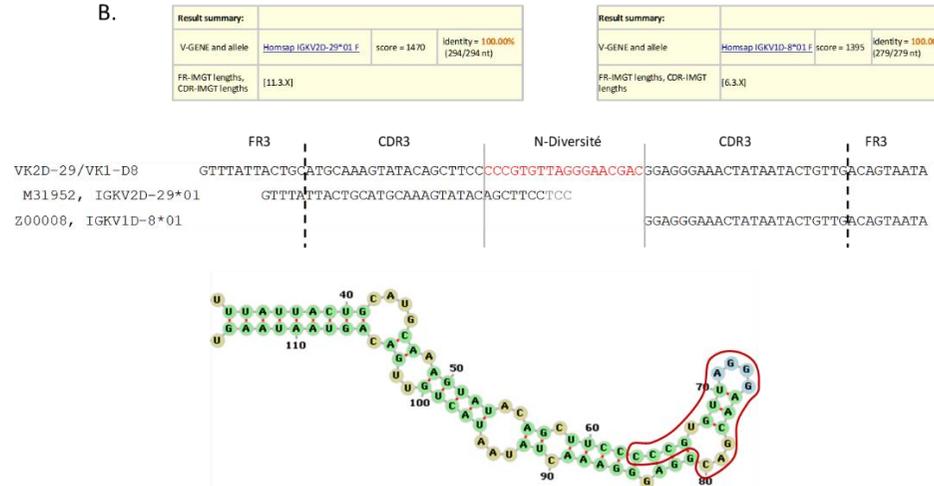


Figure 47 : Exemple d'analyse *in silico* de la structure des réarrangements $V\kappa 2-V\kappa 1$ et leur structures tige-boucle *pri-miRNA*

Les réarrangements $V\kappa 2-30-V\kappa 1-27$ (A.) et $V\kappa 2D-29-V\kappa 1D-8$ (B.) ont été analysés par alignement des séquences puis comparés à la base de données IMGT (V-Quest/Align) (Lefranc and Lefranc, 2020). Les séquences des réarrangements ont été soumises à un logiciel de prédiction de structure de *pri-miRNA* (miRNAFold) pour les séquences $V\kappa 2-30-V\kappa 1-27$ et $V\kappa 2D-29-V\kappa 1D-8$. Les nucléotides entourés en rouge correspondent à la N-diversité. Les nucléotides en bleu représentent la structure tige-boucle.

II.3.b. Etude des réarrangements $V_{\kappa}2-V_{\kappa}$ au sein d'un nouveau modèle d'étude de la différenciation B *in vitro*

Au cours de cette partie, nous avons voulu développer un modèle de différenciation *in vitro* à partir de CSH obtenues de prélèvements de cytophérèse afin de pouvoir observer les conséquences de l'introduction d'un pri-miRNA $V_{\kappa}2-V_{\kappa}$ sur la lymphopoïèse. Dans un premier temps, un protocole inspiré par ceux décrits par Ichii et al en 2008 et 2010 a été mis en place (Ichii et al., 2008, 2010). Ce protocole a été réalisé sans cellules de support, avec un milieu conditionné avec des MSC en présence de SCF (100ng/mL), de Flt3-L (10ng/mL) et de G-CSF (25ng/mL). Un modèle similaire supplémenté en IL-7 et non en G-CSF a été développé et comparé avec le modèle dépourvu en IL-7 et supplémenté en G-CSF. Nous espérons que l'IL-7 favorise la différenciation vers la lignée B au sein du modèle *stromal-free*.

Dans cette optique, deux conditions ont été définies :

- Condition IL-7 : milieu conditionné MSC + SCF (100ng/mL) + Flt3-L (10ng/mL) + IL-7 (10ng/mL)
- Condition G-CSF : milieu conditionné MSC + SCF (100ng/mL) + Flt3-L (10ng/mL) + G-CSF (25ng/mL)

Les explorations sont réalisées aux points J0, J5, J7, J11, J14 et consistent en une étude de la viabilité, du nombre de cellules et de l'expression membranaire des marqueurs CD34, CD19 et CD10 en utilisant le panel LB1 (voir III.2.d).

II.3.b.i Engagement de la différenciation B par l'IL-7 dans un modèle *in vitro stromal-free*

Viabilité et compte cellulaire

La viabilité des cellules en condition G-CSF reste stable puis chute à J14 à 76% (G-CSF J11 vs G-CSF J14, $p < 0,001$, **Figure 48A**). La viabilité cellulaire en condition IL-7 diminue à J5 à 78,25% (IL-7 J0 vs IL-7 J5 $p < 0,001$), puis augmente à 97,9% (IL-7 J5 vs IL-7 J7, $p < 0,001$) au point J7. À partir de J7, une diminution statistique de viabilité est observée à J11 en condition IL-7 (IL-7 J7 vs IL-7 J11, $p < 0,001$) et à J14 (IL-7 J11 vs IL-7 J14, $p < 0,001$), avec une viabilité terminale de 43,5%. De plus, en comparant l'évolution de la viabilité dans les deux conditions étudiées, une différence statistique de viabilité est observée en faveur du milieu G-CSF à J5 (G-CSF J5 vs IL-7 J5, $p = 0,01$), J11 (G-CSF J11 vs IL-7 J11, $p < 0,001$) et J14 (G-CSF J14 vs IL-7 J14, $p < 0,001$). Cette différence est corrélée avec une diminution significative de la

concentration cellulaire à J5 (G-CSF J5 vs IL-7 J5, $p=0,0078$, **Figure 48B**), J11 (G-CSF J11 vs IL-7 J11, $p<0,001$) et J14 (G-CSF J14 vs IL-7 J14, $p<0,001$) en défaveur de la condition IL-7. On observe également que le fold change de prolifération cellulaire est supérieur en condition G-CSF (Fold change = 10, de 100000 cellules à J0 puis 1000000 cellules à J11) qu'en condition IL-7 (Fold change = 5, 100000 cellules à J0 et 500000 cellules à J7). De plus, il est important de souligner que le pic de prolifération est différent entre les deux conditions puisqu'il apparaît à J7 en condition IL-7 et à J11 en condition G-CSF.

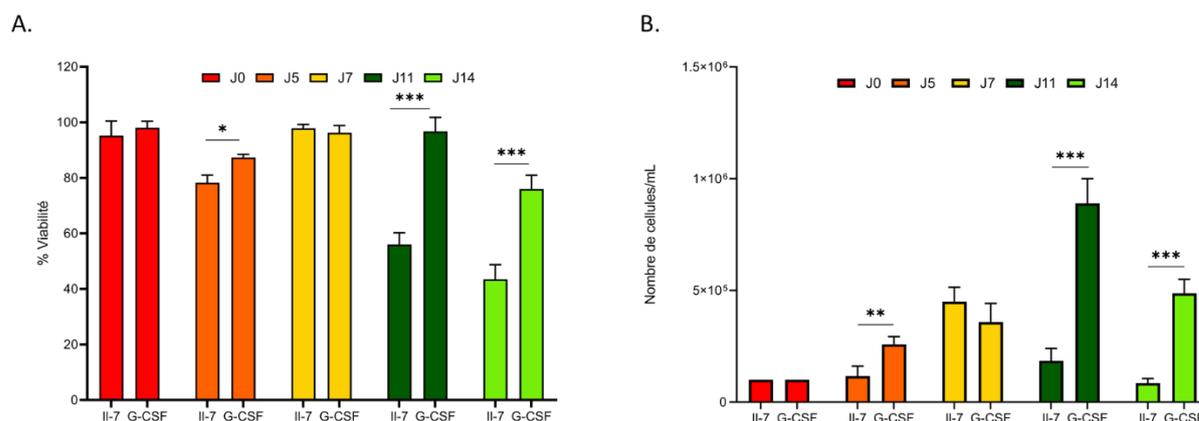


Figure 48 : Suivi de la prolifération et de la viabilité cellulaire au sein d'un modèle de différenciation B stromal-free en présence ou d'absence d'IL-7/G-CSF

Un suivi de la viabilité cellulaire (A) et du compte cellulaire (B) a été réalisé au sein d'un modèle de différenciation B *in vitro* stromal-free ($n=4$) en présence ou d'absence d'IL-7/G-CSF. Une comparaison statistique par un test Kruskal-Wallis a été réalisée et le seuil de significativité a été défini pour $p<0,05$, *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$

Expression des marqueurs B au cours de la différenciation

L'évolution des marqueurs B au cours de la lymphopoïèse B montre une différence significative de l'expression du CD19 et du CD10 respectivement à partir de J7 et J11 en condition IL-7 par rapport à la condition G-CSF (**Figure 49A**). L'expression du CD10 au cours du temps est croissante dans les deux protocoles mais elle est significativement plus importante en condition IL-7 avec plus de 30% des cellules CD10⁺ à J7 (IL-7 J5 vs IL-7 J7, $p = 0,0147$) et significativement plus importante à J11 (IL-7 J11 vs G-CSF J11, $p = 0,026$, **Figure 49B**) et J14 (IL-7 J14 vs G-CSF J14, $p = 0,007$, **Figure 49B**) par rapport à la condition G-CSF. Concernant l'expression du CD19, une différence d'expression significative est observée à partir de J7 jusqu'à J14 dans la condition IL-7 par rapport à la condition G-CSF (IL-7 J7 vs G-CSF J7, $p = 0,0450$, IL-7 J11 vs G-CSF J11, $p<0,001$, IL-7 J14 vs G-CSF J14, $p = 0,0119$, **Figure 49B**). À J7, environ 11,83% des cellules en différenciation expriment le CD19. De plus, 29,9% des

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

cellules CD34⁻/CD10⁺ expriment le CD19 en condition IL-7 contre 1,8% en condition G-CSF (*data not shown*). Enfin, aucune différence d'expression du CD34 n'a été observée entre les deux modèles. La diminution du CD34 au cours de la différenciation est très faible avec plus de 80% des cellules exprimant de façon persistante ce marqueur à J14.

Ces résultats montrent que l'IL-7 semble nécessaire à la différenciation B, en permettant l'avancée des cellules engagées dans la voie B. En effet, contrairement à la condition G-CSF, la condition IL-7 permet l'apparition d'une sous-population CD34⁻/CD10⁺/CD19⁺, phénotypiquement très proche des marqueurs retrouvés au niveau des stades pré-B/immature.

A contrario, l'IL-7 pourrait avoir un effet négatif sur la viabilité et la prolifération cellulaire dans ce modèle de différenciation.

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

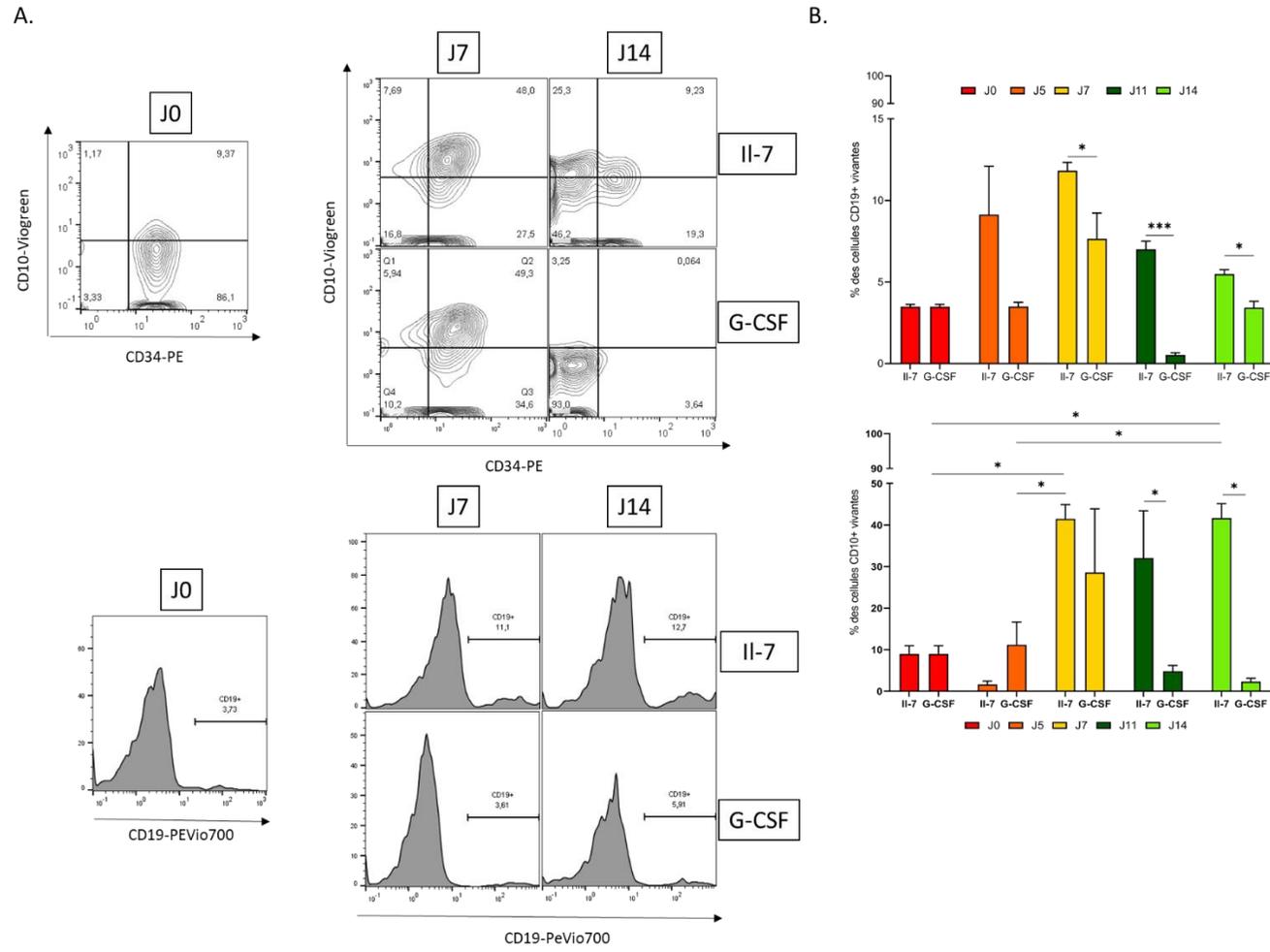


Figure 49 : Effet de l'IL-7 et du G-CSF sur un modèle de différenciation B in vitro stromal-free

Un suivi de l'expression membranaire des marqueurs CD34, CD10, CD19 (A-B) a été réalisé en présence/absence d'IL-7 ou G-CSF (n=4). Une comparaison statistique par un test Kruskal-Wallis a été réalisée et le seuil de significativité a été défini pour $p < 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

II.3.c. Développement d'un modèle de différenciation B en coculture

Afin de favoriser la viabilité et la prolifération cellulaire tout en induisant la différenciation, nous avons mis en place trois nouveaux protocoles de différenciation B *in vitro* :

- Coculture avec des cellules stromales murines (lignée MS-5 : Murine Stromale 5) = condition MS-5
- Coculture avec des cellules mésenchymateuses de moelle osseuse = condition BM-
MSC
- Coculture avec des cellules mésenchymateuses de la gelée de Wharton = condition
WJ-MSC

II.3.c.i Caractérisation des cellules de support

Une étude phénotypique a été réalisée sur les populations de BM-MSC et WJ-MSC. Les CSM sont positives phénotypiquement pour le CD90, le CD105, CD73, le CD44 et le CD166 et négatives pour le CD34, CD45, CD14 et HLA-DR (**Figure 50A**). De plus, l'induction d'un protocole de différenciation adipocytaire a été mise en place afin de confirmer leur potentiel d'orientation vers cette lignée. À J7, J14 et J21, une coloration Red Oil est observée dans les deux échantillons à l'issue de cette différenciation, non retrouvée en condition de prolifération (**Figure 50B**). Par ailleurs, le nombre de cellules positives par la coloration Red Oil est plus important pour les BM-MSC par rapport au WJ-MSC (**Figure 50B**).

Les BM-MSC et les WJ-MSC isolées présentent donc l'ensemble des caractéristiques minimales des CSM telles que définies par Dominici et al (Dominici et al., 2006).

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

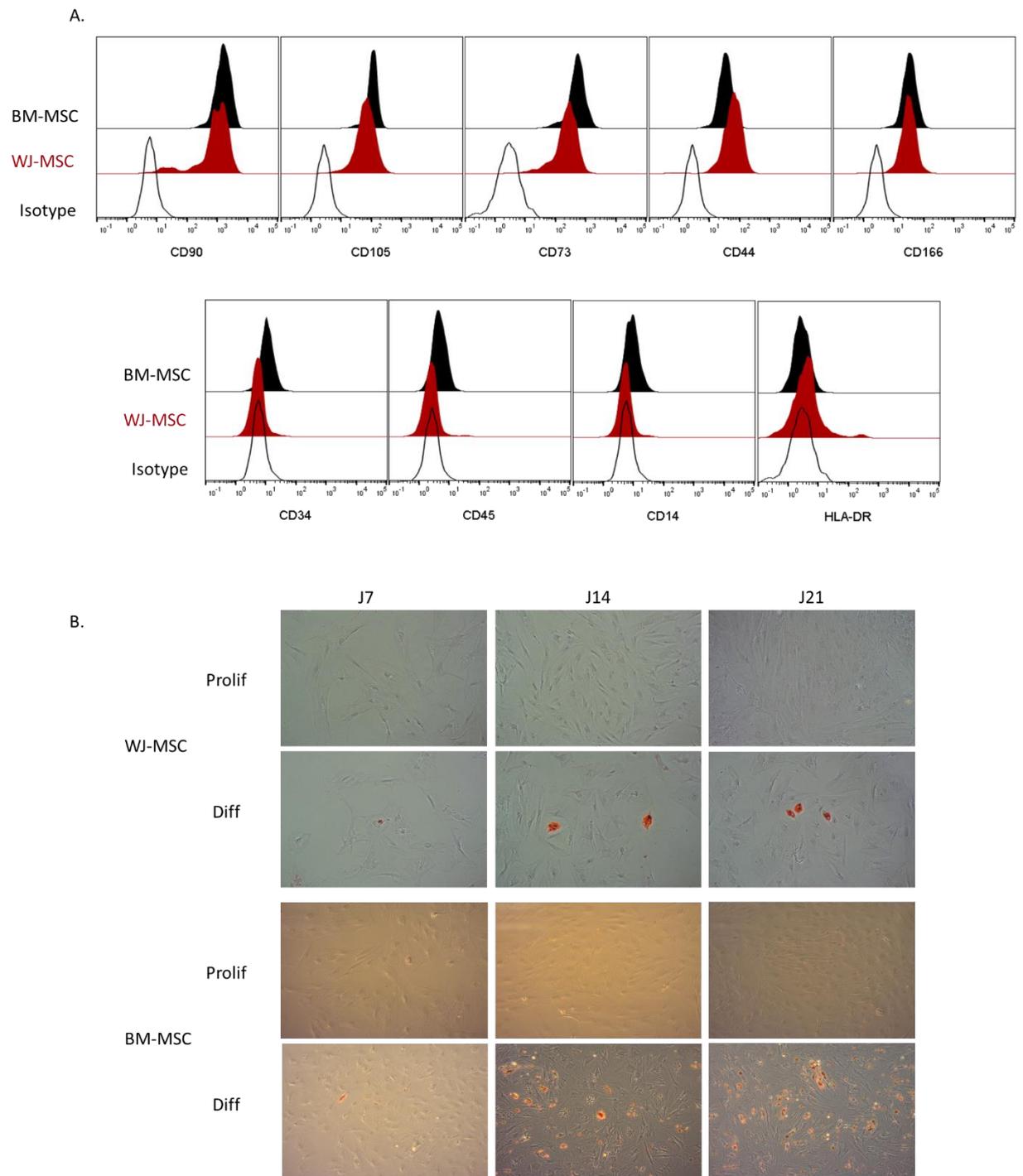


Figure 50 : Caractérisation fonctionnelle et phénotypique des MSC

Une caractérisation phénotypique a été réalisée en utilisant le panel de cytométrie MSC1 (A.) en présence d'isotypes contrôles. Les BM-MSC et les WJ-MSC ont été mises en culture en condition de prolifération et de différenciation adipocytaire. La révélation des vacuoles lipidiques a été réalisée à J7, J14 et J21 par coloration Red Oil (B.).

II.3.c.ii Comparaison des trois modèles développés

Trois protocoles de différenciation B à partir de CD34⁺ de cytophèrese ont été mis en place en coculture avec trois cellules de supports : les MS-5, les BM-MSC et les WJ-MSC. Le milieu de culture utilisé est supplémenté en IL-7. La viabilité, le compte cellulaire et l'expression membranaire du CD19, CD34, CD10, de la chaîne μ , de la chaîne légère de substitution (SLC) VpréB et de la chaîne légère κ (LC κ : « Light chain ») ont été analysés aux points J0, J5, J7, J11 et J14 pour les trois conditions de cultures.

Viabilité et compte cellulaire

Dans un premier temps, concernant la viabilité cellulaire, elle reste supérieure à 90% pour les trois modèles de différenciation durant l'intégralité du protocole. En revanche, on peut noter une légère baisse (mais significative) de viabilité en condition BM-MSC à J7 (MS-5 vs BM-MSC $p = 0,004$; WJ-MSC vs BM-MSC $p = 0,0031$, **Figure 51A**) et J14 (MS-5 vs BM-MSC $p=0,0133$; WJ-MSC vs BM-MSC $p = 0,0009$). La croissance cellulaire est constante et similaire dans les trois conditions jusque J7. À J11, une augmentation significative de la concentration cellulaire est observée en condition de culture WJ-MSC par rapport aux deux autres conditions (WJ-MSC vs MS-5 $p<0,0001$; WJ-MSC vs BM-MSC $p <0,0001$, **Figure 51B**). Dans une moindre mesure, la concentration cellulaire à J11 est également plus importante en condition MS-5 par rapport à la condition BM-MSC (MS-5 vs BM-MSC $p = 0,0027$). À J14, la concentration cellulaire est significativement supérieure dans la condition WJ-MSC avec plus de $1,5 \times 10^6$ cellules/mL (WJ-MSC vs MS-5 $p<0,0001$; WJ-MSC vs BM-MSC $p <0,0001$).

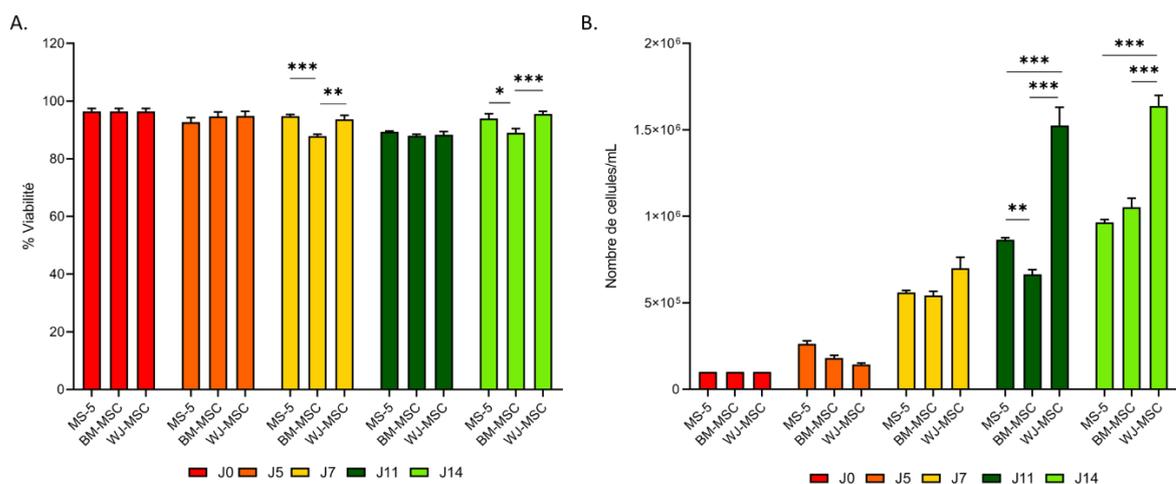


Figure 51 : Suivi de la prolifération et de la viabilité cellulaire au sein de trois modèles de différenciation B en coculture de cellules stromales

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

*Un test de viabilité (A) et un comptage cellulaire (B) ont été réalisés sur les cellules en coculture avec la lignée MS-5 (n=4), des BM-MSC (n=4) et des WJ-MSC (n=4). Une comparaison statistique aux différents points a été réalisée par test Kruskal-Wallis et le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** ; $p < 0,001$.*

Expression des marqueurs B au cours de la différenciation

L'expression des marqueurs CD34, CD10 et CD19 est analysée, par cytométrie en flux, dans les trois conditions de différenciation à J5, J7, J11 et J14 (**Figure 52**). L'expression du CD34 au cours de la différenciation montre une diminution significative à J5 (**Figure 52A**, WJ-MSC vs MS-5 $p=0,0001$) et J14 (**Figure 52D**, WJ-MSC vs MS-5 $p=0,0075$) en condition WJ-MSC par rapport à la condition MS-5. Il est important de noter que l'expression de CD34 en condition MS-5 à J14 est non significative par rapport à J0 ($p=0,46$), alors qu'en condition BM-MSC et WJ-MSC, cette diminution est significative (BM-MSC $p=0,0214$, WJ-MSC $p=0,0001$, *data not shown*). L'expression du CD10 n'est pas uniforme et linéaire au cours de la différenciation dans les trois conditions de différenciation. En effet, en condition BM-MSC, l'expression est plus importante à J5 par rapport aux deux autres conditions (**Figure 52A**, BM-MSC vs MS-5 $p=0,0001$; BM-MSC vs WJ-MSC $p=0,0001$). À la suite de la différenciation, l'expression de CD10 fluctue dans les trois conditions. À J14, l'expression du CD10 est significativement plus importante en condition WJ-MSC par rapport à la condition MS-5 mais n'est plus significative comparée à la condition BM-MSC (**Figure 52D**, WJ-MSC vs MS-5 $p=0,0192$). Le pourcentage de cellules CD19⁺ est croissant dans les conditions BM-MSC et WJ-MSC au cours de la différenciation, avec un pic d'expression à partir de J7 et jusqu'à J14 en condition WJ-MSC (respectivement 33,4 et 58,2% des cellules). Cette augmentation de fréquence est significative en condition WJ-MSC à J7 (**Figure 52B**, WJ-MSC vs MS-5 $p=0,0005$; WJ-MSC vs BM-MSC $p=0,0053$), J11 (**Figure 52C**, WJ-MSC vs MS-5 $p=0,035$) et J14 (**Figure 52D**, WJ-MSC vs MS-5 $p < 0,0001$; WJ-MSC vs BM-MSC $p=0,0058$) par rapport aux deux autres conditions.

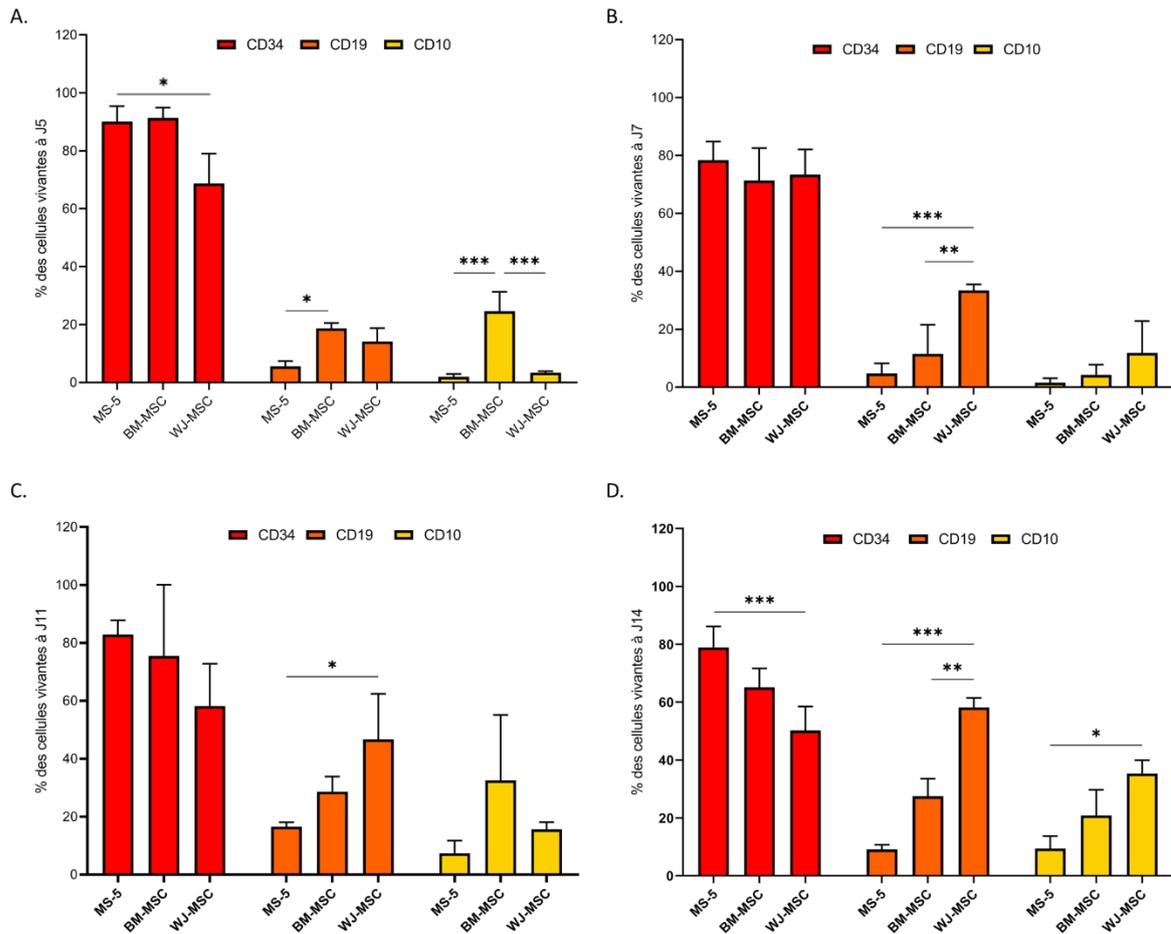


Figure 52 : Expression des marqueurs CD34, CD19 et CD10 au cours des modèles de différenciation B in vitro en coculture

Une quantification de l'expression des marqueurs en cytométrie en flux ($n=4$) a été réalisée à J5 (A), J7 (B), J11 (C) et J14 (D). Les pourcentages exprimés sont relatifs aux cellules vivantes. Une comparaison statistique aux différents points et pour chaque marqueur a été réalisée par test Kruskal-Wallis et le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** ; $p < 0,001$

Cinétique d'apparition des sous-populations B au cours de la différenciation

Les fréquences d'apparition des sous-populations CD10⁺/CD19⁻ et CD10⁺/CD19⁺ ont également été analysées (**Figure 53A-C**). Une différence significative de la fréquence des populations CD10⁺/CD19⁻ en faveur des conditions WJ-MSC et BM-MSC par rapport à la condition MS-5 est observée à J7 (**Figure 53B**, WJ-MSC vs MS-5 $p=0,0153$; WJ-MSC vs BM-MSC $p=0,0062$), J11 (WJ-MSC vs MS-5 $p=0,0415$) et J14 (WJ-MSC vs MS-5 $p=0,035$; BM-MSC vs MS-5 $p=0,0478$). Concernant les populations plus matures CD10⁺/CD19⁺, la fréquence est plus importante en condition WJ-MSC par rapport aux deux autres conditions à J7 (**Figure 53C**, WJ-MSC vs MS-5 $p=0,0004$; WJ-MSC vs BM-MSC $p=0,0007$), J11 (WJ-MSC vs MS-5 $p < 0,0001$; WJ-MSC vs BM-MSC $p=0,002$) et J14 (WJ-MSC vs MS-5 $p < 0,0001$; WJ-MSC vs BM-MSC $p=0,0058$). Plus de 50% des cellules coexpriment le CD10 et le CD19 à J14 de

différenciation en condition WJ-MSC. On observe également une différence significative entre les conditions BM-MSC et MS-5 mais uniquement à J14 (BM-MSC vs MS-5 $p=0,0399$).

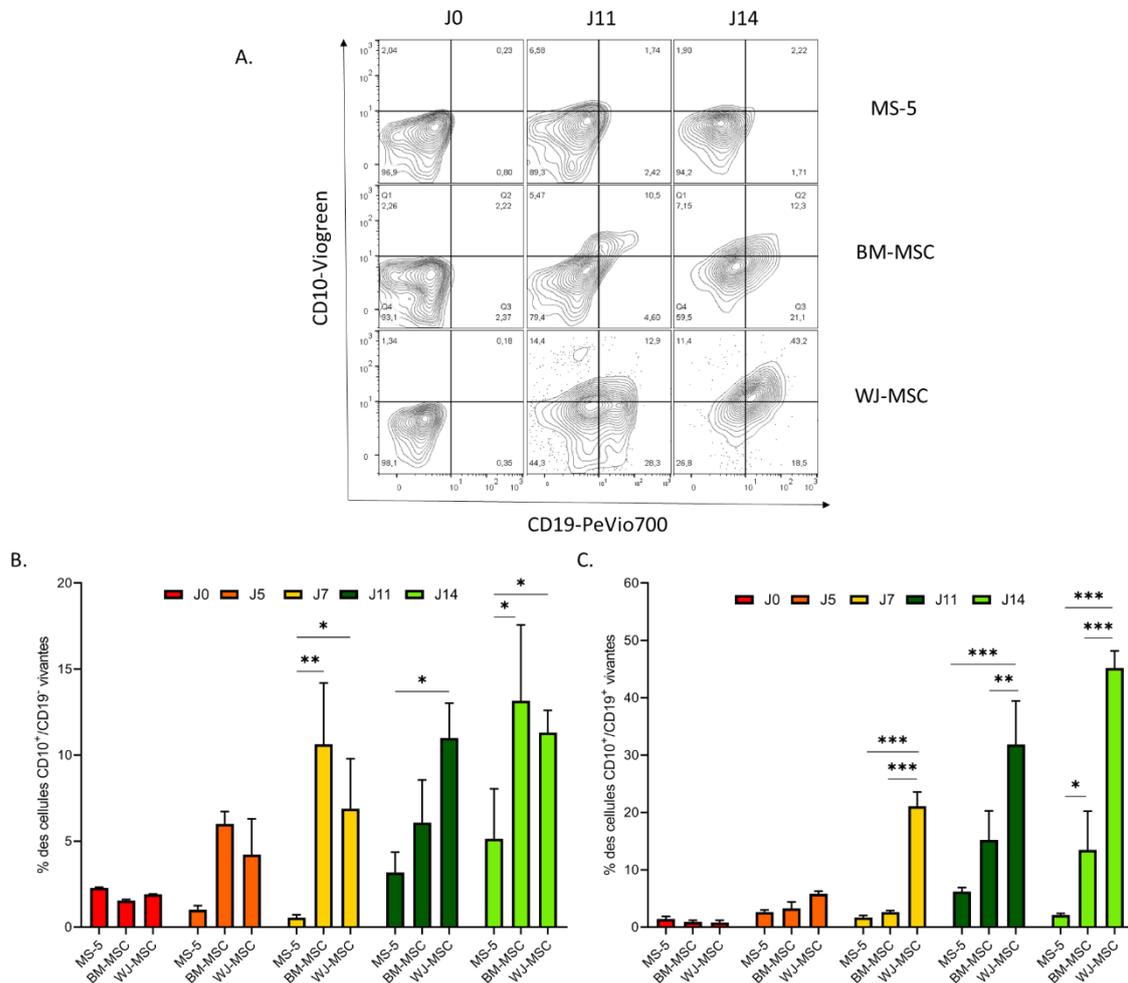


Figure 53 : Induction de la différenciation B dans 3 modèles de différenciation en coculture avec des cellules stromales

Un test de viabilité (A) et un comptage cellulaire (B) ont été réalisés sur les cellules en coculture avec la lignée MS-5 ($n=4$), des BM-MSC ($n=4$) et des WJ-MSC ($n=4$). Une comparaison statistique aux différents points a été réalisée par test Kruskal-Wallis et le seuil de significativité a été fixé à $p<0,05$, * : $p<0,05$, ** : $p<0,01$, *** ; $p<0,001$.

Expression du Pré-BCR et du BCR mature au cours de la différenciation *in vitro*

La fréquence des cellules exprimant la chaîne μ membranaire a été réalisée par cytométrie en flux (**Figure 54B**). À partir de J5 et jusqu'à J7, une augmentation importante et significative de la fréquence des cellules exprimant la chaîne μ est observée en condition BM-MSC et WJ-MSC par rapport à la condition MS-5 (WJ-MSC vs MS-5 $p<0,0001$; BM-MSC vs MS-5 $p=0,0007$). À partir de J11, la fréquence des cellules exprimant une chaîne μ augmente en condition WJ-MSC et reste stable en condition BM-MSC (WJ-MSC vs BM-MSC, J11

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

$p=0,0002$, J14 $p<0,0001$). En condition BM-MS, la fréquence des cellules μ -chain⁺ reste significativement supérieure par rapport à la condition MS-5 à J11 et J14 (BM-MS vs MS-5, J11 $p=0,0035$, J14 $p=0,0089$).

Afin de caractériser l'apparition du pré-BCR et du BCR, un marquage membranaire du CD179a (SLC VpréB) (**Figure 54A-C**) et de la chaîne légère kappa (LC κ) a été réalisée sur les cellules μ -chain⁺ (**Figure 54A-D**). À J7, la fréquence des cellules IgM⁺/CD179a⁺ est de 48,5% en condition WJ-MS contre 7,8% (WJ-MS vs MS-5 $p<0,0001$) et 1,4% (WJ-MS vs BM-MS $p<0,0001$) respectivement en condition MS-5 et BM-MS. À J11, la fréquence des cellules IgM⁺/CD179a⁺ diminue fortement en condition WJ-MS, devenant équivalente aux autres conditions. En parallèle de cette diminution, une forte augmentation de l'expression de la LC κ est observée à J14 (**Figure 54A-D**) en condition WJ-MS par rapport aux conditions MS-5 (WJ-MS vs MS-5 $p<0,0001$) et BM-MS (WJ-MS vs BM-MS $p<0,0001$). À J14, en condition WJ-MS, 31,5% des cellules μ -chain⁺ présentent une chaîne légère κ .

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

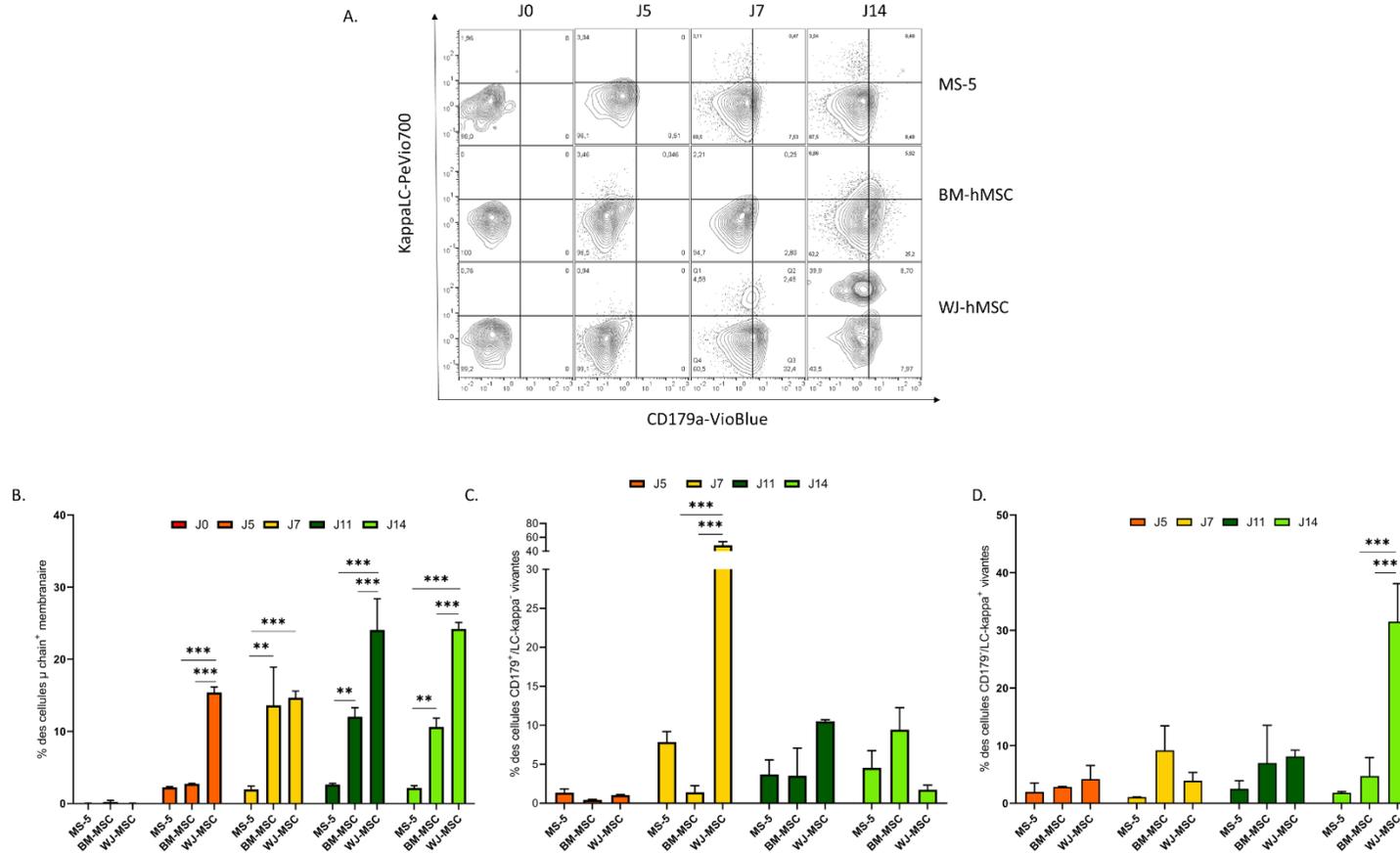


Figure 54 : Expression du pré-BCR et du BCR mature dans 3 modèles de différenciation B en coculture avec des cellules stromales

La fréquence des cellules exprimant la chaîne μ (B.), la $IgM^+/SLC^+/LC\kappa^-$ (A, C) et la $IgM^+/SLC^-/LC\kappa^+$ (A, D) a été réalisée par cytométrie en flux pour les conditions de différenciation MS-5 ($n=4$), BM-MSC ($n=4$) et WJ-MSC ($n=4$) à J0, J5, J7, J11 et J14. Les pourcentages exprimés sont relatifs aux cellules vivantes. Une comparaison statistique aux différents points a été réalisée par test Kruskal-Wallis et le seuil de significativité a été fixé à $p<0,05$, * : $p<0,05$, ** : $p<0,01$, *** ; $p<0,001$.

II.3.d. Caractérisation cellulaire et moléculaire du modèle WJ-MSC

Dans les parties précédentes, il a été démontré que le protocole de différenciation mis en place sur WJ-MSC permet la différenciation des CSH en LB exprimant une chaîne légère κ à la surface. L'apparition du CD19 au cours de la phase précoce de différenciation est corrélée avec l'apparition de la chaîne μ membranaire portant la SLC VpréB, puis à J14 associé avec une chaîne légère kappa. Afin de pouvoir caractériser au mieux ce modèle une analyse de colocalisation du CD79a membranaire et de la chaîne μ a été réalisée par immunofluorescence. En parallèle, une coloration MGG a été réalisée pour caractériser le type cellulaire des cellules différenciées à J14. Enfin, une analyse de l'expression des FT et de l'avènement des réarrangements conventionnels $V\kappa$ - $J\kappa$ et atypiques $V\kappa$ - $V\kappa$ a été réalisée sur ce modèle.

II.3.d.i Colocalisation du CD79a et de la chaîne μ au cours de la différenciation B *in vitro*

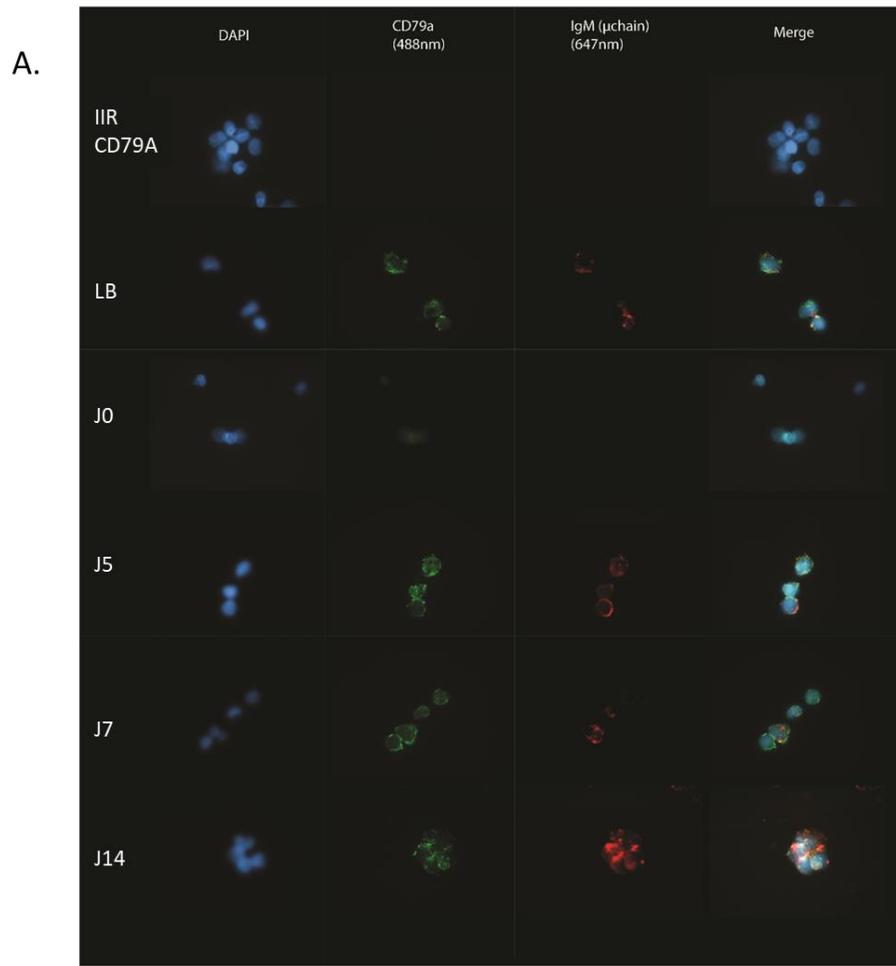
Afin de confirmer l'apparition d'une chaîne μ potentiellement fonctionnelle au cours de la différenciation, la co-expression membranaire du CD79a ($Ig\alpha$) et de la chaîne μ a été réalisée, par technique d'immunofluorescence, à J0, J5, J7 et J14 en condition WJ-MSC pour observer un co-marquage de ces deux marqueurs. Des LB primaires de cytophère ont été utilisés en contrôle de cette expérience.

Au fur et à mesure de la différenciation, un marquage CD79a et chaîne μ est détecté (**Figure 55A**). À J7 et J14, certains co-marquages peuvent être observés (Merge, couleur jaune). Ces co-marquages ne sont pas présents à J5 de la différenciation et aucun marquage n'est visible à J0.

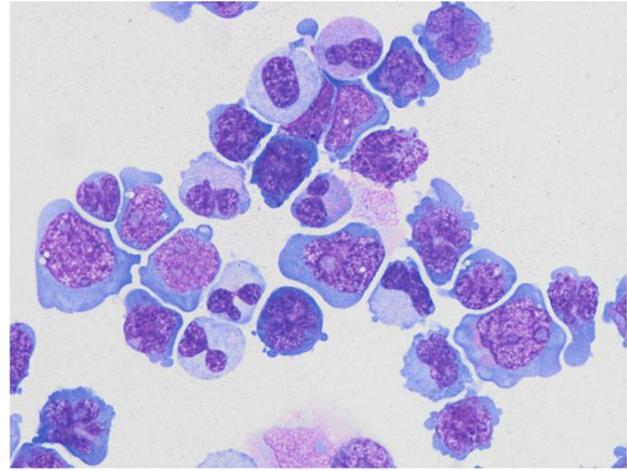
II.3.d.ii Caractérisation des types cellulaires présents à J14 par MGG

En parallèle de la technique d'immunofluorescence, une coloration MGG a été réalisée sur les cellules non-adhérentes en condition WJ-MSC (**Figure 55B**). À J14, 64% des cellules ont été identifiées avec un phénotype lymphoïde et 36% avec un phénotype myéloïde (polynucléaire neutrophile, promyélocyte et myéloblaste).

Partie II : Objectifs, résultats et discussion



B.



Lymphoïde	Myéloblaste	Promyélocyte	PNN
64%	7%	7%	22%

Figure 55 : Imagerie et coloration MGG des cellules B en différenciation

L'expression protéique de CD79a (488nm) et de la chaîne lourde μ (647nm) a été réalisée par immunofluorescence à J0, J5, J7 et J14 (A.) en condition WJ-MS (n=1). Les noyaux ont été révélés par le DAPI (405nm) et colorisés artificiellement en bleu. En parallèle, une coloration MGG a été réalisée afin d'obtenir la fréquence et le type cellulaire des populations présentes à J14.

II.3.d.iii Expression des facteurs de transcription au cours de la différenciation

Dans cette partie, nous avons quantifié par qRT-PCR l'expression des FT majeurs de la lymphopoïèse B et des protéines impliquées dans la recombinaison V(D)J afin de voir si les voies de signalisation activées dans ce modèle sont similaires à celles déjà décrites dans la littérature. Nous avons choisi de rajouter le point J3 entre J0 et J5 afin d'observer l'induction des FT induits de manière très précoce au sein du modèle. Dans un premier temps, les FT majeurs de la lymphopoïèse B (EBF-1, E2A, IKZF1, PU-1, Pax-5, IKZF3, IRF-4, IRF-8) ont été quantifiés à J0, J3, J5, J7, J11, J14 en condition WJ-MSD (**Figure 56**).

À J3, une augmentation de l'expression de IKZF1 près de 10 fois supérieure par rapport à J0 est observée (**Figure 56A**, J0 vs J3 $p=0,0008$). Cette expression de IKZF1 reste constante à J5 (J0 vs J5 $p=0,01$) puis redevient basale à J7 et J11 (J5 vs J7 $p=0,0493$). À J14, IKZF1 est de nouveau surexprimé par rapport à J7 (J14 vs J7 $p = 0,0019$) et J11 (J14 vs J11 $p = 0,0071$). Le FT EBF-1 présente une augmentation à J5 par rapport à J0 et J3 (**Figure 56B** J0 vs J5 $p=0,041$; J3 vs J5 $p=0,0224$). L'expression de EBF-1 est croissante jusqu'à J11 (J5 vs J7 $p=0,0095$; J7 vs J11 $p=0,0006$) puis, son expression reste forte et stable à J14. Concernant E2A, une légère augmentation d'expression est observée à J3 et J5 mais sans différence statistiquement significative. Toutefois, à partir de J7, l'expression devient significativement plus importante qu'à J0 (**Figure 56C**, J0 vs J7 $p=0,0099$). Par la suite, son expression reste stable à J11 et J14. L'expression de PU-1 est très faiblement induite au cours de la différenciation. En effet, malgré une tendance à la sous-expression observée à J3, une augmentation d'expression n'est observée qu'en fin de différenciation, à partir de J11 et J14 (**Figure 56D**, J0 vs J11 $p=0,0052$ J0 vs J14 $p=0,0052$).

De manière similaire à PU-1, deux autres FT présentent une expression basale ou une tendance à la sous-expression durant la majeure partie de la différenciation puis sont exprimés en fin de différenciation. L'un des de ces FT est Pax-5. En effet, les résultats montrent que dans notre modèle de différenciation, l'expression de Pax-5 a une tendance à la diminution de J3 à J7. Cependant, Pax-5 est surexprimé à J11 et J14 par rapport à J7 (**Figure 56E**, J7 vs J11 $p=0,01$, J7 vs J14 $p=0,0129$). Ce schéma d'expression est également similaire pour le FT IKZF3. En effet, ce dernier est sous-exprimé durant l'intégralité de la différenciation mais est fortement exprimé à J14 (**Figure 56F**, J0 vs J14 $p=0,0494$, J7 vs J14 $p=0,005$, J11 vs J14 $p=0,0123$).

Enfin, les derniers FT majeurs observés sont IRF4 et IRF8. Ces deux FT présentent une cinétique d'expression similaire au cours de la lymphopoïèse B. En effet, IRF4 a une cinétique d'expression progressive au cours du protocole de différenciation. Ce dernier est surexprimé à partir de J5 par rapport à J0 (**Figure 56G**, J0 vs J5 $p=0,0177$). À J14, l'expression d'IRF4 est plus importante par rapport à celle de J7 (J7 vs J14 $p=0,0435$). IRF8 est surexprimé à J5 de différenciation par rapport à J0 (**Figure 56H**, J0 vs J5 $p=0,0257$). Cependant, malgré une tendance à l'augmentation, les écarts d'expression entre les groupes à partir de J5 ne montrent pas de différences significatives.

Ces résultats montrent que la majorité des FT essentiels à la différenciation B sont exprimés au cours du modèle *in vitro* développé au sein du laboratoire.

II.3.d.iv Expression des facteurs de transcription partenaires de la recombinaison V(D)J

Dans un second temps, les acteurs de la recombinaison V(D)J ont été quantifiés par qRT-PCR aux points J0, J3, J5, J7, J11, J14 en condition WJ-MSK (**Figure 57**). Les enzymes RAG présentent deux cycles de forte expression qui sont séparés par une phase d'extinction importante de l'expression. En effet, RAG-1 et RAG-2 présentent une forte expression en début de différenciation entre J3 et J5 par rapport à J0 (**Figure 57A-B**, RAG-1 $p<0,0001$, RAG-2 $p=0,001$). À J5, l'expression des RAG-1 est significativement plus faible qu'à J3 ($p<0,0001$). Le niveau d'expression de RAG-1 et RAG-2 à J7 est comparable au niveau d'expression à J0. L'expression de ces deux enzymes augmente de nouveau de manière très importante à J11 par rapport à J7 (RAG-1 $p<0,0001$, RAG-2 $p=0,0002$) et tend de nouveau vers la diminution à J14 pour RAG-1 (J11 vs J14 $p = 0,0244$).

L'expression de la TdT (**Figure 57C**) et d'AID (**Figure 57D**) au cours de la différenciation B *in vitro* est également observée. La cinétique d'expression de la TdT dans le modèle est transitoire. En effet, la TdT est surexprimée à J5 et J7 par rapport à J0 (J0 vs J5 $p=0,025$, J0 vs J7 $p=0,0062$) et J3 (J3 vs J5 $p=0,0125$, J0 vs J7 $p=0,0032$). À J11 et J14, l'expression de la TdT diminue par rapport à J7 (J7 vs J11 $p=0,0007$, J7 vs J14 $p=0,0007$) et tend vers une sous-expression par rapport au niveau basal J0.

Enfin, de façon inattendue, l'expression d'AID est très forte et relativement constante dans le modèle *in vitro* de différenciation B (**Figure 57D**). En effet, dès J3 et jusque J14, AID est fortement exprimé par rapport à J0 (J0 vs J3 $p=0,005$). À J11, l'expression de AID est également plus importante qu'à J7 (J7 vs J11 $p=0,0356$).

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

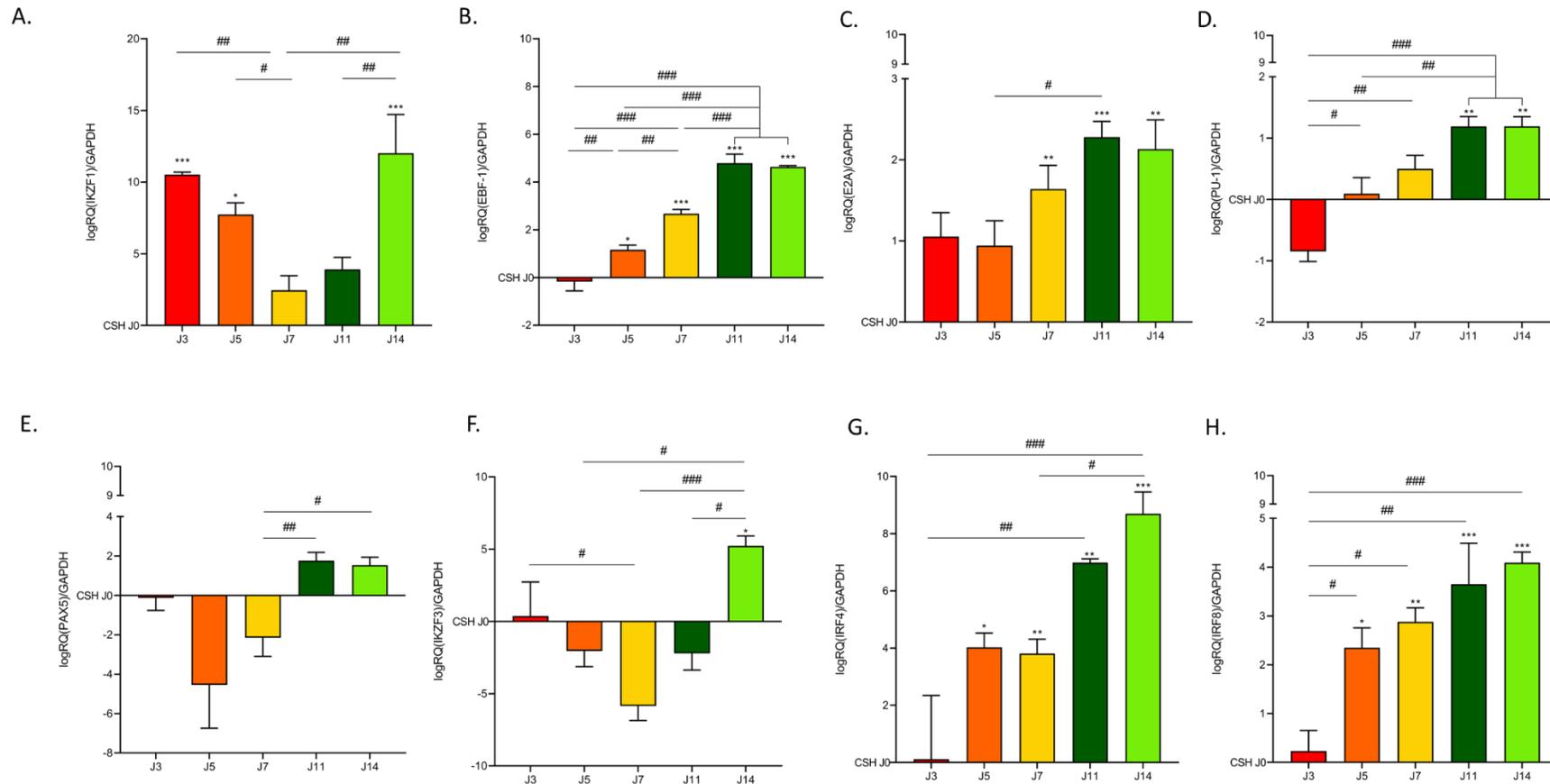


Figure 56 : Cinétique d'expression des facteurs de transcription au cours du temps dans le modèle de différenciation B en coculture avec des WJ-MSC

L'expression des ARNm codant les facteurs de transcription B EBF-1 (A.), E2A (B.), Ikaros (IKZF1, C.), PU-1(D.), Pax-5 (E.), IKZF-3 (F.), IRF4 (G.) et IRF8 (H.) a été analysée par qRT-PCR aux points J0, J3, J5, J7, J11 et J14 de la différenciation (n=3). L'expression est normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH, et comparée à l'expression à J0. Une comparaison statistique aux différents points a été réalisée par test Kruskal-Wallis. Les étoiles (*) représentent la comparaison des points J3-J14 avec J0, le dièse (#) la comparaison des points J3-J14. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$, * ou # : $p < 0,05$, ** ou ## : $p < 0,01$, *** ou ### : $p < 0,001$

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

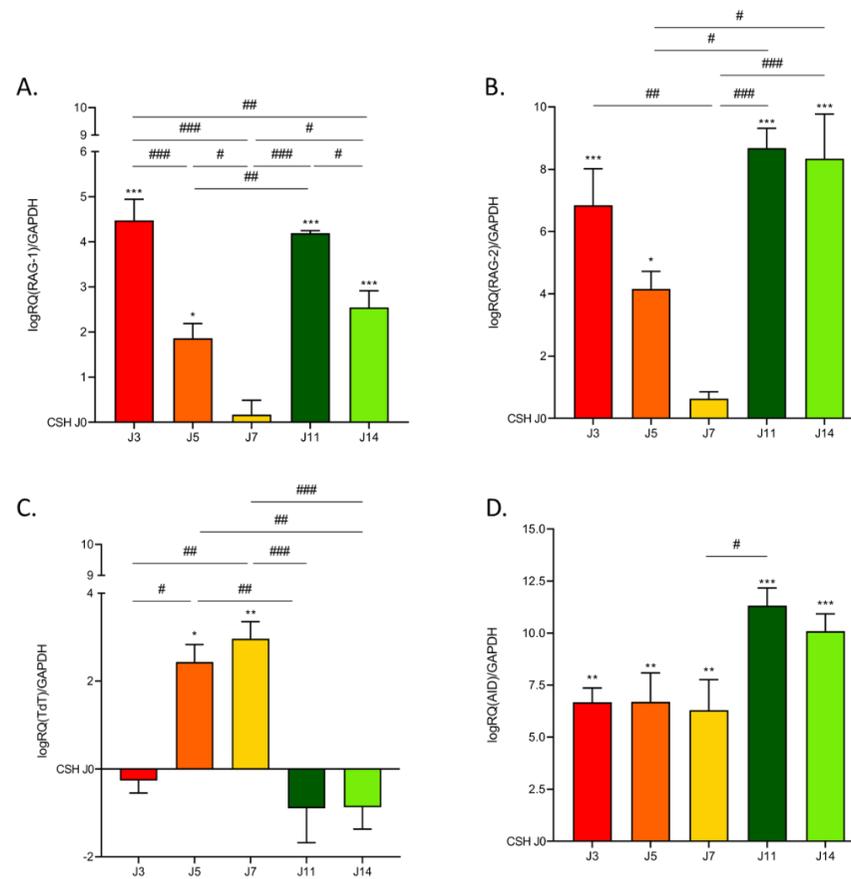


Figure 57 : Cinétique d'expression des acteurs de la recombinaison au cours du temps dans le modèle de différenciation B en coculture avec des WJ-MSC

L'expression des ARNm codant les protéines responsables de la recombinaison *V(D)J* RAG-1 (A.), RAG-2 (B.), TdT (C.) mais également AID (D.) ont été analysée par qRT-PCR aux points J0, J3, J5, J7, J11 et J14 de la différenciation (n=3). L'expression a été normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH, et comparée à l'expression à J0. Une comparaison statistique aux différents points a été réalisée par test Kruskal-Wallis. Les étoiles (*) représentent la comparaison des points J3-J14 avec J0, le dièse (#) la comparaison des points J3-J14. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$, * ou # : $p < 0,05$, ** ou ## : $p < 0,01$, *** ou ### ; $p < 0,001$

II.3.d.v Analyse de réarrangements conventionnels kappa au cours de la différenciation B *in vitro*

Une étude des réarrangements conventionnels kappa des chaînes légères des Ig a été réalisée lors du protocole de différenciation B *in vitro* en condition WJ-MSD. Dans ce but, une PCR multiplex en point final V κ -J κ aux points J0, J5, J11 et J14 a été réalisée (**Figure 58A**) et un séquençage Sanger des amplicons isolés par TOPOcloning a été fait à J14 (**Figure 58B**). Par PCR en point final, une bande aux alentours des 200 à 300bp est observée à J14. Un smir est également observé à J11 pouvant suggérer une présence faible de réarrangements. Deux clones indépendants ont été isolés et séquencés à J14. Deux réarrangements conventionnels différents ont pu être identifiés utilisant des gènes IGKV et IGKJ différents (IGKV3-15-IGKJ4 et IGKV4-IGKJ2). Cependant, il est important de noter que de nombreuses mutations sont présentes sur les séquences de ces deux clones (respectivement 8% et 25% de mutations). Ces résultats très préliminaires montrent l'acquisition de deux réarrangements V κ -J κ hypermutés au sein du modèle. Toutefois, ces derniers nous permettent de supposer qu'une genèse de réarrangements *de novo* V κ -J κ est possible au sein du modèle de différenciation B *in vitro*.

II.3.d.vi Exploration du répertoire atypique kappa au cours de la différenciation B *in vitro*

Enfin, dans cette dernière partie, les réarrangements V κ 2-V κ 3/4/1 ont été analysés à J0, J7 et J14 de différenciation par dPCR (**Figure 59A**). Les résultats montrent que la fréquence des réarrangements V κ 2-V κ totaux à est de 0,07%, 0,22% et 0,14 % respectivement à J0, J7 et J14 (**Figure 59B**). Cependant, ces différences ne sont pas significatives. De plus, la quantification des V κ 2-V κ 4 (**Figure 59C**), V κ 2-V κ 3 (**Figure 59D**) et V κ 2-V κ 1 (**Figure 59E**) montre une utilisation asynchrone des gènes IGKV partenaires en fonction du stade de différenciation observé. À J7, on constate une différence significative de la fréquence des réarrangements V κ 2-V κ 1 (J7 vs J14 : p=0,0269) et une tendance à l'augmentation pour la fréquence des réarrangements V κ 2-V κ 3 (J7 vs J14 : p=0,0594) par rapport à J14. À J14, une augmentation de la fréquence des réarrangements V κ 2-V κ 4 (J14 vs J7 : p=0,0459) a été observée par rapport à J7.

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

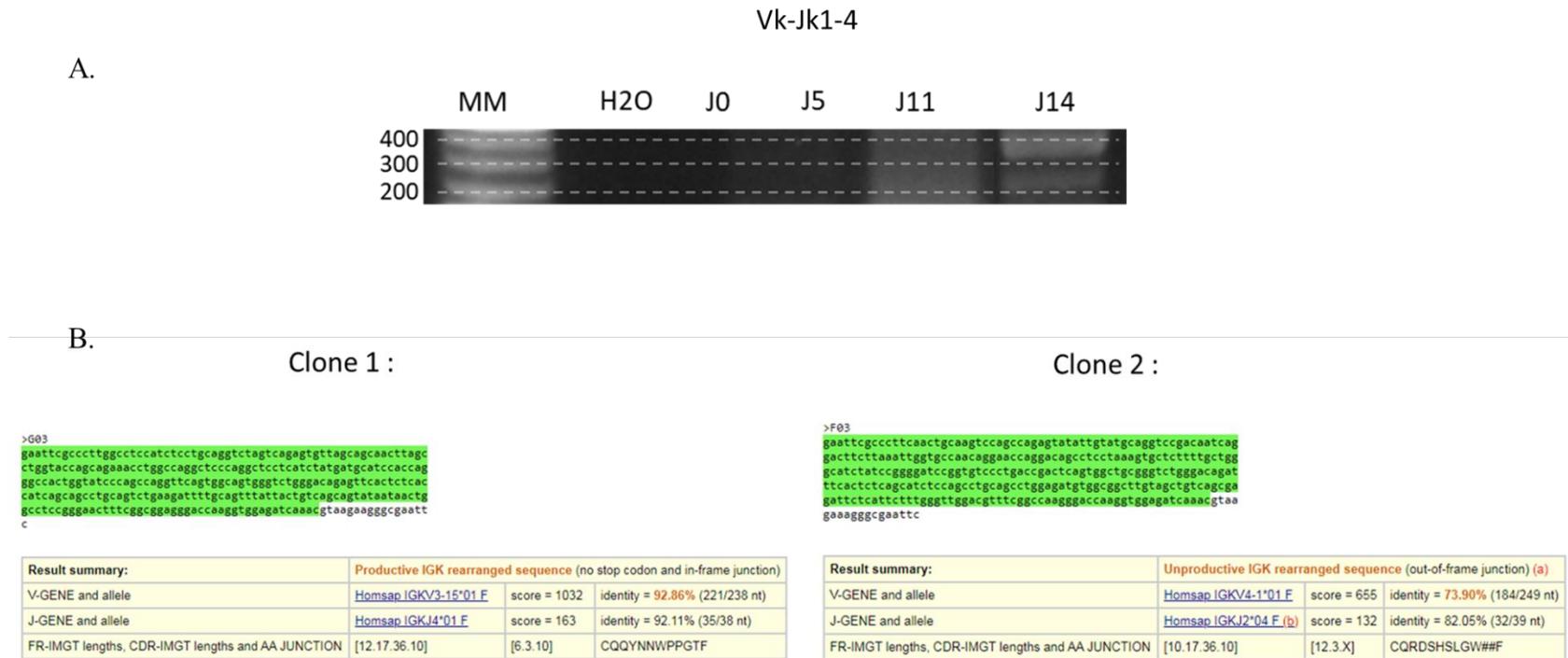


Figure 58 : Etude de réarrangements conventionnels VJ des chaînes légères kappa au cours de la différenciation B

Une PCR de clonalité (biomed-2) a été réalisée aux points J0, J5, J11 et J14 (A) de différenciation en condition WJ-MS. Les amplicons ont été isolés sur gel, clonés par TOPOcloning puis séquencés (n=2). Les séquences obtenues ont été alignées aux séquences de références V_k et J_k à l'aide du logiciel IMGT/V-QUEST (B).

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

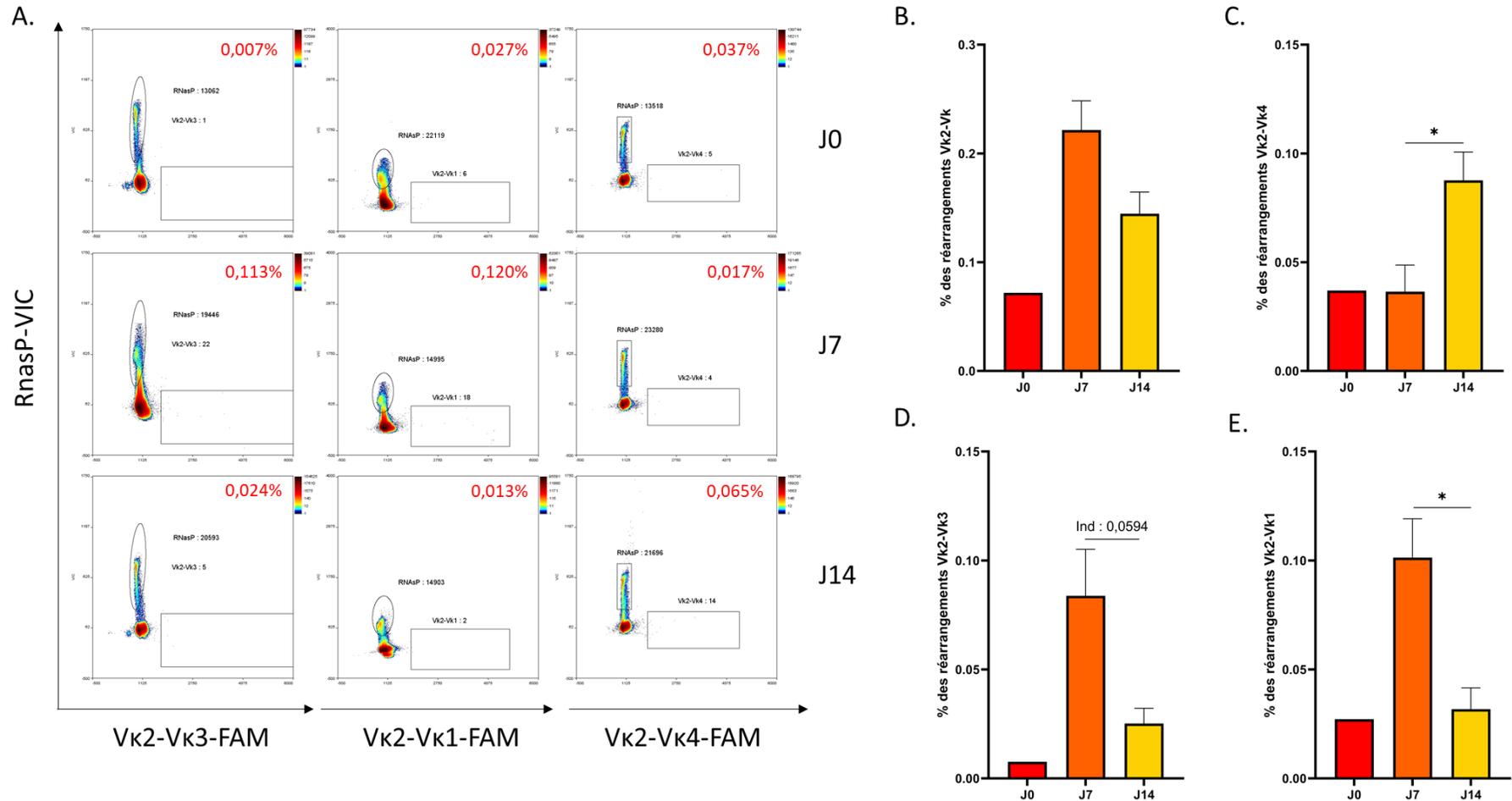


Figure 59 : Etude de l'avènement des réarrangements atypiques Vκ2-Vκ dans le modèle in vitro de différenciation B

La quantification des réarrangements Vκ2-Vκ totaux (A-B), Vκ2-Vκ3 (A-C), Vκ2-Vκ1 (B-D), Vκ2-Vκ4 (C-E) aux points J0, J7 et J14 en condition WJ-MSA a été réalisée par dPCR (n=3). Une comparaison statistique aux différents points a été réalisée par test Kruskal-Wallis et le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$

II.4. Discussion

II.4.a. Un nouveau modèle d'étude de la différenciation B

II.4.a.i Comparaison des modèles

Lors du développement de protocoles de différenciation B *in vitro*, dans un premier temps, nous avons tenté de nous inspirer du protocole décrit par Ichii et al. en 2010 (Ichii et al., 2010). Le protocole mis en place a permis l'induction d'une différenciation B et l'expression à la membrane du CD10. Cependant, un biais de différenciation myéloïde a également été constaté, ce qui avait par ailleurs été rapporté dans l'article de Ichii et al. Le G-CSF, bien que décrit comme inducteur de la différenciation B (Ichii et al., 2010 ; Lee et al., 2013), est aussi décrit comme promoteur de la différenciation monocytaire (Thomas et al., 2002). De ce fait, le biais myéloïde pourrait être expliqué en grande partie par l'utilisation du G-CSF dans le milieu de culture. Pourtant, nos résultats ne sont pas similaires en tous points à ceux rapportés dans cet article (expression du CD19 très faible dans nos résultats et diminution du CD34 moins importante) et plusieurs pistes de réflexions peuvent être émises pour expliquer ces divergences.

La première piste est apportée directement par l'équipe de Ichii et al et trouve son origine dans le sérum utilisé. En effet, ils ont montré que le nombre de cellules CD10⁺ obtenues à quatre semaines pouvait varier du simple au triple en fonction du sérum utilisé. Les résultats présentés dans ce manuscrit ont été obtenus avec un milieu supplémenté avec un sérum humain recombinant (H2B), et non du SVF. Cependant, nous n'avons constaté aucune différence entre le sérum H2B et le SVF au cours de nos expériences (*data not shown*).

Une seconde piste envisageable pouvant expliquer cette divergence serait l'origine des CSH. En effet, au cours de nos expériences, les CSH utilisées sont issues de prélèvements de cytophère. Or, dans l'article de Ichii et al, les cellules utilisées sont originaires du sang placentaire. Dans d'autres modèles de différenciation, il a été décrit que le potentiel de différenciation est dépendant de la source de cellules utilisée (Moretta et al., 2016). Enfin, en remplaçant le G-CSF par l'IL-7, nous avons obtenu une induction de la différenciation beaucoup plus importante. En contrepartie, la viabilité cellulaire et le compte de cellules/mL diminuent fortement en présence d'IL-7.

Différents travaux ont rapporté que les précurseurs lymphoïdes humains ne prolifèrent pas en absence de contact physique avec des cellules de soutien (Nishihara et al., 1998). Les cellules stromales murines (MS-5 ou S17) sont des cellules très utilisées comme support de la différenciation B *in vitro* dans la littérature (Barker and Verfaillie, 2000; Hirose et al., 2001;

Ichii et al., 2008; Sanz et al., 2010). Les résultats obtenus durant ce travail de thèse sont très similaires avec les données disponibles dans la bibliographie. En effet, 10% des cellules sont CD19⁺ à J14 de différenciation, résultats similaires à Barker et al et Hirose et al (Barker and Verfaillie, 2000; Hirose et al., 2001). Le seul point qui diverge avec les protocoles déjà décrits concerne le pourcentage de cellules exprimant une IgM membranaire. Nous obtenons environ 5% de cellules IgM⁺ en fin de différenciation contre 12 à 25% dans les autres protocoles (Barker and Verfaillie, 2000; Hirose et al., 2001; Ichii et al., 2008, 2010; Sanz et al., 2010). Cette différence peut venir de l'origine des cellules utilisées. En effet, la majorité des protocoles utilisent des prélèvements issus de sang placentaire, qui sont décrits comme plus riches en précurseurs B (Nakatani et al., 2014). Dans notre protocole, les CSH sont issues de prélèvements de cytophère, qui contiennent moins de précurseurs B.

II.4.a.ii Un modèle très proche de la physiologie

Le protocole qui permet d'obtenir le meilleur rendement de différenciation et la différenciation la plus complète est le protocole de coculture en présence de WJ-MS-C. En effet, nous avons vu que près de 60% des cellules expriment le CD19 à J14, dont environ 40% coexpriment le CD10 et le CD19. De plus, la cinétique d'apparition des FT coïncide fortement avec celle décrite dans la littérature (**Figure 60A-B**). Lors de ce protocole, nous avons observé une surexpression des FT Ikaros, EBF-1, E2A, RAG-1 et RAG-2 dans les premiers jours de différenciation. De manière plus tardive, Pax-5, Aiolos, IRF-4 et IRF-8 sont surexprimés, ce qui prouve l'avancée vers un stade plus tardif de la différenciation B. Par la suite, on note l'expression transitoire de la TdT, décrite majoritairement en phase pro-B chez la souris (Li et al., 1993; Rother et al., 2016). Cependant, il est important de souligner que l'expression de la TdT est légèrement décalée par rapport à ce qu'on aurait pu attendre. En effet son expression n'est pas simultanée avec le pic d'expression des enzymes RAG-1 et RAG-2, comme décrit dans la littérature (Rother et al., 2016). Parallèlement, on observe l'expression importante des facteurs IRF-4 et IRF-8. De plus, l'apparition du CD19, correspondant à l'entrée en phase pré-B, coïncide également avec l'apparition des recombinaisons du locus IGK (Bendall et al., 2014). La présence d'un co-marquage CD79a et chaîne μ à la membrane observée par immunofluorescence et l'expression transitoire à la membrane du CD179a puis de la chaîne légère kappa suppose que l'ensemble des acteurs impliqués dans l'acquisition de la diversité B est fonctionnelle. L'étude préliminaire des réarrangements V κ -J κ par PCR montre l'apparition d'une bande aux tailles comprises entre 200 et 300bp à J14. Cette taille de fragment correspond à des réarrangements V κ 2-J κ décrits dans le protocole de standardisation Biomed-2 (van

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

Dongen et al., 2003). Enfin, un clonage par vecteur TOPOcloning et un séquençage sanger à J14 de deux réarrangements indépendants supposent d'un profil oligoclonal du répertoire B. Cependant, ces résultats devront être confirmés par NGS ou par PCR analyse de fragments.

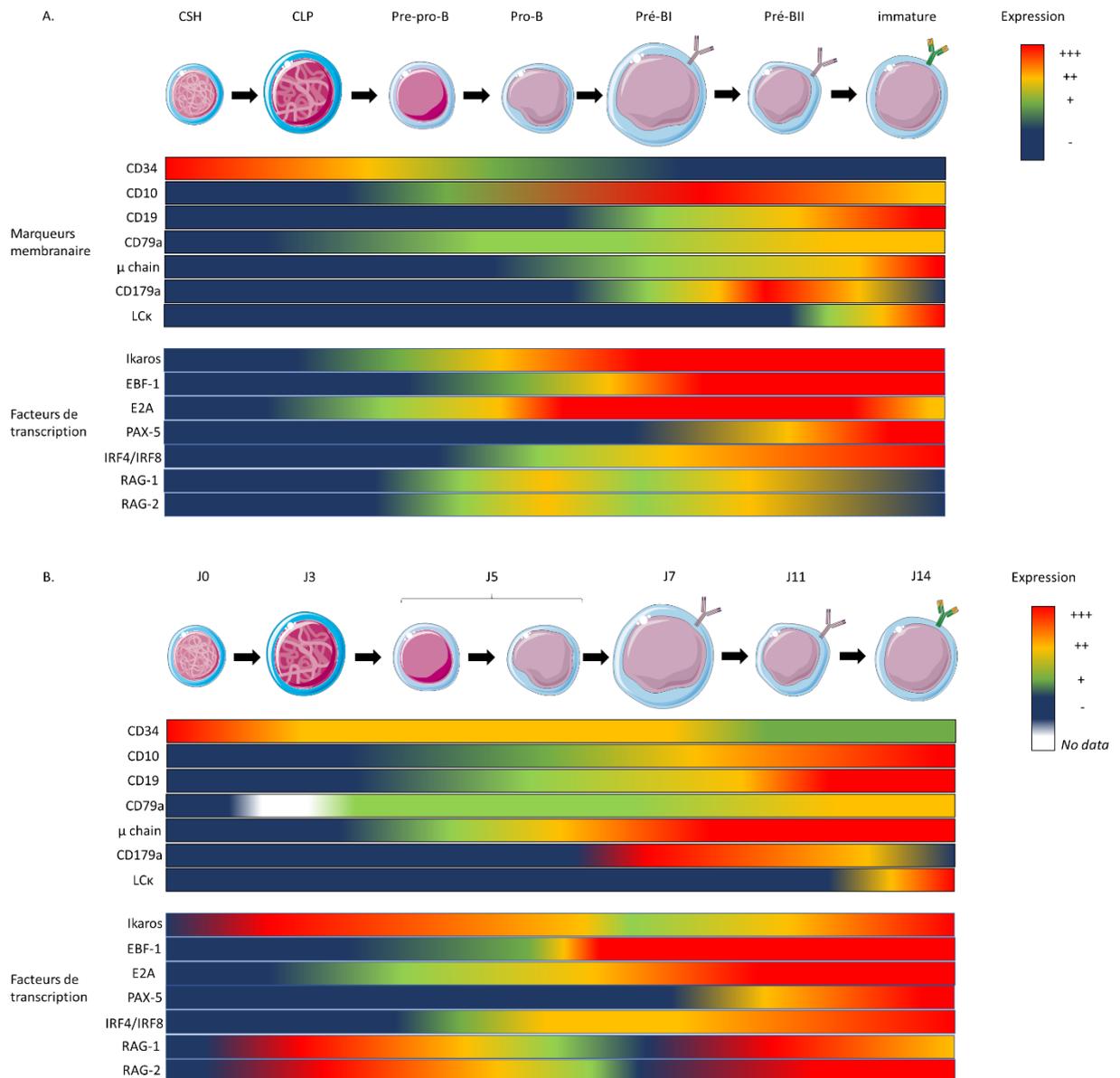


Figure 60 : Comparaison de l'expression des marqueurs membranaires et des facteurs de transcription au sein de la lymphopoïèse B décrite dans la littérature (A) (Bendall et al., 2014; Ramirez et al., 2010)) et dans le modèle de différenciation B in vitro en coculture avec des WJ-MSK (B).

II.4.a.iii Une différence en termes de reproductibilité

Au cours de ce travail, nous avons réalisé et représenté un nombre d'expériences permettant une comparaison statistique entre les modèles. Cependant, nous n'avons pas pris en compte l'ensemble des expériences réalisées ou n'ayant pas abouties à une différenciation. Au total,

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

toutes différenciations confondues, nous avons ensemencé 40 donneurs différents de CSH en différenciation B *in vitro* :

- 12 des 16 expériences en condition *stromal-free* (8/10 G-CSF et 4/5 IL-7) ont permis l'établissement d'un phénotype reproductible.
- 4 sur 4 expériences en condition MS-5
- 4 sur 7 expériences en condition BM-MS
- 8 sur 12 expériences en condition WJ-MS

Ces informations nous permettent de conclure sur un point très important et peu décrit (à notre connaissance) dans les modèles de différenciation B publiés. Il concerne la variabilité interindividuelle des cellules progénitrices et des cellules de support utilisées dans nos protocoles. Plusieurs études ont montré que l'expression des protéines membranaires à la surface des cellules progénitrices diffèrent selon les individus et que le niveau de variabilité d'expression entre les cellules, même au sein d'un seul sous-type de cellules et dans des conditions contrôlées, n'est pas identique (Lu et al., 2016; Triqueneaux et al., 2020). D'autres études ont également montré que l'âge du donneur de CSM peut influencer sur la physiologie cellulaire et plus particulièrement sur sa capacité de différenciation ostéoblastique (Bonyadi et al., 2003). Dans ce sens, les cellules stromales murines (lignée MS5) permettent de négliger la variabilité interindividuelle pour les cellules de support.

A notre connaissance, aucune expérience n'a étudié la variabilité interindividuelle au niveau des cellules de support et leur effet dans un modèle de coculture de différenciation B. En ce sens, nos travaux n'apportent peut-être pas de connaissances supplémentaires sur ce sujet mais ils mettent en lumière cette variabilité dont il serait intéressant de comprendre l'origine.

Nous pouvons conclure que le modèle de différenciation B *in vitro* en coculture avec des WJ-MS possède un taux de reproductibilité inférieur aux modèles sur MS-5 mais supérieur à celui sur BM-MS.

II.4.a.iv Les avantages du modèle WJ-MS

Au cours de ce travail de thèse, nous avons développé un modèle unique et dynamique de différenciation B *in vitro* permettant l'étude de la différenciation B allant de l'engagement de la cellule souche jusqu'à l'expression d'un BCR mature à la surface du LB. Comme déjà discuté précédemment, les processus moléculaires sont très proches des données publiées dans la

littérature (**Figure 60**), et possède un taux de reproductibilité plus important qu'un modèle similaire développé sur BM-MSc.

À notre connaissance, aucune étude n'a utilisé des WJ-MSc comme support de la différenciation B *in vitro*. Le premier avantage majeur de ce protocole est la biodisponibilité des cellules nécessaires à sa réalisation. En effet, de nombreux centres en thérapie cellulaire récoltent les cordons ombilicaux et ont à leur disposition des prélèvements de CSH issues de cytophérèse. De ce fait, ce modèle peut être facilement développé au sein d'un laboratoire de recherche possédant des techniques de tri et de culture cellulaire. Deuxièmement, contrairement à la majorité des protocoles décrits dans la littérature, ce protocole est rapide (14 jours), là où l'ensemble des autres protocoles se déroulent sur 21 à 49 jours pour une différenciation terminale (Barker and Verfaillie, 2000; Hirose et al., 2001; Ichii et al., 2008, 2010; Kraus et al., 2014; Scheeren et al., 2010; Troilo et al., 2020). Troisièmement, ce protocole est moins onéreux et permet l'obtention d'une quantité importante de cellules à un stade précis de la lymphopoïèse B.

II.4.a.v Les limites du modèle WJ-MSc

Au sein du modèle de différenciation B *in vitro*, nous avons montré que de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires sont communs avec ceux déjà décrits dans la littérature. Cependant, nous avons également observé des phénomènes moléculaires discordants.

Dans un premier temps, nous avons constaté de nombreuses mutations présentes sur les deux réarrangements V κ -J κ à J14 de différenciation. De plus, nous avons aussi détecté une surexpression inattendue d'AID au cours de la différenciation. Pour rappel, AID est une enzyme cytidine désaminase impliquée dans les hypermutations somatiques présentes au niveau du GC. Sa faible expression au cours de la lymphopoïèse B précoce a été décrite (Gonda et al., 2003), mais reste très controversée au sein de la communauté scientifique (Kuraoka et al., 2011). Nous émettons l'hypothèse que cette surexpression peut avoir comme origine un facteur libéré par les WJ-MSc. À ce jour, aucune preuve dans la littérature ne peut confirmer cette hypothèse. Cependant, cette surexpression très importante d'AID pourrait expliquer le pourcentage de mutations très important retrouvé au niveau des séquences V κ -J κ isolées. Des expériences complémentaires sont nécessaires afin de prouver le lien entre AID et ces mutations. Afin d'étudier ce lien, une sous-expression conditionnelle d'AID aux différents points de la différenciation pourrait être envisagée.

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

Dans un second temps, certaines cinétiques d'expression de marqueurs membranaires ou de FT divergent avec celles décrites dans la littérature. C'est le cas pour AID et la TdT mais également pour Ikaros et le CD34. En effet, au cours de la différenciation B, il a été prouvé qu'Ikaros possède une expression forte et continue durant l'intégralité de la lymphopoïèse B (Ramírez et al., 2010). Au sein de notre modèle, nous observons une diminution de l'expression de ce FT vers J7 puis une réexpression en fin de différenciation. De plus, dans notre modèle, nous n'observons pas la diminution du CD34, comme attendu au cours de la lymphopoïèse B (Bendall et al., 2014). Les enzymes RAG-1 et RAG-2 possèdent également une expression légèrement décalée et allongée par rapport à l'expression décrite dans la littérature (**Figure 60**). Afin de comprendre ces dissemblances, nous avons pour objectif d'étudier l'impact des WJ-MSc sur la différenciation B. Comme pour AID, nous supposons que ce phénotype particulier pourrait être expliqué par le sécrétome des WJ-MSc.

Enfin, la troisième limite de ce protocole est l'étude en *bulk* des cellules. En effet, tous les résultats en qRT-PCR ou dPCR ont été réalisés sur l'ensemble des cellules récupérées à différents temps de la différenciation. De ce fait, le plan d'expérience ne permet pas une distinction très précise des sous-populations B en étude transcriptomique. Pour remédier à ce point limite, le prochain objectif est de caractériser de manière très précise les sous-populations au cours de modèle à chaque point de cinétique et de trier chaque sous-population afin de quantifier l'expression de leurs FT afin de voir l'évolution de leur expression. Nous pourrions également nous diriger vers une technique de *RNA-seq single cell* afin de suivre les voies de signalisation activées au cours de notre modèle pour chaque « clone » induit.

II.4.b. Etude de l'avènement des réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ *ex vivo* et *in vitro*

Les résultats obtenus après tri cellulaire CD34⁺/CD19⁻ à partir du sang de cordon montrent que les réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ se produisent très précocement au cours de la lymphopoïèse B car retrouvés dans la fraction CD34⁺/CD19⁻. Or, au sein de la sous-population CD34⁺/CD19^{-/+}, il est conventionnellement admis que seul le locus IGH, codant les chaînes lourdes des Ig, est accessible à la recombinaison alors que le locus IGK est maintenu sous sa forme germinale (**Figure 61A**) (Little et al., 2015). L'expression membranaire du pré-BCR au stade CD34⁺/CD19⁺ est corrélée à l'arrêt des recombinaisons au locus IGH, et à l'initiation des événements de recombinaison au locus IGK (Hamel et al., 2014). De plus, l'importante N-diversité constatée au niveau des réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ isolés de la fraction CD34⁺/CD19⁻ montrent que ceux-ci sont effectivement générés lors de la phase précoce de la lymphopoïèse B. En effet,

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

cette phase est caractérisée par une forte expression de la TdT, responsable de l'acquisition d'une N-diversité importante au moment de la jonction D_HJ_H (Sanz et al., 2010).

L'étude des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} par NGS a montré une utilisation préférentielle des segments géniques $V_{\kappa 2}$ et V_{κ} partenaires associés en fonction du stade de différenciation. Ces réarrangements ont été explorés au sein de sous-populations de CSH ($CD34^+/CD19^-$), de précurseurs B ($CD34^+/CD19^+$) et de LB matures ($CD34^-/CD19^+$), tous issues de sang placentaire. Cependant, cette étude ayant été réalisée à partir de l'ensemble des sous-populations d'un même pool de patients, nous ne pouvons exclure que des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} détectés au stade CSH ne soient conservés au cours de la différenciation, et donc détectés dans les deux autres sous-populations isolées. En prenant en compte ce biais, nous ne pouvons donc pas écarter une surinterprétation des gènes impliqués dans les recombinaisons $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} aux stades plus avancés. L'une des façons de corriger ce biais serait d'exclure aux stades plus matures les réarrangements détectés à un stade précoce par bio-informatique. Une autre alternative serait la mise en place d'une technique de séquençage NGS en *single cell* avec un Tag propre à chaque patient.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons observé la fréquence d'apparition des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} au cours de la différenciation B *in vitro*. Les résultats montrent que les fréquences obtenues sont bien inférieures à celles que nous avons observées *ex-vivo* à partir de cellules triées de sang de cordon. En effet, la fréquence des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} est de 0,2 % à J7 (correspondant au stade Pré-B) et 0,14 % J14 par rapport à 1,1 % et 0,84 % respectivement retrouvés dans les sous-populations triées de sang placentaire $CD34^+/CD19^+$ et $CD34^-/CD19^+$. Cependant, cette fréquence est très proche de celle observée dans les cellules mononuclées de MO réalisée par le Pr Brigitte Gubler (**Tableau 6**). Nous avons deux hypothèses pouvant expliquer cette divergence d'expression.

Par ailleurs, l'utilisation des gènes IGKV au cours du protocole de différenciation B *in vitro* est très proche de ce qui a été observé *ex-vivo* dans la partie précédente. En effet, dans le modèle de différenciation B, les gènes partenaires IGKV3 et IGKV1 sont utilisés majoritairement à J7, et faiblement utilisés à J14. Ce phénotype est inversé pour le gène partenaire IGKV4.

Malgré des similitudes au niveau de l'utilisation des gènes partenaires, d'autres points divergent. À J14, très peu de réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} associent un gène de la famille IGKV 1. Or, dans les sous-populations triées de sang placentaire, les réarrangements $V_{\kappa 2}$ - $V_{\kappa 1}$ représentent presque 80 % des réarrangements retrouvés. L'une des hypothèses pouvant

expliquer ce phénotype est que le modèle de différenciation B *in vitro*, malgré sa capacité à reproduire la majorité des cascades de signalisation engageant la CSH vers la lignée B, reste encore très incomplet comparé à la complexité organisationnelle des niches hématopoïétiques fœtales ou myéloïdes. Une étude des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} dans un protocole de différenciation B *in vitro* à partir de CSH de sang placentaire permettra probablement une meilleure détection des réarrangements.

L'ensemble de ces résultats ont permis d'identifier des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} dans les populations précoces au cours de la lymphopoïèse B ($CD34^+/CD19^{-/+}$), ce qui démontre donc l'existence de phénomènes épigénétiques affectant le locus IGK et le rendant accessible à des mécanismes non conventionnels de recombinaison (**Figure 61A**).

II.4.c. Apparition asynchrone des V_{κ} - V_{κ} : identification et rôle d'un nouvel enhancer ?

Nous avons montré au cours de ce travail de thèse, qu'en condition physiologique, la fréquence des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} est faible et varie au cours de la lymphopoïèse B. En effet, la fréquence est d'environ 0,5% au stade précoce $CD34^+/CD19^-$. Cette fréquence augmente au cours de la recombinaison pour atteindre environ 1% des cellules en différenciation. Cette fréquence dépend non seulement du segment génique IGKV2 impliqué mais également de la nature du second segment IGKV engagé. En effet, les réarrangements $V_{\kappa 2}$ - $V_{\kappa 1/3}$ sont retrouvés de façon plus fréquente dans les précurseurs B les plus précoces $CD34^+/CD19^+$ que dans la population plus mature $CD34^-/CD19^+$ et impliquent préférentiellement les gènes IGKV2-24 et IGKV2-26. Les réarrangements $V_{\kappa 2}$ - $V_{\kappa 4}$ sont quant à eux plus fréquents dans la population mature. Dans la population mature, les segments IGKV partenaires sont plus diversifiés et utilisent de nombreux gènes de la famille IGKV2. Indépendamment du stade de la différenciation, le gène IGKV2-30 est le plus fréquemment retrouvé dans les recombinaisons $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} . L'existence d'un site d'ouverture du locus à proximité du gène IGKV2-24 pourrait expliquer cette utilisation différentielle des segments géniques lors des recombinaisons $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} au cours de la lymphopoïèse impliquant chronologiquement des gènes IGKV de plus en plus éloignés. Ce phénomène d'ouverture centripète est observé lors de l'activation des enhancers conventionnels des différents locus codant les différentes chaînes des Ig (Chen et al., 2000), responsables de l'induction des recombinaisons (**Figure 61B**).

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

L'ensemble des résultats obtenus concernant l'aspect asynchrone des recombinaisons $V\kappa 2-V\kappa$ par rapport aux recombinaisons conventionnelles du locus, la mise en place précoce de ces réarrangements à un stade où le locus IGK est inaccessible à la recombinaison et l'utilisation différentielle des segments géniques IGKV en fonction du stade de maturation nous ont conduits à émettre l'hypothèse de l'existence d'un enhancer indépendant qui contrôlerait ces recombinaisons. De plus, dans un modèle murin, un enhancer appelé E88 a été identifié dans une région similaire (Barajas-Mora et al., 2019). Ce dernier permet un rapprochement des gènes du locus, favorisant la recombinaison des gènes distaux. Shinoda et al ont également émis l'hypothèse que cet enhancer pourrait être à l'origine des réarrangements intra- $V\kappa$ chez la souris (Shinoda et al., 2019). Au cours de sa thèse au sein du laboratoire, le Dr Ouled-Haddou a identifié des sites de fixation pour les FT E2A et NF- κ B au niveau du locus IGK, entre les segments IGKV2-24 et IGKV3-20. Nous émettons l'hypothèse que les réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ observés au cours de cette thèse sont générés par l'activation et l'ouverture de cet enhancer très précocement dans la différenciation B.

II.4.d. Le rôle des réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$: différentes hypothèses.

Les réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ associent par recombinaison-inversion l'extrémité 3' d'un gène IGKV2 à l'extrémité 3' d'un autre gène IGKV dont la séquence s'inverse sur le locus. La structure partiellement complémentaire ainsi créée s'apparente à celle d'un pré-miRNA pouvant être transcrit de façon bidirectionnelle puisque chaque gène IGKV est précédé par une séquence promotrice. Par analyse *in silico*, nous avons montré que ces structures pourraient conduire à la genèse de miRNA, dont l'un, le hsa-miR-12132 (Özata et al., 2017), a été retrouvé de façon récurrente. Les effets de la structure pré-miRNA doivent être explorés pour comprendre les raisons pouvant expliquer la fréquence de ces recombinaisons dans les LAL-B pédiatrique (7%) comparée aux cellules B de donneurs sains (0,5 à 1%). Les données obtenues pourraient contribuer à une meilleure compréhension de certains mécanismes physiopathologiques des néoplasies lymphoïdes.

Des travaux préliminaires ont été réalisés au sein du laboratoire et apportent quelques pistes pour expliquer le rôle des réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ au cours de la lymphopoïèse. Par vecteur lentiviral, une surexpression d'un réarrangement atypique $V\kappa 2.30-V\kappa 1.27$ a été induite sur la lignée cellulaire SUDHL-16 et montre un effet sur la prolifération et le cycle cellulaire. Nous avons pu observer une diminution de la prolifération (10 fois inférieure aux cellules infectées par un vecteur scramble) et une accumulation en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Ces résultats ont été corrélés avec une augmentation de la phosphorylation de p21, p27 et de la protéine du

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

rétinoblastome en surexpression du réarrangement $V\kappa 2.30-V\kappa 1.27$. Une étude complémentaire par méthode transcriptomique Nanostring® est en cours afin de comprendre les voies de signalisation impliquées lors de l'expression du réarrangement $V\kappa 2.30-V\kappa 1.27$ dans le modèle de lignée cellulaire. L'étude de la surexpression de ce réarrangement dans le modèle de différenciation B *in vitro* développé durant cette thèse permettra de comprendre son rôle au sein de la lymphopoïèse.

L'une des hypothèses supposées de son rôle est son implication dans la signalisation du pré-BCR. En effet, il a été démontré dans un modèle humain qu'une SLC atypique $J\kappa$ pouvait remplacer la SLC conventionnelle $\lambda 5$ (Francés et al., 1994; McKeller and Martinez-Valdez, 2006). Nous émettons l'hypothèse que les réarrangements $V\kappa 2-V\kappa$ pourraient être transcrits en protéine et devenir une SLC atypique. Par leurs rôles supposés de pri-miR, ils pourraient cibler l'ARNm de la SLC $J\kappa$ et donc empêcher la poursuite de la différenciation B par inhibition de la voie du pré-BCR. Ce processus pourrait favoriser une prolifération intensive et donc un processus leucémogène.

À l'heure actuelle, nous ignorons si chaque réarrangement $V\kappa 2-V\kappa$ a un rôle spécifique, ou si l'ensemble de ces réarrangements possèdent le même rôle.

Partie II : Objectifs, résultats et discussion

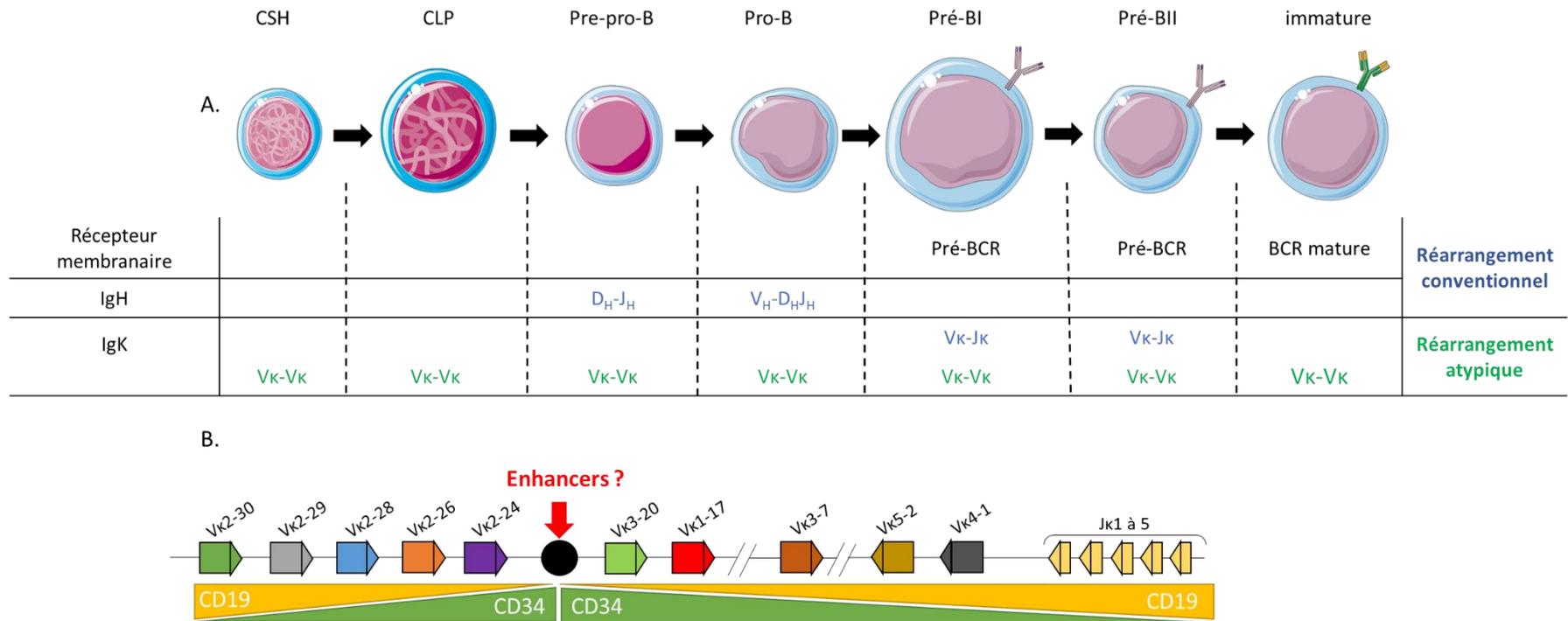


Figure 61 : Schématisation des mécanismes d'apparition des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} physiologiques (A) et hypothèse d'identification d'un enhancer (B)

Partie III : Conclusion et perspectives

Partie IV : Conclusion et perspectives

Au cours de la lymphopoïèse B, des mécanismes recombinaatoires sont mis en place pour permettre la synthèse des Ig, qui sont composées de quatre chaînes protéiques : deux chaînes lourdes et deux chaînes légères identiques. Au sein du locus IGK, codant les chaînes légères kappa, ces mécanismes entraînent l'association d'un fragment génique de variabilité IGKV et de jonction IGKJ : c'est la recombinaison somatique des gènes des Ig médiée par le complexe RAG grâce à la reconnaissance de RSS et leur appariement suivant la règle 12/23. Cependant, certaines de ces recombinaisons sont non-conventionnelles.

Les réarrangements atypiques $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} ont initialement été identifiés par le P^r Brigitte Gubler à partir de prélèvements de moelle osseuse de patients atteints de LAL-B pédiatrique. Durant ces travaux de thèse, nous avons poursuivi cette étude en nous concentrant sur l'apparition physiologique des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} au sein de populations cellulaires triées de sang placentaire. Nos expériences ont permis de valider l'hypothèse que des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} physiologiques existent et apparaissent au cours de la différenciation B mais à une fréquence environ 10 fois inférieure à celle observée en pathologie (7% au sein des LAL-B et entre 0,5 et 1,1% en physiologie). De plus, en observant l'utilisation des segments géniques impliqués dans l'avènement de ces réarrangements atypiques, nous avons pu conclure qu'il existe une utilisation préférentielle des segments géniques IGKV2 et IGKV partenaires en fonction du stade de différenciation. Par séquençage massif en parallèle, nous avons démontré que la diversité jonctionnelle (N-diversité) des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} est très importante. Une analyse *in silico* des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} nous a permis de constater que leurs structures s'apparentent à celle d'un pri-miR. À notre connaissance, nos travaux sont les premiers à émettre l'hypothèse que des réarrangements somatiques des gènes pourraient conduire à l'émergence de miR.

Dans une seconde partie de ce travail, nous avons développé au sein du laboratoire un modèle de différenciation B *in vitro* à partir de cellules CD34⁺ de sang périphérique en coculture avec des CSM-WJ. Ce protocole a été comparé avec d'autres modèles et nous avons montré que l'utilisation des CSM-WJ avait un impact positif dans l'induction de la différenciation B *in vitro*. De plus, la cinétique d'apparition des FT et des sous-unités des Ig membranaires (pré-BCR et BCR) est similaire à l'ensemble des données décrites dans la littérature.

Au sein du modèle développé durant ce travail de thèse, nous avons constaté l'existence de réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} physiologiques. Cependant, leur fréquence d'apparition au cours de la différenciation est plus faible que celle observée dans les sous-populations triées de sang

Partie IV : Conclusion et perspectives

placentaire (0,2% vs 1%). Il n'en demeure pas moins que l'utilisation des gènes V_{κ} partenaires en fonction du stade de différenciation est très proche de celle observée dans les expériences précédentes. Ces nouveaux évènements recombinatoires sont indépendants des réarrangements atypiques au sein du locus (tels que les réarrangements intra- V_{κ}) déjà décrits dans la littérature car leur fréquence d'apparition, leur mode de recombinaison et les RSS impliquées dans le processus de recombinaison diffèrent.

Nos résultats permettent d'envisager trois perspectives en prolongement direct de cette thèse.

L'organisation des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} au cours de la lymphopoïèse B ayant été détaillée et la localisation d'un enhancer permettant l'émergence de ces recombinaisons à un stade non-conventionnel d'ouverture du locus ayant été suggérée, il resterait à explorer le rôle de l'épigénétique dans l'avènement des réarrangements V_{κ} - V_{κ} . En effet, l'ouverture des locus est étroitement liée avec la méthylation des histones. Il faudrait observer si la région comprise entre le gène $V_{\kappa 2.30}$ et $V_{\kappa 3.20}$ est le lieu d'une méthylation importante en phase pro-B, majoritairement au niveau de H3K4me1, marqueur de l'activation d'un enhancer. Les résultats de ces expériences auraient un triple bénéfice : ils valideraient la présence d'un enhancer dans cette région au sein du locus IGK, ils conforteraient l'hypothèse de la gouvernance de cet enhancer sur l'avènement des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} et enfin, ils démontreraient que le locus IGK est bien accessible à la recombinaison, y compris en dehors des périodes de recombinaisons conventionnelles du locus. L'invalidation de cette région par technique de CRISPR-Cas-9, et plus particulièrement des sites de fixations pour Nf- κ B et E2A (identifiés par le D^r Hakim Ouled-Haddou), pourrait confirmer ces résultats.

La seconde piste serait de comprendre le rôle des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} sur la physiologie du LB en différenciation. En effet, la variation des fréquences pathologiques et physiologiques suppose d'un potentiel rôle oncogénique des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} . Les premiers résultats obtenus au cours de cette thèse nous poussent à émettre l'hypothèse que les réarrangements entre deux gènes V_{κ} pourraient conduire à la genèse d'une ou plusieurs structures pri-miR. Étant donné que les miR sont des régulateurs post-transcriptionnels, l'émergence de ces recombinaisons pourrait cibler certains gènes suppresseurs de tumeurs et donc favoriser le processus de leucémogénèse. Des travaux préliminaires réalisés au sein du laboratoire montrent que l'induction des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} par vecteur lentiviral au sein d'une lignée cellulaire B et d'un modèle de différenciation B diminuent la prolifération cellulaire. Ce phénotype est

Partie IV : Conclusion et perspectives

provoqué par la diminution de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome et l'augmentation de la phosphorylation de p21 et p27. L'activation au sein du modèle montre également une diminution de la fréquence membranaire du CD19 à J14 de différenciation. Cependant, l'ensemble de ces résultats est encore à confirmer.

Enfin, il nous semblerait intéressant d'étudier l'interaction des CSM-WJ et des CSH. Cela permettrait ainsi de savoir si l'origine des réarrangements $V_{\kappa 2}-V_{\kappa}$ est liée au microenvironnement cellulaire. En effet, l'étude de la fréquence des réarrangements atypiques au sein des différentes hémopathies a montré que les $V_{\kappa 2}-V_{\kappa}$ n'étaient pas retrouvés au sein de cellules pathologiques des LAL chez les adultes mais uniquement au niveau des LAL-B pédiatriques. Ce type de réarrangements atypiques ne pourrait être généré qu'au sein d'un environnement cellulaire particulier, propre aux niches hématopoïétiques fœtales ou infantiles. Il s'agirait de commencer par quantifier les réarrangements $V_{\kappa 2}-V_{\kappa}$ au sein des précurseurs B dans le modèle de différenciation sur tapis de CSM de MO et de les comparer aux fréquences obtenues au cours de ce travail de thèse.

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'explorer les réarrangements atypiques $V_{\kappa 2}-V_{\kappa}$ physiologiques dans des sous-populations triées de sang placentaire et dans un modèle de différenciation B *in vitro*. L'utilisation des gènes V_{κ} partenaires en fonction du stade de différenciation et l'apparition asynchrone de ces réarrangements par rapport au processus conventionnel de recombinaison du locus IGK conforte l'hypothèse de l'existence d'un enhancer présent au sein des segments géniques IGKV. Le rôle de l'enhancer et du microenvironnement sur l'avènement des recombinaisons $V_{\kappa 2}-V_{\kappa}$ et celui de ces réarrangements sur la physiologie cellulaire seraient à privilégier pour des futurs projets.

Partie IV : Projet annexe

Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats (étude annexe à la thèse).

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

900 MHz electromagnetic fields induce microbiota dysbiosis and adaptive immunity disorders on juvenile rats.

Authors:

COLLET Louison^{1*}, BOSQUILLON de JENLIS Aymar^{2*}, KHORSI-CAUET Hafida², NAUDOT Marie³, DJEKKOUN Nariman², GHAMLOUCH Hussein¹, CORONA Aurélie², OULED-HADDOU Hakim¹, DELANAUD Stéphane², GARCON Loïc^{1,4}, BACH Véronique², PELLETIER Amandine^{2*}, MAROLLEAU Jean-Pierre^{1,5*}

¹ : Equipe HematIm EA4666, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Université Picardie Jules Verne, Amiens, France

² : Equipe PériTox (UMR_I 01), UPJV/INERIS, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

³ : Equipe Chimère EA7516, Centre Universitaire de Recherche en Santé, Université Picardie Jules Verne, Amiens, France

⁴Service d'hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, Amiens, France

⁵Service d'Hématologie Clinique, Centre Hospitalier Universitaire Amiens Picardie, Amiens, France

* authors worked equivalently on this work

Keywords: RF-EMF, chronic exposure, juvenile rat, immune system

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

Abstract:

Background:

Cell phones and electronic devices are inseparable from most people in modern society and especially from young people, but the radiofrequency electromagnetic field (RF-EMF) from the devices is a potential health threat. The evaluation of these effects has been subject of studies in various fields: epidemiology, neurology... But despite the important role of the immune system in defending the body against infections and cancer, only a few investigations on the possible effects of RF-EMF of immune cells have been undertaken.

Objectives:

This study aimed to assess whether chronic exposure of juvenile rats to RF-EMF has adverse effects on the immune system.

Methods:

Rats were exposed or not to 900MHz RF-EMF 23h/day during 5 weeks, then blood, spleen, thymus and gut tissues were isolated. To reveal the changes operated by the electromagnetic fields, the hematological parameters were measured, the cytometric and bacteriological analyzes were carried out. Indeed, the microbiota was shown to cause changes in immune cell development and function.

Results:

Our results showed modification of the innate immune system with an increase of neutrophils in the blood of exposed rats. Adaptive immunity appears to be much more affected by RF-EMF with a decrease of lymphocytes in blood, changes in subpopulations of LBs, and a decrease of total LT, CD4⁺ LT in blood and spleen in exposed rats. The percentages of LT subpopulations in the thymus are also affected by RF-EMF. Intestinal microbiota analysis revealed dysbiosis characterized by Enterococcus, Clostridium and Bacteroides over-representation. Enterococcus was found to translocate in the spleen in 67% of exposed rats. The increase of Enterococcus in the gut is correlated with the decrease of global LT and helper LT in the blood.

Discussion:

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

The RF-EMF under our conditions seems to alter the immune system and in particular the adaptive immunity either directly or via intestinal dysbiosis.

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

IV.1. Introduction

Wireless technologies lead to incrementing of electromagnetic fields (EMF) sources in the everyday environment. The most common technology-related EMF include extremely low frequency (ELF, <60 Hz) and radiofrequency (RF, 100 kHz–300 GHz). ELF fields are generated from electrical and electronic appliances, power lines and especially the household alternating current electrical power supply. RF-emitting devices (radio waves and microwaves) are extensively used in industry (welding machines, induction heaters), telecommunication (TV and radio broadcast stations), medicine (NMR, diathermy), and in everyday life (microwave ovens, mobile phones and 5G—the newest generation of mobile communication). Mobile phones have a frequency range of 300MHz to 3GHz(Moradi et al., 2016) and is classified in the ultra-high frequencies (UHF) category(Breckenkamp et al., 2003). The peak power of mobile phones is also legally set by International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP) in the range of 0.1 to 2 watts(International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 2009). Some people, accused RF-EMF, in particular from mobiles phones and base stations, of causing sleep perturbation, tiredness, headache or equilibrium perturbation (Johansson, 2015; Leitgeb and Schröttner, 2003; Seitz et al., 2005). Is this accusation justified?

Preliminary epidemiologic studies assessed the relationship between EMF exposure and the risk of developing various cancers, especially mobile phone use and intracranial cancer incidence(Hardell, 2017). In 2011, relying on the results of these studies, the International Agency of Research of Cancer (IARC) classified radiofrequency electromagnetic fields as possibly carcinogenic to humans (group 2B)(https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/pr208_E.pdf). Since, new epidemiological studies were published, confirming that long term use (over 10 years) of mobile phone may be associated with an increased risk of intracranial tumors(Bortkiewicz et al., 2017; Momoli et al., 2017).

In vivo models represent an important step in understanding the effects of RF-EMFs since limiting external parameters and allowing to study the effect of continuous or intermittent exposure, in a specific type of population such as juvenile rats. Studies carried out on exposure of rodents to 900 MHz fields, which is the frequency used by most of the mobile phones, showed deleterious effects on the brain, lymphoid organs and kidney(Aydin and Akar, 2011; Fragopoulou et al., 2010; Mercantepe et al., 2018; Okatan et al., 2018), while others revealed no effects of exposure to RF-EMF at the same frequency(Galloni et al., 2005; Jin et al., 2012; Nasta et al., 2006; Petitdant et al., 2018).

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

In vitro cells cultures brought also conflicting results, some studies describing a sensitivity of neurons, lymphocytes and monocytes to EMF exposure (Del Vecchio et al., 2009; Szymański et al., 2020) while other found no effect of RF-EMF on monocytes and epithelial cells(Bouwens et al., 2012).

The impact of RF-EMF on the immune system is also controversial(Ohtani et al., 2015), and seems to be highly variable depending on exposure protocols and rodent ages. Underlying mechanisms are unclear, implicating histamine release(Gangi and Johansson, 2000), or calcineurin inhibition (Doyon and Johansson, 2017). Some studies showed an effect of 900 MHz RF-EMF chronic exposition on growing rats with evidence of biochemical and oxidative damage on spleen and thymic cells(Aydin and Akar, 2011; Hancı et al., 2015). However, others studies with rodent acute or chronic exposure at 900 MHz did not show immune alteration specially in lymphocyte populations (Gatta et al., 2003; Laudisi et al., 2012; Prisco et al., 2008).

Early childhood is a vulnerable period due to the ongoing development of physiological and neurologic functions(Rice and Barone, 2000), and the greater RF-EMF penetration into "juvenile" tissues (including the brain), compared to adult (Wiert et al., 2011). Studies focusing on the impact of RF-EMF on such population are absolutely required as young people are large users of connected devices (Rideout, 2017 The Common Sense census: Media use by kids age zero to eight)(Kabali et al., 2015; Kılıç et al., 2019). In 2014, Pelletier et al exposed juvenile rats to 900 MHz RF-EMF and described alterations in sleep patterns(Pelletier et al., 2013), thermal regulation(Pelletier et al., 2014), weight and food intake(Bosquillon de Jenlis et al., 2020). Here, we aimed to study on the effects of such exposure on juvenile rat immune system, using the same protocol. The objectives of our study were to analyze the effects of chronic exposure to 900 MHz RF-EMF on (i) innate and adaptive immunity, (ii) the intestinal microbiota(Jiao et al., 2020; Levy et al., 2017; Sherwani et al., 2018), since some studies described a perturbation of bacteria growth under electromagnetics field(Al-Harbi et al., 2018; Crabtree et al., 2017) which could induce gut dysbiosis and (iii) the role of these microbiota alterations on immune system. We described blood cell count modifications and analyzed extensively by flow cytometry adaptive immune cells in blood and lymphoid organs. Feces and spleen bacteria were characterized and correlated to immune modifications.

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

IV.2. Material and methods

IV.2.a. Animals

All procedures for animal experiments were evaluated and approved by the local animal care and use committee and by the French Ministry of Research (registration number: APAFIS 3735-2016012017118094). Experiments were conducted on 17 male Wistar rats (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) weighing between 55 and 85 g and aged 3 weeks at the time of their arrival. Two groups of animals were formed: a RF-EMF-exposed group (n=9) and a control, non-exposed group (n=8). Each group was housed in a separate anechoic chamber with a controlled thermoneutral air temperature ($24\pm 1^\circ\text{C}$), 12 hr:12 hr dark/light cycle, relative air humidity (mean \pm standard deviation (SD): $39\pm 12\%$) and air velocity (<0.2 m/s). Rats were individually housed in plastic cages (425 mm x 266 mm x 185 mm) within the chamber. Food (3436EXF12, Serlab, Montataire, France) and water were available *ad libitum*.

IV.2.b. RF-EMF exposure

The RF-EMF exposure protocol used is the same as Bosquillon de Jenlis et al., 2020. After 4 days of acclimatization, the RF-EMF exposure started for 5 weeks of experiments running for 23 hours per day. The climatic chambers were equipped with RF-EMF antennas powered by a generator (model RFS 900–64, RFPA, Artigues-près-Bordeaux, France) emitting a continuous-wave 900 MHz electromagnetic field. Antennas (model 800–10465, KATHREIN-Werke KG, Rosenheim, Germany) were horizontally located in the climatic chamber, 80 cm above the exposed rats' boxes. The power of the generator was set in order to obtain a field intensity of 1.8 V/m. The Specific Absorption Rate of the animals was estimated at 30 mW/kg. The level of RF-EMF exposure was checked with a radiofrequency dosimeter (PMM EP600, Narda Safety Test Solution, Hauppauge, USA) and monitor on computer software (Win EP 600, Narda Safety Test Solution). Emission was interrupted for one hour by day to allow animal care.

IV.2.c. Rat's exposition protocol, sacrifice and sample isolation

After 5 weeks of experiments, the rats were sacrificed by heart puncture under isofluorane anesthesia (airflow 1L/min and isoflurane 2.5 % (Iso-Vet 1000 mg/g, Piramal Healthcare UK Ltd, Morpeth, United-Kingdom)). The blood from heart puncture was preserved. Part of the spleen and thymus were collected postmortem and placed in phosphate buffer saline (PBS, Corning, New York, USA). Splenic or thymic cells were dissociated with gentleMACS Octodissociator (Miltenyi Biotec) using spleen program. The samples were passed through a

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

100 µm sieve and then frozen at – 150°C in a fetal bovine serum/dimethyl sulfoxide solution (90% FBS and 10% DMSO).

IV.2.d. Microbiological studies

IV.2.d.i Culture methods

All sample preparation steps (collection, centrifugation, dilution, and inoculation into culture media) were performed at the same time for aerobe and anaerobe analyses. Anaerobic conditions were used first, and all steps were performed as quickly as possible, to protect the anaerobic bacteria.

After weighing, thawed intestine and organs were mashed in an equal weight of cysteine broth and homogenized in a sterile blender to maintain adherent bacteria. Then 1 mL samples of organ homogenate (intestine and organs) were diluted and plated on various selective and non-selective media for qualitative and quantitative cultures of aerobic and anaerobic microbiota (100 µL of dilution per plate). Standard microbiological techniques were applied (Lennette and American Society for Microbiology, 1985) and conventional microbial medium used was the same as already described (Reygner et al., 2016). All aerobic plates were incubated at 37 °C for 48 h. All anaerobic plates were incubated in an anaerobic chamber (Bactron Anaerobic, Sheldon Manufacturing, Cornelius, OR, USA) and examined after 4 days of incubation at 37 °C. The plate counts for the different groups were performed in a blind manner. Isolated colonies grown on Petri dishes were counted using an automatic colony counter (Scan® 500, INTERSCIENCE, France) and expressed as log¹⁰ colony-forming units per gram of tissue (log(CFU)/g).

After macroscopic and microscopic observations (Gram staining procedures), biochemical assays were performed. A number of specific chromogenic media were also used. Reading, counting and identification were performed in a blind manner.

IV.2.d.ii Bacterial Translocation

Spleen was removed for culture of translocated organisms were numbered and identified according to their characteristic colonial and microscopic appearances and by using MALDI-TOF-MS as described in Joly et al, 2016 (Joly Condetta et al., 2016) under aseptic conditions. Each thawed tissue was placed in sterile preweighed glass. On the day of inoculation, organs were weighed and placed in a sterile stomacher and then homogenized in a Ringer's saline solution (Bio-Rad, France). Finally, plates were inoculated with the resulting homogenate. The

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

conventional microbial medium used was the same as already described below (Reygner et al., 2016). After incubation, bacteria were identified using standard microbiological techniques (Lennette and American Society for Microbiology, 1985). Reading, counting and identification of plates were performed in a blind fashion. The beneficial intestinal microbiome is defined by the quantification of lactobacillus and bifides. As for the pathogenic one, it includes the quantification of Enterococci, Enterobacteria, Clostridium, Bacteroides and Staphylococci.

IV.2.e. Data acquisition and analysis

IV.2.e.i Blood

One day after the sacrifice, the blood was analyzed on KT-6400 (Genrui Biotech Inc, Shenzhen, China) in order to obtain general blood count. Then peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from non-exposed or exposed animals were separated using gradient separation by Ficoll Pacques Plus© (GE-Healthcare, Little Chalfont, United-Kingdom). Ficoll's first phase (i.e plasma serum sample) was kept and frozen at -150°C. PBMC's ring was collected, washed in phosphated buffer saline (PBS, Corning, New York, USA), pelleted at 300G and then frozen at -150°C in a fetal bovine serum/dimethyl sulfoxide solution (90% FBS and 10% DMSO).

IV.2.e.ii Flow cytometry analysis

Single cells suspensions prepared from the spleen, thymus or PBMC were unfrozen in RPMI medium (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% FBS (Eurobio, Courtaboeuf, France), 2 mM L-glutamine (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) and 10 U/mL penicilline-streptomycine (Sigma Aldrich) for three hours. Cells were then stained with fluorochrome-conjugated Antibodies (Abs). The following Abs were used for flow cytometry analysis: PE-anti-rat-CD3 (clone REA223), APC-anti-rat-CD4 (clone REA482), FITC-anti-CD8a (clone REA437), FITC-anti-rat-IgM (clone ES26-13D3.4), APC-anti-rat-CD45R (clone REA450), APCVio770-anti-rat-CD45 (clone REA504), FITC-anti-rat-CD161 (clone REA227), APC, anti-rat-IgG1 (clone RG11/39.2) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). Analyses of lymphoid populations were performed on events gated (1×10^5 viable cells) according to FSC/SSC parameters. B cell (CD45+/CD3-/CD45R+), Active B cells (CD45+/CD3-/IgG1+), immature B cell (CD45+/CD3-/IgM+), switched B cell (CD45+/CD3-/IgG1+), memory B cell (CD45+/CD3-/CD45R+/CD27+), T cell (CD45+/CD3+), helper T cells (CD45+/CD3+/CD4+CD8a-) or cytotoxic T cells (CD45+/CD3+/CD4-CD8a+) subsets detection was realized following previously described gating strategy (Barnett-Vanes et al.,

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

2016; Chen et al., 2016b; Han et al., 2019). All sample were acquired using a MACSQuantify (Miltenyi Biotec). Cytometry analysis was done on FlowJo v10.2 software.

IV.2.e.iii Serum analysis

Immunoglobulin concentrations were done from plasma serum sample using Antibody Isotyping 6-Plex Rat ProcartaPlex© (Invitrogen, Carlsbad, USA). Plasma serums were diluted 4000-fold as recommended by manufactures instructions. Luminex analysis was realized on MagPix Milliplex Map (Merck). Result was analyzed on ProcartaPlex© Analysis (Invitrogen).

IV.2.e.iv Statistical analysis

Normality distribution was determined using Agostino-Pearson test. In order to compare and correlate control and exposed groups, data were analyzed using Mann Withney test, Wilcoxon test, Chi-square test and Pearson r test (show in the figure legends). Data were analyzed using GraphPad Prism (Version 8.4.0, GraphPad Software, San Diego, USA) and expressed in median, min and max. The threshold for statistical significance was set to $p < 0.05$.

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

IV.3. Results

IV.3.a. Effect of RF-EMF on hematological parameters

To verify the impact of RF-EMF exposure on rat's immune system we first measured various hematological parameters in exposed and control rats (**Table 1**). In exposed rats, the white blood cells count (WBC) was significantly lower than control rats ($p=0,0434$). The distribution of lymphocyte and neutrophil subpopulations was also modified. The percentage of neutrophils was significantly greater in the exposed group than in the control group ($p=0,0253$). In contrast, the percentage of lymphocytes was lower in the exposed group compared to the control group ($p=0,007$). The number of lymphocytes was lower in the exposed group compared to the control group ($p=0,005$).

*IV.3.b. RF-EMF induces changes of **Lymphocytes B populations and products.***

We analyzed B cell subpopulations in the peripheral blood and in spleen of exposed and control rats by flow cytometry (**Figure 62**). For B-cells subsets in blood, no significant differences were observed except for the absolute cell number of IgG1+ B-cells ($p=0,009$) which was higher in exposed rats compared to control rats (**Figure 62A-B**). In the spleen, the percentage of mature B cells was not significantly modified by RF-EMF exposure (**Figure 62C**). However, percentage of IgG1+ B cells in exposed rats was higher than controls ($p=0,002$). Percentage of memory B cells in spleen was significantly lower in exposed rats than controls ($p=0,001$) (**Figure 62C**).

We measured the Ig production by B cells in the serum of exposed and control rats (**Figure 63**). We observed significantly lower percentages of IgG1 ($p=0,019$) and IgG2c ($p=0,003$) in exposed rats compared to control. Together, these data demonstrate that RF-EMF exposure induces an alteration of immune cells in the peripheral blood and impacts humoral immune response.

*IV.3.c. RF-EMF induces major modification of **Lymphocytes T subpopulations***

In RF-EMF exposed animals, both the blood percentage and cell numbers of total T lymphocytes (CD45+ CD3+) were significantly lower than in control animals (**Figure 64A** $p=0,0012$ and $p=0,037$ respectively). Although the percentages of helper (CD4+) and cytotoxic (CD8+) T cells were not modified, the absolute value of these subpopulations were significantly

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

lower in exposed rats compared to control rats (**Figure 64B**; $p=0,008$ (CD4+) and $p=0,012$ (CD8+)).

Similar to our observation in peripheral blood, frequencies of splenic total T cells ($p=0,019$) and CD4+ T cells ($p=0,049$) were also significantly lower in exposed rats (**Figure 64C**).

In thymus, the percentage of total T lymphocytes was not modified in exposed compared to control group (**Figure 64D**). But, CD4+ single-positive thymocytes were significantly higher in exposed group ($p=0,031$), however, CD8+ single-positive thymocytes showed no significant change. Double positive thymocyte (CD4+/CD8+, $p=0,010$) frequencies were lower in exposed rats (**Figure 64D**). T cells precursor (CD4-/CD8-) is also higher in exposed rats' thymocyte than control ($p=0,033$, **Figure 64D**).

IV.3.d. RF-EMF induces changes in intestinal microbiota composition/dysbiosis.

To explain immunological changes observed in exposed rats, we analyzed intestinal microbiota composition. The quantification of the microbiota in colon tissue (expressed in log CFU/g colon tissues) revealed significant variations between exposed and control group (**Figure 65**). The beneficial microbiota was unaffected in the colon tissue of exposed rats. The pathogenic microbiota was increased in exposed rats compared to control rats (Fig. 4A; $p=0.024$). Comparing the microbiome balance beneficial/pathogenic in control and exposed rats, we observed a significant difference in RF-EMF exposed rats (**Figure 65A**; $p=0.005$) not found in control rats ($p=0.79$). We identified by conventional bacterial culture 5 genus: *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Staphylococcus*, *Clostridium* and *Bacteroides* in exposed or control rats. In a significant way, we observed a higher concentration of *Enterococcus* ($p=0.011$), *Clostridium* ($p=0.002$) and *Bacteroides* ($p=0.041$) genus in EMF-RF exposed rats (**Figure 65B**). We observed an increase of *enterococcus* bacterial translocation in spleen exposed rats (**Figure 65C**; $p=0.001$). These data demonstrate intestinal dysbiosis induced with exposition to RF-EMF.

IV.3.e. *Enterococcus* gut concentration correlates with immunological changes

To highlight the relation between RF-EMF, microbiota and immunity, a correlation study was performed between bacterial and immunological parameters in exposed and control group. Significant correlations were only identified in the exposed rat's group and are shown in figure 5.

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

A negative correlation between Enterococcus gut concentration and blood T cells concentration and helper T cell (**Figure 66A.**, $p=0,046$). (**Figure 66B**, $p=0,004$). Regarding other T cell subsets in blood, we did not observed correlation (*data not show*). In secondary lymphoid tissue, we found a positive correlation between spleen memory B cell frequencies and Enterococcus concentration (**Figure 66C**, $p=0,028$).

IV.4. Discussion

During the last few years, RF-EMF emitting devices including cell phones, Wi-Fi and satellite communication systems are extremely used and mainly by young people. Such devices are present everywhere in everyday life places (home, school, metro, bus, street ...) leading to continuous exposition to RF-EMF. To model this chronic exposure to RF-EMF in youth, in this study, we exposed juvenile rats to 900MHz RF-EMF for 23h/day during 5 weeks, as Pelletier et al (Pelletier et al., 2013), and analyzed the impact of this exposure on immune system and intestinal microbiota.

Although work on the effects of RF-EMF has been published for 20 years, there is still no consensus on the exposure model to use. First of all, because wireless technologies are constantly evolving along with the parameters of fields. Yet it seems obvious today that individuals are chronically subjected to electromagnetic fields, but the intensity of these fields is not clearly established. Some studies have attempted to quantify the intensity of electromagnetic fields present in the environment (Ramirez-Vazquez et al., 2019; Waldmann-Selsam et al., 2016; Wall et al., 2019). This parameter could strongly fluctuate depending on a given geographical area, and the number of connected devices present around the individual. In everyday life, the intensity of electromagnetic fields is variable, whereas for our study it was necessary to fixed it.

Our results shown that the exposure of rats to the RF-EMF caused a decrease of WBC and total lymphocytes count and frequencies and a higher percentage of neutrophil in peripheral blood. Similar changes in hematological parameters have been observed in a study on juvenile rats using 915 MHz frequencies and a short exposure of 8h/day during 2 weeks (Kim et al., 2018). However, in contrast to short exposure⁴⁸, our data suggest that longer exposure to RF-EMF induces an alteration of immunity and especially adaptive immunity. Indeed, we observed modifications of some B cells subsets (IgG1⁺ B cells and memory B cells), and of the T lymphocytes populations in blood, spleen and thymus. Modifications in the Ig secretion in the

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

serum of exposed vs. controls rats, reflects a deep change in adaptive immunity. This type of results has never been observed before.

A study conducted on rats exposed to 900MHz RF-EMF 2h/day during 45 days showed oxidative stress in secondary lymphoid organs¹⁰. The decrease of lymphocytes in exposed rats in our study could be explained by an increased apoptosis as it was shown that 900MHz RF-EMF induces cells apoptosis through the mitochondrial pathway by a ROS and caspase-3 dependent mechanism^{49, 50}.

Gut microbiota analysis in rats exposed to RF-EMF revealed dysbiosis. This dysbiosis is characterized by an increase of the *Enterococcus*, *Clostridium* and *Bacteroides* in the gut tissue. *Enterococcus* was also translocated into the spleen in 67% of rats exposed to RF-EMF against 25% in the control rats.

These bacteria have already been identified in the literature as having an effect on the immune system. *Clostridium* was associated with food allergies (Chen et al., 2016a; Ling et al., 2014), inducing accumulation of intestinal Treg able to inhibit allergic inflammation (Nagano et al., 2012) and metabolize short-chain fatty acids, which can have systemic anti-inflammatory effects, influencing dendritic cells and T-cell responses (Fyhrquist, 2019). The bacterium *Bacteroides fragilis*, drive the differentiation of IL-10-secreting Tregs, by producing an unusual capsular polysaccharide A. Daillère et al, have demonstrated immunomodulatory effects of *Enterococcus hirae* during cyclophosphamide therapy. This bacterium changed the tumor microenvironment, reducing regulatory T cells and stimulating cognate antitumor cytotoxic T cells responses (Daillère et al., 2016).

Our results shown that the increase of *Enterococcus* in the gut tissue was correlated with a decrease of T cells and CD4+ T cells in the blood of exposed rats. However, we are not able to explain with this rat's model the mechanisms involved.

We hypothesized that the immune deregulations observed in peripheral blood and secondary lymphoid organs could be partly caused by the intestinal dysbiosis.

To explore this hypothesis, it would be interesting to study of the effect of the RF-EMF on germ-free mice in order to identify the direct action of the electromagnetic field on the immune system. This study will make it possible to target more specifically lymphocyte subpopulations such as Th17, Treg, and also to target cells of the innate immune system which was not done in this study.

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

This model of chronic exposure of rats to RF-EMF demonstrates the deregulatory effect of radiofrequency on the immune system, and particularly indirectly through the dysbiosis that it causes in the intestinal microbiota. The adaptive immune system appears to be more affected by the RF-EMF with major changes in LB and LT subpopulation in the blood as well as in secondary lymphoid organs.

Acknowledgments

We thank Ludovic Didier (Head of the PlatAnN facility) for assistance with animal experiments, and Luciane Zabijak (ICAP platform).

Parameters	Control	RF-EMF	Group comparison
Number of WBC (*10 ⁹ /L)	13,17 ± 0,380	9,99 ± 2,299	*
Lymphocyte (%)	70,86 ± 1,371	63,52 ± 2,313	**
Monocytes (%)	6,99 ± 0,299	8,87 ± 1,014	ns
Neutrophiles (%)	22,15 ± 1,466	27,57 ± 2,087	*
Lymphocytes (*10 ⁹ /L)	9,92 ± 0,147	6,93 ± 1,161	**
Monocytes (*10 ⁹ /L)	0,81 ± 0,108	1,03 ± 0,206	ns
Neutrophiles (*10 ⁹ /L)	2,57 ± 0,374	3,594 ± 0,892	ns

Table 1 : Blood count parameters (expressed in mean ± SEM) in control (n=8) and exposed group (n=9), Mann-Whitney statistical comparison
 NS: non-significant, *: p<0,05, **: p<0,01.

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

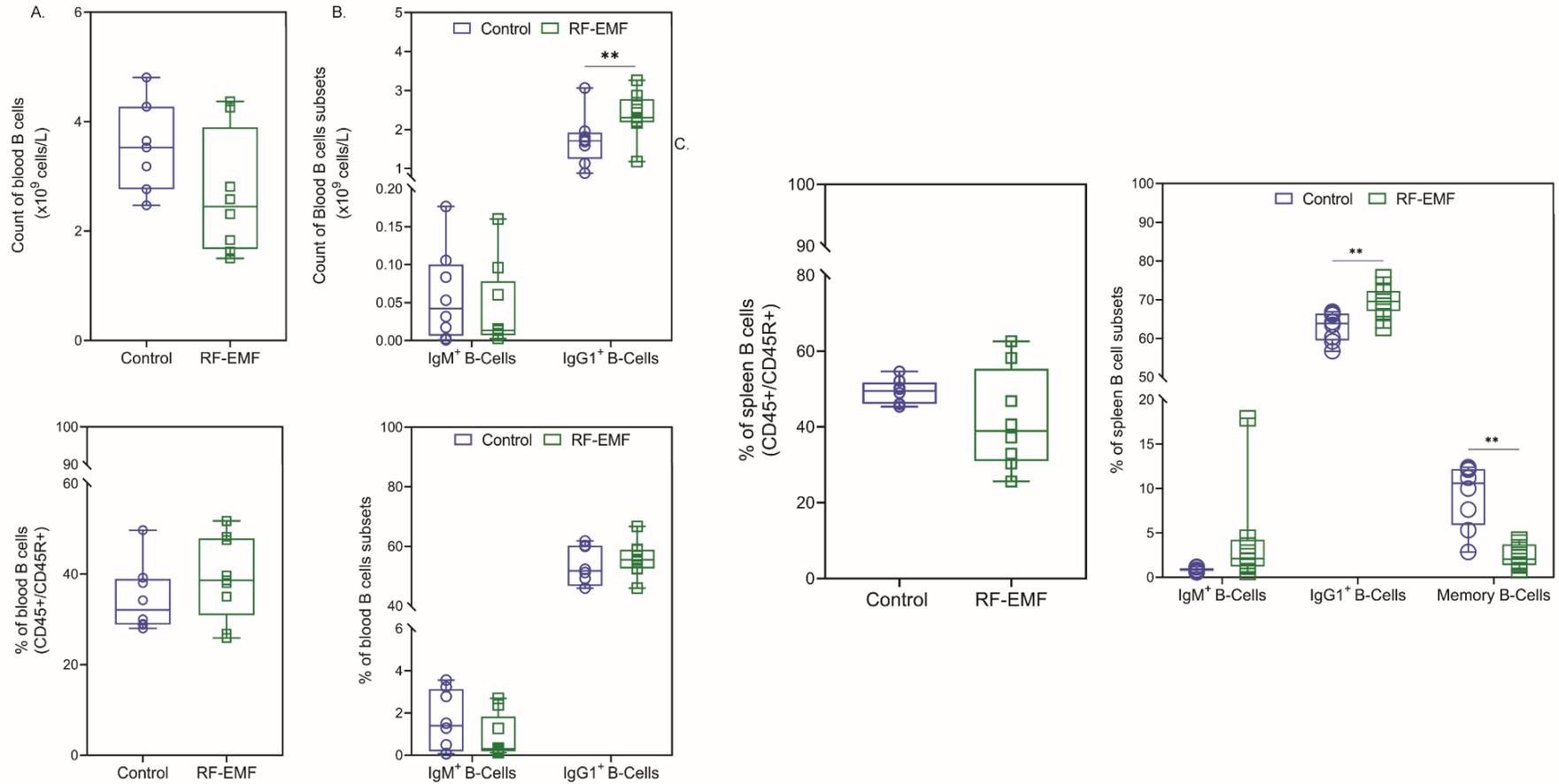


Figure 62 : B lymphocyte subpopulation distribution in control and exposed rats in peripheral blood and spleen

Frequencies or count of active B cell (CD45⁺/CD3⁻/IgG1⁺), B cell (CD45⁺/CD3⁻/CD45R⁺), immature B cell (CD45⁺/CD3⁻/IgM⁺), switched B cell (CD45⁺/CD3⁻/IgG1⁺), and memory B cell (CD45⁺/CD3⁻/CD45R⁺/CD27⁺) was analyzed by flow cytometry in exposed (n=8) and control (n=9) rats' peripheral blood (A-B) and spleen (C). Frequencies were obtained according to CD45 positive alive events. Mann-Whitney statistical comparison was done, and significance was defined for p<0,05, NS: non-significant, *: p<0,05, **: p<0,01.

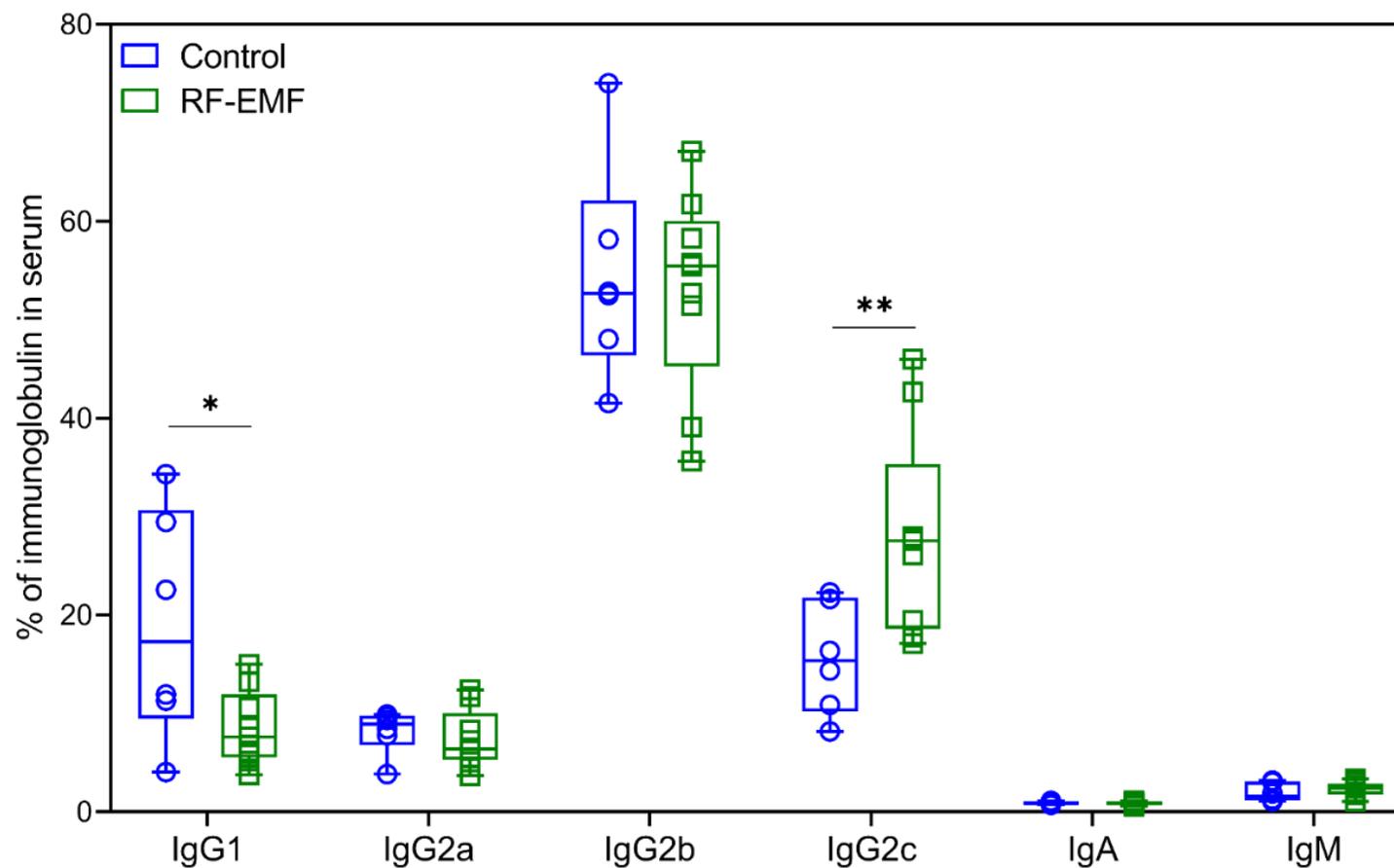


Figure 63 : Immunoglobulin repartition in control and exposed rat's blood serum

Immunoglobulin repartition of IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgA and IgM was obtained by Luminex© Beads Analysis in exposed (n=9) and control (n=8) rats blood serum. Mann-Whitney statistical comparison was done, and significance was defined for $p < 0,05$, *: $p < 0,05$

Partie V : Projet SIREF : Effet des ondes électromagnétiques de 900MHz sur l'immunité des rats.

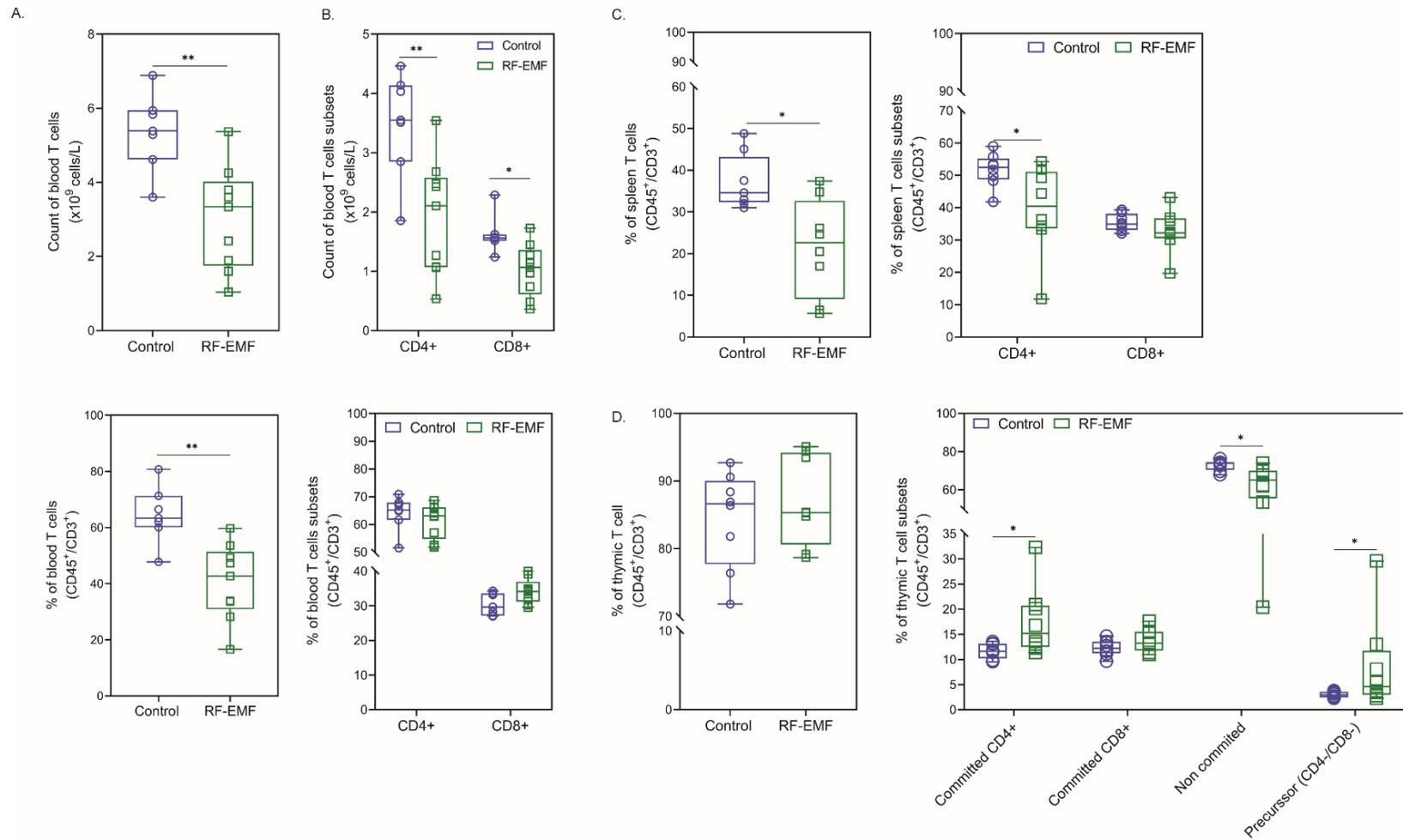


Figure 64 : T lymphocyte subpopulation distribution in control and exposed rat's in peripheral blood, spleen and thymus
 Frequencies or count of T cell ($CD45^+/CD3^+$), helper T cell ($CD45^+/CD3^+/CD4^+CD8a^-$) or cytotoxic T cell ($CD45^+/CD3^+/CD4^+CD8a^+$), was analyzed by flow cytometry in exposed ($n=8$) and control ($n=9$) rats peripheral blood (A-B), spleen (C) and thymus (D). Mean of frequencies were obtained according to CD45 positive alive events. Mann-Whitney statistical comparison was done, and significance was defined for $p < 0,05$, NS: non-significant, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

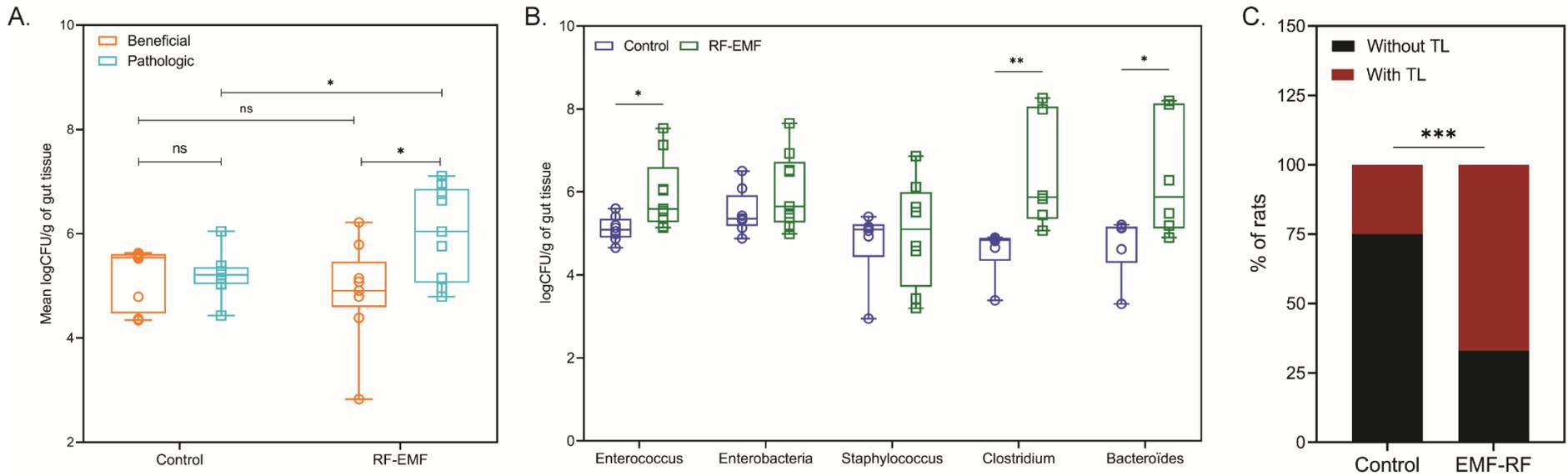


Figure 65 : Microbiome population for gut tissues sample in control and exposed rats

Beneficial and pathogenic microbioma was quantify on exposed (n=8) and control (n=9) rats. Results were expressed according to CFUs (colony forming units) account by gram of colon tissues (A). Each pathogenic genus (Enterobacteria, Enterococcus, Staphyococcus, Clostridium, Bacteroid) was individually quantified on exposed (n=8) and control (n=9) rats colon tissues (B.). Percentage of enterococcus translocation to spleen (w. = with; w/ = without) was represented in rats exposed or unexposed (C.). Statistical significance was determined by Mann-Withney test, and Chi-square test for and defined for $p < 0,05$.

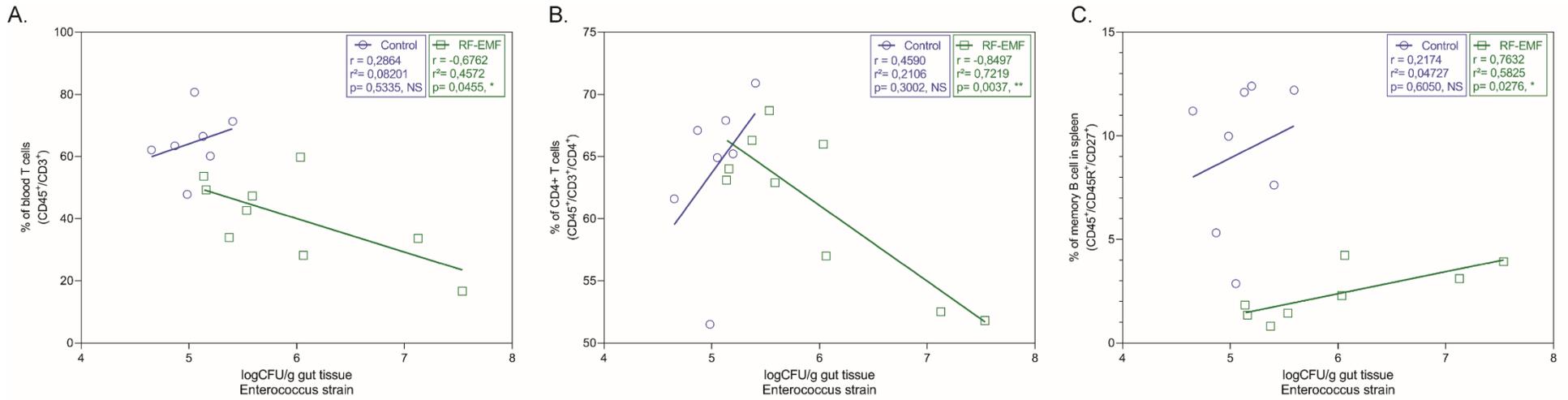


Figure 66 : Relation between Enterococcus gut concentration and hematological parameters in control and exposed rats. Enterococcal strain concentration was correlated with blood global T cell (A.), blood helper T cell (B.) and spleen memory B cell frequencies (C.) for exposed and control group. Pearson correlation was done, and significance was defined for $p < 0.05$.

Bibliographie

Bibliographie

Abbas, A., and Lichtman, A.H. (2010). *Basic Immunology Updated Edition 3rd Edition : Functions and Disorders of the Immune System* (Saunders).

Acar, M., Kocherlakota, K.S., Murphy, M.M., Peyer, J.G., Oguro, H., Inra, C.N., Jaiyeola, C., Zhao, Z., Luby-Phelps, K., and Morrison, S.J. (2015). Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature* 526, 126–130.

Ademokun, J.A., Chapman, C., Dunn, J., Lander, D., Mair, K., Proctor, S.J., and Dickinson, A.M. (1997). Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking. *Bone Marrow Transplant.* 19, 1023–1028.

Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). Mechanisms of Phagocytosis in Macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593–623.

Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.-J., Thoren, L.A.M., et al. (2005). Identification of Flt3+ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential: A Revised Road Map for Adult Blood Lineage Commitment. *Cell* 121, 295–306.

Al-Harbi, F.F., Alkhalifah, D.H.M., Elqahtani, Z.M., Ali, F.M., Mohamed, S.A., and Abdelbacki, A.M.M. (2018). Nonthermal control of *Escherichia coli* growth using extremely low frequency electromagnetic (ELF-EM) waves. *Biomed. Mater. Eng.* 29, 809–820.

Alkhatib, A., Werner, M., Hug, E., Herzog, S., Eschbach, C., Faraidun, H., Köhler, F., Wossning, T., and Jumaa, H. (2012). FoxO1 induces Ikaros splicing to promote immunoglobulin gene recombination. *J. Exp. Med.* 209, 395–406.

Allman, D., Li, J., and Hardy, R.R. (1999). Commitment to the B Lymphoid Lineage Occurs before DH-JH Recombination. *J. Exp. Med.* 189, 735–740.

Allman, D., Sambandam, A., Kim, S., Miller, J.P., Pagan, A., Well, D., Meraz, A., and Bhandoola, A. (2003). Thymopoiesis independent of common lymphoid progenitors. *Nat. Immunol.* 4, 168–174.

Almeida, C.R., Hendriks, R.W., and Stadhouders, R. (2015). Chapter Five - Dynamic Control of Long-Range Genomic Interactions at the Immunoglobulin κ Light-Chain Locus. In *Advances in Immunology*, C. Murre, ed. (Academic Press), pp. 183–271.

Alugupalli, K.R., Leong, J.M., Woodland, R.T., Muramatsu, M., Honjo, T., and Gerstein, R.M. (2004). B1b Lymphocytes Confer T Cell-Independent Long-Lasting Immunity. *Immunity* 21, 379–390.

Amin, R.H., and Schlissel, M.S. (2008). Foxo1 directly regulates the transcription of recombination-activating genes during B cell development. *Nat. Immunol.* 9, 613–622.

Aoki-Ota, M., Torkamani, A., Ota, T., Schork, N., and Nemazee, D. (2012). Skewed Primary Ig κ Repertoire and V–J Joining in C57BL/6 Mice: Implications for Recombination Accessibility and Receptor Editing. *J. Immunol.* 188, 2305–2315.

Aquapendente, F. (1621). *The Embryological Treatises of Hieronymus Fabricius of Aquapendente: A Facsim. Ed., with an Intro., a Trans* (Cornell U.P.).

Bibliographie

Ara, T., Nakamura, Y., Egawa, T., Sugiyama, T., Abe, K., Kishimoto, T., Matsui, Y., and Nagasawa, T. (2003). Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 5319–5323.

Aung, S.-W., Abu Kasim, N.H., and Ramasamy, T.S. (2019). Isolation, Expansion, and Characterization of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cell: Method to Identify Functional Passages for Experiments. In *Stem Cells and Aging: Methods and Protocols*, K. Turksen, ed. (New York, NY: Springer), pp. 323–335.

Aydin, B., and Akar, A. (2011). Effects of a 900-MHz Electromagnetic Field on Oxidative Stress Parameters in Rat Lymphoid Organs, Polymorphonuclear Leukocytes and Plasma. *Arch. Med. Res.* *42*, 261–267.

Baird, A.M., Gerstein, R.M., and Berg, L.J. (1999). The role of cytokine receptor signaling in lymphocyte development. *Curr. Opin. Immunol.* *11*, 157–166.

Barker, J., and Verfaillie, C.M. (2000). A novel in vitro model of early human adult B lymphopoiesis that allows proliferation of pro-B cells and differentiation to mature B lymphocytes. *Leukemia* *14*, 1614–1620.

Barnett-Vanes, A., Sharrock, A., Birrell, M.A., and Rankin, S. (2016). A Single 9-Colour Flow Cytometric Method to Characterise Major Leukocyte Populations in the Rat: Validation in a Model of LPS-Induced Pulmonary Inflammation. *PloS One* *11*, e0142520.

Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2012). Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol. Rev.* *247*, 172–183.

Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2015). Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 172–184.

Basso, K., Saito, M., Sumazin, P., Margolin, A.A., Wang, K., Lim, W.-K., Kitagawa, Y., Schneider, C., Alvarez, M.J., Califano, A., et al. (2010). Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* *115*, 975–984.

Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 34–46.

Bendall, S.C., Davis, K.L., Amir, E.D., Tadmor, M.D., Simonds, E.F., Chen, T.J., Shenfeld, D.K., Nolan, G.P., and Pe'er, D. (2014). Single-Cell Trajectory Detection Uncovers Progression and Regulatory Coordination in Human B cell Development. *Cell* *157*, 714–725.

Berek, C., Berger, A., and Apel, M. (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* *67*, 1121–1129.

Bergman, Y., and Cedar, H. (2013). DNA methylation dynamics in health and disease. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 274–281.

Bertrand, J.Y., Desanti, G.E., Lo-Man, R., Leclerc, C., Cumano, A., and Golub, R. (2006). Fetal spleen stroma drives macrophage commitment. *Development* *133*, 3619–3628.

Bibliographie

Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M.C., Tassani, S., Piva, F., et al. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. *Ann. Hum. Biol.* *40*, 463–471.

Billips, L.G., Petite, D., Dorshkind, K., Narayanan, R., Chiu, C.P., and Landreth, K.S. (1992). Differential roles of stromal cells, interleukin-7, and kit-ligand in the regulation of B lymphopoiesis. *Blood* *79*, 1185–1192.

Bl, K., Mw, Q., and C, M. (2000). E2A proteins: essential regulators at multiple stages of B-cell development. *Immunol. Rev.* *175*, 138–149.

Borchert, G.M., Holton, N.W., and Larson, E.D. (2011). Repression of human activation induced cytidine deaminase by miR-93 and miR-155. *BMC Cancer* *11*, 347.

Bortkiewicz, A., Gadzicka, E., and Szymczak, W. (2017). Mobile phone use and risk for intracranial tumors and salivary gland tumors – A meta-analysis. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* *30*, 27–43.

Bosquillon de Jenlis, A., Del Vecchio, F., Delanaud, S., Bach, V., and Pelletier, A. (2020). Effects of co-exposure to 900 MHz radiofrequency electromagnetic fields and high-level noise on sleep, weight, and food intake parameters in juvenile rats. *Environ. Pollut.* *256*, 113461.

Bouwens, M., Kleijn, S. de, Ferwerda, G., Cuppen, J.J., Savelkoul, H.F.J., and Kemenade, B.M.L.V. (2012). Low-frequency electromagnetic fields do not alter responses of inflammatory genes and proteins in human monocytes and immune cell lines. *Bioelectromagnetics* *33*, 226–237.

Breckenkamp, J., Berg, G., and Blettner, M. (2003). Biological effects on human health due to radiofrequency/microwave exposure: a synopsis of cohort studies. *Radiat. Environ. Biophys.* *42*, 141–154.

Brown, J.A., and Boussiotis, V.A. (2008). Umbilical cord blood transplantation: Basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin. Immunol.* *127*, 286–297.

van der Burg, M., Tümkaya, T., Boerma, M., de Bruin-Versteeg, S., Langerak, A.W., and van Dongen, J.J.M. (2001). Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. *Blood* *97*, 1001–1008.

Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* *425*, 841–846.

Chan, C.K.F., Chen, C.-C., Luppen, C.A., Kim, J.-B., DeBoer, A.T., Wei, K., Helms, J.A., Kuo, C.J., Kraft, D.L., and Weissman, I.L. (2009). Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature* *457*, 490–494.

Chandra, V., Bortnick, A., and Murre, C. (2015). AID targeting: old mysteries and new challenges. *Trends Immunol.* *36*, 527–535.

Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., et al. (2007). Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv. Immunol.* *94*, 157–214.

Bibliographie

Chen, C.-C., Chen, K.-J., Kong, M.-S., Chang, H.-J., and Huang, J.-L. (2016a). Alterations in the gut microbiotas of children with food sensitization in early life. *Pediatr. Allergy Immunol. Off. Publ. Eur. Soc. Pediatr. Allergy Immunol.* *27*, 254–262.

Chen, J., Young, F., Bottaro, A., Stewart, V., Smith, R.K., and Alt, F.W. (1993). Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *EMBO J.* *12*, 4635–4645.

Chen, J., Wang, Q., Wu, H., Liu, K., Wu, Y., Chang, Y., and Wei, W. (2016b). The ginsenoside metabolite compound K exerts its anti-inflammatory activity by downregulating memory B cell in adjuvant-induced arthritis. *Pharm. Biol.* *54*, 1280–1288.

Chou, S., and Lodish, H.F. (2010). Fetal liver hepatic progenitors are supportive stromal cells for hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 7799–7804.

Choudhary, M., Tamrakar, A., Singh, A.K., Jain, M., Jaiswal, A., and Kodgire, P. (2018). AID Biology: A pathological and clinical perspective. *Int. Rev. Immunol.* *37*, 37–56.

Ci, W., Polo, J.M., Cerchietti, L., Shaknovich, R., Wang, L., Yang, S.N., Ye, K., Farinha, P., Horsman, D.E., Gascoyne, R.D., et al. (2009). The BCL6 transcriptional program features repression of multiple oncogenes in primary B cells and is deregulated in DLBCL. *Blood* *113*, 5536–5548.

Ciriza, J., Thompson, H., Petrosian, R., Manilay, J.O., and García-Ojeda, M.E. (2013). The migration of hematopoietic progenitors from the fetal liver to the fetal bone marrow: Lessons learned and possible clinical applications. *Exp. Hematol.* *41*, 411–423.

Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., and Shaper, J.H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *133*, 157–165.

Clark, G., Stockinger, H., Balderas, R., van Zelm, M.C., Zola, H., Hart, D., and Engel, P. (2016). Nomenclature of CD molecules from the Tenth Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshop. *Clin. Transl. Immunol.* *5*, e57.

Clark, M.R., Mandal, M., Ochiai, K., and Singh, H. (2014). Orchestrating B cell lymphopoiesis through interplay of IL-7 receptor and pre-B cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 69–80.

Collins, A.M., and Jackson, K.J.L. (2018). On being the right size: antibody repertoire formation in the mouse and human. *Immunogenetics* *70*, 143–158.

Collins, L.S., and Dorshkind, K. (1987). A stromal cell line from myeloid long-term bone marrow cultures can support myeloopoiesis and B lymphopoiesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *138*, 1082–1087.

Cooper, A.B., Sawai, C.M., Sicinska, E., Powers, S.E., Sicinski, P., Clark, M.R., and Aifantis, I. (2006). A unique function for cyclin D3 in early B cell development. *Nat. Immunol.* *7*, 489–497.

Bibliographie

Cortes, P., Weis-Garcia, F., Misulovin, Z., Nussenzweig, A., Lai, J.S., Li, G., Nussenzweig, M.C., and Baltimore, D. (1996). In vitro V(D)J recombination: signal joint formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 14008–14013.

Coşkun, S., Chao, H., Vasavada, H., Heydari, K., Gonzales, N., Zhou, X., de Crombrugge, B., and Hirschi, K.K. (2014). Development of the Fetal Bone Marrow Niche and Regulation of HSC Quiescence and Homing Ability by Emerging Osteolineage Cells. *Cell Rep.* *9*, 581–590.

Crabtree, D.P.E., Herrera, B.J., and Kang, S. (2017). The response of human bacteria to static magnetic field and radiofrequency electromagnetic field. *J. Microbiol. Seoul Korea* *55*, 809–815.

Cunningham, A.F., Flores-Langarica, A., Bobat, S., Dominguez Medina, C.C., Cook, C.N.L., Ross, E.A., Lopez-Macias, C., and Henderson, I.R. (2014). B1b cells recognize protective antigens after natural infection and vaccination. *Front. Immunol.* *5*, 535.

Daillère, R., Vétizou, M., Waldschmitt, N., Yamazaki, T., Isnard, C., Poirier-Colame, V., Duong, C.P.M., Flament, C., Lepage, P., Roberti, M.P., et al. (2016). *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory Effects. *Immunity* *45*, 931–943.

Dang, C.V. (2012). MYC on the Path to Cancer. *Cell* *149*, 22–35.

Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* *116*, 205–219.

Dedeoglu, F., Horwitz, B., Chaudhuri, J., Alt, F.W., and Geha, R.S. (2004). Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int. Immunol.* *16*, 395–404.

Degner, S.C., Wong, T.P., Jankevicius, G., and Feeney, A.J. (2009). Cutting Edge: Developmental Stage-Specific Recruitment of Cohesin to CTCF Sites throughout Immunoglobulin Loci during B Lymphocyte Development. *J. Immunol.* *182*, 44–48.

DeKoter, R.P., Lee, H.-J., and Singh, H. (2002). PU.1 regulates expression of the interleukin-7 receptor in lymphoid progenitors. *Immunity* *16*, 297–309.

Del Vecchio, G., Giuliani, A., Fernandez, M., Mesirca, P., Bersani, F., Pinto, R., Ardoino, L., Lovisolò, G.A., Giardino, L., and Calzà, L. (2009). Continuous exposure to 900MHz GSM-modulated EMF alters morphological maturation of neural cells. *Neurosci. Lett.* *455*, 173–177.

Delogu, A., Schebesta, A., Sun, Q., Aschenbrenner, K., Perlot, T., and Busslinger, M. (2006). Gene repression by Pax5 in B cells is essential for blood cell homeostasis and is reversed in plasma cells. *Immunity* *24*, 269–281.

Deniaud, E., and Bickmore, W.A. (2009). Transcription and the nuclear periphery: edge of darkness? *Curr. Opin. Genet. Dev.* *19*, 187–191.

Descatoire, M., Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., and Weller, S. (2011). A human equivalent of mouse B-1 cells? *J. Exp. Med.* *208*, 2563–2564.

Bibliographie

Dias, S., Silva, H., Cumano, A., and Vieira, P. (2005). Interleukin-7 is necessary to maintain the B cell potential in common lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* *201*, 971–979.

Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* *495*, 231–235.

Ding, D.-C., Chang, Y.-H., Shyu, W.-C., and Lin, S.-Z. (2015). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. *Cell Transplant.* *24*, 339–347.

Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* *481*, 457–462.

Do, G., Ne, H., and TL, R. (2011). Human B1 cells are CD3-: A reply to “A human equivalent of mouse B-1 cells?” and “The nature of circulating CD27+CD43+ B cells”. *J. Exp. Med.* *208*, 2566–2569.

Domen, J., and Weissman, I.L. (1999). Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol. Med. Today* *5*, 201–208.

Dominguez-Sola, D., Victora, G.D., Ying, C.Y., Phan, R.T., Saito, M., Nussenzweig, M.C., and Dalla-Favera, R. (2012). The proto-oncogene MYC is required for selection in the germinal center and cyclic reentry. *Nat. Immunol.* *13*, 1083–1091.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* *8*, 315–317.

van Dongen, J.J.M., Langerak, A.W., Brüggemann, M., Evans, P. a. S., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurung, E., García-Sanz, R., et al. (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* *17*, 2257–2317.

Dörner, T., Radbruch, A., and Burmester, G.R. (2009). B-cell-directed therapies for autoimmune disease. *Nat. Rev. Rheumatol.* *5*, 433–441.

Doyon, P.R., and Johansson, O. (2017). Electromagnetic fields may act via calcineurin inhibition to suppress immunity, thereby increasing risk for opportunistic infection: Conceivable mechanisms of action. *Med. Hypotheses* *106*, 71–87.

Ebert, A., Hill, L., and Busslinger, M. (2015). Chapter Three - Spatial Regulation of V-(D)J Recombination at Antigen Receptor Loci. In *Advances in Immunology*, C. Murre, ed. (Academic Press), pp. 93–121.

Engel, P., Boumsell, L., Balderas, R., Bensussan, A., Gattei, V., Horejsi, V., Jin, B.-Q., Malavasi, F., Mortari, F., Schwartz-Albiez, R., et al. (2015). CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J. Immunol.* *195*, 4555–4563.

Bibliographie

Espeli, M., Rossi, B., Mancini, S.J.C., Roche, P., Gauthier, L., and Schiff, C. (2006). Initiation of pre-B cell receptor signaling: common and distinctive features in human and mouse. *Semin. Immunol.* *18*, 56–66.

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

Essafi, A., Fernández de Mattos, S., Hassen, Y.A.M., Soeiro, I., Mufti, G.J., Thomas, N.S.B., Medema, R.H., and Lam, E.W.-F. (2005). Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. *Oncogene* *24*, 2317–2329.

Fan, X., Liu, T., Liu, Y., Ma, X., and Cui, Z. (2009). Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design. *Biotechnol. Prog.* *25*, 499–507.

Feddersen, R.M., Martin, D.J., and Ness, B.G.V. (1990). Novel recombinations of the IG kappa-locus that result in allelic exclusion. *J. Immunol.* *145*, 745–750.

Fisher, M.R., and Bassing, C.H. (2015). To $\kappa + B$ or not to $\kappa + B$. *Nat. Immunol.* *16*, 1007–1009.

Fragopoulou, A.F., Miltiadous, P., Stamatakis, A., Stylianopoulou, F., Koussoulakos, S.L., and Margaritis, L.H. (2010). Whole body exposure with GSM 900MHz affects spatial memory in mice. *Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol.* *17*, 179–187.

Francés, V., Pandrau-Garcia, D., Guret, C., Ho, S., Wang, Z., Duvert, V., Saeland, S., and Martinez-Valdez, H. (1994). A surrogate 15 kDa JC kappa protein is expressed in combination with mu heavy chain by human B cell precursors. *EMBO J.* *13*, 5937–5943.

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

Fyhrquist, N. (2019). The Human Microbiota and Its Relationship with Allergies. *Gastroenterol. Clin. North Am.* *48*, 377–387.

Galloni, P., Lovisolo, G.A., Mancini, S., Parazzini, M., Pinto, R., Piscitelli, M., Ravazzani, P., and Marino, C. (2005). Effects of 900 MHz electromagnetic fields exposure on cochlear cells' functionality in rats: Evaluation of distortion product otoacoustic emissions. *Bioelectromagnetics* *26*, 536–547.

Gangi, S., and Johansson, O. (2000). A theoretical model based upon mast cells and histamine to explain the recently proclaimed sensitivity to electric and/or magnetic fields in humans. *Med. Hypotheses* *54*, 663–671.

Ganuja, M., Chabot, A., Tang, X., Bi, W., Natarajan, S., Carter, R., Gawad, C., Kang, G., Cheng, Y., and McKinney-Freeman, S. (2018). Murine hematopoietic stem cell activity is derived from pre-circulation embryos but not yolk sacs. *Nat. Commun.* *9*, 1–16.

Bibliographie

Gao, S., and Liu, F. (2018). Fetal liver: an ideal niche for hematopoietic stem cell expansion. *Sci. China Life Sci.* *61*, 885–892.

Gao, X., Xu, C., Asada, N., and Frenette, P.S. (2018). The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Development* *145*.

Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E., and Ramalho-Santos, M. (2011). Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 36–47.

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

Gatta, L., Pinto, R., Ubaldi, V., Pace, L., Galloni, P., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2003). Effects of in vivo exposure to GSM-modulated 900 MHz radiation on mouse peripheral lymphocytes. *Radiat. Res.* *160*, 600–605.

Gellert, M. (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 101–132.

van Gent, D.C., Hiom, K., Paull, T.T., and Gellert, M. (1997). Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. *EMBO J.* *16*, 2665–2670.

Girardi, E., Holdom, M.D., Davies, A.M., Sutton, B.J., and Beavil, A.J. (2009). The crystal structure of rabbit IgG-Fc. *Biochem. J.* *417*, 77–83.

Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K.J., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J. Exp. Med.* *198*, 1427–1437.

Goodarzi, A.A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R., Härer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., et al. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J.* *25*, 3880–3889.

Goodnow, C.C., Sprent, J., de St Groth, B.F., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* *435*, 590–597.

Greenbaum, A., Hsu, Y.-M.S., Day, R.B., Schuettpelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* *495*, 227–230.

Griffin, D.O., Holodick, N.E., and Rothstein, T.L. (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20⁺CD27⁺CD43⁺CD70⁻. *J. Exp. Med.* *208*, 67–80.

Guilbert, C., Chou, H., Bolt, A.M., Wu, T.H., Luo, V.M., Orthwein, A., and Mann, K.K. (2020). A Functional Assay to Assess Toxicity During Murine B Cell Development In Vitro. *Curr. Protoc. Toxicol.* *83*, e91.

Guillemin, C., and Francastel, C. (2010). Compartiments nucléaires d'hétérochromatine et répression génique : le modèle de la différenciation hématopoïétique humaine. *Biol. Aujourd'hui* *204*, 221–233.

Bibliographie

Haas, K.M., Poe, J.C., Steeber, D.A., and Tedder, T.F. (2005). B-1a and B-1b Cells Exhibit Distinct Developmental Requirements and Have Unique Functional Roles in Innate and Adaptive Immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23, 7–18.

Hagman, J., and Lukin, K. (2006). Transcription factors drive B cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 127–134.

Hamel, K.M., Mandal, M., Karki, S., and Clark, M.R. (2014). Balancing Proliferation with I κ g Recombination during B-lymphopoiesis. *Front. Immunol.* 5.

Hammel, M., Rey, M., Yu, Y., Mani, R.S., Classen, S., Liu, M., Pique, M.E., Fang, S., Mahaney, B.L., Weinfeld, M., et al. (2011). XRCC4 protein interactions with XRCC4-like factor (XLF) create an extended grooved scaffold for DNA ligation and double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 286, 32638–32650.

Han, L., Masani, S., and Yu, K. (2011). Overlapping activation-induced cytidine deaminase hotspot motifs in I κ g class-switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 11584–11589.

Han, Y., Jin, Y., Miao, Y., Shi, T., and Lin, X. (2019). Improved RANKL expression and osteoclastogenesis induction of CD27+CD38- memory B cells: A link between B cells and alveolar bone damage in periodontitis. *J. Periodontal Res.* 54, 73–80.

Hancı, H., Türedi, S., Topal, Z., Mercantepe, T., Bozkurt, I., Kaya, H., Ersöz, Ş., Ünal, B., and Odacı, E. (2015). Can prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field affect the morphology of the spleen and thymus, and alter biomarkers of oxidative damage in 21-day-old male rats? *Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm.* 90, 535–543.

Hardell, L. (2017). World Health Organization, radiofrequency radiation and health - a hard nut to crack (Review). *Int. J. Oncol.* 51, 405–413.

Häsler, J., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2011). Cytoplasmic activation-induced cytidine deaminase (AID) exists in stoichiometric complex with translation elongation factor 1 α (eEF1A). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 18366–18371.

Heizmann, B., Kastner, P., and Chan, S. (2013). Ikaros is absolutely required for pre-B cell differentiation by attenuating IL-7 signals. *J. Exp. Med.* 210, 2823–2832.

Heizmann, B., Kastner, P., and Chan, S. (2018). The Ikaros family in lymphocyte development. *Curr. Opin. Immunol.* 51, 14–23.

Hewitt, S.L., Farmer, D., Marszalek, K., Cadera, E., Liang, H.-E., Xu, Y., Schlissel, M.S., and Skok, J.A. (2008). Association between the I κ g and I κ h immunoglobulin loci mediated by the 3' I κ g enhancer induces “decontraction” of the I κ h locus in pre-B cells. *Nat. Immunol.* 9, 396–404.

Hirose, Y., Kiyoi, H., Itoh, K., Kato, K., Saito, H., and Naoe, T. (2001). B-cell precursors differentiated from cord blood CD34+ cells are more immature than those derived from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood CD34+ cells. *Immunology* 104, 410–417.

Bibliographie

Holl, T.M., Haynes, B.F., and Kelsoe, G. (2010). Stromal cell independent B cell development in vitro: generation and recovery of autoreactive clones. *J. Immunol. Methods* 354, 53–67.

Hoppe, P.S., Schwarzfischer, M., Loeffler, D., Kokkaliaris, K.D., Hilsenbeck, O., Moritz, N., Endele, M., Filipczyk, A., Gambardella, A., Ahmed, N., et al. (2016). Early myeloid lineage choice is not initiated by random PU.1 to GATA1 protein ratios. *Nature* 535, 299–302.

Hordyjewska, A., Popiołek, Ł., and Horecka, A. (2015). Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cytotechnology* 67, 387–396.

Hosokawa, K., Arai, F., Yoshihara, H., Iwasaki, H., Hembree, M., Yin, T., Nakamura, Y., Gomei, Y., Takubo, K., Shiama, H., et al. (2010a). Cadherin-Based Adhesion Is a Potential Target for Niche Manipulation to Protect Hematopoietic Stem Cells in Adult Bone Marrow. *Cell Stem Cell* 6, 194–198.

Hosokawa, K., Arai, F., Yoshihara, H., Iwasaki, H., Nakamura, Y., Gomei, Y., and Suda, T. (2010b). Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood* 116, 554–563.

Hu, S., Pluth, J.M., and Cucinotta, F.A. (2012). Putative binding modes of Ku70-SAP domain with double strand DNA: a molecular modeling study. *J. Mol. Model.* 18, 2163–2174.

Ichii, M., Oritani, K., Yokota, T., Nishida, M., Takahashi, I., Shirogane, T., Ezoe, S., Saitoh, N., Tanigawa, R., Kincade, P.W., et al. (2008). Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor-beta superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment. *Exp. Hematol.* 36, 587–597.

Ichii, M., Oritani, K., Yokota, T., Schultz, D.C., Holter, J.L., Kanakura, Y., and Kincade, P.W. (2010). Stromal cell-free conditions favorable for human B lymphopoiesis in culture. *J. Immunol. Methods* 359, 47–55.

Imperato, M.R., Cauchy, P., Obier, N., and Bonifer, C. (2015). The RUNX1–PU.1 axis in the control of hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* 101, 319–329.

Inlay, M., Alt, F.W., Baltimore, D., and Xu, Y. (2002). Essential roles of the kappa light chain intronic enhancer and 3' enhancer in kappa rearrangement and demethylation. *Nat. Immunol.* 3, 463–468.

Inlay, M.A., Lin, T., Gao, H.H., and Xu, Y. (2006). Critical roles of the immunoglobulin intronic enhancers in maintaining the sequential rearrangement of IgH and Igk loci. *J. Exp. Med.* 203, 1721–1732.

International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (2009). ICNIRP statement on the “Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz).” *Health Phys.* 97, 257–258.

Iritani, B.M., and Eisenman, R.N. (1999). c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 13180–13185.

Bibliographie

Jabara, H., Laouini, D., Tsitsikov, E., Mizoguchi, E., Bhan, A., Castigli, E., Dedeoglu, F., Pivniouk, V., Brodeur, S., and Geha, R. (2002). The binding site for TRAF2 and TRAF3 but not for TRAF6 is essential for CD40-mediated immunoglobulin class switching. *Immunity* *17*, 265–276.

Janssen, A., Colmenares, S.U., and Karpen, G.H. (2018). Heterochromatin: Guardian of the Genome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *34*, 265–288.

Jensen, C.T., Kharazi, S., Böiers, C., Cheng, M., Lübking, A., Sitnicka, E., and Jacobsen, S.E.W. (2008). FLT3 ligand and not TSLP is the key regulator of IL-7-independent B-1 and B-2 B lymphopoiesis. *Blood* *112*, 2297–2304.

Jhunjunwala, S., Zelm, M.C. van, Peak, M.M., and Murre, C. (2009). Chromatin Architecture and the Generation of Antigen Receptor Diversity. *Cell* *138*, 435–448.

Jiang, Q., Li, W.Q., Hofmeister, R.R., Young, H.A., Hodge, D.R., Keller, J.R., Khaled, A.R., and Durum, S.K. (2004). Distinct regions of the interleukin-7 receptor regulate different Bcl2 family members. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 6501–6513.

Jiang, X., Gurel, O., Mendiaz, E.A., Stearns, G.W., Clogston, C.L., Lu, H.S., Osslund, T.D., Syed, R.S., Langley, K.E., and Hendrickson, W.A. (2000). Structure of the active core of human stem cell factor and analysis of binding to its receptor kit. *EMBO J.* *19*, 3192–3203.

Jiao, Y., Wu, L., Huntington, N.D., and Zhang, X. (2020). Crosstalk Between Gut Microbiota and Innate Immunity and Its Implication in Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* *11*, 282.

Jin, Y.B., Pyun, B.-J., Jin, H., Choi, H.-D., Pack, J.-K., Kim, N., and Lee, Y.-S. (2012). Effects of simultaneous combined exposure to CDMA and WCDMA electromagnetic field on immune functions in rats. *Int. J. Radiat. Biol.* *88*, 814–821.

Johansson, O. (2015). Electrohypersensitivity: a functional impairment due to an inaccessible environment. *Rev. Environ. Health* *30*, 311–321.

Johnson, K., Hashimshony, T., Sawai, C.M., Pongubala, J.M.R., Skok, J.A., Aifantis, I., and Singh, H. (2008). Regulation of immunoglobulin light-chain recombination by the transcription factor IRF-4 and the attenuation of interleukin-7 signaling. *Immunity* *28*, 335–345.

Joly Condette, C., Elion Dzon, B., Hamdad, F., Biendo, M., Bach, V., and Khorsi-Cauet, H. (2016). Use of molecular typing to investigate bacterial translocation from the intestinal tract of chlorpyrifos-exposed rats. *Gut Pathog.* *8*, 50.

Kabali, H.K., Irigoyen, M.M., Nunez-Davis, R., Budacki, J.G., Mohanty, S.H., Leister, K.P., and Bonner, R.L. (2015). Exposure and Use of Mobile Media Devices by Young Children. *Pediatrics* *136*, 1044–1050.

Kee, B.L., and Murre, C. (1998). Induction of early B cell factor (EBF) and multiple B lineage genes by the basic helix-loop-helix transcription factor E12. *J. Exp. Med.* *188*, 699–713.

Bibliographie

Kee, B.L., Cumano, A., Iscove, N.N., and Paige, C.J. (1994). Stromal cell independent growth of bipotent B cell--macrophage precursors from murine fetal liver. *Int. Immunol.* *6*, 401–407.

Keim, C., Kazadi, D., Rothschild, G., and Basu, U. (2013). Regulation of AID, the B-cell genome mutator. *Genes Dev.* *27*, 1–17.

Kikuchi, K., Lai, A.Y., Hsu, C.-L., and Kondo, M. (2005). IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF. *J. Exp. Med.* *201*, 1197–1203.

Kim, H.S., Park, J.S., Jin, Y.-B., Choi, H.D., Kwon, J.H., Pack, J.-K., Kim, N., and Ahn, Y.H. (2018). Effects of exposure to electromagnetic field from 915 MHz radiofrequency identification system on circulating blood cells in the healthy adult rat. *Bioelectromagnetics* *39*, 68–76.

Kinoshita, K., and Honjo, T. (2001). Linking class-switch recombination with somatic hypermutation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 493–503.

Kirk, A.D., Turgeon, N.A., and Iwakoshi, N.N. (2010). B cells and transplantation tolerance. *Nat. Rev. Nephrol.* *6*, 584–593.

Kılıç, A.O., Sari, E., Yucel, H., Oğuz, M.M., Polat, E., Acoglu, E.A., and Senel, S. (2019). Exposure to and use of mobile devices in children aged 1–60 months. *Eur. J. Pediatr.* *178*, 221–227.

Klein, U., Tu, Y., Stolovitzky, G.A., Keller, J.L., Haddad, J., Miljkovic, V., Cattoretti, G., Califano, A., and Dalla-Favera, R. (2003). Transcriptional analysis of the B cell germinal center reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 2639–2644.

Knudtson, S. (1974). In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* *43*, 357–361.

Kodgire, P., Mukkavar, P., Ratnam, S., Martin, T.E., and Storb, U. (2013). Changes in RNA polymerase II progression influence somatic hypermutation of Ig-related genes by AID. *J. Exp. Med.* *210*, 1481–1492.

Köhler, G., and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* *256*, 495–497.

Kosak, S.T., Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Beau, M.M.L., Fisher, A.G., and Singh, H. (2002). Subnuclear Compartmentalization of Immunoglobulin Loci During Lymphocyte Development. *Science* *296*, 158–162.

Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* *47*, D155–D162.

Kraus, H., Kaiser, S., Aumann, K., Bönelt, P., Salzer, U., Vestweber, D., Erlacher, M., Kunze, M., Burger, M., Pieper, K., et al. (2014). A Feeder-Free Differentiation System Identifies Autonomously Proliferating B Cell Precursors in Human Bone Marrow. *J. Immunol.* *192*, 1044–1054.

Bibliographie

Kuchroo, P., Dave, V., Vijayan, A., Viswanathan, C., and Ghosh, D. (2014). Paracrine Factors Secreted by Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Angiogenesis In Vitro by a VEGF-Independent Pathway. *Stem Cells Dev.* *24*, 437–450.

Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., Kheradpour, P., Zhang, Z., Wang, J., Ziller, M.J., et al. (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* *518*, 317–329.

Kuraoka, M., McWilliams, L., and Kelsoe, G. (2011). AID expression during B-cell development: searching for answers. *Immunol. Res.* *49*, 3–13.

Kurimasa, A., Kumano, S., Boubnov, N.V., Story, M.D., Tung, C.S., Peterson, S.R., and Chen, D.J. (1999). Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3877–3884.

Laird, D.J., von Andrian, U.H., and Wagers, A.J. (2008). Stem Cell Trafficking in Tissue Development, Growth, and Disease. *Cell* *132*, 612–630.

Landree, M.A., Kale, S.B., and Roth, D.B. (2001). Functional Organization of Single and Paired V(D)J Cleavage Complexes. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 4256–4264.

Langerak, A.W., Nadel, B., Torbal, A. de, Wolvers-Tettero, I.L.M., Gastel-Mol, E.J. van, Verhaaf, B., Jäger, U., and Dongen, J.J.M. van (2004). Unraveling the Consecutive Recombination Events in the Human IGK Locus. *J. Immunol.* *173*, 3878–3888.

Lanier, L.L., Warner, N.L., Ledbetter, J.A., and Herzenberg, L.A. (1981). Expression of Lyt-1 antigen on certain murine B cell lymphomas. *J. Exp. Med.* *153*, 998–1003.

Laudisi, F., Sambucci, M., Nasta, F., Pinto, R., Lodato, R., Altavista, P., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2012). Prenatal exposure to radiofrequencies: effects of WiFi signals on thymocyte development and peripheral T cell compartment in an animal model. *Bioelectromagnetics* *33*, 652–661.

Lazorchak, A.S., Wojciechowski, J., Dai, M., and Zhuang, Y. (2006). E2A promotes the survival of precursor and mature B lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 2495–2504.

Lee-Theilen, M., and Chaudhuri, J. (2010). Walking the AID tightrope. *Nat. Immunol.* *11*, 107–109.

Lefranc, M.-P. IMGT Web resources: IMGT Education.

Lefranc, M.-P., and Lefranc, G. (2020). Immunoglobulins or Antibodies: IMGT® Bridging Genes, Structures and Functions. *Biomedicines* *8*, 319.

Leitgeb, N., and Schröttner, J. (2003). Electrosensibility and electromagnetic hypersensitivity. *Bioelectromagnetics* *24*, 387–394.

Lennette, E.H. and American Society for Microbiology (1985). Manual of clinical microbiology. (Washington, D.C.: American Society for Microbiology).

Bibliographie

Levy, M., Blacher, E., and Elinav, E. (2017). Microbiome, metabolites and host immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* *35*, 8–15.

Li, C.L., and Johnson, G.R. (1994). Stem cell factor enhances the survival but not the self-renewal of murine hematopoietic long-term repopulating cells. *Blood* *84*, 408–414.

Li, G., Alt, F.W., Cheng, H.-L., Brush, J.W., Goff, P., Murphy, M.M., Franco, S., Zhang, Y., and Zha, S. (2008). Lymphocyte-Specific Compensation For XLF/Cernunnos End-Joining Functions In V(D)J Recombination. *Mol. Cell* *31*, 631–640.

Li, H., Ghazanfari, R., Zacharaki, D., Ditzel, N., Isern, J., Ekblom, M., Méndez-Ferrer, S., Kassem, M., and Scheduling, S. (2014a). Low/Negative Expression of PDGFR- α Identifies the Candidate Primary Mesenchymal Stromal Cells in Adult Human Bone Marrow. *Stem Cell Rep.* *3*, 965–974.

Li, T., Xia, M., Gao, Y., Chen, Y., and Xu, Y. (2015). Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* *15*, 1293–1306.

Li, X., Bai, J., Ji, X., Li, R., Xuan, Y., and Wang, Y. (2014b). Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int. J. Mol. Med.* *34*, 695–704.

Li, Y.S., Hayakawa, K., and Hardy, R.R. (1993). The regulated expression of B lineage associated genes during B cell differentiation in bone marrow and fetal liver. *J. Exp. Med.* *178*, 951–960.

Li, Z., Woo, C.J., Iglesias-Ussel, M.D., Ronai, D., and Scharff, M.D. (2004). The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination. *Genes Dev.* *18*, 1–11.

Lin, H., and Grosschedl, R. (1995). Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF. *Nature* *376*, 263–267.

Ling, Z., Li, Z., Liu, X., Cheng, Y., Luo, Y., Tong, X., Yuan, L., Wang, Y., Sun, J., Li, L., et al. (2014). Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 2546–2554.

Little, A.J., Matthews, A., Oettinger, M., Roth, D.B., and Schatz, D.G. (2015). Chapter 2 - The Mechanism of V(D)J Recombination. In *Molecular Biology of B Cells (Second Edition)*, F.W. Alt, T. Honjo, A. Radbruch, and M. Reth, eds. (London: Academic Press), pp. 13–34.

Liu, H., Chen, X., Focia, P.J., and He, X. (2007). Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* *26*, 891–901.

Liu, Z., Widlak, P., Zou, Y., Xiao, F., Oh, M., Li, S., Chang, M.Y., Shay, J.W., and Garrard, W.T. (2006). A Recombination Silencer that Specifies Heterochromatin Positioning and Ikaros Association in the Immunoglobulin κ Locus. *Immunity* *24*, 405–415.

Longo, N.S., Rogosch, T., Zemlin, M., Zouali, M., and Lipsky, P.E. (2017). Mechanisms That Shape Human Antibody Repertoire Development in Mice Transgenic for Human Ig H and L Chain Loci. *J. Immunol.* *198*, 3963–3977.

Bibliographie

Lutz, J., Müller, W., and Jäck, H.-M. (2006). VH Replacement Rescues Progenitor B Cells with Two Nonproductive VDJ Alleles. *J. Immunol.* *177*, 7007–7014.

Lymperi, S., Horwood, N., Marley, S., Gordon, M.Y., Cope, A.P., and Dazzi, F. (2008). Strontium can increase some osteoblasts without increasing hematopoietic stem cells. *Blood* *111*, 1173–1181.

Ma, S., Pathak, S., Trinh, L., and Lu, R. (2008). Interferon regulatory factors 4 and 8 induce the expression of Ikaros and Aiolos to down-regulate pre-B-cell receptor and promote cell-cycle withdrawal in pre-B-cell development. *Blood* *111*, 1396–1403.

Ma, S., Pathak, S., Mandal, M., Trinh, L., Clark, M.R., and Lu, R. (2010). Ikaros and Aiolos inhibit pre-B-cell proliferation by directly suppressing c-Myc expression. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 4149–4158.

Majeti, R., Park, C.Y., and Weissman, I.L. (2007). Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. *Cell Stem Cell* *1*, 635–645.

Malin, S., McManus, S., Cobaleda, C., Novatchkova, M., Delogu, A., Bouillet, P., Strasser, A., and Busslinger, M. (2010). Role of STAT5 in controlling cell survival and immunoglobulin gene recombination during pro-B cell development. *Nat. Immunol.* *11*, 171–179.

Mandal, M., Powers, S.E., Ochiari, K., Georgopoulos, K., Kee, B.L., Singh, H., and Clark, M.R. (2009). Ras orchestrates exit from the cell cycle and light-chain recombination during early B cell development. *Nat. Immunol.* *10*, 1110–1117.

Mandal, M., Powers, S.E., Maienschein-Cline, M., Bartom, E.T., Hamel, K.M., Kee, B.L., Dinner, A.R., and Clark, M.R. (2011). Epigenetic repression of the Igk locus by STAT5-mediated recruitment of the histone methyltransferase Ezh2. *Nat. Immunol.* *12*, 1212–1220.

Mandal, M., Hamel, K.M., Maienschein-Cline, M., Tanaka, A., Teng, G., Tuteja, J.H., Bunker, J.J., Bahroos, N., Eppig, J.J., Schatz, D.G., et al. (2015). Histone reader BRWD1 targets and restricts recombination to the Igk locus. *Nat. Immunol.* *16*, 1094–1103.

Mansson, R., Zandi, S., Anderson, K., Martensson, I.-L., Jacobsen, S.E.W., Bryder, D., and Sigvardsson, M. (2008). B-lineage commitment prior to surface expression of B220 and CD19 on hematopoietic progenitor cells. *Blood* *112*, 1048–1055.

Martin, C.H., Aifantis, I., Scimone, M.L., von Andrian, U.H., Reizis, B., von Boehmer, H., and Gounari, F. (2003). Efficient thymic immigration of B220 + lymphoid-restricted bone marrow cells with T precursor potential. *Nat. Immunol.* *4*, 866–873.

Martin-Subero, J.I., and Oakes, C.C. (2018). Charting the dynamic epigenome during B-cell development. *Semin. Cancer Biol.* *51*, 139–148.

Masuda, K., Ouchida, R., Li, Y., Gao, X., Mori, H., and Wang, J.-Y. (2009). A Critical Role for REV1 in Regulating the Induction of C:G Transitions and A:T Mutations during Ig Gene Hypermutation. *J. Immunol.* *183*, 1846–1850.

Matesanz-Isabel, J., Sintes, J., Llinàs, L., de Salort, J., Lázaro, A., and Engel, P. (2011). New B-cell CD molecules. *Immunol. Lett.* *134*, 104–112.

Bibliographie

McBlane, J.F., van Gent, D.C., Ramsden, D.A., Romeo, C., Cuomo, C.A., Gellert, M., and Oettinger, M.A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell* 83, 387–395.

McBride, K.M., Gazumyan, A., Woo, E.M., Schwickert, T.A., Chait, B.T., and Nussenzweig, M.C. (2008). Regulation of class switch recombination and somatic mutation by AID phosphorylation. *J. Exp. Med.* 205, 2585–2594.

McKeller, M.R., and Martinez-Valdez, H. (2006). The kappa-like pre-B receptor: surplus biology or a missing link? *Semin. Immunol.* 18, 40–43.

McMurry, M.T., Hernandez-Munain, C., Lauzurica, P., and Krangel, M.S. (1997). Enhancer control of local accessibility to V(D)J recombinase. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4553–4561.

Me, B., and A, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 496–506.

Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., MacArthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829–834.

Mercantepe, T., Tümkaya, L., Gökçe, M.F., Topal, Z.S., and Esmer, E. (2018). Effect of 900-MHz Electromagnetic Field on the Cerebellum: A Histopathological Investigation. *Sisli Etfal Hastan. Tip Bul.* 52, 129–134.

Mikkola, H.K.A., and Orkin, S.H. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* 133, 3733–3744.

Milne, C.D., and Paige, C.J. (2006). IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin. Immunol.* 18, 20–30.

Min, H., Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2006). Effects of Aging on the Common Lymphoid Progenitor to Pro-B Cell Transition. *J. Immunol.* 176, 1007–1012.

Minc, E., Allory, Y., Worman, H.J., Courvalin, J.-C., and Buendia, B. (1999). Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* 108, 220–234.

Mitchell, G.F., and Miller, J.F. (1968). Immunological activity of thymus and thoracic-duct lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 59, 296–303.

Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869–877.

Momoli, F., Siemiatycki, J., McBride, M.L., Parent, M.-É., Richardson, L., Bedard, D., Platt, R., Vrijheid, M., Cardis, E., and Krewski, D. (2017). Probabilistic Multiple-Bias Modeling Applied to the Canadian Data From the Interphone Study of Mobile Phone Use and Risk of Glioma, Meningioma, Acoustic Neuroma, and Parotid Gland Tumors. *Am. J. Epidemiol.* 186, 885–893.

Monroe, J.G. (2006). ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 283–294.

Bibliographie

Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2012). B-1 B Cell Development in the Fetus and Adult. *Immunity* 36, 13–21.

Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., and Dorshkind, K. (2006). Identification of a B-1 B cell–specified progenitor. *Nat. Immunol.* 7, 293–301.

Moon, H., Lee, J.-G., Shin, S.H., and Kim, T.J. (2012). LPS-Induced Migration of Peritoneal B-1 Cells is Associated with Upregulation of CXCR4 and Increased Migratory Sensitivity to CXCL12. *J. Korean Med. Sci.* 27, 27–35.

Moradi, M., Naghdi, N., Hemmati, H., Asadi-Samani, M., and Bahmani, M. (2016). Effect of Ultra High Frequency Mobile Phone Radiation on Human Health. *Electron. Physician* 8, 2452–2457.

Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327–334.

Moshous, D., Callebaut, I., Chasseval, R. de, Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Deist, F.L., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N., et al. (2001). Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency. *Cell* 105, 177–186.

Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., and Honjo, T. (1999). Specific Expression of Activation-induced Cytidine Deaminase (AID), a Novel Member of the RNA-editing Deaminase Family in Germinal Center B Cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476.

Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honjo, T. (2000). Class Switch Recombination and Hypermutation Require Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID), a Potential RNA Editing Enzyme. *Cell* 102, 553–563.

Nadel, B., Tang, A., Escuro, G., Lugo, G., and Feeney, A.J. (1998). Sequence of the Spacer in the Recombination Signal Sequence Affects V(D)J Rearrangement Frequency and Correlates with Nonrandom V κ Usage In Vivo. *J. Exp. Med.* 187, 1495–1503.

Nagano, Y., Itoh, K., and Honda, K. (2012). The induction of Treg cells by gut-indigenous Clostridium. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 392–397.

Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 107–116.

Nagasawa, T., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2305–2309.

Nagasawa, T., Nakajima, T., Tachibana, K., Iizasa, H., Bleul, C.C., Yoshie, O., Matsushima, K., Yoshida, N., Springer, T.A., and Kishimoto, T. (1996). Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14726–14729.

Nakano, T., Kodama, H., and Honjo, T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265, 1098–1101.

Bibliographie

Nasta, F., Prisco, M.G., Pinto, R., Lovisolo, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2006). Effects of GSM-modulated radiofrequency electromagnetic fields on B-cell peripheral differentiation and antibody production. *Radiat. Res.* *165*, 664–670.

Nicolas, L., Cols, M., Choi, J.E., Chaudhuri, J., and Vuong, B. (2018). Generating and repairing genetically programmed DNA breaks during immunoglobulin class switch recombination. *F1000Research* *7*, 458.

Nishihara, M., Wada, Y., Ogami, K., Ebihara, Y., Ishii, T., Tsuji, K., Ueno, H., Asano, S., Nakahata, T., and Maekawa, T. (1998). A combination of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances the growth of human progenitor B cells supported by murine stromal cell line MS-5. *Eur. J. Immunol.* *28*, 855–864.

Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K.J., Harley, B., Mahoney, J.E., Park, S.-Y., Lu, J., Protopopov, A., and Silberstein, L.E. (2013). Quantitative Imaging of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell localization and hypoxic status in the Bone Marrow microenvironment. *Nat. Cell Biol.* *15*, 533–543.

Nossal, G.J.V., and Lederberg, J. (2009). Pillars Article: Antibody Production by Single Cells. 1958. *Nature* *181*: 1419–1420. *J. Immunol.* *182*, 1231–1232.

Novelli, E.M., Ramirez, M., and Civin, C.I. (1998). Biology of CD34+CD38- Cells in Lymphohematopoiesis. *Leuk. Lymphoma* *31*, 285–293.

Nutt, S.L., and Kee, B.L. (2007). The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment. *Immunity* *26*, 715–725.

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

Ochiai, K., Maienschein-Cline, M., Mandal, M., Triggs, J.R., Bertolino, E., Sciammas, R., Dinner, A.R., Clark, M.R., and Singh, H. (2012). A self-reinforcing regulatory network triggered by limiting IL-7 activates pre-BCR signaling and differentiation. *Nat. Immunol.* *13*, 300–307.

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

Ohtani, S., Ushiyama, A., Maeda, M., Ogasawara, Y., Wang, J., Kunugita, N., and Ishii, K. (2015). The effects of radio-frequency electromagnetic fields on T cell function during development. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *56*, 467–474.

Okatan, D.Ö., Kaya, H., Aliyazıcıoğlu, Y., Demir, S., Çolakoğlu, S., and Odacı, E. (2018). Continuous 900-megahertz electromagnetic field applied in middle and late-adolescence causes qualitative and quantitative changes in the ovarian morphology, tissue and blood biochemistry of the rat. *Int. J. Radiat. Biol.* *94*, 186–198.

Ong, C.-T., and Corces, V.G. (2014). CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 234–246.

Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* *132*, 631–644.

Bibliographie

O'Shea, J.J., and Plenge, R. (2012). JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity* 36, 542–550.

Ouled-Hadou, H., Ghamlouch, H., Regnier, A., Bissac, E., Dubot, P., Lefranc, M.-P., Marolleau, J.-P., and Gubler, B. (2014). De Novo Vk- Jk and Vk-Vk induction in human EkI-Ek3' deleted B cells is dependant of a new Kappa regulatory region (EVk). Unpubl. Data.

Özata, D.M., Li, X., Lee, L., Liu, J., Warsito, D., Hajeri, P., Hultman, I., Fotouhi, O., Marklund, S., Åhrlund-Richter, L., et al. (2017). Loss of miR-514a-3p regulation of PEG3 activates the NF-kappa B pathway in human testicular germ cell tumors. *Cell Death Dis.* 8, e2759.

Palis, J. (2014). Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front. Physiol.* 5.

Park, C.W., Kim, K.-S., Bae, S., Son, H.K., Myung, P.-K., Hong, H.J., and Kim, H. (2009). Cytokine Secretion Profiling of Human Mesenchymal Stem Cells by Antibody Array. *Int. J. Stem Cells* 2, 59–68.

Pelletier, A., Delanaud, S., Décima, P., Thuroczy, G., de Seze, R., Cerri, M., Bach, V., Libert, J.-P., and Loos, N. (2013). Effects of chronic exposure to radiofrequency electromagnetic fields on energy balance in developing rats. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2735–2746.

Pelletier, A., Delanaud, S., Seze, R. de, Bach, V., Libert, J.-P., and Loos, N. (2014). Does Exposure to a Radiofrequency Electromagnetic Field Modify Thermal Preference in Juvenile Rats? *PLOS ONE* 9, e99007.

Perez-Andres, M., Grosserichter-Wagener, C., Teodosio, C., van Dongen, J.J.M., Orfao, A., and van Zelm, M.C. (2011). The nature of circulating CD27+CD43+ B cells. *J. Exp. Med.* 208, 2565–2566.

Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., et al. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* 180, 1955–1960.

Petitdant, N., Lecomte, A., Robidel, F., Gamez, C., Blazy, K., and Villégier, A.-S. (2018). Alteration of adaptive behaviors of progeny after maternal mobile phone exposure. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 10894–10903.

Pichugin, A., Iarovaia, O.V., Gavrilov, A., Sklyar, I., Barinova, N., Barinov, A., Ivashkin, E., Caron, G., Aoufouchi, S., Razin, S.V., et al. (2017). The IGH locus relocates to a “recombination compartment” in the perinucleolar region of differentiating B-lymphocytes. *Oncotarget* 8, 40079–40089.

Pinho, S., Lacombe, J., Hanoun, M., Mizoguchi, T., Bruns, I., Kunisaki, Y., and Frenette, P.S. (2013). PDGFR α and CD51 mark human nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J. Exp. Med.* 210, 1351–1367.

Porter, R.R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73, 119–127.

Bibliographie

Potocnik, A.J., Kohler, H., and Eichmann, K. (1997). Hemato-lymphoid in vivo reconstitution potential of subpopulations derived from in vitro differentiated embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 10295–10300.

Pourcher, G., Mazurier, C., King, Y.Y., Giarratana, M.-C., Kobari, L., Boehm, D., Douay, L., and Lapillonne, H. (2011). Human Fetal Liver: An In Vitro Model of Erythropoiesis (Hindawi).

Prieto, J.M.B., and Felipe, M.J.B. (2017). Development, phenotype, and function of non-conventional B cells. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* *54*, 38–44.

Prisco, M.G., Nasta, F., Rosado, M.M., Lovisolò, G.A., Marino, C., and Pioli, C. (2008). Effects of GSM-Modulated Radiofrequency Electromagnetic Fields on Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat. Res.* *170*, 803–810.

Raaijmakers, M.H.G.P., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J.A., Ebert, B.L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R.P., Scadden, E.O., et al. (2010). Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* *464*, 852–857.

Rada, C., and Milstein, C. (2001). The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *EMBO J.* *20*, 4570–4576.

Rafii, S., Shapiro, F., Pettengell, R., Ferris, B., Nachman, R.L., Moore, M.A., and Asch, A.S. (1995). Human bone marrow microvascular endothelial cells support long-term proliferation and differentiation of myeloid and megakaryocytic progenitors. *Blood* *86*, 3353–3363.

Rahman, N.S., Godderz, L.J., Stray, S.J., Capra, J.D., and Rodgers, K.K. (2006). DNA Cleavage of a Cryptic Recombination Signal Sequence by RAG1 and RAG2 IMPLICATIONS FOR PARTIAL VH GENE REPLACEMENT. *J. Biol. Chem.* *281*, 12370–12380.

Ramírez, J., Lukin, K., and Hagman, J. (2010). From hematopoietic progenitors to B cells: mechanisms of lineage restriction and commitment. *Curr. Opin. Immunol.* *22*, 177–184.

Ramirez-Vazquez, R., Gonzalez-Rubio, J., Arribas, E., and Najera, A. (2019). Personal RF-EMF exposure from mobile phone base stations during temporary events. *Environ. Res.* *175*, 266–273.

Ramsden, D.A., Baetz, K., and Wu, G.E. (1994). Conservation of sequence in recombination signal sequence spacers. *Nucleic Acids Res.* *22*, 1785–1796.

Reece, J., Minorsky, P., Urry, L., Wasserman, S., and Lichaël Cain (2012). *Campbell Biologie* (Canada: Pearson).

Reth, M., Gehrmann, P., Petrac, E., and Wiese, P. (1986). A novel VH to VHDJH joining mechanism in heavy-chain-negative (null) pre-B cells results in heavy-chain production. *Nature* *322*, 840–842.

Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Lagelouse, R., Gennery, A., et al. (2000). Activation-Induced Cytidine

Bibliographie

Deaminase (AID) Deficiency Causes the Autosomal Recessive Form of the Hyper-IgM Syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565–575.

Reygnier, J., Lichtenberger, L., Elmhiri, G., Dou, S., Bahi-Jaber, N., Rhazi, L., Depeint, F., Bach, V., Khorsi-Cauet, H., and Abdennebi-Najar, L. (2016). Inulin Supplementation Lowered the Metabolic Defects of Prolonged Exposure to Chlorpyrifos from Gestation to Young Adult Stage in Offspring Rats. *PloS One* 11, e0164614.

Reynaud, D., Demarco, I.A., Reddy, K.L., Schjerven, H., Bertolino, E., Chen, Z., Smale, S.T., Winandy, S., and Singh, H. (2008). Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros. *Nat. Immunol.* 9, 927–936.

Ribatti, D., Crivellato, E., and Vacca, A. (2006). The contribution of Bruce Glick to the definition of the role played by the bursa of Fabricius in the development of the B cell lineage. *Clin. Exp. Immunol.* 145, 1–4.

Rice, D., and Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 108 Suppl 3, 511–533.

Robbiani, D.F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., Deroubaix, S., McBride, K.M., Klein, I.A., Stone, G., Eisenreich, T.R., et al. (2009). AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Mol. Cell* 36, 631–641.

Rodriguez-Zhurbenko, N., Quach, T.D., Hopkins, T.J., Rothstein, T.L., and Hernandez, A.M. (2019). Human B-1 Cells and B-1 Cell Antibodies Change With Advancing Age. *Front. Immunol.* 10.

Roessler, S., Györy, I., Imhof, S., Spivakov, M., Williams, R.R., Busslinger, M., Fisher, A.G., and Grosschedl, R. (2007). Distinct promoters mediate the regulation of Ebf1 gene expression by interleukin-7 and Pax5. *Mol. Cell. Biol.* 27, 579–594.

Roitt, I.M., Greaves, M.F., Torrigiani, G., Brostoff, J., and Playfair, J.H. (1969). The cellular basis of immunological responses. A synthesis of some current views. *Lancet Lond. Engl.* 2, 367–371.

Roldán, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M., and Skok, J.A. (2005). Locus “decontraction” and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat. Immunol.* 6, 31–41.

Rolink, A., ten Boekel, E., Melchers, F., Fearon, D.T., Krop, I., and Andersson, J. (1996). A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J. Exp. Med.* 183, 187–194.

Rossi, M.I.D., Yokota, T., Medina, K.L., Garrett, K.P., Comp, P.C., Schipul, A.H., Jr, and Kincade, P.W. (2003). B lymphopoiesis is active throughout human life, but there are developmental age-related changes. *Blood* 101, 576–584.

Rother, M.B., Jensen, K., van der Burg, M., van de Bovenkamp, F.S., Kroek, R., van IJcken, W.F.J., van der Velden, V.H.J., Cupedo, T., Olstad, O.K., van Dongen, J.J.M., et al. (2016).

Bibliographie

Decreased IL7R α and TdT expression underlie the skewed immunoglobulin repertoire of human B-cell precursors from fetal origin. *Sci. Rep.* *6*, 33924.

S, G., L, M., G, de S.B., F, L.D., C, R.-P., C, F., E, M., S, D., R, E., A, K., et al. (2005). Interleukin-7 receptor alpha (IL-7R α) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients. *Immunol. Rev.* *203*, 110–126.

Saada, R., Weinberger, M., Shahaf, G., and Mehr, R. (2007). Models for antigen receptor gene rearrangement: CDR3 length. *Immunol. Cell Biol.* *85*, 323–332.

Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Cesare, S.D., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., et al. (2007). Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell* *131*, 324–336.

Sanz, E., Muñoz-A, N., Monserrat, J., Van-Den-Rym, A., Escoll, P., Ranz, I., Alvarez-Mon, M., and de-la-Hera, A. (2010). Ordering human CD34+CD10-CD19+ pre/pro-B-cell and CD19- common lymphoid progenitor stages in two pro-B-cell development pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 5925–5930.

Sawchuk, D.J., Weis-Garcia, F., Malik, S., Besmer, E., Bustin, M., Nussenzweig, M.C., and Cortes, P. (1997). V(D)J Recombination: Modulation of RAG1 and RAG2 Cleavage Activity on 12/23 Substrates by Whole Cell Extract and DNA-bending Proteins. *J. Exp. Med.* *185*, 2025–2032.

Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1412–1417.

Scheeren, F.A., van Lent, A.U., Nagasawa, M., Weijer, K., Spits, H., Legrand, N., and Blom, B. (2010). Thymic stromal lymphopoietin induces early human B-cell proliferation and differentiation. *Eur. J. Immunol.* *40*, 955–965.

Schroeder, H.W. (2006). Similarity and divergence in the development and expression of the mouse and human antibody repertoires. *Dev. Comp. Immunol.* *30*, 119–135.

Schuetz, C., Neven, B., Dvorak, C.C., Leroy, S., Ege, M.J., Pannicke, U., Schwarz, K., Schulz, A.S., Hoenig, M., Sparber-Sauer, M., et al. (2014). SCID patients with ARTEMIS vs RAG deficiencies following HCT: increased risk of late toxicity in ARTEMIS-deficient SCID. *Blood* *123*, 281–289.

Seitz, H., Stinner, D., Eikmann, T., Herr, C., and Rösli, M. (2005). Electromagnetic hypersensitivity (EHS) and subjective health complaints associated with electromagnetic fields of mobile phone communication--a literature review published between 2000 and 2004. *Sci. Total Environ.* *349*, 45–55.

Shen, C., Lie, P., Miao, T., Yu, M., Lu, Q., Feng, T., Li, J., Zu, T., Liu, X., and Li, H. (2015). Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Mol. Med. Rep.* *12*, 20–30.

Bibliographie

Sherwani, M.A., Tufail, S., Muzaffar, A.F., and Yusuf, N. (2018). The skin microbiome and immune system: Potential target for chemoprevention? *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* *34*, 25–34.

Shih, H.-Y., and Krangel, M.S. (2013). Chromatin Architecture, CCCTC-Binding Factor, and V(D)J Recombination: Managing Long-Distance Relationships at Antigen Receptor Loci. *J. Immunol.* *190*, 4915–4921.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* *68*, 855–867.

Shinoda, K., Maman, Y., Canela, A., Schatz, D.G., Livak, F., and Nussenzweig, A. (2019). Intra-V κ Cluster Recombination Shapes the Ig Kappa Locus Repertoire. *Cell Rep.* *29*, 4471-4481.e6.

Siminovitch, K.A., Bakhshi, A., Goldman, P., and Korsmeyer, S.J. (1985). A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. *Nature* *316*, 260–262.

Skok, J.A., Brown, K.E., Azuara, V., Caparros, M.-L., Baxter, J., Takacs, K., Dillon, N., Gray, D., Perry, R.P., Merckenschlager, M., et al. (2001). Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat. Immunol.* *2*, 848–854.

Smith, E.M.K., Gisler, R., and Sigvardsson, M. (2002). Cloning and characterization of a promoter flanking the early B cell factor (EBF) gene indicates roles for E-proteins and autoregulation in the control of EBF expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 261–270.

Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2006). Mismatch repair converts AID-instigated nicks to double-strand breaks for antibody class-switch recombination. *Trends Genet. TIG* *22*, 23–28.

Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* *25*, 977–988.

Sugiyama, T., Omatsu, Y., and Nagasawa, T. (2019). Niches for hematopoietic stem cells and immune cell progenitors. *Int. Immunol.* *31*, 5–11.

Swanson, P.C. (2004). The bounty of RAGs: recombination signal complexes and reaction outcomes. *Immunol. Rev.* *200*, 90–114.

Szymański, Ł., Sobiczewska, E., Cios, A., Szymanski, P., Ciepielak, M., and Stankiewicz, W. (2020). Immunotropic effects in cultured human blood mononuclear cells exposed to a 900 MHz pulse-modulated microwave field. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *61*, 27–33.

Till, J.E., and McCulloch, E.A. (2011). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells1. *Radiat. Res.* *175*, 145–149.

Troilo, A., Wehr, C., Janowska, I., Venhoff, N., Thiel, J., Rawluk, J., Frede, N., Staniek, J., Lorenzetti, R., Schleyer, M.-T., et al. (2020). Nonpermissive bone marrow environment impairs early B-cell development in common variable immunodeficiency. *Blood* *135*, 1452–1457.

Bibliographie

Tze, L.E., Schram, B.R., Lam, K.-P., Hogquist, K.A., Hippen, K.L., Liu, J., Shinton, S.A., Otipoby, K.L., Rodine, P.R., Vegoe, A.L., et al. (2005). Basal Immunoglobulin Signaling Actively Maintains Developmental Stage in Immature B Cells. *PLoS Biol.* 3.

Vale, A.M., Kearney, J.F., Nobrega, A., and Schroeder, H.W. (2015). Chapter 7 - Development and Function of B Cell Subsets. In *Molecular Biology of B Cells* (Second Edition), F.W. Alt, T. Honjo, A. Radbruch, and M. Reth, eds. (London: Academic Press), pp. 99–119.

Vieira, P., and Cumano, A. (2004). Differentiation of B lymphocytes from hematopoietic stem cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 271, 67–76.

Waddington, C.H. (1942). The epigenotype. 1942. *Int. J. Epidemiol.* 41, 10–13.

Waldmann-Selsam, C., Balmori-de la Puente, A., Breunig, H., and Balmori, A. (2016). Radiofrequency radiation injures trees around mobile phone base stations. *Sci. Total Environ.* 572, 554–569.

Wall, S., Wang, Z.-M., Kendig, T., Dobraca, D., and Lipsett, M. (2019). Real-world cell phone radiofrequency electromagnetic field exposures. *Environ. Res.* 171, 581–592.

Wang, C.Y., Good, R.A., Ammirati, P., Dymbort, G., and Evans, R.L. (1980). Identification of a p69,71 complex expressed on human T cells sharing determinants with B-type chronic lymphatic leukemic cells. *J. Exp. Med.* 151, 1539–1544.

Ward, P.S., and Thompson, C.B. (2012). Signaling in Control of Cell Growth and Metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a006783.

Warner, N., Szenberg, A., and Burnet, F. (1962). The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 40, 373–388.

Welinder, E., Åhsberg, J., and Sigvardsson, M. (2011). B-lymphocyte commitment: Identifying the point of no return. *Semin. Immunol.* 23, 335–340.

Wentink, M.W.J., Kalina, T., Perez-Andres, M., del Pino Molina, L., IJspeert, H., Kavelaars, F.G., Lankester, A.C., Lecrevisse, Q., van Dongen, J.J.M., Orfao, A., et al. (2019). Delineating Human B Cell Precursor Development With Genetically Identified PID Cases as a Model. *Front. Immunol.* 10.

Weterings, E., Verkaik, N.S., Keijzers, G., Florea, B.I., Wang, S.-Y., Ortega, L.G., Uematsu, N., Chen, D.J., and van Gent, D.C. (2009). The Ku80 Carboxy Terminus Stimulates Joining and Artemis-Mediated Processing of DNA Ends. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1134–1142.

Wiart, J., Hadjem, A., Varsier, N., and Conil, E. (2011). Numerical dosimetry dedicated to children RF exposure. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 107, 421–427.

Will, B., and Steidl, U. (2010). Multi-parameter fluorescence-activated cell sorting and analysis of stem and progenitor cells in myeloid malignancies. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 23, 391–401.

Bibliographie

Wilson, E.H., Katz, E., Goodridge, H.S., Harnett, M.M., and Harnett, W. (2003). In vivo activation of murine peritoneal B1 cells by the filarial nematode phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. *Parasite Immunol.* *25*, 463–466.

Wu, X., and Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *18*, 517–534.

Xiang, Y., Park, S.-K., and Garrard, W.T. (2013). V κ Gene Repertoire and Locus Contraction Are Specified by Critical DNase I Hypersensitive Sites within the V κ -J κ Intervening Region. *J. Immunol.* *190*, 1819–1826.

Xu, S., Lee, K.-G., Huo, J., Kurosaki, T., and Lam, K.-P. (2006). Combined deficiencies in Bruton tyrosine kinase and phospholipase C γ 2 arrest B-cell development at a pre-BCR⁺ stage. *Blood* *109*, 3377–3384.

Xu, Z., Pone, E.J., Al-Qahtani, A., Park, S.-R., Zan, H., and Casali, P. (2007). Regulation of aicda expression and AID activity: Relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Crit. Rev. Immunol.* *27*, 367–397.

Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Suh, H., Hood, L., and Alt, F.W. (1986). Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: Evidence that B and T cells use a common recombinase. *Cell* *44*, 251–259.

Yuzawa, S., Opatowsky, Y., Zhang, Z., Mandiyan, V., Lax, I., and Schlessinger, J. (2007). Structural basis for activation of the receptor tyrosine kinase KIT by stem cell factor. *Cell* *130*, 323–334.

Zandi, S., Mansson, R., Tsapogas, P., Zetterblad, J., Bryder, D., and Sigvardsson, M. (2008). EBF1 Is Essential for B-Lineage Priming and Establishment of a Transcription Factor Network in Common Lymphoid Progenitors. *J. Immunol.* *181*, 3364–3372.

Zehentmeier, S., and Pereira, J.P. (2019). Cell circuits and niches controlling B cell development. *Immunol. Rev.* *289*, 142–157.

van Zelm, M.C., Szczepanski, T., van der Burg, M., and van Dongen, J.J.M. (2007). Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *J. Exp. Med.* *204*, 645–655.

Zhang, Z. (2007). VH replacement in mice and humans. *Trends Immunol.* *28*, 132–137.

Zhang, C.C., and Lodish, H.F. (2004). Insulin-like growth factor 2 expressed in a novel fetal liver cell population is a growth factor for hematopoietic stem cells. *Blood* *103*, 2513–2521.

Zhang, Q., Iida, R., Yokota, T., and Kincade, P.W. (2013). Early events in lymphopoiesis: an update. *Curr. Opin. Hematol.* *20*, 265–272.

Zhang, W., Stoica, G., Tasca, S.I., Kelly, K.A., and Meininger, C.J. (2000). Modulation of tumor angiogenesis by stem cell factor. *Cancer Res.* *60*, 6757–6762.

Zhang, Z., Burrows, P.D., and Cooper, M.D. (2004). The molecular basis and biological significance of VH replacement. *Immunol. Rev.* *197*, 231–242.

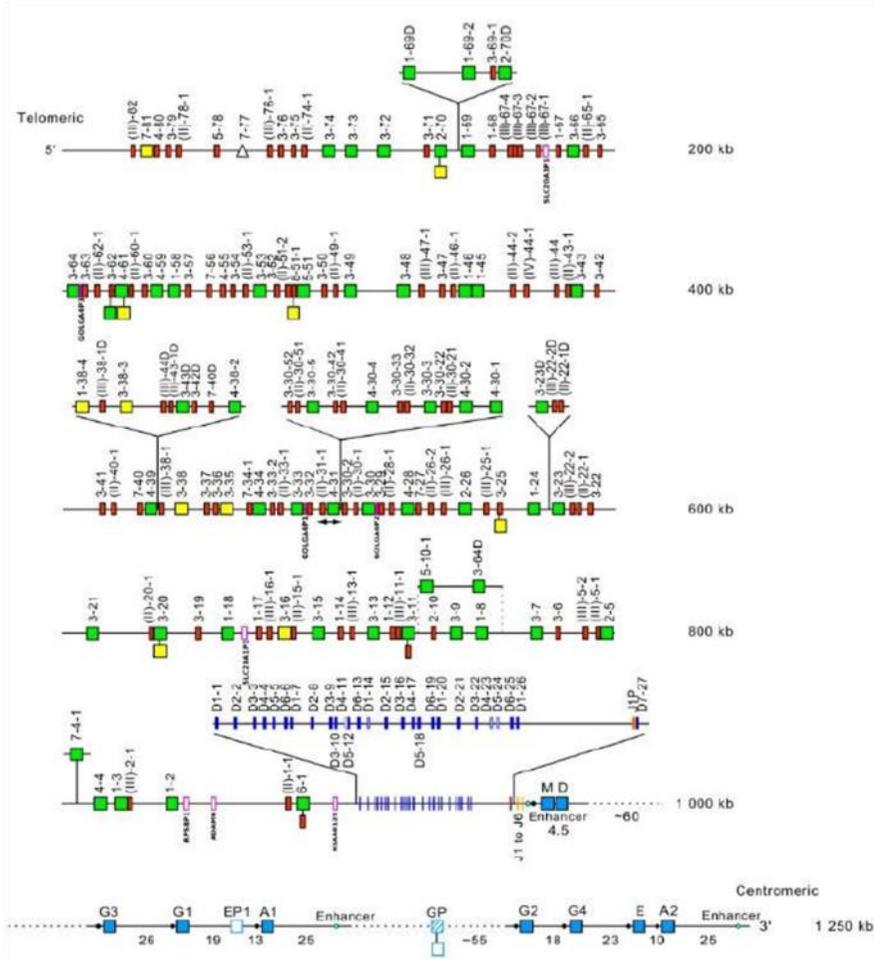
Bibliographie

Zheng, S., Papalexi, E., Butler, A., Stephenson, W., and Satija, R. (2018). Molecular transitions in early progenitors during human cord blood hematopoiesis. *Mol. Syst. Biol.* *14*, e8041.

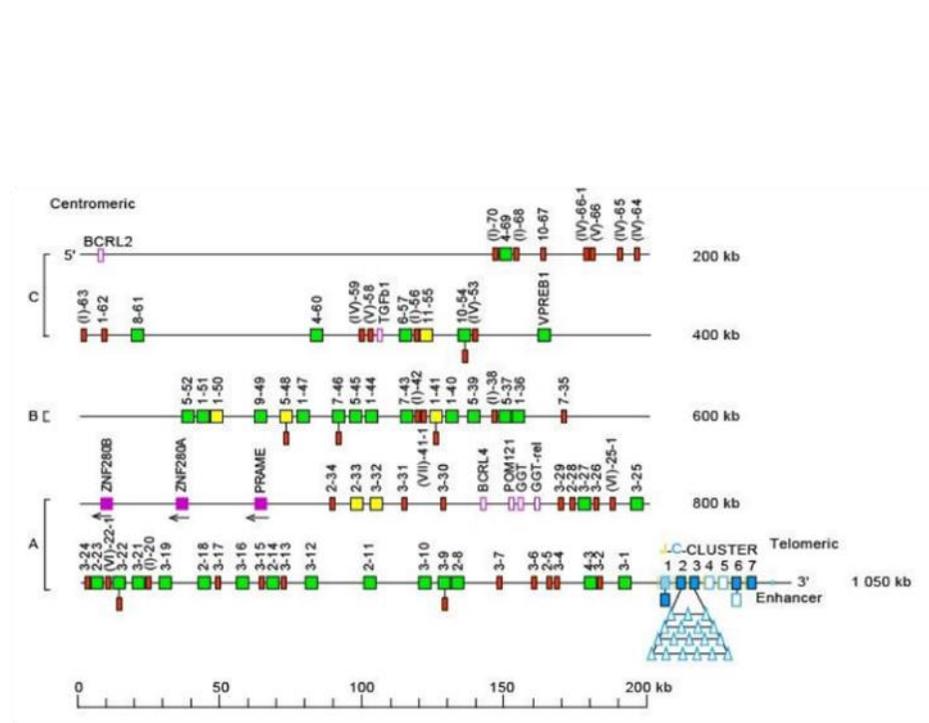
Zhou, X., Zhang, Z., Feng, J.Q., Dusevich, V.M., Sinha, K., Zhang, H., Darnay, B.G., and Crombrughe, B. de (2010). Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 12919–12924.

Annexes :

A.



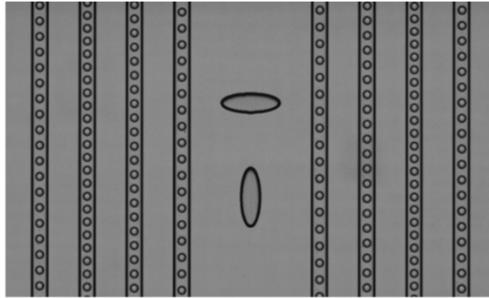
B.



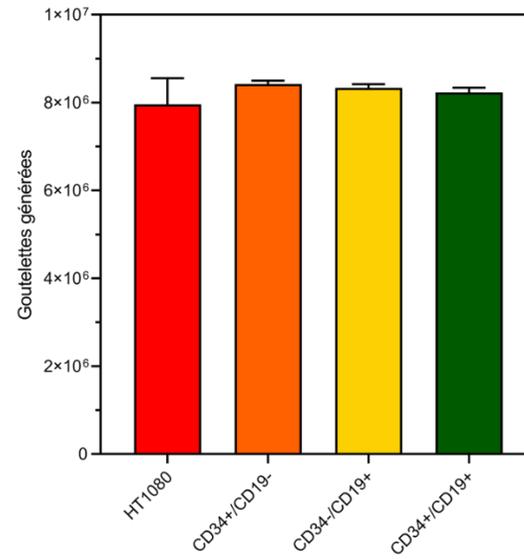
Annexe 1 : Représentation des loci IGH (A.) et IGL (B.) (Lefranc and Lefranc, 2020)

Annexes

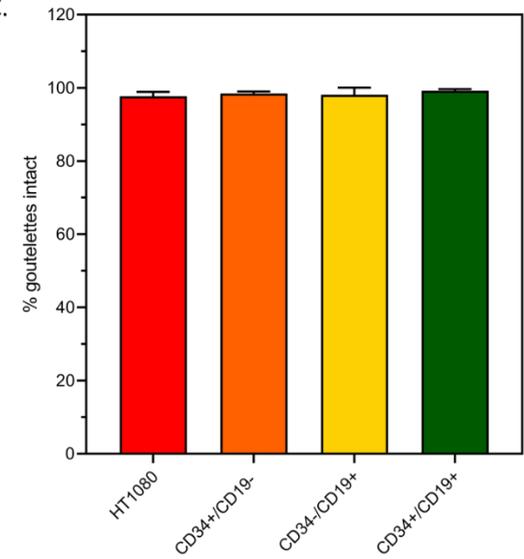
A.



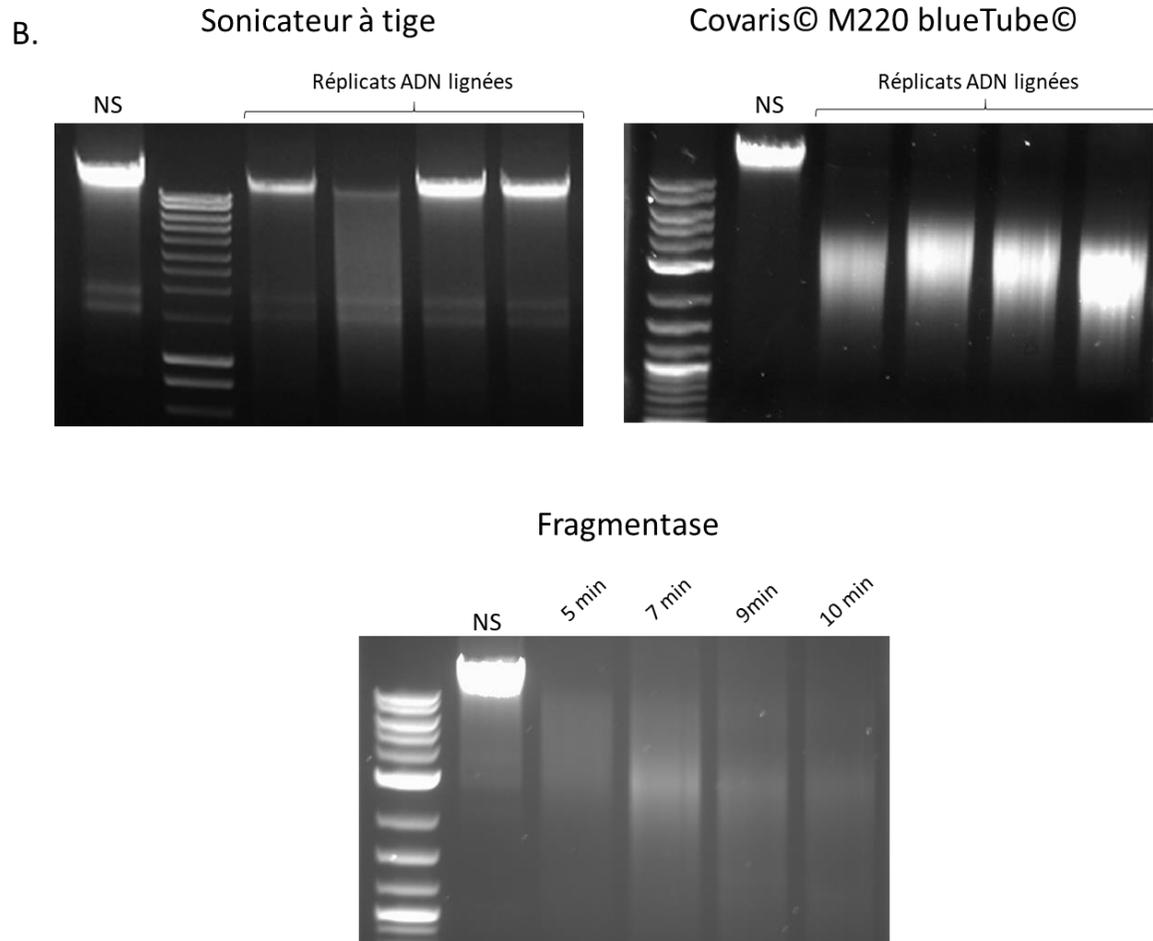
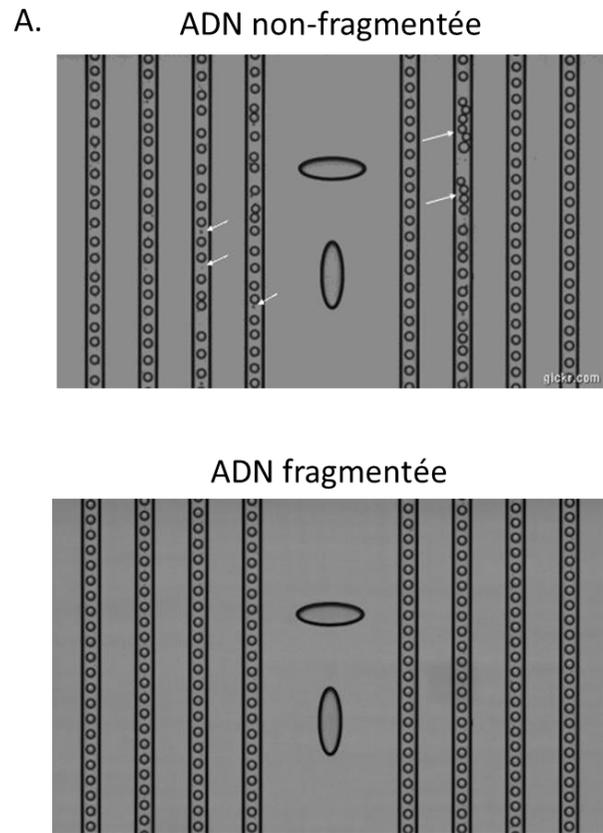
B.



C.



Annexe 2 : Contrôle qualité des expériences de dPCR comprenant la génération des gouttelettes (A.), le nombre de gouttelettes générées (B.) et le pourcentage de gouttelettes intactes lors de l'analyse (C.)



Annexe 3 : Impact de la fragmentation sur l'efficacité de l'émulsion en dPCR (A) ainsi que les différentes techniques de fragmentation de l'ADN testé (B)

Annexes

A.

Nom	Séquence	Tm	%Gc	Taille	Gène Vk
Vk2 TQ1	CAGGGACAGATTTCACACTGAAAA	57	41,67	24	Vk2.24-26-29
Vk2 TQ2	GGGTCAAGCACTGATTACACA	58,3	55	20	Vk2.30
Vk2 TQ3	GGATCAGGCACAGATTTTACA	55,1	42,9	21	Vk2.28
Vk2-1 - FAM	CCTCAGCCTCCACCCGGCTG	65,5	75	20	Vk2.26-29
Vk2-2 - FAM	TCAGCCTCCACCTGCTGATTTTCA	63,6	52	25	Vk2.30
Vk2-3 - FAM	CATCCTCAGCTTCCACCTGCTG	62,9	60,9	23	Vk2.24
Vk2-4 - FAM	CCTCAGCCTCCACTGCTGATTTTC	62,6	53,8	26	Vk2.28

B.

Etapas	PCR en émulsion	QRT-PCR	NGS
Dénaturation longue	95°C pendant 10 min	95°C pendant 10min	95°C pendant 10min
Nombre cycles	50	40	40
Dénaturation	95°C pendant 15 sec	95°C 15seconde	95°C pendant 30 sec
Hybridation	60°C pendant 60 sec	58°C pendant 1 minutes	58°C pendant 30 sec
Elongation	72°C pendant 90 sec		68°C pendant 1min/kb
Elongation finale	72°C pendant 90sec	Courbe de fusion	
Rampe température	1°C/sec	Conventionnelle	Conventionnelle

C.

Nom	Séquence	Tm	%GC	Taille	gène Vk
NGS-Vk3-A-for	CTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG	62,12	52	23	
NGS-Vk3-B-for	TGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAG	62.31	55	22	
NGS-Vk1-A-for	TCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCA	61.03	48	25	Vk1-5,6,9,12 et D12,13,16 et D16,17 et D17,27 et D27,33 et D33, 37 et D37, 39 et D39, D43
NGS-Vk1-B-for	TCTACAGGAGACAGAGTCACCATCA	61.03	48	25	Vk1-8 et 1D-8
NGS-Vk1-C-for	GACTGCATCTGTAGGAGAGAGTCAC	61.90	48	25	Vk1-22 et D22
NGS-Vk1-D-for	CCTGTCTAGGTGAGAGTCACCATCA	62.58	52	25	Vk1-32 et D32
NGS-Vk1-E-for	GCATCTGTAAGGAGACAGTGTACC	62.09	52	25	Vk1-35
NGS-Vk1-F-for	GCATCTGTAAGGAGACAGCGTCA	62.52	52	23	Vk1D-35
NGS-Vk1-G3-for	GCATCTGTAGGAGACAGAGTCAGTATCA	62.05	46	28	Vk1D42
NGS-Vk6-for	GGAGAAATCACCATCACCTGC	61.76	55	22	Vk6-21 et D21, D41
NGS-Vk2-A-rev	TCCATCTCTGCAGGTCTAGTCA	62.00	52	23	Vk2-4,10,D10,23,24,D26, 28,D28,D30,30,40,D40
NGS-Vk2-C-for	CCTCCATCTTTGCAGGTCTAGTC	61,41	54	24	Vk2-18
NGS-Vk2-D-for	ATCCTCAATTTCTGCAGGTCT	61,99	50	22	Vk2-19
NGS-Vk2-E-rev	GCCTCCATCTCTCAGGTCTAGT	62,04	54	24	Vk2D-24
NGS-Vk2-F-rev	CCATGCTCTGCAGGTCTAGTCA	61,05	55	22	Vk2-26
NGS-Vk2-G4-rev	GCCTCCATCTCTGCAAGTCTAGT	63	54	24	Vk2-29,D29
NGS-Vk2-H-for	AGCCTTTGTCTCTGCAGGTCT	61,65	57	21	Vk2-36
NGS-Vk4-for	CCACCATCAACTGCAAGTCCA	62.82	52	21	Vk4-1
NGS-Vk5B-for	CGACTCAGGAGACAAGTCAACA	63.56	50	24	Vk5-2
NGS-Vk7-for	GCCAGTGAGAGTGTGATTTCTTG	61.18	50	24	Vk7-3

Annexe 4 : Récapitulatif des amorces utilisées en PCR en émulsion (A) et en NGS (C) ainsi que les conditions d'amplifications associées (B) (séquences des amorces et sondes confidentielles)

Primer	Sens/antisens	Taille	%GC	TM	Séquence
Pax-5	Sens	20	60	59	CCG-CCA-GAG-GAT-AGT-GGA-AC
	Antisens	20	55	58,2	GAT-GGA-ACT-GAC-GCT-AGG-CA
IKZF1	Sens	20	55	58,2	ATG-GGG-AAG-AAT-GTG-CGG-AG
	Antisens	20	55	58,3	CCG-GAA-TGC-AGC-TTG-ATG-TG
IKZF3	Sens	20	55	58,9	AAG-AAG-TGC-GGA-GGC-AAG-AC
	Antisens	20	55	58,4	GCA-GTG-GTC-ACA-CCG-ATA-CA
PU-1	Sens	21	52,4	58,4	CTA-TAC-CAA-CGC-CAA-ACG-CAC
	Antisens	21	52,4	58,4	GTG-AAG-TTG-TTC-TCG-GCG-AAG
EBF-1	Sens	21	57,1	58,1	CGG-AAG-GTA-CGC-CCT-CTT-ATC
	Antisens	20	60	58,6	CGT-CGT-CCA-TCC-TTC-ACT-CG
E2A	Sens	20	55	57,4	TCT-ACT-CCC-CGG-ATC-ACT-CA
	Antisens	20	60	59,1	CGT-CGT-AGC-TGG-GCG-ATA-AG
GAPDH	Sens	20	50	57,9	AAG-GTG-AAG-GTC-GGA-GTC-AA
	Antisens	20	50	58,2	CTT-GAC-GGT-GCC-ATG-GAA-TT
CD19	Sens	20	55	58,3	AGC-CTA-GAG-CTG-AAG-GAC-GA
	Antisens	20	50	58,4	AAT-GCC-CAC-AAG-GGA-ACA-CA
IRF4	Sens	20	60	59,3	GGG-CAA-GCA-GGA-CTA-CAA-CC
	Antisens	20	55	58,8	CTC-TTG-TTC-AAA-GCG-CAC-CG
IRF8	Sens	20	55	58,6	GGA-TCC-CTT-GGA-AAC-ACG-CT
	Antisens	20	55	58,2	CAA-AGC-ACA-GCG-TAA-CCT-CG
RAG-1	Sens	20	50	58,9	GTG-AGG-GAA-ATG-AGT-CTG-GT
	Antisens	20	55	59,2	CCT-AAT-GGG-TCC-CCT-AAG-CT
RAG-2	Sens	19	52,6	57,3	GCC-ATG-ATC-TAC-TGC-TCT-C
	Antisens	19	52,6	58,9	CTT-TGG-GGA-GTG-TGT-AGA-G
TdT	Sens				
	Antisens				
AID	Sens	23	47,8	58,6	CAC-TGG-ACT-TTG-GTT-ATC-TTC-GC
	Antisens	21	47,6	58,4	CGT-AAG-TCAA-CCT-CAT-ACA-GG

Annexe 5 : Récapitulatif des amorces utilisées en QRT-PCR

Autres collaborations :

Loriguet et al. *BMC Cancer* (2018) 18:964
<https://doi.org/10.1186/s12885-018-4873-9>

BMC Cancer

CASE REPORT

Open Access



Combining genomic analyses with tumour-derived slice cultures for the characterization of an *EGFR*-activating kinase mutation in a case of glioblastoma

Lea Loriguet^{1,3}, Mory Chenda Morisse^{1,3}, Julie Dremaux^{1,2}, Louison Collet¹, Christophe Attencourt⁴, Alexandre Coutte⁵, Mathieu Boone³, Henri Sevestre⁴, Antoine Galmiche^{1,6}, Brigitte Gubler^{1,2}, Bruno Chauffert^{1,3} and Stephanie Trudel^{1,2*}

Abstract

Background: Epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene alterations and amplification are frequently reported in cases of glioblastoma (GBM). However, *EGFR*-activating mutations that confer proven sensitivity to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in lung cancer have not yet been reported in GBM.

Case presentation: Using next-generation sequencing, array comparative genomic hybridization and droplet digital PCR, we identified the p.L861Q *EGFR* mutation in a case of GBM for the first time. The mutation was associated with gene amplification. L861Q may be a clinically valuable mutation because it is known to sensitize non-small-cell lung cancers to treatment with the second-generation *EGFR* TKI afatinib in particular. Furthermore, we used slice culture of the patient's GBM explant to evaluate the tumour's sensitivity to various *EGFR*-targeting drugs. Our results suggested that the tumour was not intrinsically sensitive to these drugs.

Conclusions: Our results highlight (i) the value of comprehensive genomic analyses for identifying patient-specific, targetable alterations, and (ii) the need to combine genomic analyses with functional assays, such as tumour-derived slice cultures.

Keywords: Glioblastoma, *EGFR*, Activating kinase mutation, Tyrosine kinase inhibitors, Afatinib, Next-generation sequencing, Tumour-derived slice cultures

Background

Glioblastoma (GBM) is the most common malignant, primary brain tumour. This type of tumour is extremely invasive and difficult to treat, and is characterized by intense and aberrant vascularization and high resistance to radiotherapy and chemotherapy. Standard treatment of GBM includes surgery and concomitant radiotherapy and temozolomide (TMZ), followed by systemic treatment with TMZ in an adjuvant setting [1]. At present, there are few treatment options in the event of relapse,

and the clinical effectiveness is low [2]. The median survival time is still no longer than 15 months, with a 5-year survival rate of 4 to 5% [3].

The molecular identification and characterization of the alterations that drive oncogenesis and the progression of GBM are important factors in the development of effective therapies. Glioblastoma was the first type of cancer to be studied by the Cancer Genome Atlas Research Network [4]. Thus, complex genetic alterations and genomic profiles (which usually involve multiple signalling pathways) have been defined for GBM; they include copy number variations (chr 7 gain, chr 10 and chr 9p losses), gene mutations and alterations (in *PTEN*, *TP53*, *EGFR*, and *PIK3CA*), gene amplifications or deletions (*EGFR*, *MDM2*, *PDGFRA*, and *CDKN2A/B*) and

* Correspondence: trudel.stephanie@chu-amiens.fr

¹EA4666, UNPC, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, France

²Laboratoire d'Oncobiologie moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire Amiens-Picardie, Amiens, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** 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 you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

An Alginate-Based Hydrogel with a High Angiogenic Capacity and a High Osteogenic Potential

Anaïs Barre,^{1†} Marie Naudot,^{1†} Fanny Collin,² Henri Sevestre,³ Louison Collet,⁴ Bernard Devauchelle,^{1,5,6} Stéphane Lack,² Jean-Pierre Marolleau,^{4,6,7} and Sophie Le Ricousse^{1,6*}

Abstract

In bone tissue engineering, autologous cells are combined with osteoconductive scaffolds and implanted into bone defects. The major challenge is the lack of post-implantation vascular growth into biomaterial. The objective of the present study was to develop a new alginate-based hydrogel that enhances the regeneration of bone defects after surgery. The viability of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BM-MSCs) or human endothelial cells (ECs) cultured alone or together on the hydrogel was analyzed for 24 and 96 h. After seeding, the cells self-assembled and aggregated to form clusters. For functional validation, empty or cellularized hydrogel matrices were implanted ectopically at subcutaneous sites in *nude* mice. After 2 months, the matrices were explanted. Transplanted human cells were present, and we observed vessels expressing human von Willebrand factor (resulting from the incorporation of transplanted ECs into neovessels and/or the differentiation of BM-MSCs into ECs). The addition of BM-MSCs improved host vascularization and neovessel formation from human cells, relative to ECs alone. Although we did not observe bone formation, the transplanted BM-MSCs were able to differentiate into osteoblasts. This new biomaterial provided an appropriate three-dimensional environment for transplanted cells and has a high angiogenic capacity and an osteogenic potential.

Keywords: alginate-based hydrogel; angiogenic and osteogenic capacities; ectopic animal model; endothelial cell; mesenchymal stem cell

Introduction

Recent advances in tissue engineering owe their success largely to the development of novel biomaterial-based strategies that better mimic native tissue and organ structure.¹ For bone reconstruction, the ideal scaffold must (1) promote cell survival, proliferation, and differentiation, (2) facilitate and enhance vascularization, (3) inhibit fibrous tissue formation, and (4) be able to integrate into the surrounding tissue. As a natural non-thrombogenic hydrogel with good biocompatibility

and biodegradability, alginate has been used variously for cell delivery *in vitro* and *in vivo*,^{2,3} vascular regeneration,⁴ cardiac repair,⁵ and bone tissue engineering.⁶ The combination of potentially osteogenic cells with a bone-mimicking scaffold is a promising alternative approach to bone grafting. Although the treatment of bone defects using mesenchymal stem cells (MSCs) can effectively promote bone regeneration in human and animal models,⁷ the lack of blood vessels deprives the bone graft of nutritional support. Great effort has

¹EA7516, CHIMERE, Jules Verne University of Picardie, Amiens, France.

²Les Laboratoires Brothier, Nanterre, France.

³Department of Pathology and Anatomy, Amiens University Medical Center, Amiens, France.

⁴EA4666 HEMATIM, Jules Verne University of Picardie, Amiens, France.

⁵Department of Maxillofacial Surgery, Amiens University Medical Center, Amiens, France.

⁶Facing Faces Institute, Amiens, France.

⁷Department of Hematology, Amiens University Medical Center, Amiens, France.

[†]These authors contributed equally to this work.

*Address correspondence to: Sophie Le Ricousse, PhD, EA7516, CHIMERE, Jules Verne University of Picardie, CHU Amiens Picardie Sud, F-80054 Amiens cedex 1, France; Email: sophie.le.ricousse@u-picardie.fr

© Anaïs Barre et al. 2020; Published by Mary Ann Liebert, Inc. This Open Access article is distributed under the terms of the Creative Commons 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.





Legallais Cecile (Orcid ID: 0000-0002-8061-906X)

Le Ricousse Sophie (Orcid ID: 0000-0002-6748-1393)

The combination of a poly-caprolactone/nano-hydroxyapatite honeycomb scaffold and mesenchymal stem cells promotes bone regeneration in rat calvarial defects

Running title : PCL-nHA honeycomb scaffold with MSCs promotes bone regeneration *in vivo*

Marie Naudot¹, Alejandro Garcia Garcia², Nicolas Jankovsky³, Anaïs Barre¹, Luciane Zabijak⁴, Soufiane Zakaria Azdad⁵, Louison Collet³, Fahmi Bedoui⁶, Anne Hébraud⁷, Guy Schlatter⁷, Bernard Devauchelle^{1,8,9}, Jean-Pierre Marolleau^{3,10}, Cécile Legallais², Sophie Le Ricousse^{1*}.

1: EA7516, CHIMERE. Jules Verne University of Picardie, Amiens, France

2: UMR 7338, BMBI. CNRS, University of Technology of Compiègne, Compiègne, France

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/term.3114

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Résumé :

Au cours de la lymphopoïèse B, de nombreux mécanismes recombinatoires sont mis en place pour permettre la synthèse des immunoglobulines, qui sont composées de quatre chaînes protéiques : deux chaînes lourdes et deux chaînes légères identiques. Au sein du locus IGK des chaînes légères, des mécanismes entraînent l'association d'un fragment de gène de variabilité V_{κ} et de jonction J_{κ} : c'est la recombinaison V(D)J des gènes des immunoglobulines. Des travaux antérieurs du Pr Brigitte Gubler ont identifié des réarrangements atypiques associant deux gènes V_{κ} , appelés $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} , dans les prélèvements de patients atteints de LAL-B pédiatrique. Durant ces travaux de thèse, nous avons poursuivi cette étude en nous concentrant sur l'apparition physiologique des réarrangements $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} au sein de populations cellulaires triées de sang placentaire. Nous avons découvert que ces réarrangements atypiques apparaissent à une fréquence comprise entre 0,5% et 1%. Nos résultats montrent une utilisation préférentielle des gènes en fonction du stade de maturation. Dans un nouveau modèle de différenciation B *in vitro* développé à partir de cellules souches matures en coculture avec des cellules souches stromales issues de sang de cordon, nous avons constaté que ces réarrangements atypiques ont une fréquence inférieure (0,2%) mais qu'ils possèdent les mêmes caractéristiques d'utilisation préférentielle des gènes au cours de la différenciation B. Ces résultats démontrent l'existence de réarrangements atypiques $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} physiologiques et démontrent de façon indirecte l'existence d'un enhancer fonctionnel responsable du contrôle des recombinaisons atypiques $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} permettant la diversité et la révision du répertoire des chaînes légères κ des immunoglobulines.

Summary :

During B lymphopoiesis, many recombinant mechanisms are involved allowing the synthesis of immunoglobulins. The immunoglobulins are composed of two heavy and light identical chains. Within the IGK locus, mechanisms allow the association of a gene fragment of variability V_{κ} and junction J_{κ} . This mechanism is called V (D) J recombination of immunoglobulin genes. Previous work by Prof. Brigitte Gubler identified atypical rearrangements associating two V_{κ} genes, called $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} in samples from patients with pediatric ALL-B. During this thesis work, we continued this study by focusing on the physiological appearance of $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} rearrangements in sorted cell populations of cord blood. We have identified these atypical rearrangements at a frequency of between 0.5% and 1%. Our results show a preferential use of genes depending on the stage of maturation. In addition, in a new model of *in vitro* B-cell differentiation developed from mature stem cells in coculture with cord stromal stem cells, we found these rearrangements at a lower frequency, but having the same characteristics of preferential use of genes than previously demonstrated. These results demonstrate the existence of atypical physiological $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} rearrangements and indirectly demonstrate the existence of a functional enhancer responsible for the control of atypical $V_{\kappa 2}$ - V_{κ} recombination, allowing diversity and revision of the repertoire IG kappa light chains.