

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 524)

Centre de Biologie et de Recherche en Santé

UMR CNRS 7276 – CRIBL-
Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie Science Santé
Spécialité : Immunogénétique

Présentée et soutenue publiquement par

ARMAND GAROT

Le 22 octobre 2015

**Régions régulatrices E μ et 3'RR au locus de chaînes lourdes
d'immunoglobulines : dynamique, fonctions et interactions des
modules**

Directeur de thèse : Dr. Eric PINAUD

Jury

Président :

Michel Cogné – Professeur/ Directeur de Recherche CNRS – CBRS - Limoges

Rapporteurs :

Ana-Maria Lennon-Duménil - Directrice de Recherche INSERM - Institut Curie – Paris

Jérôme Moreaux – Maître de conférence-Institut de génétique humaine/CHRU- Montpellier

Examineur :

Philippe Ruminy – Chargé de Recherche INSERM – Centre Henri Becquerel - Rouen

Directeur de thèse:

Eric Pinaud – Chargé de Recherche CNRS – CBRS – Limoges

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 524)

Centre de Biologie et de Recherche en Santé

UMR CNRS 7276 – CRIBL-
Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie Science Santé
Spécialité : Immunogénétique

Présentée et soutenue publiquement par

ARMAND GAROT

Le 22 octobre 2015

**Régions régulatrices E μ et 3'RR au locus de chaînes lourdes
d'immunoglobulines : dynamique, fonctions et interactions des
modules**

Directeur de thèse : Dr. Eric PINAUD

Jury

Président :

Michel Cogné – Professeur/ Directeur de Recherche CNRS – CBRS - Limoges

Rapporteurs :

Ana-Maria Lennon-Duménil - Directrice de Recherche INSERM - Institut Curie – Paris

Jérôme Moreaux – Maître de Conférence-Institut de génétique humaine/CHRU- Montpellier

Examineur :

Philippe Ruminy – Chargé de Recherche INSERM – Centre Henri Becquerel - Rouen

Directeur de thèse :

Eric Pinaud – Chargé de Recherche CNRS – CBRS – Limoges



Au cours de ces travaux de thèse j'ai bénéficié pendant les trois premières années d'un financement par la région Limousin. Ces trois années ont été accompagnées par un poste de moniteur (Doctorant Contractuel Avec Charge d'Enseignement) de l'Université de Limoges dans le service de Physiologie de la faculté de Pharmacie sous la direction du Professeur A. Desmoulière.

Lors de ma dernière année de doctorat j'ai bénéficié d'un contrat d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) à l'Institut Universitaire du Limousin financé par l'Université de Limoges.



Faculté de



Médecine
Limoges



Résumé

L'expression des immunoglobulines (Ig) par les cellules B est dictée par de multiples remaniements géniques appelées recombinaisons V(D)J, commutation de classe (CSR) et hypermutation somatique (SHM). Tous ces événements sont contrôlés par des éléments *cis*-régulateurs notamment au locus IgH. Les mieux décrits sont la région intronique E μ et ses régions d'attachement à la matrice nucléaire MAR_{S μ} et la région régulatrice en 3' du locus IgH (3'RR), constituée de 4 éléments activateurs (hs3a ; hs1,2 ; hs3b ; hs4) et possédant une structure quasi-palindromique très conservée. Afin d'étudier ces régions régulatrices, nous avons analysé plusieurs modèles murins présentant la délétion de la totalité de la région E μ , des MAR_{S μ} , et de diverses parties de la 3'RR. Ces modèles ont mis au jour des fonctions insoupçonnées de ces régions régulatrices, à divers stades du développement B.

Au delà de son rôle régulateur des réarrangements précoces de D_H vers J_H, nous avons précisé la fenêtre d'action de région E μ et son rôle sur la transcription et l'expression de la chaîne lourde μ du stade pré-B jusqu'au stade B transitionnel. L'activateur E μ module en effet l'expression du pré-BCR et du BCR et par conséquent conditionne l'orientation des cellules B matures vers les compartiments de la zone marginale et folliculaire. Notre étude indique également que E μ n'influence pas le choix des segments V_H au cours de la recombinaison VDJ. Nous montrons que les régions MAR_{S μ} sont impliquées dans le ciblage des gènes d'Ig par l'hypermutation somatique. Le mode d'action de ces régions MAR_{S μ} reste à définir mais nous décrivons qu'il est découplé de la transcription et qu'il affecte également des loci situés sur des chromosomes différents : loci codant les chaînes légères d'Ig (*Igk*) et loci des cibles illégitimes de AID (*Bcl6* et *Cd83*).

Une étude comparant un nouveau modèle murin déficient pour la région quasi-palindromique 3'IgH (de hs3a à hs3b) à deux autres modèles de notre laboratoire (3'RR KO et hs3b-hs4 KO) nous a permis d'identifier deux modules fonctionnels complémentaires dans la région 3'RR. Le module distal (hs4) impliqué dans la régulation de l'expression de la chaîne lourde du stade B immature au stade B naïf et le module proximal (de hs3a à hs3b) nécessaire aux stades matures pour la SHM et la CSR vers la majorité des isotypes après activation, mais également pour la synthèse des anticorps par les plasmocytes.

Abstract

Immunoglobulin (Ig) gene expression in B cells depends on multiple genetic rearrangements named V(D)J recombination, class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM). These events are controlled by *cis*-regulatory elements which are, especially numerous within the IgH locus. Major IgH regulatory elements are E μ composed of a core enhancer flanked by nuclear matrix attachment regions MARs_{E μ} and the regulatory region located at the 3' end of the locus (3'RR), composed of 4 enhancers (hs3a; hs1-2; hs3b; hs4) harbouring a highly conserved quasi-palindromic structure. To study these regulatory regions, we analyzed multiple mice models carrying endogenous deletions of either the entire E μ region, MARs_{E μ} only or various parts of the 3'RR. These models revealed unsuspected functions for all IgH regulatory regions, at various stages of B cell development.

Beyond its role to control accessibility prior D_H to J_H rearrangements, we identified the window of activity for E μ region and its particular role on transcription and expression of the μ heavy chain from pre-B to the transitional stages. Indeed, the E μ enhancer modulates pre-BCR and BCR expression and consequently modulates the mature B cell fate toward marginal zone and follicular compartments. Our study also indicated that the absence of E μ has no effect on V_H segment usage during V to DJ recombination. We also showed that MARs_{E μ} are implicated in the targeting of Ig genes by SHM. The mechanism by which MARs_{E μ} enhances SHM remains to be clarified but we showed that the process does not depend on transcription. Surprisingly MARs_{E μ} also modulates SHM occurring on genes located on different chromosomes: the Ig light chain loci (*Ig κ*) and AID off-targets loci (*Bcl6* and *Cd83*).

In a study comparing a new mouse model devoid of the 3' IgH quasi-palindromic region (hs3a to hs3b) to previous relevant models available in our laboratory (3'RR KO and hs3b-hs4 KO), we identified two complementary functional modules within the 3'RR. The distal module (hs4), which regulates Ig heavy chain expression (and therefore BCR expression) from the immature to mature naïve B cell stages and the proximal module (hs3a to hs3b and its quasi-palindromic structure) required at mature stages for SHM, CSR to most isotypes in activated B cells, and antibody production in plasma cells.

Remerciements

Ces quelques lignes sont en sorte un résumé des mes quatre dernières années au laboratoire. Sans le soutien des personnes que je souhaite remercier, cette thèse n'aurait pas été possible !

Je tiens tout d'abord exprimer ma sincère reconnaissance et mes remerciements à Eric : Voilà maintenant plus de quatre ans que tu guides le Bon Gros Mâle. Merci pour ta confiance, ta patience, tes conseils et tes encouragements. Merci de m'avoir donné la chance dès mon M2 d'avoir pu travailler à tes côtés. Non je ne suis pas maniaque ! Bon j'avoue que stériliser les instruments à chaque fois c'est peut être un peu trop mais dans la BGTeam la rigueur c'est le mot d'ordre ! En espérant que le Padawan soit prêt et pour faire référence à ton proverbe, le 22 octobre je vais être en haut du cocotier j'en connais un qui va être exposé....

Je tiens également à remercier le Professeur Michel Cogné de m'avoir accueilli dans son laboratoire durant ces quatre années. Merci de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse. Je suis sincèrement reconnaissant de la confiance que vous m'avez accordée pendant ces années et que vous continuez de me témoigner en m'intégrant dans vos projets futurs.

Je remercie également tous les membres de mon jury. Merci aux Docteurs Ana-Maria Lennon-Duménil et Jérôme Moreaux d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux. Merci également au Docteur Philippe Ruminy de me faire l'honneur d'examiner ce travail.

Je tiens maintenant à remercier le Docteur Bernardo Reina San Martín de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire à l'IGBMC de Strasbourg. Merci à toute son équipe pour son accueil, une pensée toute particulière pour Anne-Sophie notamment pour son expertise sur la 3C.

Un grand merci à tous mes collègues de l'UT Génie Biologique, Patrick, Karine, Cornelia qui nous permettent de faire des TP dans les meilleurs conditions, Carinne pour ton aide précieuse et je te souhaite bonne chance dans ton nouvel environnement. Merci à mes collègues enseignants : Philippe, François, Christophe, Gaëlle, Sophie, Ludo et Etienne (merci pour tes conseils...j'avoue que terroriser et « projeter la force » sur les étudiants au premier cours est une très bonne technique pour se faire respecter).

Merci à Dominique pour ta gestion de l'emploi du temps, merci pour tes conseils culinaires, je vais essayer le gâteau transparent...

Merci à Jocelyne, j'espère que nous arrivons à transmettre nos connaissances en biologie cellulaire et moléculaire, merci pour ton aide précieuse pour l'organisation des cours et des TP.

Enfin, des remerciements très particulier à Romain, Tan et Cathy, merci pour vos conseils, aussi bien professionnels que personnels. @ Romain : bon courage pour ton Post-Doc ! @ Cathy : Un grand merci pour ta relecture en urgence!!

Merci au Professeur Desmoulière et Nelly (La bretonne) de m'avoir encadré pendant mes 3 années de monitorat. Un grand merci pour votre soutien, vos précieux conseils et merci de m'avoir transmis la passion de l'enseignement...

Je voudrais également remercier sincèrement et chaleureusement toute l'équipe de l'UMR CNRS 7276 (Ex 6101).

Merci tout d'abord à l'équipe de Jean, Nathalie, Robin (oui on est à Limoges et le 1^{er} septembre c'est pantalon...) et notamment Chantal et Cathy pour les tris et les conseils en cytométrie. Bon courage aux futurs docteurs, Nicolas, Hazar, Racha. Merci Héloïse pour les sondes et produits de Q-PCR que je t'ai « volé » dans l'urgence....

Un merci très particulier à l'ensemble de l'équipe de Michel, l'ex labo du 3^{ème} !
Merci tout d'abord à toutes les personnes qui ne sont pas forcément dans le labo en permanence où que l'on ne voit pas toujours mais sans qui, le labo ne pourrait pas « tourner ». Je veux bien entendu parler de nos animaliers, Bernadette, David, Karine ; un merci particulier à Sylvie pour sa disponibilité et son efficacité. Ensuite je voudrais remercier Makiadi et Laurent de s'être occupé de notre verrerie et de notre « plastique ».

Une pensée pour Aurore, merci pour la gestion de notre laboratoire et merci de m'avoir préparé un arbre de vie, bravo pour ton coup de crayon, notamment en cette triste année, où les Charlie ont beaucoup souffert de la stupidité humaine. Merci à Christian (Le Lyonnais) pour toutes ces commandes, notamment à la dernière minute...Je crois que Lyon ne sera pas champion cette année....

Merci à toute l'équipe de B Cell Design, Armelle, Cécile, Marie et Gaël (merci pour les pronostics footballistiques !).

Merci à Anne de nous permettre de transmettre nos connaissances et d'éblouir les tout petits et parfois les grands aussi. Je tiens à te féliciter pour ton organisation irréprochable dans tous ces événements. Merci également pour la réorganisation de notre labo qui en avait bien besoin, mais comme tu as dû le remarquer, les habitudes ont la vie dure...

Je tiens également à remercier Laurent (LoLo) et Krap ; Merci à Laurent pour nos discussions foot, ski et moto. Merci Krap pour tes conseils, et merci d'avoir relu au dernier moment la partie sur les GC. Merci Yves pour vos discussions politiques engagées, votre franchise et vos conseils. Merci à Sophie pour tes conseils et ton aide précieuse sur le Ton Torrent...Un grand merci à Jenny pour toutes les corrections in English et surtout merci de m'avoir aidé à adopté Faridon qui coule maintenant des jours heureux dans nos pâturages...

Je voudrais maintenant remercier les personnes à proximité de la paillasse avec qui j'ai parfois travaillé, galéré. Tout d'abord merci aux anciens qui nous ont ouvert la voie : Isabelle (il paraît que le tiramisu ça se mange ?), Estelle, Guillaume, Ahmed, Amandine, Virgo (future toubib), Aurélien, Pauline (la Silab team), Rada (mais pourquoi ! mais c'est stupide ! ces quelques mots prennent maintenant tout leur sens...et promis je ne soutiens pas habillé en violet), Christelle VF (Allez le CSP !), Fabien (merci pour nos « Alien parties » dans la fac au cœur de la nuit), Magali (Merci pour ta relecture au dernier moment, bon courage pour tes concours !), Amélie (merci de m'avoir accompagné pendant ces années de fac, on est « enfin » au bout, bon courage pour ton post-doc), Audrey (Bon courage D'artagnan !).

Merci à toutes nos aides techniques, Claire pour la cyto « Allo, Claire, le cyto est bouché... », Zeliha pour la transgénèse, Cendrine pour les ELISA, Christelle O. pour les Western, Seb (notre footeux vétéran du labo), Marie C, le doobby ou féliway (Miahaou, tu crois que les chats nous domineront ?) Merci à tous pour vos conseils !

Bon courage aux prochains : Iman, Omar, Zainab, Hazar, Anderson, Racha, Nicolas A., Héloïse, Faten (une grande fan des « Sinjab »), Nicolas DL (alias le ptit blond, courage c'est bientôt la fin, et vive les

Mac ;-)), Matthieu (toujours souriant, et oui tu as raison Mac vaincra !), Nivine (toujours souriante et gourmande, on retourne à Oléron quand tu veux !), Hënd (bon courage pour ces futures années de thèse) et enfin Ophélie (d'abord stagiaire dans la team, maintenant thésarde, je te passe le flambeau)

Maintenant je vais remercier ceux qui ont travaillé à mes côtés, Merci à ma senior Marie (j'ai bien récupéré les souris et merci pour tes conseils sur la gestion du « chef »). Merci à Sandrine (SLN) d'avoir bien galéré (encore et toujours) avec moi sur la 3C-4C (la malédiction continue il faut maintenant faire du 5C). Merci à mes anciens collègues dans le bureau du fond, « loger » à quatre dans 6 m² on l'a fait : tout d'abord merci à Miyou (Je rappelle le slogan Fast and delicious), je ne sais pas si je dois te remercier pour mon surnom « Noopy » qui reste tout de même peu flatteur (je ne sers vraiment à rien ?! et je ne suis pas sûr de savoir me comporter comme une « bête féroce » en cas d'agression !). Merci à Brice (l'infatigable du labo, et mon premier « maître de stage, que de chemin parcouru pendant tout ce temps, bon courage pour ton post-doc aux States et j'espère que ça va le faire pour tous les 2 !) et un très grand merci à Steph : Difficile de faire un bilan avec toi tant les anecdotes sont nombreuses...mais en sachant que tu vas lire ces quelques lignes, je me dis que je ne dois pas te décevoir (Toupin !)...d'abord tu es une référence pour nous, aussi bien pour la musique, oui Muse c'est la classe !, pour ta maniaquerie (sur ce point-là je pense qu'on s'est bien trouvé), que pour le boulot (oui, tu es bien une référence pôle emploi...désolé j'étais obligé). Plus sérieusement je te remercie de la confiance que tu me portes pour les projets futurs, j'espère que CUTE12 deviendra grand, très grand...j'y crois !

Merci à mon collègue de bureau Alexis, c'est bientôt ton tour, merci pour ton soutien et toutes les petites pauses délirantes que l'on a eu pendant la rédaction, et qui ont pu plus ou moins me retarder (je veux notamment parler de Games Of Thrones...) mais qui m'ont détendu...Je n'ai pas encore décidé si j'allais lâcher le foot pour le rugby, peut-être que oui pour jouer dans la catégorie vétérans...

D'un côté plus personnel, je voudrais remercier ma famille, mes parents, mon frère (Manu), Virginie et Nathan pour leur soutien tout au long de ces années de fac. Merci Maman, merci Papa, « ça y est j'ai fini l'école », merci de m'avoir soutenu pendant toutes ces années. J'ai également une pensée pour mes grands-parents parti trop tôt, mais qui ont toujours cru en moi. Merci à mes beaux-parents (Martine et Antoine) et Yoan qui me soutiennent depuis de nombreuses années.

Enfin, mes derniers remerciements vont à toi, Marina qui partage ma vie, oh oui, que de chemin parcouru depuis 2002. On avait prévu de terminer nos études la même année, à quelques heures d'intervalle ça sera chose faite. J'espère que maintenant on va pouvoir prendre du temps pour nous. Ce n'est pas la peine d'en dire plus, l'avenir nous appartient...

*"Toute vérité franchit trois étapes.
D'abord elle est ridiculisée.
Ensuite, elle subit une forte opposition.
Puis, elle est considérée comme ayant
toujours été une évidence."*

A. Schopenhauer

"Rien n'est plus dangereux que la certitude d'avoir raison"

F. Jacob

À mes parents,

Table des illustrations	2
Abréviations	6
Avant propos	10
Synthèse Bibliographique	13
<i>Introduction</i>	14
<i>Chapitre 1 Structure des Immunoglobulines</i>	15
1- Généralités	15
2- Le locus de chaîne lourde IgH.....	16
3- Les loci de chaînes légères	16
a. Le locus kappa (Igκ).....	16
b. Le locus lambda (Igλ).....	17
4- Les régions hypervariables et diversité antigénique	17
<i>Chapitre 2- Ontogénie et fonction des sous-ensembles de cellules B</i>	19
1- Généralités sur la lymphopoïèse B	19
2- La moelle osseuse : berceau du développement B précoce.....	20
a. L'environnement stromal.....	20
b. Les réarrangements géniques au cours du développement B précoce	21
• Les réarrangements V(D)J.....	21
• Le réarrangement au locus IgH, pré-BCR et exclusion allélique	21
c. L'activation d'un programme génétique spécifique	23
d. Accessibilité et modifications épigénétiques au locus IgH	25
• Les transcrits germinaux.....	25
• Les modifications de la chromatine.....	25
• Structure 3D du locus IgH au cours des recombinaisons VDJ.....	27
• Position des loci des gènes d'Ig au cours de la recombinaison V(D)J.....	29
3- Survie et maturation des lymphocytes B au cours de la phase tardive du développement.....	30
a. Cellules B transitionnelles.....	30
b. Cellules B matures	32
• Les cellules B-1	32
• Les cellules B-2	33
c. Initiation, formation et maintien des centres germinatifs.....	33
• Formation des centres germinatifs.....	33
• Facteurs régulateurs des centres germinatifs.....	35
d. La mémoire immunitaire.....	36
e. Les cellules sécrétrices d'anticorps : les plasmocytes.....	36
4- La transmission du signal par le BCR : régulation du « B-cell fate »	37
a. Le pré-BCR et phase précoce du développement.....	37
b. Le signal du BCR aux stades B immatures et périphériques.....	39
5- AID, un acteur majeur de deux événements clés du développement B en périphérie : SHM et CSR	40
a. AID : structure, régulation de l'expression, localisation, stabilité, fonction, et recrutement....	40
• Structure.....	40
• Régulation de l'expression, localisation et stabilité de AID	41
• Fonction	42
• Recrutement/ Ciblage de l'ADN simple brin par AID	43
▪ Mécanisme d'action de AID lors de la SHM et CSR : caractéristiques communes	43
▪ « Ciblage » par AID lors de la SHM	44
▪ « Ciblage » par AID lors de la CSR.....	45
b. Induction de la SHM après déamination par AID.....	46
c. Mécanisme de la recombinaison de classe	47
d. Cas particulier du <i>trans</i> -CSR	48
e. Nouvelles cibles de AID : les régions LS en 3' du locus IgH.....	49
f. AID et cancer.....	49
• Les cibles illégitimes de AID : les gènes AID « off-targets »	50

• Expression ectopique de AID	51
• Régulation spatiale de AID et de ses gènes cibles dans le noyau.....	51
<i>Chapitre 3 Les contrôles du locus IgH : expression, position, interaction</i>	52
1- Description des éléments <i>cis</i> -régulateurs	52
a. Les promoteurs.....	52
• Les promoteurs V _H	52
• Le « promoteur-enhancer » pDQ52.....	53
• Les promoteurs I en amont des gènes constants.....	53
b. Les activateurs et isolateurs transcriptionnels : généralités	54
• Les enhanceurs.....	54
• Les isolateurs de la chromatine.....	54
c. Les enhanceurs et isolateurs transcriptionnels au sein du locus IgH	55
2- La région régulatrice en 5' du locus	55
3- La région intergénique V _H -D _H	56
4- La région intronique E _μ	57
a. L'enhancer E _μ	57
b. Les régions d'attachement à la matrice (MARs).....	59
5- La région régulatrice en 3' du locus (3'RR).....	61
a. Composition et structure de la 3'RR	61
• Les éléments hs de la 3'RR	61
• Structure de la 3'RR.....	61
b. Cinétique d'activation de la 3'RR au cours de l'ontogénie B	62
c. Les fonctions de la 3'RR au cours de l'ontogénie B.....	63
• Etudes dans des lignées cellulaires.....	63
• Analyse des modèles de souris transgéniques	64
• Analyse des modèles de souris Knock in et Knock out	64
▪ Travaux sur hs1,2 et hs3a	64
▪ Travaux sur hs3b.....	65
▪ Travaux sur hs4.....	65
▪ Etudes des délétions multiples.....	65
6- La région isolatrice en aval du locus IgH (3' CBE)	67
7- Notions de super-enhancers	68
8- 3'RR et cancer	68
Résultats	71
Article 1	73
Article 2.....	75
Résultats préliminaires.....	77
Discussion & Perspectives	86
1- Implication de la région E _μ lors du développement B.....	87
2- Dynamique de la 3'RR: quels rôles pour les éléments proximaux et distaux au cours du développement B ?.....	90
3- Topologie du locus IgH et interactions entre les éléments régulateurs.....	93
4- Les animaux KO dans la région E _μ ou 3'RR sont-ils de bons modèles pour l'analyse des interactions au locus IgH ?.....	95
Conclusion Générale	97
Annexes	98
Article 1	101
Manuscrit 2.....	103
Manuscrit 3.....	104
Article 4.....	106
Manuscrit 5.....	107
Bibliographie	108

Table des illustrations

Introduction

- Figure 1. Vue d'ensemble de l'évolution du système immunitaire adaptatif.
- Figure 2. Structure tridimensionnelle d'une immunoglobuline soluble monomérique.
- Figure 3. Génération des fragments Fab et Fc après digestion partielle à la papaine.
- Figure 4. Schéma général d'une molécule d'anticorps.
- Figure 5. Structure génomique des loci codant le récepteur aux antigènes.
- Figure 6. Exemple de l'impact de la maturation d'affinité sur la structure et la dynamique d'un anticorps.
- Figure 7. Position et « constance » des acides aminés dans les domaines variables des immunoglobulines.
- Figure 8. Organisation spatiale des régions CDR.
- Figure 9. Principe de la recombinaison VDJ au locus IgH lors de la phase précoce de l'ontogénie B dans la moelle osseuse.
- Figure 10. Profil d'hypermutation somatique et schéma de la recombinaison de classe au cours de la phase tardive du développement
- Figure 11. Schéma général de l'ontogénie B au sein de la moelle osseuse.
- Figure 12. Modèle du développement B dans la moelle osseuse.
- Figure 13. Les séquences signal de recombinaison (RSS).
- Figure 14. Mécanisme de la recombinaison V(D)J.
- Figure 15. Principe de la réparation des cassures par le système NHEJ lors des réarrangements V(D)J.
- Figure 16. Modèle exposant l'exclusion allélique.
- Figure 17. Transcrits germinaux au locus IgH pendant l'ontogénie B
- Figure 18. Modèle du recrutement de facteurs de transcription induit par PU.1.
- Figure 19. Schématisation des modèles RW/GL et MLS.
- Figure 20. Topologie en 3 dimensions du locus IgH dans les cellules prépro et pro-B.
- Figure 21. Structure de la chromatine : principes des techniques de 3C, 4C et 5C et exemple de résultats obtenus par 4C.
- Figure 22. Implication de Pax5 dans la contraction du locus IgH dans des cellules proB.
- Figure 23. Architecture du génome : rôle de CTCF
- Figure 24. Changements de conformation et repositionnement nucléaire des loci d'Ig pendant le développement B.
- Figure 25. Schéma indiquant les différents stades de développement B en périphérie.
- Figure 26. Organisation de la région constante du locus IgH
- Figure 27. La régulation au stade transitionnel.
- Figure 28. Modèle exposant le développement des cellules B1 et B2.
- Figure 29. Schéma indiquant la localisation des cellules dans la rate.
- Figure 30. Schéma de la mise en place d'un centre germinatif.
- Figure 31. Le centre germinatif : les populations cellulaires et les étapes du développement.
- Figure 32. Les acteurs du centre germinatif.
- Figure 33. Génération des cellules B mémoires.
- Figure 34. Cascades de signalisation après activation du pré-BCR
- Figure 35. Description des domaines de AID et leurs fonctions.
- Figure 36. Exemple de séquences ciblées par AID lors de la maturation d'affinité ou la recombinaison de classe
- Figure 37. Super-enroulement de l'ADN lors de la transcription.
- Figure 38. Ciblage des régions switch par AID lors de la commutation de classe vers g1

Figure 39. Les voies de réparation BER

Figure 40. Prise en charge des mésappariements lors de l'hypermutation somatique

Figure 41. Résolution des cassures doubles brins par les voies C-NHEJ et A-EJ

Figure 42. Régions LS et recombinaison suicide au locus IgH murin

Figure 43. Diversité et architecture des promoteurs VH

Figure 44. Carte du locus IgH murin

Figure 45. Modèles murins générés pour étudier les régions MARs, core Em, 3'RR et 3'CBE.

Discussion

Figure 46. Implication de la région E μ lors du développement B

Figure 47. Dynamique de la 3'RR: quels rôles pour les éléments proximaux et distaux au cours du développement B

Figure 48. Topologie du locus IgH et interactions entre les éléments régulateurs

Figure 49. Etudes des interactions à courtes et longues distances au sein du locus IgH

Abréviations

3C : Chromosome Capture Conformation
3'RR : 3' Regulatory Region
3'-UTR : 3'-UnTRanslated
4C : Circularized-3C
5C : Carbon Copy 3C
κ : kappa
λ : lambda
μ : mu
δ : delta
ε : epsilon
γ : gamma
γ-H2AX : Forme phosphorylée de H2AX
α : alpha

A

Adam6a et b : A Disintegrin And Metalloproteinase domain 6a et b
A-EJ : Alternative End Joining
Ag : antigène
AID : Activation-Induced cytidine Deaminase
APC : Cellule Présentatrice d'Antigène
APOBEC : APOlipoprotein B mRNA Editing Catalytic Component
ARID : AT-Rich Interaction Domain
ARN pol II : ARN polymérase II
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

B

BAFF : B-cell Activating Factor
BCAP : B Cell Adaptor Protein
BCL-2 : B-Cell Lymphoma 2
BCL-6 : B-Cell Lymphoma 6
BCR : B Cell Receptor
BER : Base Excision Repair
BLIMP-1 : B Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1
BLNK : B-cell LiNKer

BRD4 : BRomoDomain-containing protein 4
BRIGHT : B cell Regulator of IgH Transcription
BSAP : B cell Specific Activator Protein

C

C : Cytosine
CBE : CTCF Binding Element
CDR : Complementary Determining Regions
C_H : Domaine constant des chaînes lourdes
ChIP-seq : Chromatin ImmunoPrecipitation and Sequencing
C_L : Domaine constant des chaînes légères
CLP : Common Lymphoid Progenitors
CMH II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité II
C-NHEJ : Classical Non Homologous End Joining
CSR : Class Switch Recombination
CTCF : CCCTC-binding Factor
CtIP : CtBP-Interacting Protein
CTNBL1 : Catenin Beta Like 1
CXCL-12 : CXC-chemokine ligand 12
CXCR4 : CXC-chemokine receptor 4

D

D : Diversité
DC : Cellule Dendritique
D_H : Segment de diversité du locus IgH
DNA-PKcs : DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit
dV_H : Domaine variable des chaînes lourdes
dV_L : Domaine variable des chaînes légères

E

E2A : E box Protein Binding 2A
EBF-1 : Early B cell Factor-1
EXO1 : EXOnucléase 1

F

Fab : Fragment antigen Binding
FC : Fragment Cristallisable
FDC : Cellule Dendritique Folliculaire
FISH-3D : Fluorescent In Situ Hybridization in 3 dimensions
FLT3L : Fms-related Tyrosine kinase 3 Ligand
FO : cellule de la zone Folliculaire
FOXO-1 : Forkhead boX O-1

G

GC : Germinal Center
GFP : Green Fluorescent Protein

H

H3K27ac : acétylation de la lysine 27 de l'histone H3
H3K4me2 : dimétylation de la lysine 4 de l'histone H3
Hs : Hypersensible
HSC : Hematopoietic Stem Cells

I

I : Intervening
Ig : Immunoglobuline
IGCR1 : InterGenic Control Region-1
Ig_C : Segment constant du locus Igκ
Ig_J : Segment de jonction du locus Igκ
Ig_V : Segment variable du locus Igκ
IgH : Immunoglobulin Heavy chain
Ig_HC : Segment constant du locus IgH

IgL : Immunoglobulin Light chain
IL7 : InterLeukine 7
IRF-4 : Interferon Regulatory Factor 4
IRIS : Inverted Repeat Intervening Sequences

J

J : Jonction
J_H : Segment de jonction du locus IgH

K

Kb : kilobases
KI : Knock In
KO : Knock Out

L

LB : Lymphocyte B
LCR : Locus Control Region
LMMP : Lymphoid-Primed Multipotential Progenitors
lncRNA : Long Non Coding RNA
LPS : LipoPolySaccharide
LS : Like Switch
LSR : Like Switch Recombination

M

MARs : Matrix Attachment Regions
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
Mb : Mégabases
Mbp : Millions de paires de bases
MCL : Mantle Cell Lymphoma
MED1 : MEDIator of RNA polymerase II transcription subunit 1
MEF2B : Myocyte specific Enhancer Factor 2B
miRNA : micro-ARN
MLH1/PMS : MutL Homologue 1/ Post Meiotic Segregation 2
MLS : Multi-Loop-Subcompartment

MMR : MisMatch Repair
MPP : Multipotent Hematopoietic Progenitors
MRB : Cellule B mature Recirculante
MRN : Mre11-Rad50-Nbs1
MSH2/MSH6 : MutS Homologue 2 et 6
MZ : cellule de la Zone Marginale

N

NAS : Nonsense-associated Altered Splicing
Neo^R : gène de résistance à la Néomycine
NMD : Nonsense-Mediated mRNA Decay
NHEJ : Non Homologous End Joining
NK : Natural Killer
NMUP : Nonsense-Mediated Upregulation of PremRNA

P

PALS : PeriArteriolar Lymphoid Sheath
Pax 5 : Paired box 5
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PHD : Plant HomeoDomain
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PKA/PKB/PKC : Protein Kinase A/B/C
PLCγ2 : PhosphoLipase Cγ2
PNA : PeaNut Agglutinin
PRDM1 : PR DoMain zinc finger protein 1
PTBP2 : Polypyrimidine Tract Binding Protein 2
PTC : Premature Termination Codon
PU.1 : PUrine box factor-1

R

RAG : Recombinase Activating Genes
RANKL : Receptor Activator of Nuclear factor-κB Ligand
RPA : Replication Protein A

RSS : Séquence Signal de Recombinaison
RW/GL : Random-Walk/Giant-Loop

S

S : Switch
SATB : Special AT-rich sequence-Binding
SCF : Stem-Cell Factor
SE : Super-Enhancer
SHM : Somatic Hypermutation
SI : Système immunitaire
SLP-65 : SH2 domain containing Leukocyte Protein of 65 kDa
Spt5 : SuPressor of Ty5 homolog

T

T1/T2/T3 : Transitionnel 1/2/3
TCR : T-Cell receptor
Tdt : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
T_{FH} : T Follicular Helper

U

U : Uracile

V

V : Variable
V_H : Segment variable du locus IgH

W

WT : Wildtype

X

XBP-1 : X Box Protein 1

Y

YY1 : Yin Yang 1

Z

ZC : Zone Claire
ZS : Zone Sombre

Avant propos

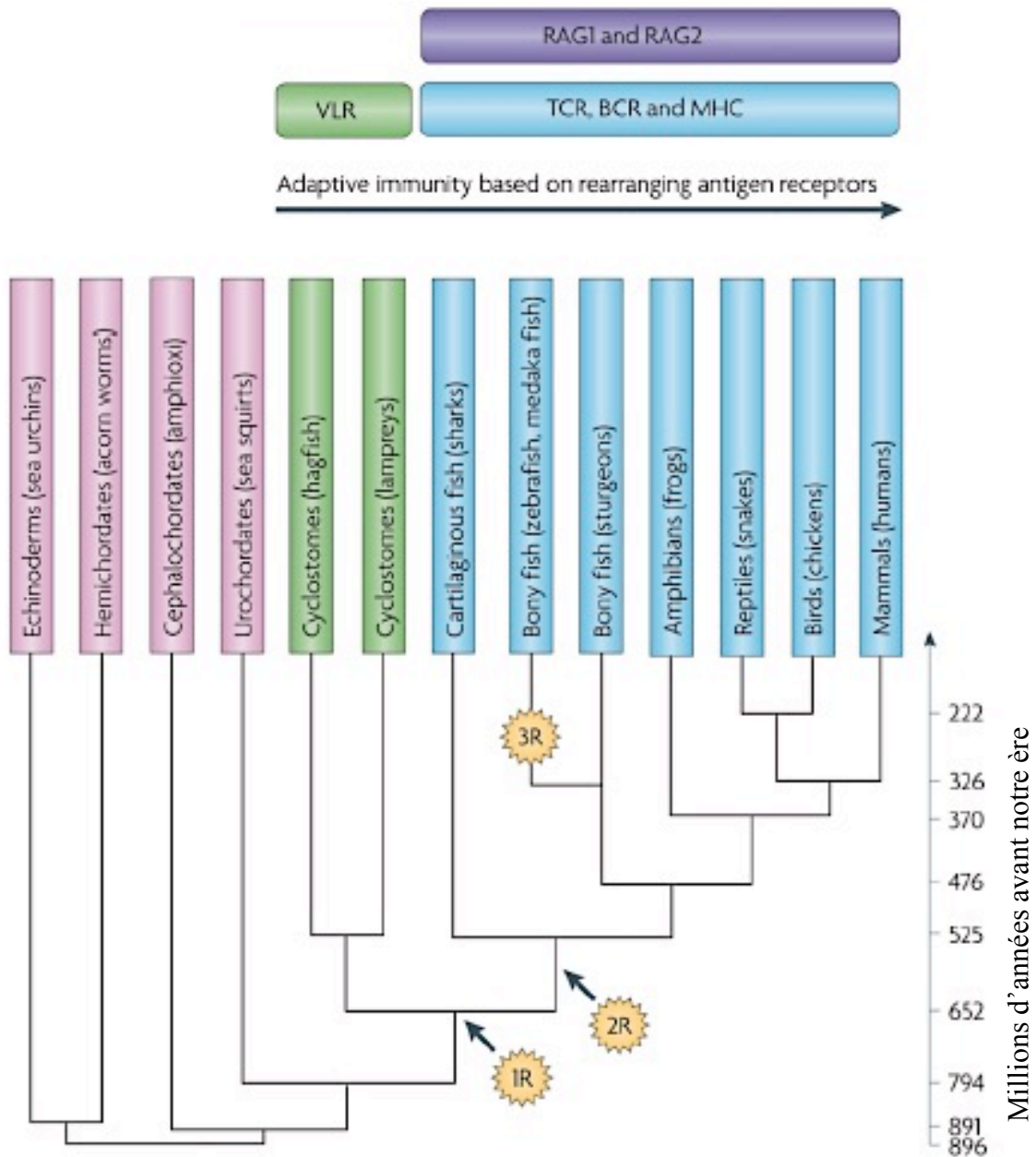


Figure 1. Vue d'ensemble de l'évolution du système immunitaire adaptatif.

L'ensemble des récepteurs immunitaires adaptatifs basé sur la recombinaison a émergé chez un ancêtre commun il y a plus de 500 millions d'années. En rose : les invertébrés ; en vert : les vertébrés sans mâchoires ; en bleu : les vertébrés avec mâchoires. 1R ; 2R et 3R indiquent les hypothèses de duplication du génome, avec respectivement première, deuxième et troisième duplication. (VLR : variable lymphocyte receptor ; MHC, major histocompatibility complex ; TCR : T-cell receptor ; BCR : B-cell receptor ; RAG : Recombination-activating gene.) (*adapté de* Flajnik and Kasahara, 2010).

Avant propos

L'intégrité d'un organisme repose sur ses capacités à se défendre vis à vis des agressions extérieures et à s'adapter. Le système immunitaire (SI) est composé d'un réseau de cellules au sein d'organes interdépendants permettant à l'organisme de se protéger. Les études génétiques récentes ont permis de mettre en lumière la présence de récepteurs immunitaires, basés sur la recombinaison, chez un ancêtre commun (vertébré à mâchoire) au cours du dernier éon, il y a plus de 500 millions d'années (Cooper, 2015) (**Figure 1**).

La mise en évidence du système immunitaire et sa compréhension ont beaucoup évolué ces 150 dernières années. On parle pour la première fois de « l'action » du système immunitaire seulement à la fin du XIX^e siècle. C'est à partir du milieu du XX^e que les connaissances en immunologie progressent à grands pas. Les grandes avancées débutent avec les premières descriptions de la structure des immunoglobulines (Edelman, 1959 ; Porter, 1959). Puis, rapidement les études animales ont permis de mettre en évidence que le système immunitaire n'est pas l'oeuvre que d'une seule population de cellules mais qu'il repose sur la coopération de plusieurs types cellulaires (Warner et al., 1962). A la fin des années 70 les études en immunologie moléculaire ont permis de nouvelles approches et ont éclairé certaines hypothèses, notamment sur la possibilité de certaines cellules à produire des immunoglobulines particulières (Lawton et al., 1972). A l'époque, ces récentes techniques ont apporté des précisions sur les réarrangements des segments constituant respectivement les chaînes légères et lourdes (Hozumi and Tonegawa, 1976 ; Early et al., 1980). Ces découvertes ont été essentielles quant à la compréhension de la diversification des immunoglobulines, particulièrement en ce qui concerne la commutation de classe d'une part (Davis et al., 1980; Rogers et al., 1980; Sakano et al., 1980), et les hypermutations somatiques d'autre part (McKean et al., 1984; pour revue Kocks and Rajewsky, 1989; Jacob et al., 1991).

Ce sont plus récemment les découvertes de la composition de l'ensemble des acteurs cellulaires, protéiques et moléculaires du réseau immunitaire (Reth et al., 1991; Schatz et al., 1989; Oettinger et al., 1990; Muramatsu et al., 2000) qui ont apporté des réponses aussi bien dans la coopération intercellulaire (pour revues Mueller et Germain, 2009; Panaroni et Wu, 2013) que dans la signalisation intracellulaire (pour revue Reth and Nielsen, 2014).

La force du système immunitaire repose sur sa très grande mobilité, ses capacités d'adaptation, de communication et d'autocontrôle. Cependant, ce système hyper-complexe n'est pas sans faille. Certains pathogènes ont mis en place des mécanismes d'échappement afin de contourner la surveillance de l'organisme par le SI. Il existe par ailleurs de multiples pathologies directement imputables au SI. De nombreux processus cancéreux sont aujourd'hui connus et étudiés. Ces processus, qu'ils soient liés ou non à un dysfonctionnement des cellules du SI, sont d'autant plus critiques qu'ils se produisent dans ces cellules. En effet, la capacité de ces cellules à pouvoir intervenir directement sur leur propre matériel génétique les rend dangereuses. Même si l'ensemble de ces mécanismes est sous surveillance, les risques de dérives sont réels. Il faut aujourd'hui distinguer les troubles du SI qui entraînent une absence de protection de l'organisme des troubles qui font que le SI se retourne contre l'organisme (maladies auto-immunes etc.).

Avant propos

Le SI est une structure hiérarchisée extrêmement complexe mais basée sur un fonctionnement simple : produire de la diversité. En effet, chaque processus est ordonné et contrôlé. La complexité de cet « organe » est due à la grande variété d'acteurs nécessaires pour la mise en place d'un système efficace.

La connaissance des processus génétiques mis en jeu au cours du développement du SI est une condition *sine qua non* pour la compréhension des pathologies engendrées par un dysfonctionnement du SI.

Mes travaux de thèse ont concerné l'étude d'activateurs transcriptionnels positionnés au sein du locus de chaîne lourde d'immunoglobuline. Tout d'abord nous avons étudié la région régulatrice intronique « $E\mu$ », composée du « core » activateur $cE\mu$ et des deux régions d'attachement à la matrice (*MARs*) puis la région régulatrice située en 3' du locus (*3'RR*). J'ai analysé l'impact de l'invalidation de tout ou partie de ces régions sur le développement précoce ou tardif de la lignée lymphocytaire B. Ensuite, nous avons évalué l'implication de la région régulatrice $E\mu$ sur les « dommages collatéraux » infligés aux oncogènes du lignage B. Ce manuscrit sera axé dans un premier temps sur la description des loci codant les immunoglobulines, j'aborderai ensuite le développement lymphocytaire B puis je détaillerai les acteurs de la régulation des événements géniques.

Synthèse Bibliographique

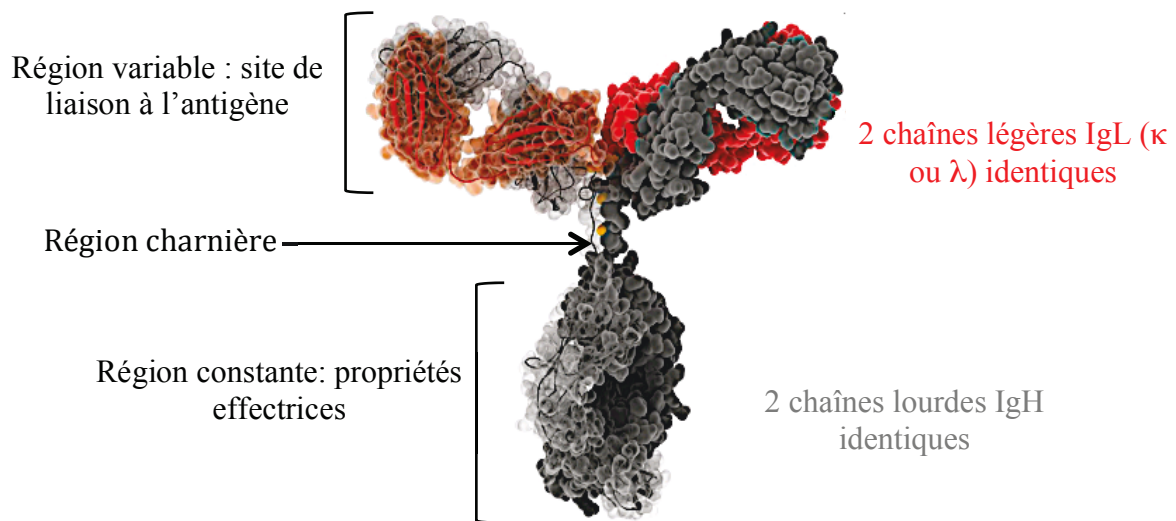


Figure 2. Structure tridimensionnelle d'une immunoglobuline soluble monomérique.

Exemple d'une IgG1. Chez la souris, chaque Ig est constituée de deux chaînes légères (en rouge) identiques de types kappa (κ) ou lambda (λ) et deux chaînes lourdes identiques IgH (en gris). Les Ig sont composées de trois régions distinctes, à savoir deux régions variables correspondant au site de liaison à l'antigène reliées par une charnière à une région constante portant les propriétés effectrices.

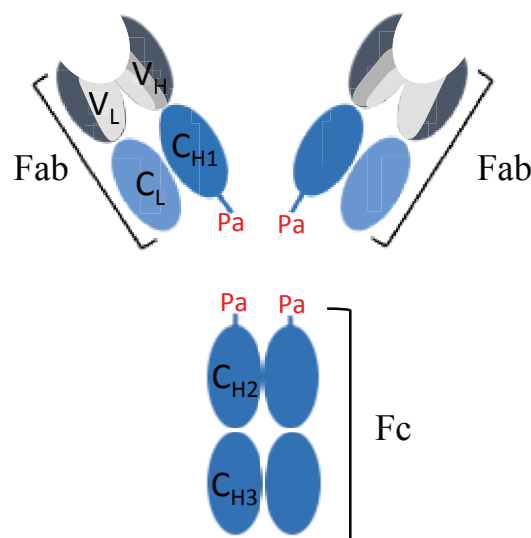


Figure 3. Génération des fragments Fab et Fc après digestion partielle à la papaïne.

La digestion partielle d'une molécule d'immunoglobuline par la papaïne (enzyme protéolytique) génère trois fragments. Deux fragments Fab conservant la propriété de fixation à l'antigène et un fragment Fc portant les propriétés effectrices. Les fragments Fab sont constitués des domaines variables (V_L) et constants (C_L) des chaînes légères ainsi que le domaine variable (V_H) et le premier domaine constant (C_{H1}) de la chaîne lourde. Les fragments Fc sont composés uniquement des domaines constants de la chaîne lourde, ici les domaines constants deux et trois (C_{H2} et C_{H3}). Les sites d'action de la papaïne sont représentés en rouge.

Introduction

Afin d'être performant, le système immunitaire doit assurer plusieurs fonctions parmi lesquelles la reconnaissance immunologique, c'est-à-dire le fait que l'infection soit détectée. Dans un premier temps, certaines cellules appartenant au système immunitaire inné vont réagir de manière immédiate ensuite le système adaptatif va entrer en jeu *via* la coopération entre les lymphocytes B et T. Cette collaboration permet la mise en place des fonctions immunitaires effectrices. L'engagement du SI adaptatif nécessite que la réponse immunitaire reste sous contrôle et cela doit se faire à plusieurs niveaux. En effet, la réponse immunitaire doit être adaptée à l'agression *i.e* que l'organisme ne va pas engager tous les procédés disponibles mais seulement mettre en place les moyens les plus appropriés. Cette régulation se fait tout au long de la réponse immunitaire. Elle est nécessaire et indispensable pour un fonctionnement optimal du SI. Toute dérive de cette régulation est susceptible d'entraîner un défaut de réponse voire des pathologies auto-immunes. Une autre des grandes propriétés du SI est sa capacité à mettre en place une mémoire immunologique. Cela permet à notre organisme de produire une réponse plus rapide et plus forte face à un pathogène déjà rencontré. Je m'intéresserai en particulier au cas des lymphocytes B (LB). Les LB matures sont capables de reconnaître de nombreux antigènes différents par l'intermédiaire d'une structure protéique de surface appelé BCR (B Cell Receptor) dont le constituant majeur est une immunoglobuline (Ig) (**Figure 2**). Chaque LB est spécifique d'un antigène donné, ainsi l'ensemble des LB d'un organisme constitue son répertoire antigénique. Au terme de la différenciation B, les cellules spécialisées appelées plasmocytes vont sécréter une Ig soluble de même spécificité antigénique qui est alors dénommée anticorps. La genèse des récepteurs aux antigènes est particulièrement complexe : les gènes codant les Ig ne sont pas fonctionnels dans leur configuration germinale pour le devenir ces derniers doivent subir des réarrangements intragéniques spécifiques des LB.

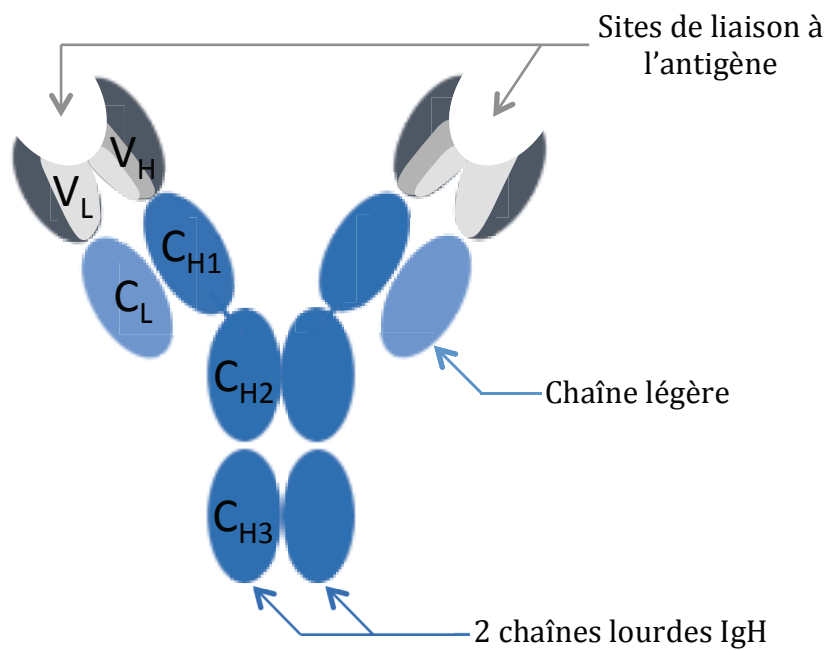


Figure 4. Schéma général d'une molécule d'anticorps.

Le schéma montre l'ossature polypeptidique d'une immunoglobuline. Les chaînes légères sont composées d'un domaine variable V_L et un domaine constant C_L. Les chaînes lourdes sont composées d'un domaine variable V_H et plusieurs domaines constants C_H. L'Ig présentée dans ce schéma est constituée de trois domaines constants (C_{H1} ; C_{H2} ; C_{H3}).

Chapitre 1 Structure des Immunoglobulines

Sous leur forme monomérique les Ig sont constituées de trois parties : deux sites de liaison de l'antigène nommés Fab (fragment antigen binding) reliés par un segment flexible, la région charnière, à une région constante Fc (fragment cristallisable) conférant les propriétés effectrices de la molécule (**Figure 3**). Le site de liaison de l'antigène diffère beaucoup entre toutes les Ig exprimées chez un individu et est appelé région variable.

1- Généralités

La structure des immunoglobulines a été élucidée avec le temps. A la fin des années 50, Porter décrivait les différents fragments composant cette molécule (Porter, 1959). Nous savons actuellement que chaque monomère d'Ig est composé de quatre chaînes polypeptidiques identiques deux à deux. On distingue d'une part deux chaînes lourdes IgH (H pour heavy) reliées entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures et deux chaînes légères IgL (L pour light), chacune liée à une chaîne lourde par un pont disulfure. Les chaînes légères peuvent être de deux types, à savoir kappa (κ) ou lambda (λ). Il existe cinq classes de chaînes lourdes mu (μ), delta (δ), gamma (γ), epsilon (ϵ) et alpha (α) correspondant respectivement aux monomères d'IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Parmi les IgG on distingue plusieurs sous-classes chez la souris : IgG3, IgG1, IgG2b et IgG2a ou IgG2c selon les souches de souris. En effet, l'isotype IgG2a est notamment trouvé dans la souche BALB/c (ou d'autres souches d'haplotypes « a ») alors que l'isotype IgG2c a été identifié dans des souches C57BL/6 (d'haplotypes « b ») (Morgado et al., 1989).

La plupart de ces isotypes sont retrouvés sous forme monomérique, sauf les IgM qui sont en générale sous forme pentamériques et les IgA associées en dimères. Les variations de séquences des chaînes lourdes sont à l'origine des différences de propriétés des classes d'Ig. Ces variations peuvent être de plusieurs types, tels que la longueur de la région constante, la longueur de la région charnière, le nombre et la position des ponts disulfures et les sites de glycosylation.

Toutes les chaînes lourdes sont exprimées à partir du locus IgH localisé sur le chromosome 12 chez la souris, alors que les chaînes légères sont produites à partir de deux loci, Ig κ ou Ig λ positionnés respectivement sur les chromosomes murins 6 et 16. Les chaînes légères sont composées de deux domaines, un variable (dV_L) et un constant (C_L) (**Figure 4**). Les chaînes lourdes ont un nombre différent de domaines selon les isotypes, mais sont constituées d'au moins un domaine variable (dV_H) et de plusieurs domaines constants (C_H).

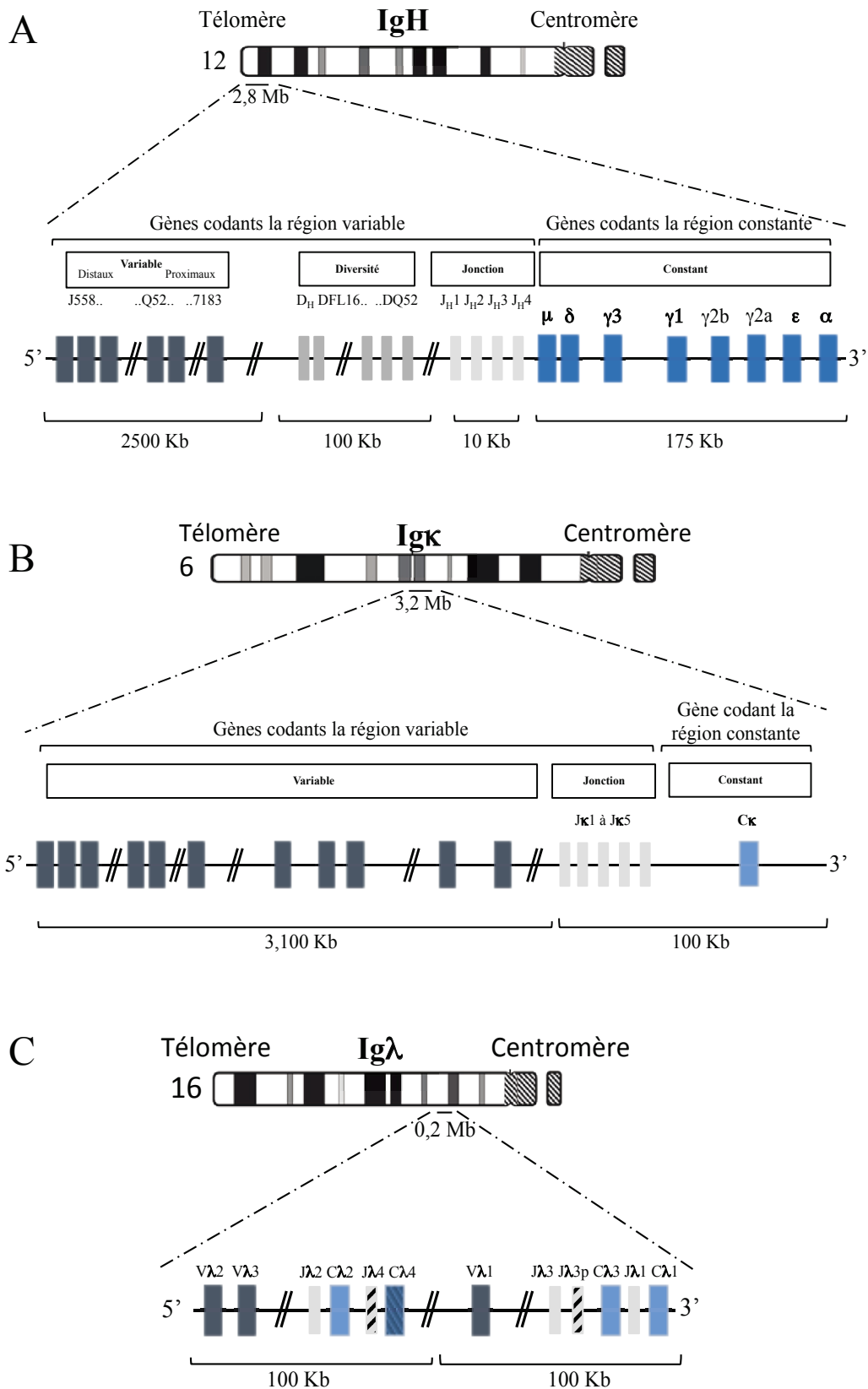


Figure 5. Structure génomique des loci codant le récepteur aux antigènes.

Les segments variables, de jonction, de diversité et constants sont indiqués par des rectangles. (A) Diagramme du locus de chaîne lourde d'immunoglobuline (IgH). (B) Diagramme du locus de chaîne légère kappa (Igκ). (C) Diagramme du locus de chaîne légère lambda (Igλ). Les segments à rayures indiquent la présence d'éléments non fonctionnels. Les régions régulatrices ne sont pas représentées. (Les schémas ne sont pas à l'échelle).

La région variable de l'Ig est constituée de l'association des domaines aminoterminaux variables des chaînes lourdes et légères ($dV_H + dV_L$). Ces domaines variables (dV_H ou dV_L) résultent de l'assemblage de différents segments. Le domaine V_L est produit à partir de l'assemblage de segments dits variables (V) et de segments de jonctions (J). Le domaine variable de la chaîne lourde inclut un troisième segment de diversité (D). Une des particularités remarquables de notre système immunitaire est sa capacité à rassembler, par recombinaison, des éléments parfois distant de presque 3 mégabases (Mb). Ces segments semblent être associés de manière aléatoire parmi tous ceux composant chaque loci.

2- Le locus de chaîne lourde IgH

Le locus des chaînes lourdes situé sur la partie télomérique du chromosome 12 de la souris s'étend sur environ 2,8 Mb. A ce jour, les données de la littérature estiment que ce locus est composé d'environ 180 à 210 segments pouvant participer à la composition de la chaîne lourde (**Figure 5A**). Ce nombre peut varier en fonction de la souche murine étudiée. Parmi ces éléments, le nombre de segments variables (V_H) est estimé à 160 dont une centaine sont fonctionnels ; on compte environ 20 segments de diversité (D_H) (dont 10 fonctionnels) et 4 segments de jonction (J_H), qui sont tous fonctionnels. Enfin, on trouve également 8 segments constants (IgH_C) codant les différents isotypes de chaîne lourde (Chowdhury and Sen, 2004; Bossen et al., 2012). Les segments V_H sont regroupés dans 15 familles réparties sur la majorité du locus. On distingue les segments variables dits « distaux » situés en 5' du locus des segments plus en aval, *i.e* à proximité des segments de diversité, dits « proximaux ». Près de la moitié des segments V_H sont des membres de la famille J558, située essentiellement dans la partie distale. Plus en 3' on trouve d'autres familles de segments V_H telle que la famille 7183 dont le V_H81X est le dernier segment fonctionnel. Les segments de diversité sont regroupés en 4 familles (DFL16, DSP2, DST4 et DQ52) (Lefranc et al., 2009). Les segments constants sont constitués de plusieurs exons pouvant coder les domaines dits « constants » des chaînes lourdes et dont le nombre est différent selon l'isotype. On trouve également des exons codant la région charnière, les régions intracytoplasmiques et transmembranaires.

3- Les loci de chaînes légères

a. Le locus kappa ($Ig\kappa$)

Le locus kappa a une taille légèrement supérieure à celle du locus de chaîne lourde à savoir 3,2 Mb (**Figure 5B**). Il n'est constitué que d'un seul segment constant ($Ig\kappa_C$), 5 segments de jonction ($Ig\kappa_J$) dont 4 fonctionnels et plus de 160 segments variables ($Ig\kappa_V$) (80 fonctionnels) (Schlissel, 2004).

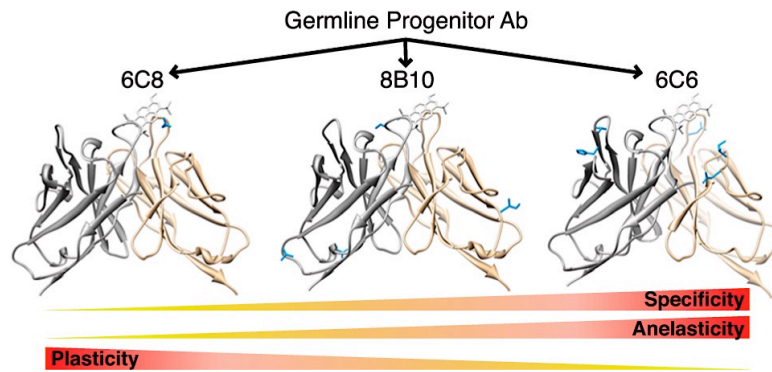


Figure 6. Exemple de l'impact de la maturation d'affinité sur la structure et la dynamique d'un anticorps.

Dans cet exemple, les anticorps anti-MPTS 6C8, 8B10, 6C6 sont des anticorps produits après la SHM. La structure et surtout la dynamique des anticorps sont affectées par la SHM permettant d'optimiser la reconnaissance antigénique. (MPTS : 8-méthoxy-pyrène-1,3,6-trisulfonate ; SHM : somatic hypermutation). (Adapté de Adhikary et al., 2015).

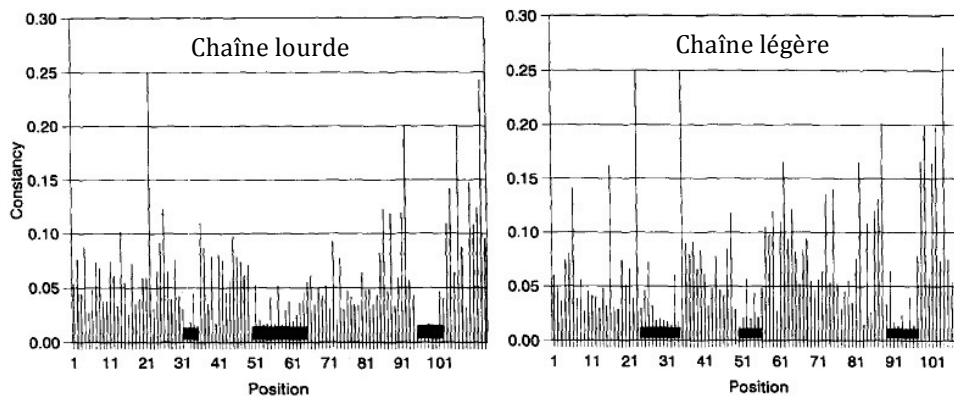


Figure 7. Position et « constance » des acides aminés dans les domaines variables des immunoglobulines.

La constance des acides aminés est définie comme la fréquence des acides aminés les plus utilisés divisée par le nombre d'acides aminés utilisés à cette position. Les barres noires indiquent la position des CDR. (CDR : complementary determining region). (Adapté de Lara-Ochoa et al., 1994).

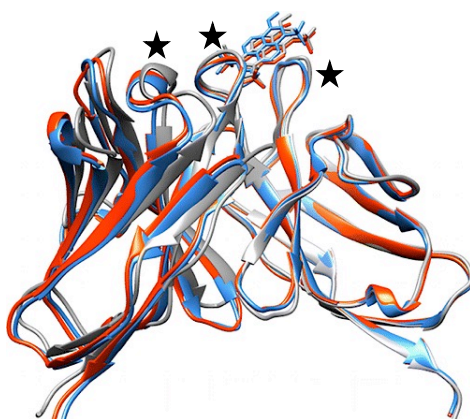


Figure 8. Organisation spatiale des régions CDR.

Schéma représentant la superposition de la structure 3D d'anticorps anti-MPTS après maturation d'affinité. Les régions charnières sont superposables. C'est au niveau des boucles des CDR que l'on trouve la plus grande variabilité. Les étoiles représentent les boucles de CDR. (MPTS : 8-méthoxy-pyrène-1,3,6-trisulfonate ; CDR : complementary determining region). (Adapté de Adhikary et al., 2015).

b. Le locus lambda ($Ig\lambda$)

Le locus lambda est beaucoup moins conséquent, il ne fait que 200 kilobases (kb) et son organisation est différente des loci décrits précédemment. Il existe deux groupes de gènes V-J-C (Variable-Jonction-Constant) (**Figure 5C**). Le premier est constitué de deux segments variable (V_2 et V_3) associés à un segment de jonction (J_2) puis à un segment constant (C_2). Le second groupe contient un segment variable (V_1) suivi des segments de jonction et constant J_3C_3 puis des segments J_1C_1 (Bossen et al., 2012). On trouve également entre ces régions des segments non fonctionnels, tels que 2 segments de jonctions et un segment constant.

Chez la souris, les chaînes légères codées par le locus lambda sont très peu représentées dans la constitution des anticorps. En effet, 95% des anticorps sériques sont de type κ .

4- Les régions hypervariables et diversité antigénique

Le BCR se met en place suite à un processus complexe de recombinaisons somatiques permettant d'associer les différents segments composant les régions variables. Cette variabilité est complétée par un autre processus, l'hypermutation somatique (SHM), permettant d'améliorer l'affinité des anticorps vis à vis de l'antigène cible (**Figure 6**). L'ensemble de ces processus permettrait, en théorie, la génération d'un répertoire immense comprenant plus de 10^{15} Ig. Sur l'ensemble de la région variable d'un anticorps (V_H et V_L associés) la variabilité n'est pas distribuée équitablement. En effet, au niveau de ces régions variables, l'antigène va être reconnu mais la spécificité antigénique repose sur une structure complémentaire de celle de l'antigène, les CDR (Complementary Determining Regions). Les CDR sont en réalité des régions hypervariables au nombre de trois pour chaque segment variable (V_H ou V_L) et parmi lesquelles se trouvent des régions « charpentes » présentant moins de variabilité (**Figure 7**) (Lara-Ochoa et al., 1994). L'association d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère permet le rassemblement des CDR de chaque domaine. Bien que légèrement éloignées sur la séquence, ces régions hypervariables se retrouvent être très proches spatialement après le repliement protéique afin de former le site d'interaction avec l'antigène (**Figure 8**) (Adhikary et al., 2015).

La mise en place de la réaction immunitaire nécessite que la cellule s'engage dans un certain nombre d'événements strictement contrôlés. En effet, les locus des gènes d'Ig en l'état (en configuration germinale) ne permettent pas la production de protéines fonctionnelles. C'est seulement au cours de l'ontogénie B que vont s'opérer des modifications géniques. Ces processus se produisent à des temps différents du développement B. Le premier a lieu au cours de la phase précoce au sein de la moelle osseuse. Il consiste en un rapprochement d'un segment de chaque type (Variable, Diversité et Jonction) pour former un unique segment VDJ pour la chaîne lourde ou VJ pour la chaîne légère (**Figure 9**). Les autres processus ont lieu au cours de la phase tardive du développement dans les organes lymphoïdes secondaires. L'un, nommé CSR (pour Class

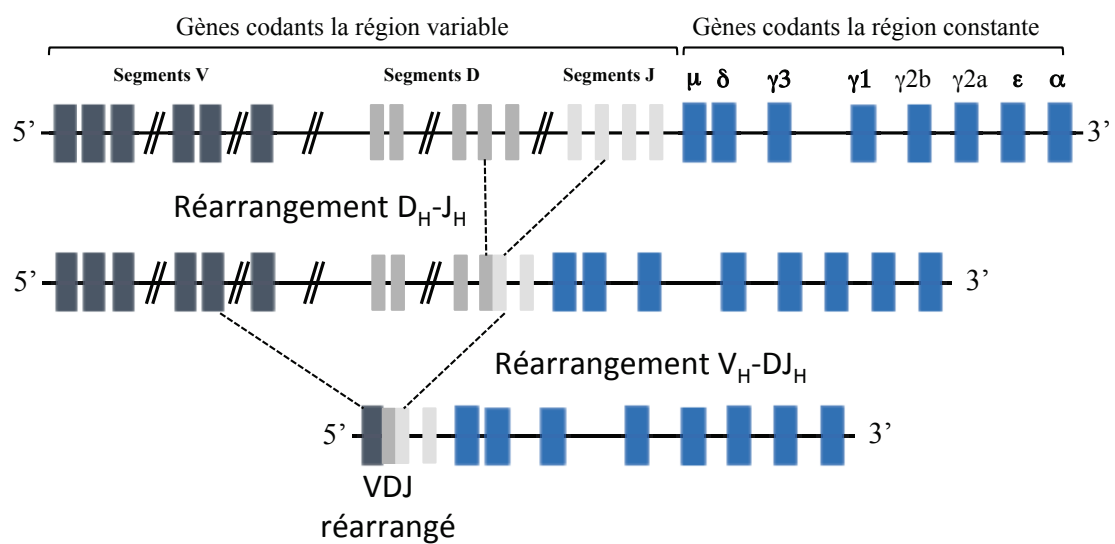


Figure 9. Principe de la recombinaison VDJ au locus IgH lors de la phase précoce de l'ontogénie B dans la moelle osseuse.

Synthèse bibliographique – Chapitre 1 - Structure des immunoglobulines

Switch Recombination), permet de changer l'isotype de l'immunoglobuline synthétisée par une recombinaison de classe au sein des gènes constants (**Figure 10B**), l'autre processus étant la SHM évoquée précédemment (**Figure 10A**).

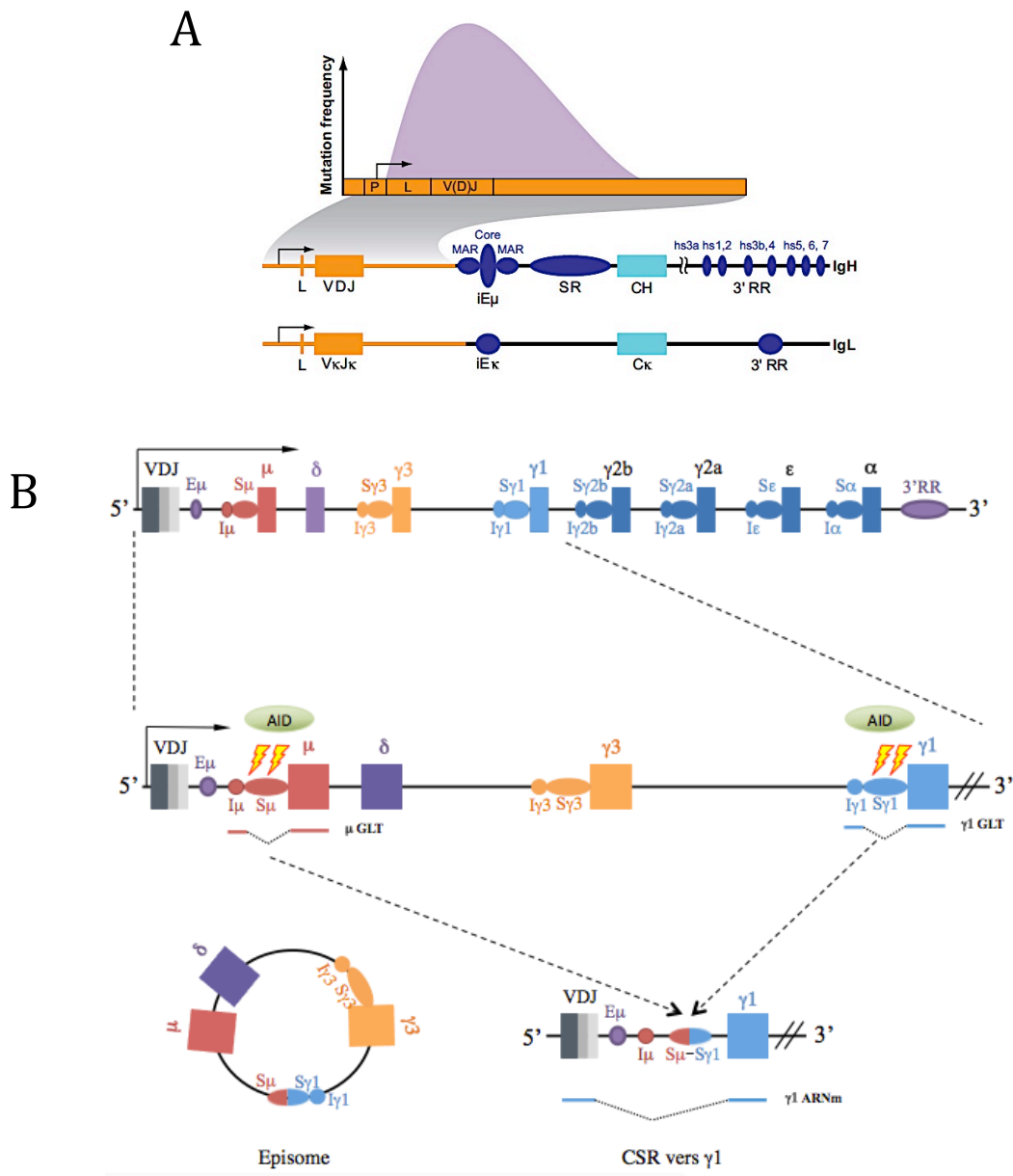


Figure 10. Profil d'hypermutation somatique et schéma de la recombinaison de classe au cours de la phase tardive du développement

A. Le profil et la fréquence de mutations au locus κ et IgH sont indiqués sur ce dessin (violet). Les mutations s'accumulent de 100 à 200 pb en aval du site d'initiation de la transcription jusqu'à environ 2 kpb après le site d'initiation. B. La recombinaison a lieu entre deux régions switch, ici les régions μ et γ 1. AID (vert) crée des lésions au niveau des régions switch. Ces lésions nécessitent la transcription germinale (GLT) des régions switch devant être réarrangées. Ces lésions vont induire la formation de cassures doubles brins, puis la formation d'une jonction entre les deux régions switch. Le fragment d'ADN situé entre ces deux régions switch est éliminé sous forme d'un épisode. Après la commutation de classe, un ARN messager est initié à partir du promoteur V (γ 1 ARNm). La flèche indique le site d'initiation de la transcription. L : leader ; V(D)J : région variable V ; SR : région switch ; 3'RR : Région Régulatrice en 3' ; MAR : Matrix Attachment Region. (Extrait de Peled et al., 2008).

Chapitre 2- Ontogénie et fonction des sous-ensembles de cellules B

La production d'Ig soluble s'opère au stade ultime (plasmocyte) de développement du lymphocyte B et nécessite le passage par de nombreuses étapes orchestrées par un programme bien défini.

1- Généralités sur la lymphopoïèse B

Les lymphocytes B sont produits à partir de cellules pluripotentes plus connues sous le nom de cellules souches hématopoïétiques HSC (pour Hematopoietic Stem Cells) (**Figure 11**). Initialement, l'ontogénie B débute dans le foie fœtal avant la naissance, puis se poursuit dans la moelle osseuse après la naissance. Au cours de ce processus finement régulé, de nombreux acteurs interviennent dont des facteurs trophiques solubles et membranaires. Au cours du développement B, les cellules vont circuler dans plusieurs organes, et rencontrer des microenvironnements différents. Ces environnements plus connus sous le nom de « niche » ont plusieurs rôles. Ils vont apporter des facteurs spécifiques selon le stade de développement cellulaire et ceux-ci auront pour effet d'engager ces cellules dans des programmes de prolifération ou de différenciation. De plus, ces niches servent également de support à l'hématopoïèse et au développement B (**Figure 12**) (Nagasawa, 2006; Wilson and Trumpp, 2006). Il est bien entendu nécessaire que l'ensemble des acteurs engagés dans le développement B coopère pour assurer une ontogénèse saine.

Afin de comprendre les différentes étapes du développement du système immunitaire, notamment la prolifération, la différenciation et la sélection, il est nécessaire de connaître les différents stades du développement de ces cellules. Plusieurs nomenclatures ont été jusqu'à présent établies. Bien que les termes utilisés pour définir les populations de cellules soient différents, les données de ces nomenclatures convergent vers le même schéma de développement (Osmond et al., 1998). L'équipe d'Osmond a établi une nomenclature en fonction de l'expression des molécules impliquées dans la formation d'une IgM. Une autre équipe s'est appuyée sur le statut de réarrangement des gènes d'Ig pour construire son schéma de développement B (Rolink and Melchers, 1993; Melchers et al., 2000). Une dernière équipe a caractérisé l'ontogénie B selon différentes fractions cellulaires. Ces fractions se distinguent les unes des autres par plusieurs points : l'expression de molécules de surface, le statut de réarrangement de gènes d'Ig ou encore la dépendance des cellules au stroma médullaire et aux molécules de stimulation (Hardy et al., 1991).

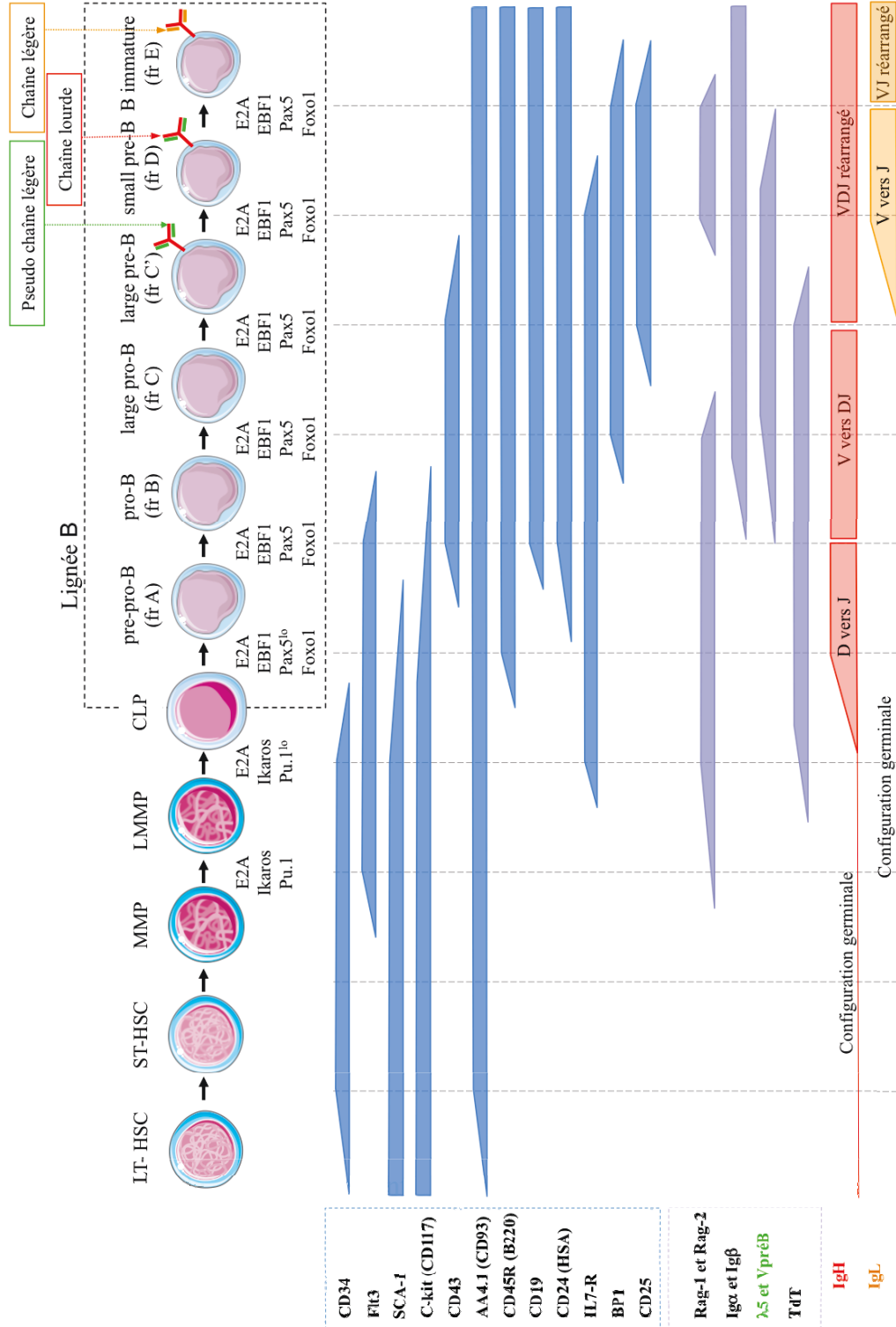


Figure 11. Schéma général de l'ontogénie B au sein de la moelle osseuse.

Les stades de développement sont définis selon la configuration des gènes d'immunoglobulines (rouge et jaune), l'expression de marqueurs membranaires (bleu), l'expression de marqueurs intracellulaires (violet), la présence de facteurs de transcriptions spécifiques. LT : long-term ; ST : short-term ; HSC : Hematopoietic Stem Cells ; MMP : Multipotential Progenitors ; LMPP : Lymphoid-primed multipotential progenitors ; CLP : Common Lymphoid Progenitors ; Fr : Fraction ; TdT : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. (*Inspiré de* : Nutt et al., 1999; Miosge and Goodnow, 2005; Wilson and Trumpp, 2006; Nagasawa, 2006; Hardy et al., 2007; Månsson et al., 2007; Mansson et al., 2010; Miyazaki et al., 2014).

2- La moelle osseuse : berceau du développement B précoce

Une lymphopoïèse B saine se caractérise par l'addition de plusieurs événements : (1) un environnement stromal adapté aux cellules, (2) l'exécution d'un programme génétique ordonné (activation de facteurs de transcription, modifications épigénétiques, présence de repliements, positionnement nucléaire, réarrangements géniques), (3) l'expression de marqueurs membranaires, (4) l'expression et les signaux du BCR. L'avancement dans la différenciation B s'accompagne de changements dans la nomination des cellules. En effet, les CLP (pour Common Lymphoid Progenitors) se différencient en pré-pro-B (fraction A) jusqu'au stade immature avant de quitter la moelle osseuse.

a. L'environnement stromal

Bien que les HSC de la moelle osseuse soient à l'origine de la lignée B, elles sont également impliquées dans le développement d'autres lignées du système immunitaire telles que celles des lymphocytes T, des macrophages ou des cellules NK (pour Natural Killer) (Seita and Weissman, 2010). La progression dans le développement B n'est pas clairement cloisonnée, on parle plutôt de *continuum*. En effet les cellules ne sont pas fixées durant les stades : selon les signaux reçus, elles s'engagent progressivement dans un processus de différenciation. Il existe cependant une hiérarchie au cours du développement B basée sur l'expression par les cellules de molécules et/ou sur le statut génique (réarrangement des locus d'Ig). Au sein de la moelle, il existe plusieurs types cellulaires pour passer du stade HSC aux cellules de la lignée B. Ces cellules perdent progressivement certaines capacités, notamment leur pluripotence. Les HSC, plus précisément les HSC à longue durée de vie, donnent naissance aux HSC à courte durée de vie qui deviennent elles-mêmes des progéniteurs hématopoïétiques multipotents (MPP). Ces cellules vont ensuite se différencier en LMMP (Lymphoid-primed multipotential progenitors) puis en CLP (**Figure 11**). Ceux-ci peuvent ensuite s'engager dans la lignée B. Toutes ces cellules sont identifiables en fonction de l'expression de marqueurs spécifiques.

Des méthodes de cocultures ont permis d'identifier des facteurs solubles indispensables au développement des précurseurs des cellules du lignage B. On trouve notamment des chemokines (molécules ayant un impact sur la migration des cellules), et des cytokines (molécules influençant les fonctions des cellules). Actuellement les facteurs solubles indispensables identifiés sont CXCL12 (CXC-chemokine ligand 12) et son récepteur CXCR4 (CXC-chemokine receptor 4) (Nagasawa et al., 1996; Tokoyoda et al., 2004; Sugiyama et al., 2006), FLT3L (Fms-related tyrosine kinase 3 Ligand), IL-7 (interleukine 7), RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand), SCF (Stem-cell factor) (Wilson and Trumpp, 2006; Welner et al., 2008).

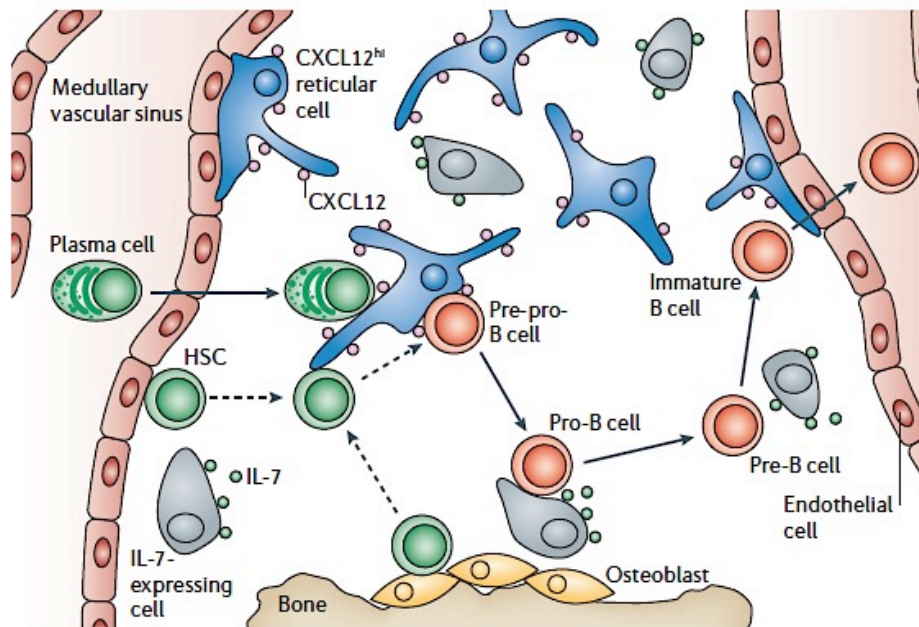


Figure 12. Modèle du développement B dans la moelle osseuse.

Ce modèle montre quelles pourraient être les cellules résidentes de la moelle osseuse impliquées dans le développement B et les mouvements opérés par les précurseurs B au sein de la niche stromale. (CXCL12 : CXC-chemokine ligand 12 ; HSC : Hematopoïetic Stem Cell ; IL-7 : Interleukine-7) (*adapté de Nagasawa, 2006*).

b. Les réarrangements géniques au cours du développement B précoce

- **Les réarrangements V(D)J**

Les réarrangements précoces des gènes d'Ig sont strictement contrôlés et régulés, ils s'opèrent selon un ordre précis. Ces processus, connus sous le nom de recombinaisons V(D)J, sont dépendants de l'action des enzymes RAG-1 et RAG-2 (Recombination Activating Genes 1 et 2). Tous les segments V, D et J sont flanqués d'une séquence signal de recombinaison (RSS) (**Figure 13**). Ces RSS sont constituées de séquences hautement conservées comprenant une séquence heptamérique (CACAGTG) et une nonamérique riches en A-T (ACAAAACC) séparées par un « espaceur » moins conservé de 12 à 23 paires de bases (Schatz and Ji, 2011). Le complexe enzymatique incluant les produits des gènes *Rag* lie et clivent l'ADN au niveau de ces RSS. La recombinaison se produit selon la règle 12/23 *i.e* entre une RSS contenant un espaceur de 12 pb et une RSS contenant un espaceur de 23pb (**Figure 14**). Or, les segments V, D, J ne sont pas constitués par les mêmes RSS. Les segments V et J portent une RSS avec un espaceur de 23pb alors que les segments D ont une RSS (de part et d'autre de chaque segment) contenant un espaceur de 12 pb. Cette configuration permet des réarrangements ordonnés. Sur le locus de chaîne lourde, un segment D_H va réarranger avec un segment J_H , puis un segment V_H va réarranger sur le segment DJ_H déjà réarrangé. La règle 12/23 empêche qu'un segment V_H s'associe à un segment J_H . Sur le locus des chaînes légères, il existe également un processus de recombinaison permettant d'associer un segment V_L sur un segment J_L .

Ce mécanisme de ligature/réparation des recombinaisons V(D)J nécessite le recrutement d'un certain nombre de facteurs spécifiques, notamment les facteurs du système de réparation NHEJ (Non Homologous Eng joining) (**Figure 15**).

- **Le réarrangement au locus IgH, pré-BCR et exclusion allélique**

L'expression des protéines de la famille RAG est obligatoire lors du réarrangement V(D)J. Les réarrangements D_H vers J_H ne sont pas exclusifs aux cellules du lignage B, ce processus a également lieu dans les cellules du lignage T. En revanche, la seconde étape permettant le réarrangement d'un segment V_H sur un DJ_H déjà réarrangé est spécifique à la lignée B. La recombinaison D_H vers J_H débute au stade pré-pro-B puis le réarrangement se poursuit et se termine au stade pro-B (fraction B) par la recombinaison V_H vers DJ_H (**Figure 9**). Etant donné la longueur de la région codant les segments V_H , on peut se demander si ces segments sont utilisés à la même fréquence. Il a été démontré que les segments proximaux (au voisinage des segments D_H sur le locus IgH) sont utilisés plus fréquemment que les segments distaux (Yancopoulos et al., 1984). Les travaux sur les populations B immatures et matures ont montré que les réarrangements D_H vers J_H se produisent quasi-simultanément sur les deux allèles alors que les réarrangements suivants de V_H vers DJ_H sont séquentiels et finement régulés.

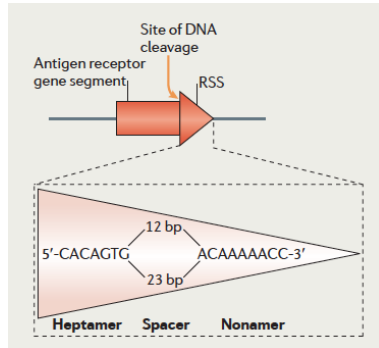


Figure 13. Les séquences signal de recombinaison (RSS).

Les RSS sont disposées à chaque segment V, D et J. Elles sont constituées de 2 types de séquences hautement conservées (heptamères et nonamères) séparées par 12 ou 23 paires de bases) (*extrait de Schatz and Ji, 2011*).

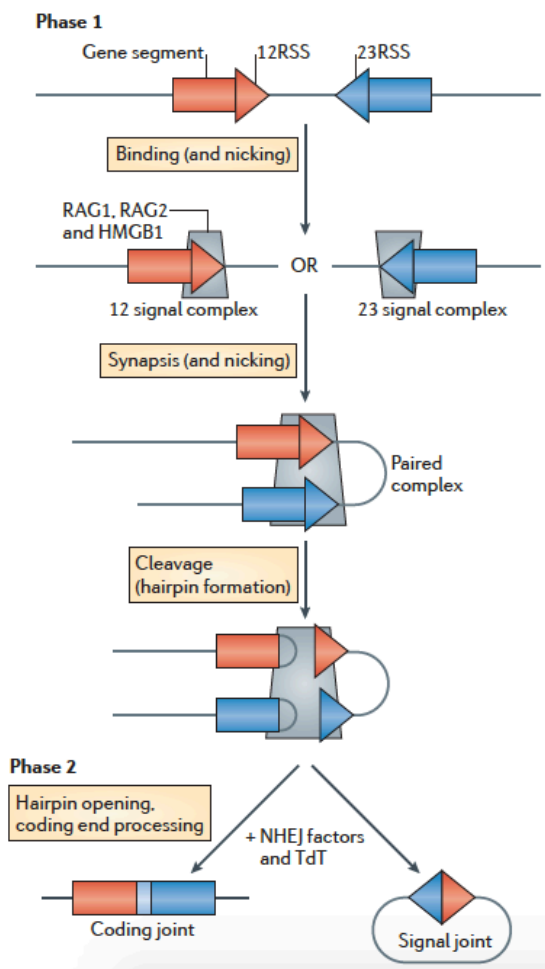


Figure 14. Mécanisme de la recombinaison V(D)J.

Lors de la première phase de la recombinaison V(D)J. Un complexe RAG-1, RAG-2, HMGB1 se fixe au niveau de chaque RSS pour former une « synapse ». Les enzymes RAG introduisent des cassures doubles brins. Les RAG collaborent ensuite avec le système de réparation NHEJ pour recoller les extrémités avec élimination des RSS (signal joint) d'une part et rapprochement d'un segment D vers J ou V vers DJ d'autre part (coding joint). (RSS : Recombination Signal Sequence; RAG: Recombination Activating Genes ; HMGB1 : High Mobility Group Protein B1 ; NHEJ : Non Homologous End Joining ; TdT : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase). (*Extrait de Schatz and Ji, 2011*).

Un réarrangement est dit « productif » si le cadre de lecture de l'exon VDJ réarrangé est respecté et permet l'expression d'une chaîne lourde μ à la surface de la cellule. Dans le cas contraire (exon VDJ « hors phase ») on parle de réarrangement « non productif ».

Environ 30% des réarrangements V_H vers DJ_H sont productifs (**Figure 16**). Dans cette situation le réarrangement sur le second allèle n'a pas lieu. Cependant cette situation n'est pas la plus fréquente. Si le réarrangement V_H vers DJ_H est non productif, le second allèle réarrange à son tour (Alt et al., 1984). De la même manière, un réarrangement productif permet à la cellule de poursuivre son développement. En revanche si aucun des deux réarrangements n'est productif, la cellule sera éliminée par apoptose (Rajewsky, 1996).

Cette chaîne lourde s'associe à une pseudo chaîne légère constituée des protéines $V_{\text{pré-B}}$ (CD179a) et $\lambda 5$ (CD179b) et est associée aux molécules de transduction du signal $Ig\alpha$ (CD79a) et $Ig\beta$ (CD79b) pour former le pré-BCR qui, exprimé à la surface, contrôle la transition du stade pro-B à pré-B (**Figure 11**). Le signal donné par la liaison du pré-BCR à son ligand la Galectine 1 (Espeli et al., 2006) induit la prolifération des grandes cellules pré-B (fraction C') qui deviennent ensuite de petites cellules pré-B (fraction D). Afin d'éviter qu'une cellule produise deux chaînes lourdes différentes à partir des deux loci, la signalisation par le pré-BCR impose une exclusion allélique *i.e* que seule une chaîne lourde sera exprimée à partir d'un locus IgH réarrangé (Jung et al., 2006). Les mutations empêchant l'association entre le pré-BCR et les protéines transmembranaires court-circuitent le phénomène d'exclusion allélique.

Pendant la phase de prolifération, les gènes *Rag* sont temporairement dérégulés, puis après la phase de prolifération, les RAG sont de nouveau surexprimés pour permettre le réarrangement de la chaîne légère selon la même règle 12/23. Si le réarrangement de la chaîne légère est productif, cette dernière s'exprime et s'associe à la chaîne lourde pour former un BCR composé d'IgM. L'expression du BCR est un point critique du développement B, en délivrant notamment les signaux de survie et de maturation. Son expression induit également un rétrocontrôle négatif pour bloquer les éventuels réarrangements des autres allèles des chaînes légères.

Avec l'expression d'un BCR fonctionnel de type IgM, les cellules passent au stade B immature (fraction E). A ce stade, certains marqueurs ne sont plus exprimés, tel que BP1 ou CD25. Avant de quitter la moelle osseuse pour se diriger vers les organes lymphoïdes périphériques, ces cellules vont subir une sélection négative. Ce point de contrôle est essentiel. En effet, les recombinaisons amènent parfois à la création d'un BCR dit « auto-réactif » *i.e* qui reconnaît des éléments du soi. A ce stade, ces BCR potentiellement dangereux pour l'organisme induisent un signal intracellulaire qui peut conduire à l'apoptose (sélection négative). Dans certains cas, ce signal induit de nouvelles recombinaisons, en particulier aux loci des chaînes légères, qui peuvent conduire à l'expression de nouvelles chaînes et donc d'un nouveau BCR compatible avec les éléments du soi. Ce mécanisme de « récupération », est connu sous le nom de « receptor editing » (édition du BCR) ; il permet de « sauver » une cellule B auto-réactive en modifiant sa spécificité antigénique. Si ce processus se révèle infructueux pour la cellule, elle est alors éliminée par apoptose.

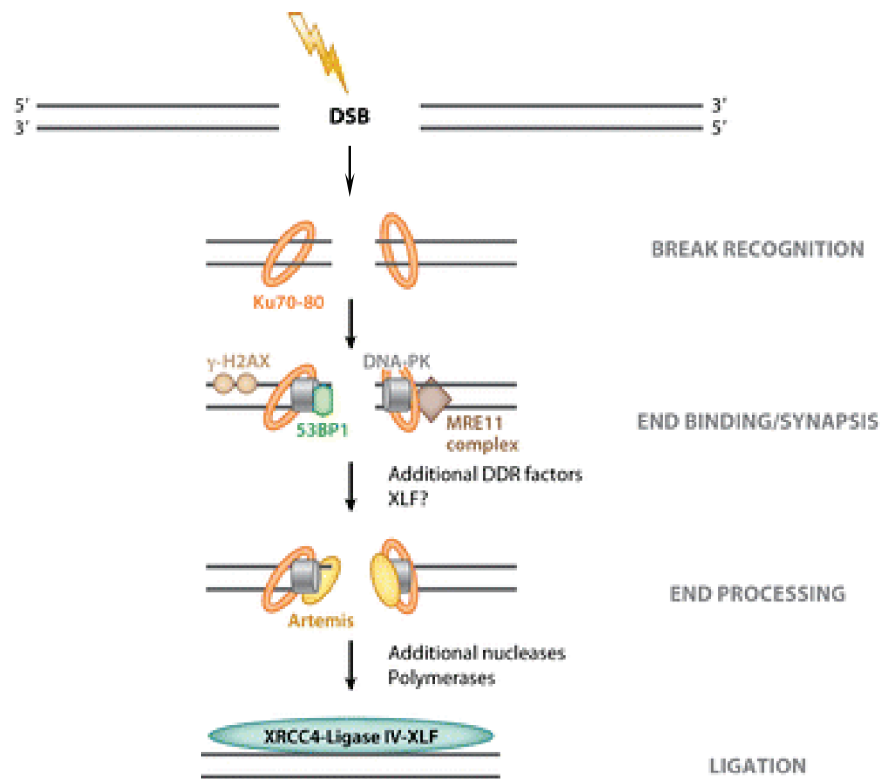


Figure 15. Principe de la réparation des cassures par le système NHEJ lors des réarrangements V(D)J.

Les cassures sont reconnues par l'hétérodimère Ku70/Ku80. Ce complexe permet le recrutement d'autres facteurs, tels que DNA-PK et Artemis. Ensuite le processus de réparation se termine grâce au complexe de ligature XRCC4-ligase IV, et XLF. (NHEJ : non homologous end-joining ; DNA-PK : DNA-dependent protein kinase ; XRCC4 : X-ray repair cross complementing protein 4 ; XLF : XRCC4 like factor également appelé cernunnos). (Schéma adapté de Deriano and Roth, 2013).

c. L'activation d'un programme génétique spécifique

Bien que de nombreux facteurs de transcription participent à la lymphopoïèse B, seuls quelques-uns sont essentiels. Après le stade CLP, les cellules se spécialisent pour s'engager dans la lignée B. L'avancement vers le lignage B nécessite l'expression de facteurs de transcription spécifiques tels que E2A (E box protein Binding 2A), IKAROS (Georgopoulos et al., 1994), PU.1 (Purine box factor -1), EBF-1 (early B cell Factor-1), BSAP (B cell specific activator protein) codée par le gène *Pax5* (Paired box 5) (Nutt et al., 1999; Miyazaki et al., 2014). Ces facteurs forment le cœur de la machinerie de transcription permettant la progression dans le lignage B et suppriment également l'expression de facteurs associés à un autre lignage. L'absence d'un ou plusieurs de ces facteurs de transcription se traduit généralement par une altération importante du développement B.

PU.1 codé par le gène *spil* est un facteur de transcription nécessaire pour la génération des lignées myéloïdes et lymphoïdes (Scott et al., 1994). Le développement de l'une ou l'autre de ces lignées est conditionné par le niveau d'expression de PU.1 dans ces cellules (DeKoter and Singh, 2000). Son action est dose dépendante.

Le facteur de transcription IKAROS appartenant à la famille des protéines en doigt de zinc est codé par la gène *Ikzf1* ; il est essentiel pour la génération de toutes les lignées lymphoïdes (Georgopoulos et al., 1994). Chez les souris où l'on a ciblé *Ikzf1*, le développement B est bloqué à un stade très précoce. L'absence d'*Ikzf1* dans ces modèles murins se traduit par un défaut d'expression des enzymes RAG1, RAG2 et TdT¹ (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase). De plus, des recombinaisons D_H vers J_H sur locus IgH sont détectées, alors que les recombinaisons V_H vers DJ_H sont inexistantes. L'absence de ce réarrangement induit le blocage des cellules au cours de l'ontogénie B (Reynaud et al., 2008). De même dans ce modèle, il semblerait que les transcrits germinaux initiés au niveau des VJ558 soient moins représentés et selon l'hypothèse de l'accessibilité du locus (*cf.* Chapitre 2, d.), cette baisse est cohérente avec l'absence de réarrangement de V_H vers DJ_H. IKAROS aurait donc une influence sur l'accessibilité des segments V_H (notamment VJ558) lors de la recombinaison (Reynaud et al., 2008). De plus, l'équipe de Busslinger a récemment démontré qu' IKAROS est requis pour permettre la transition de pro-B vers pré-B (Schwickert et al., 2014).

La génération de souris dépourvues du gène codant E2A a montré l'importance de ce facteur de transcription au cours du développement et de la fonction des cellules B. En effet, ces souris sont totalement dépourvues de cellules B. L'absence de cellules exprimant le CD45R (B220) et de recombinaison V(D)J montre que le développement B est arrêté à un stade très précoce. En absence de E2A ou EBF-1, le développement B s'arrête avant même le réarrangement DJ_H. De plus, la suppression conditionnelle de E2A au stade pré-B n'induit pas une réduction dramatique de l'expression de V_{préB} ou $\lambda 5$ par exemple (Ye and Graf,

¹ L'enzyme TdT ajoute des nucléotides de manière aléatoire au niveau des jonction lors des réarrangement des segments V, D et J.

Synthèse bibliographique – Chapitre 2 - Ontogénie et fonction des sous-ensembles de cellules B

2007). Ceci suggère que E2A est nécessaire pour l'initiation de l'expression des gènes spécifiques aux cellules B mais qu'il n'est pas indispensable au maintien de cette expression.

EBF-1 est un des facteurs clé de la régulation du développement B. Impliqué à plusieurs niveaux, il active ou réprime certains gènes. Les modèles de KO (Knock out) conditionnel apportent des réponses quant à son implication dans le développement B précoce, la prolifération, et la survie des cellules. Les facteurs de transcription E2A et EBF-1 contrôlent l'étape initiale du réarrangement D_H vers J_H en activant l'expression des gènes *Rag* et en facilitant l'accès aux régions D_H et J_H au locus IgH (Goebel et al., 2001).

D'autres facteurs de transcription ont récemment été identifiés, tel que FOXO1 (forkhead box O1). Ce régulateur transcriptionnel est impliqué dans la régulation de l'expression des gènes *Rag* et du récepteur α de l'IL-7 (IL7R α) (Dengler et al., 2008). Certains progéniteurs B nécessitent le facteur de transcription c-MYC qui module la croissance cellulaire, la survie et l'expansion des fractions C et C' du développement (Vallespinós et al., 2011) (**Figure 11**).

PAX5 est l'un des premiers facteurs de liaison à l'ADN qui fut identifié et qui interagit avec les loci de chaîne lourde et de chaîne légère κ . Il fait partie d'une famille de neuf facteurs de transcription aussi appelée famille « paired domain » à cause de sa structure divisée en deux sous-domaines (Czerny et al., 1993). PAX5 également appelé BSAP est le seul exprimé dans les cellules hématopoïétiques. Son implication au cours du développement B est essentielle (Nutt et al., 1999). En effet chez les animaux déficients, le développement B est arrêté entre le stade pré-pro-B et pro-B (Cobaleda et al., 2007). Les cellules bloquées sont incapables d'exprimer des facteurs B spécifiques tels que CD79a ou CD19. Son absence a également démontré son implication au cours de la recombinaison V_H vers DJ_H avec notamment une perte très importante de l'utilisation des V_HJ558 (Nutt et al., 1997).

Les études sur le facteur de transcription YY1 (Yin Yang 1) ont indiqué que l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans l'accessibilité engendre un taux de transcription normal. En revanche, en son absence, les réarrangements V_H vers DJ_H sont affectés, ce qui suggère donc que YY1 joue un rôle important au stade pro-B (Liu et al., 2007a).

L'ensemble de ces facteurs de transcription est en réalité inclus dans une boucle de régulation où chacun contrôle plus ou moins l'expression de l'autre, parfois en synergie. Cette régulation pourrait sembler chaotique, cependant les dernières études montrent que cette régulation s'organise dans le temps et dans l'espace (Boller and Grosschedl, 2014). Pour exemple, E2A et FOXO1 agissent ensemble pour activer EBF-1 ; E2A, FOXO1 et EBF-1 activent ensemble l'expression de PAX5 afin d'établir l'engagement dans le lignage B (Miyazaki et al., 2014). Les analyses globales du génome sont nécessaires pour comprendre comment ces facteurs de transcriptions dialoguent afin de maintenir l'identité B.

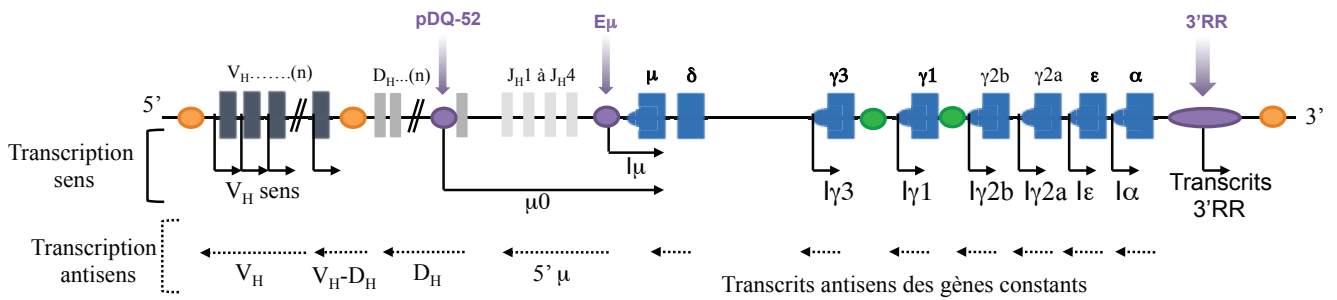


Figure 17. Transcrits germinaux au locus IgH pendant l'ontogénie B

De nombreux transcrits germinaux sont présents tout au long du développement B. Les transcrits sens sont indiqués par des flèches pleines dirigées vers la droite. Les transcrits antisens sont orientés vers la gauche et schématisés par des flèches en pointillés. Dans les segments V_H , D_H et J_H , les transcrits précèdent le réarrangement de la région variable. Après l'assemblage VDJ, des transcrits sens et antisens aident au ciblage d'AID lors de la SHM et la CSR. Des transcrits sens sont également décrits dans la 3'RR.

d. Accessibilité et modifications épigénétiques au locus IgH

- **Les transcrits germinaux**

Pour expliquer l'ordre et la séquence des réarrangements VDJ, Alt a émis l'hypothèse que les régions qui doivent recombiner soient accessibles. Cette « accessibilité » repose sur la découverte de transcrits dits « germinaux » ou « stériles » au niveau des régions qui vont recombiner. Ces transcrits germinaux épissés mais non codants sont détectables uniquement au moment où ces régions recombinent. Ils permettraient « l'ouverture de la chromatine » aux enzymes impliquées dans le réarrangement (Yancopoulos and Alt, 1985; Alt et al., 1992). Ces premiers transcrits germinaux « sens », décrits dans les loci d'Ig, débutent à partir de promoteurs en amont des segments V_H , D_H et J_H et leur profil d'expression coïncide avec l'accessibilité de ces éléments (Yancopoulos and Alt, 1985). Plus récemment, des transcrits germinaux « antisens » ont été détectés à proximité des segments V_H non réarrangés dans des régions géniques ou intergéniques (**Figure 17**). Ces transcrits sont présents au stade où les cellules n'ont pas encore réalisé la recombinaison D_H vers J_H ou V_H vers DJ_H . En revanche, dans les cellules comprenant un segment VDJ réarrangé ces transcrits ne sont pas détectés (Bolland et al., 2004, 2007; Perlot and Alt, 2008). Le site d'initiation est imprécis et la fonction de ces transcrits « antisens » n'est pas clairement établie, mais il a été proposé qu'ils participent activement à l'accessibilité des régions destinées à recombiner. Ces transcrits « antisens » pourraient limiter des recombinaisons trop précoces des segments V_H jusqu'à ce que le réarrangement DJ_H soit terminé. Ils seraient alors produits aux dépens de transcrits sens qui eux faciliteraient la recombinaison. Cette transcription ouvrirait la région des segments V_H pour faciliter le réarrangement.

Au locus IgH, les premiers transcrits non codants sont générés avant la recombinaison D_H vers J_H et sont initiés à partir de l'activateur intronique E_μ (transcrit I_μ) et du promoteur pDQ52 situé en amont du dernier segment D_H (transcrit $\mu 0$). Après la recombinaison DJ_H , des transcrits non codants sont initiés dans les segments V_H (Corcoran, 2010) (**Figure 17**).

- **Les modifications de la chromatine**

Étymologiquement, « épi » signifie « sur » en Grec. L'épigénétisme décrit donc tout changement sur la séquence d'ADN qui influence le développement d'un organisme. Ces modifications incluent la méthylation de l'ADN, la modification des histones, la transcription non codante, le remodelage chromatinien, la position nucléaire et les boucles de chromatine.

L'ADN des eucaryotes est compacté sous forme de nucléosomes dans lesquels l'ADN génomique est enroulé autour de structures protéiques : les histones. La partie aminoterminale ou queue des histones peut porter plusieurs types de modifications (e.g., méthylation, acétylation, phosphorylation etc.). Ces modifications sont à l'origine de l'état de la chromatine à savoir active ou inactive.

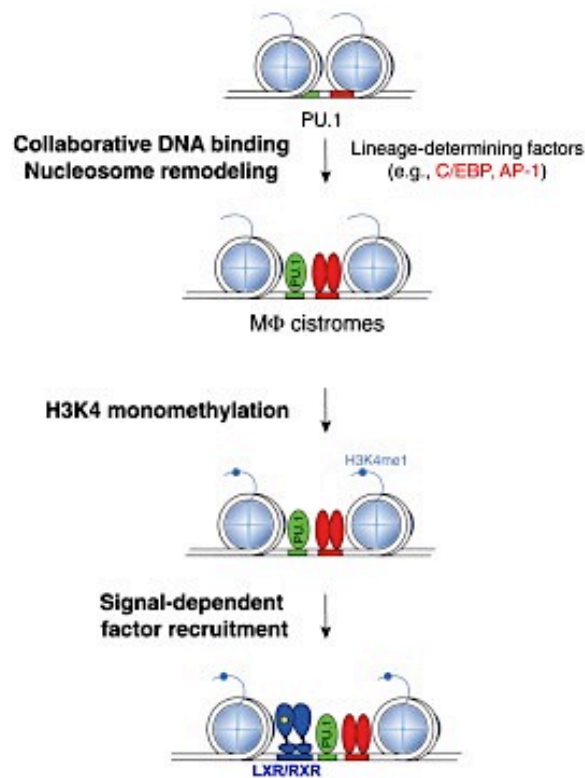


Figure 18. Modèle du recrutement de facteurs de transcription induit par PU.1.

Ce modèle propose que des facteurs spécifiques se fixent dans des régions régulatrices. Ici la fixation de PU.1 induit une monométhylation de l'histone H3 sur la lysine 4 (H3K4me1). Ce remodelage des nucléosomes favorise l'accessibilité de la région à d'autres facteurs de transcription. L'ensemble de ces facteurs *trans* coopèrent pour induire des éléments régulateurs en *cis* nécessaires au développement et à la fonction des cellules B. (extrait de Heinz et al., 2010)

Synthèse bibliographique – Chapitre 2 - Ontogénie et fonction des sous-ensembles de cellules B

Un des exemples remarquable du rôle de l'épigénétisme est le réarrangement au locus IgH. Ce locus n'est jamais entièrement recombinaison dans les cellules T à cause de la région contenant les segments V inaccessible au complexe RAG dans les cellules T. Ce manque d'accessibilité est dû à la présence de modifications répressives d'histones et de la séquestration de cette région à la périphérie nucléaire (Kosak et al., 2002). Des études récentes ont montré que les facteurs de transcription impliqués dans la détermination des lignages s'associaient préférentiellement dans des régions du génome présentant des marques chromatiniques spécifiques du type cellulaire. Ces marques correspondent à des modifications des histones de type méthylation ou acétylation sur des résidus lysine (Heintzman et al., 2007).

L'état fonctionnel de la chromatine peut être modifié par deux mécanismes épigénétiques distincts : la méthylation de l'ADN et la modification de certains résidus sur les histones. La méthylation de l'ADN est fréquemment associée à de la chromatine inactive. Concernant les histones, les modifications les plus fréquentes sont la méthylation et l'acétylation de résidus lysine. Ainsi, de la chromatine active est associée à l'acétylation des histones H3 et H4 avec par exemple, l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27ac) ainsi que la diméthylation ou triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me2 ou H3K4me3) (Heintzman et al., 2009). Les régions des activateurs transcriptionnels (à l'état actif) présentent fréquemment des histones mono ou diméthylés sur l'histone H3, l'acétylation de la lysine 27 (H3K27ac) est également une marque d'activation de ces «enhancers» (Kolovos et al., 2012). En revanche, les marques de types H3K9me, H3K27me3 ou l'hypoacétylation sont fréquemment associées avec des gènes inactifs (Bossen et al., 2012). La diméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 (H3K9me2) est également connue pour être une modification de la chromatine de type répressive.

Le facteur PU.1 agit comme un facteur de transcription initiateur au cours du développement B en induisant des changements dans la structure de la chromatine. En effet, la fixation de PU.1 induit une monométhylation de l'histone H3 (H3K4me1) (**Figure 18**) (Heinz et al., 2010) et aiderait la fixation d'autres facteurs de transcription. Cette fixation est conditionnée par ces marques épigénétiques. Ainsi E2A, EBF-1 et FOXO1 occupent des régions où les histones sont principalement monométhylées (H3K4me1) (Lin et al., 2010). EBF-1 se fixe préférentiellement sur des régions dont les histones présentent des marques du type H3K4me2 (Boller and Grosschedl, 2014).

La déméthylation de l'ADN est également nécessaire lors de l'assemblage de la région variable (Mostoslavsky et al., 1998). En présence de cette modification les recombinaisons VDJ au locus sont inhibés (Johnson et al., 2004). Au cours des réarrangements le locus IgH est activé par étapes et il semble que les marques d'hyperacétylation soient un prérequis (McBlane and Boyes, 2000; Chowdhury and Sen, 2001). Ces marques épigénétiques sont un prérequis pour le recrutement des enzymes RAG après le réarrangement DJ_H (Subrahmanyam et al., 2012). Dans les cellules pro-B les histones sont hyperacétylés à proximité des segments D_H lorsque le réarrangement DJ_H a lieu, contrairement aux segments V_H qui sont hypoacétylés. Ensuite après la recombinaison DJ_H,

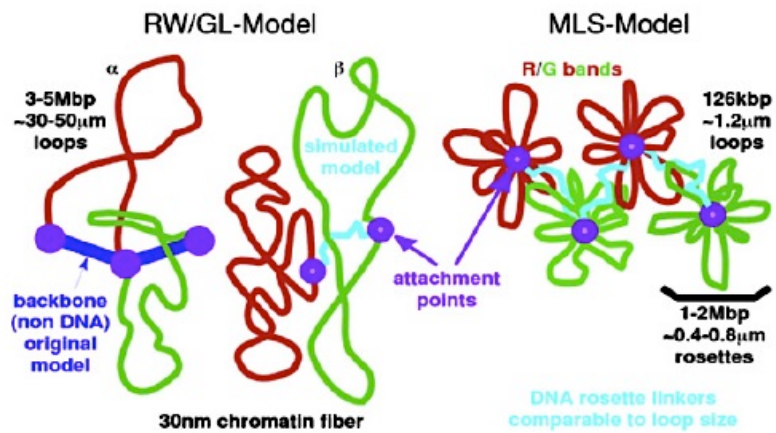


Figure 19. Schématisation des modèles RW/GL et MLS.

Les schémas détaillent la configuration des fibres chromatiennes selon les modèles RW/GL et MLS. (RW/GL : Random-Walk/Giant-Loop ; MLS : Multi-Loop-Subcompartment). (*Extrait de Jhunjhunwala et al., 2008*).

les segments V_H sont associés à des marques d'acétylation sur les lysines 9 et 14 de l'histone H3 (Li et al., 2013).

Les marques chromatiniennes des segments devant réarranger sont reconnues par un domaine spécifique de RAG-2 appelé PHD (pour Plant HomeoDomain) qui reconnaît spécifiquement la marque H3K4me3. Les mutations altérant la reconnaissance de ce motif induisent une forte diminution des recombinaisons V(D)J *in vivo* (Liu et al., 2007b; Matthews et al., 2007). Les observations suggèrent qu'il existe une hiérarchie épigénétique lors de l'activation du locus IgH. Le modèle proposé par l'équipe de Sen suppose que l'activation se produit en deux phases dépendantes ou non de l'enhancer intronique $E\mu$. Lors de la première étape, indépendante de $E\mu$, les marques H3K9me2 sont éliminées au profit des marques H3K4me2. Ces modifications font que le locus a un statut « partiellement activé » permettant le recrutement de facteurs de transcription au niveau de $E\mu$ ainsi que des protéines de transfert de groupement acétyles sur les histones et l'ARN polymérase II (ARN pol II). L'induction de la transcription germinale dépendante de $E\mu$ permet la mise en place de modifications d'histones du type H3K36me3 et H3K4me3. Cette dernière marque est importante pour le recrutement de RAG-2 par son domaine PHD et donc pour les réarrangements VDJ (Chakraborty et al., 2009).

- **Structure 3D du locus IgH au cours des recombinaisons VDJ**

Les études tendent à montrer que les structures complexes de la chromatine sont à la fois dynamiques et critiques pour la régulation génique. L'organisation de la chromatine est régulée par un certain nombre d'éléments non codants tels que les promoteurs, les activateurs transcriptionnels (enhancers), les isolateurs, ou les régions d'attachement à la matrice nucléaire (MARs). Ces éléments *cis*-régulateurs sont occupés par des facteurs de transcription en fonction du tissu et du stade de développement. Ces facteurs de transcription peuvent ensuite servir de point d'ancrage à des facteurs remodelant la chromatine. Les mécanismes précis mettant en jeu des interactions à longue distance restent encore peu connus. Cependant la présence de boucles d'interaction permettant de rapprocher des éléments régulateurs distants a été mise en évidence dans les cellules B (Sayegh et al., 2005).

Les premières études sur la conformation des chromosomes pouvaient laisser suggérer que leur comportement était aléatoire. Cependant, le confinement de tout ou partie de chromosome dans des territoires nucléaires distincts indique la présence d'une contrainte spatiale. Les résultats de ces analyses ont permis de mettre au point deux modèles exposant la configuration chromatinienne. Dans la configuration RW/GL (Random-Walk/Giant-Loop), la chromatine s'organise en larges boucles de 0,5 à 5 millions de pb (Mpb) rattachées à un squelette de chromatine fixe (**Figure 19**). Dans la configuration MLS (Multi-Loop-Subcompartment), la chromatine est également organisée en boucle mais de moindre dimension (environ 60 à 250 Kpb) (**Figure 19**). Dans ce modèle, un ensemble de boucles se fixent en un seul point pour former une structure appelée rosette (1 à 2 Mpb). Ces structures sont séparées par de la chromatine « linéaire » de 60 à 250 Kpb. Lorsque ces contraintes sont

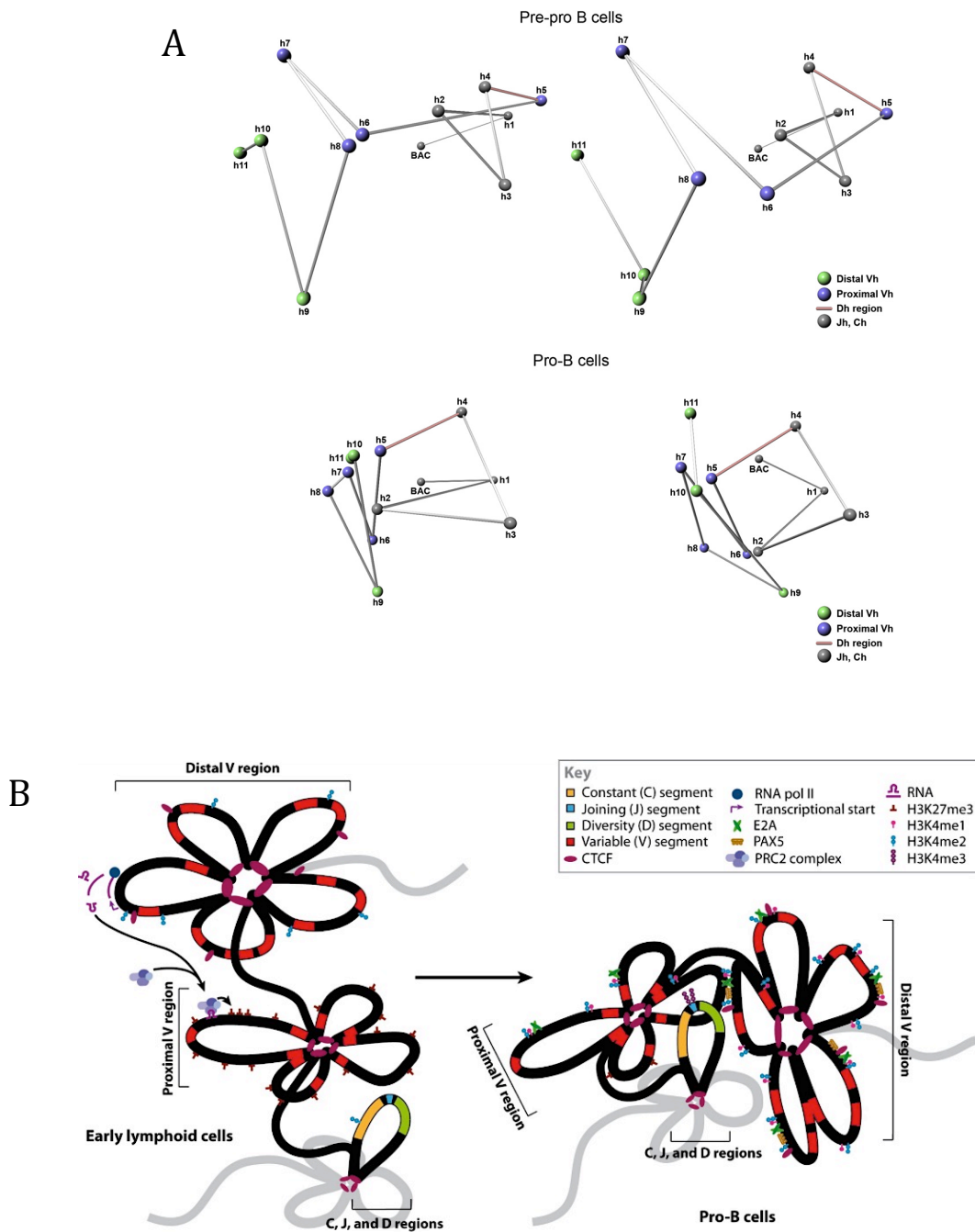


Figure 20. Topologie en 3 dimensions du locus IgH dans les cellules prépro et pro-B.

(A) La topologie du locus IgH dans les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) et les pro-B est déterminée à l'aide de sondes réparties sur l'ensemble du locus IgH par la méthode « trilatération ». Pour obtenir les coordonnées 3D des différents marqueurs, la distance dans l'espace d'un marqueur est déterminée à l'aide de sondes de références positionnées sur le locus. (B) Dans les progéniteurs, le locus IgH est replié en trois domaines distincts alors qu'au stade pro-B, le regroupement ne forme qu'un seul domaine. (*Extrait de Jhunjunwala et al., 2008; Bossen et al., 2012*).

Synthèse bibliographique – Chapitre 2 - Ontogénie et fonction des sous-ensembles de cellules B

étudiées dans les stades précoces pré-pro-B et pro-B, on remarque que l'organisation des segments V_H proximaux est identique dans ces deux types cellulaires. En revanche, les distances spatiales entre les segments V_H distaux et les segments réarrangés DJ_H sont réduites dans les cellules pro-B ce qui suggère que le locus IgH soit plus « compacté » au stade pro-B qu'au stade précédent (**Figure 20**) (Jhunjhunwala et al., 2008).

En plus des contacts avec la lamina (une structure composée de lamines située à proximité de la membrane interne du noyau) (Amendola and van Steensel, 2014), le génome s'organise en réalisant des interactions chromatiniennes à l'intérieur d'un même chromosome mais également entre des chromosomes différents. Ces interactions sont souvent tissu-spécifiques et régulées. Afin d'étudier la conformation du locus au cours du développement B, plusieurs techniques peuvent être employées. Le FISH 3D (Fluorescent in situ hybridization in 3 dimensions) et les techniques de 3C (Chromosome Capture Conformation), 4C (Circularized 3C) voire 5C (Carbon Copy 3C) sont très fréquemment utilisées (**Figure 21**). Ces techniques ont permis de démontrer que les cellules en cours de réarrangement VDJ (cellules pro-B) ont un locus IgH en conformation « contractée ». En revanche les cellules ayant achevé la recombinaison VDJ présentent des locus IgH dans un état « détendu » (Roldán et al., 2005). Les travaux sur la structure tridimensionnelle du locus IgH montrent que la contraction imposée au locus se fait *via* la formation de boucles permettant à des éléments éloignés physiquement de se retrouver à proximité au moment des réarrangements VDJ.

Busslinger et son équipe ont montré que PAX5 était nécessaire au réarrangement V_H vers DJ_H en initiant une contraction du locus IgH (Fuxa et al., 2004). Plus précisément, l'activation (l'accessibilité) du locus se ferait en deux étapes selon l'hypothèse de Fuxa. EBF-1 permettrait dans un premier temps la relocalisation du locus IgH de la périphérie vers le centre du noyau et favoriserait le réarrangement D_H vers J_H . Puis, PAX5 permettrait la contraction du locus favorisant ainsi le réarrangement V_H vers DJ_H (**Figure 22**) (Cobaleda et al., 2007).

Si les rosettes sont formées tel que le prédit le modèle MLS, alors les ancrs permettant la formation des boucles doivent être espacées périodiquement. Des études de ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation and Sequencing) à l'échelle du génome ont mis au jour de possibles candidats *cis*- et *trans*- effecteurs de la formation de ces boucles. CTCF (CCCTC-binding factor) est une protéine nucléaire en doigt de zinc (Lobanenkov et al., 1990; Klenova et al., 1993) identifiée tout d'abord comme facteur de transcription (Filippova, 2008) puis comme protéine occupant la fonction « d'isolation » de la chromatine. Aujourd'hui, des résultats apportés par la méthode de 3C suggèrent que CTCF serait un médiateur des interactions intra- et interchromosomiques. Ces caractéristiques fonctionnelles font que CTCF n'est plus connue sous le nom de protéine « isolatrice » mais plutôt ayant un rôle « architectural ». Environ 50% des sites de liaison à CTCF sont localisés dans les régions intergéniques, 15% à proximité des promoteurs et 40% dans les régions intragéniques. De plus, on trouve de nombreux sites de liaison aux environs des enhancers ce qui suggère que CTCF est important dans la régulation de la transcription. Afin d'exercer sa fonction CTCF

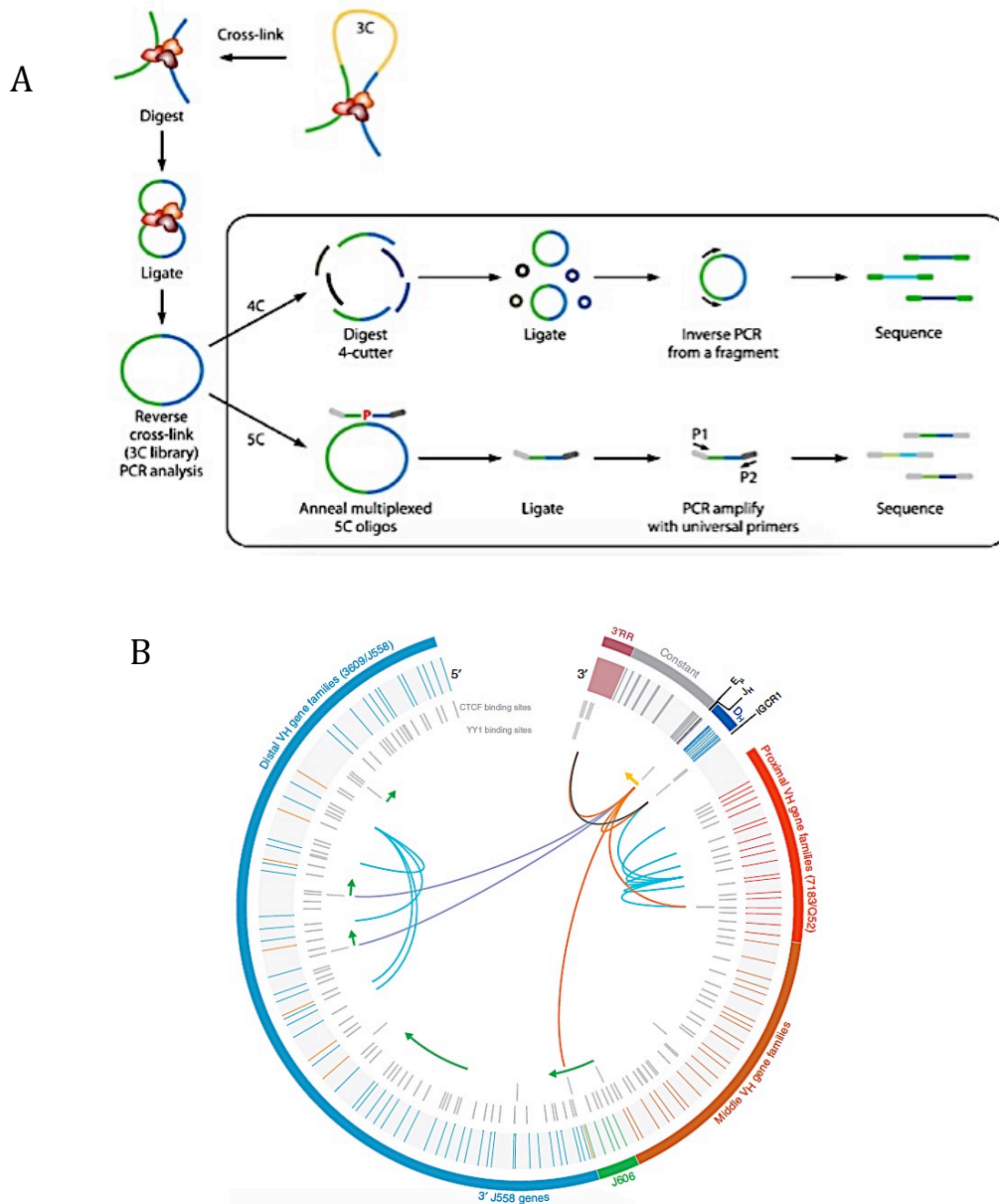


Figure 21. Structure de la chromatine : principes des techniques de 3C, 4C et 5C et exemple de résultats obtenus par 4C.

A. Ce schéma résume le principe des techniques de 3C, 4C et 5C utilisées en laboratoire. Après extraction, les noyaux sont fixés avec du formaldéhyde puis digérés par une enzyme de restriction. La librairie de 3C est produite après ligature des extrémités et élimination des protéines. La librairie de 4C est générée et séquencée après digestion enzymatique de la librairie 3C. La librairie de 5C est créée à partir de la librairie de 3C puis séquencée par des amorces universelles. B. Représentation circulaire du locus IgH. A l'extérieur les gènes V_H , D_H , J_H et constants sont représentés en couleur. Les barres intérieures indiquent la position des sites de fixation pour CTCF ou YY1. Les flèches vertes indiquent les transcrits V_H antisens. La flèche jaune montre le transcrit I_μ . Les courbes au centre représentent les interactions observées par 3C. 3C : Chromosome Capture Conformation ; 4C : Circularized-3C ; 5C : Carbon-Copy-3C. (Adapté de Fraser et al., 2015) et (Extrait de Stubbington and Corcoran, 2013)

nécessite des partenaires protéiques notamment le complexe cohésine connu pour stabiliser la fixation de CTCF et moduler son activité (Ong and Corces, 2014). Les données sur CTCF permettent d'établir trois fonctions. (1) CTCF agit comme une barrière en limitant la méthylation de l'ADN à proximité des promoteurs. Ce mécanisme évite ainsi la propagation de l'hétérochromatine et donc le « silencing épigénétique ». (2) CTCF agit comme un « enhancer blocker ». La fixation de CTCF et ses partenaires inhiberaient le rôle activateur de l'enhancer sur le promoteur (**Figure 23**). (3) Enfin, CTCF aurait également une fonction dite « facilitatrice » en favorisant le rapprochement entre un enhancer et un promoteur. Ce processus nécessite la formation de boucles incluant CTCF et cohésine (**Figure 23**) (Choi and Feeney, 2014; Ong and Corces, 2014). Les facteurs CTCF et cohésine possèdent de nombreux sites de liaison au locus IgH (Ebert et al., 2011). La suppression d'un segment contenant deux sites de liaison de CTCF en amont de DFL16.1 dérégule la séquence des réarrangements VDJ (Guo et al., 2011a). Pour autre exemple, il a été récemment montré que les sites de fixation de CTCF-cohésine pouvaient se trouver mutés dans certains cancers colorectaux en association avec des mutations de *p53*. Ces observations suggèrent que les mutations pourraient avoir un impact sur les modifications épigénétiques ou l'expression de gènes (Katainen et al., 2015).

- **Position des loci des gènes d'Ig au cours de la recombinaison V(D)J**

Les nombreuses études ayant contribué à élucider les mécanismes des réarrangements VDJ dans la lignée B montrent qu'il s'agit d'un processus particulièrement dynamique. Les mouvements des loci des gènes d'Ig, régulés dans le temps et dans l'espace du noyau, corrélerent avec les événements de recombinaison et d'expression des chaînes respectives. Dans les cellules engagées dans la lignée B, les loci IgH sont positionnés vers le centre du noyau, au contraire, dans les cellules non B ils se trouvent en périphérie, à proximité de la lamina nucléaire (Kosak et al., 2002).

L'équipe de Singh a montré qu'IKAROS n'était pas requis pour le repositionnement des loci IgH, mais participait à la régulation de la contrainte spatiale imposée au locus (Reynaud et al., 2008). Dans l'étude menée par Liu, la suppression du facteur de transcription YY1 montre que la contraction du locus IgH est affectée. En revanche, il ne semble y avoir aucun impact sur sa localisation au sein du noyau (Liu et al., 2007a). Ces facteurs sont donc impliqués dans la modulation de la structure tridimensionnelle du locus et son positionnement au sein du noyau.

Ces dernières années un autre niveau de contrôle de l'organisation nucléaire a été mis en évidence. On pensait que les recombinaisons se produisaient de manière indépendante sur les deux allèles et dans des régions différentes du noyau. Il semblerait en fait que les allèles s'apparient au moment des recombinaisons D_H vers J_H uniquement. Ce phénomène de « locus pairing » serait dépendant du complexe RAG (**Figure 24**) (Hewitt et al., 2009).

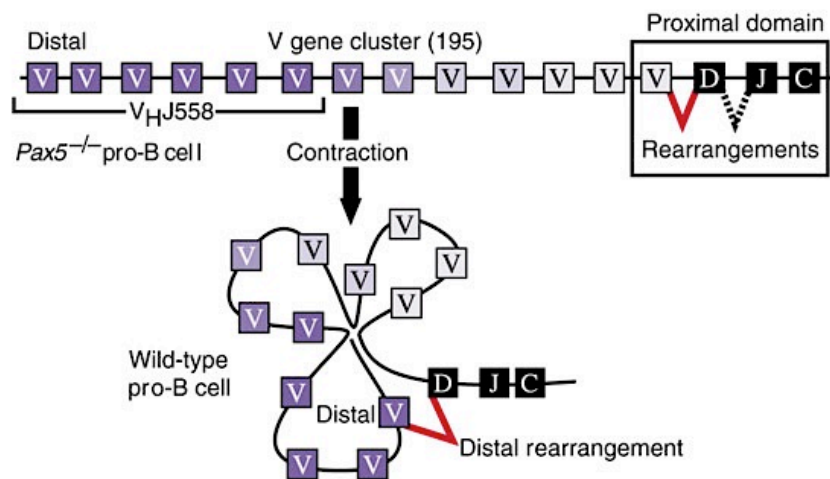


Figure 22. Implication de Pax5 dans la contraction du locus IgH dans des cellules proB.

Lors du développement B normal, Pax5 impose une contraction du locus en formant des boucles permettant aux V distaux d'être à proximité des segments D. Dans les cellules déficientes pour PAX5, le locus IgH reste dans un état relâché. Dans cette configuration, les segments V proximaux seront très largement favorisés. (Extrait de Cobaleda et al., 2007)

La position des allèles par rapport au centromère est un autre mécanisme de contrôle impliqué dans l'exclusion allélique. En effet, le recrutement au niveau des centromères a été associé à une inhibition de la transcription du locus IgH réarrangé de façon non productive (exon VDJ hors phase) (Skok et al., 2001). Lorsque la recombinaison au locus IgH est correcte (productive), le second allèle est repositionné dans l'hétérochromatine centromérique (transcriptionnellement inactive) au stade pré-B et au même moment le réarrangement de la chaîne légère a lieu. Le recrutement du second allèle dans un compartiment répresseur du noyau évite que cet allèle soit accessible aux recombinaisons (surexprimées) pendant le réarrangement du locus de chaîne légère (**Figure 24**) (Fuxa and Skok, 2007). Ces données sur le « silencing » de l'allèle non productif restent cependant controversées. En effet d'autres chercheurs montrent que les deux allèles sont transcrits (Daly et al., 2007). La transcription à partir de ces allèles non productifs est prise en charge par le mécanisme de surveillance des ARN afin d'éviter que ces ARN néfastes subsistent dans le noyau (Tinguely et al., 2012). La surveillance des ARN se produit à plusieurs niveaux et fait intervenir trois processus : (1) le mécanisme NMUP (Nonsense-Mediated Upregulation of Pre-mRNA) inhibe l'épissage, (2) le NAS (Nonsense-associated Altered Splicing) permet d'éliminer les exons contenant un codon de terminaison prématuré (PTC) et (3) le processus de NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay) permet l'élimination des transcrits matures portant un PTC (Tinguely et al., 2012).

3- Survie et maturation des lymphocytes B au cours de la phase tardive du développement.

Après avoir quitté la moelle osseuse, les cellules B immatures (naïves) colonisent progressivement les organes lymphoïdes périphériques (e.g., rate, ganglions, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses). Dans ces organes, les cellules B pourront poursuivre leur développement et différenciation qui dépendent de la rencontre avec l'antigène (Ag) spécifique de leur récepteur de surface. Ces événements aboutiront à la production de cellules sécrétrices (plasmocytes) d'Ig solubles ou anticorps et de cellules assurant la mémoire immunitaire (**Figure 25**). Les phases tardives du développement B permettront la production d'anticorps de très haute affinité grâce notamment à deux mécanismes : l'hypermutation somatique (SHM) et la commutation isotypique ou CSR (class switch recombination).

a. Cellules B transitionnelles

Les cellules B immatures non auto-réactives qui quittent la moelle osseuse pour se diriger en périphérie sont nommées lymphocytes B transitionnels (**Figure 25**). A ce stade les cellules présentent à leur surface CD93 (AA4.1) (Allman et al., 1992), CD24 (HSA), et expriment fortement IgM et peu ou pas IgD. Elles répriment l'ensemble des gènes ayant servi lors des recombinaisons V(D)J. Ces cellules ont une courte durée de vie et seulement 10 à 30% d'entre elles gagneront les compartiments périphériques (Osmond, 1991). Au sein des

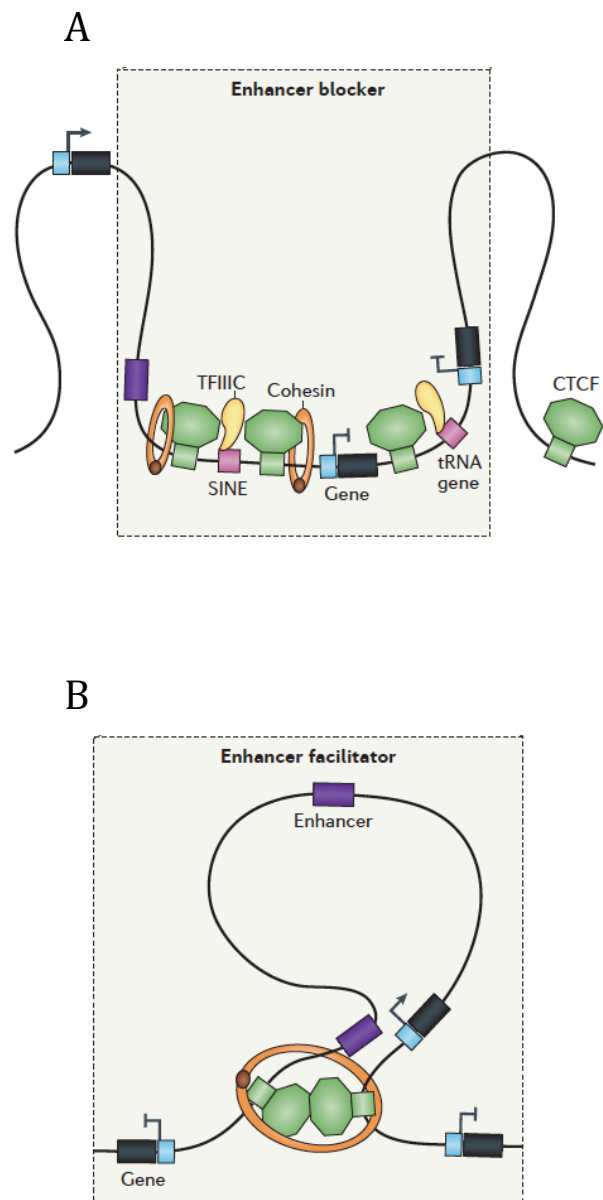


Figure 23. Architecture du génome : rôle de CTCF

Ce schéma présente deux fonctions de CTCF ayant un impact sur l'architecture du génome. (A) Rôle « d'enhancer-blocker » : La fixation de CTCF sur de multiples sites de liaison permet d'éloigner spatialement un enhancer et son promoteur empêchant la fonction activatrice de l'enhancer. (B) Rôle « d'enhancer-facilitator » : La fixation de CTCF sur des sites de liaison et stabilisé par le complexe cohésine permet la formation de boucles. Cette structure particulière permet le rapprochement physique d'un enhancer et d'un promoteur. (Adapté de Ong and Corces, 2014)

Synthèse bibliographique – Chapitre 2 - Ontogénie et fonction des sous-ensembles de cellules B

cellules B transitionnelles plusieurs sous populations peuvent être identifiées. L'équipe de Carsetti a décrit deux sous populations, les lymphocytes B transitionnels 1 et 2 (T1 et T2 respectivement) basées sur leur expression phénotypique et leurs caractéristiques fonctionnelles (Loder et al., 1999).

Les cellules T1 se caractérisent par une forte expression d'IgM membranaires et peu voire pas d'IgD. Ces cellules n'expriment pas les marqueurs CD21 et CD23 et ressemblent donc à des cellules immatures. Les T1 sont trouvées dans la moelle osseuse, le sang et la rate. Les T2 conservent une forte expression d'IgM et expriment l'IgD, CD21 et CD23. L'expression IgM et/ou IgD est possible grâce à un mécanisme d'épissage alternatif (**Figure 26**). Les T2 ne sont rencontrées que dans la rate et dérivent des cellules T1. Une troisième population de cellules nommée T3 (transitionnel 3) a été établie à partir des travaux de Allman (Allman et al., 2001). Elles ont un profil proche des T2, expriment moins d'IgM, ne semble pas proliférer et ne progressent pas jusqu'au stade mature. On peut donc diviser les transitionnels en trois populations : T1 (AA4.1⁺ CD23⁻ IgM^{high}), T2 (AA4.1⁺ CD23⁺ IgM^{high}), T3 (AA4.1⁺ CD23⁺ IgM^{low}) (Lindsley et al., 2007).

À la sortie de la moelle, les cellules T1 se dirigent vers la rate pour atteindre la partie externe des manchons lymphoïdes péri-artériolaires (PALS) situés dans la pulpe blanche. En revanche, les T2 migrent vers les follicules (Chung et al., 2003). Les mécanismes contrôlant la sélection de ces cellules afin de devenir des cellules B matures restent encore mal connus. À la périphérie, il s'opère à la fois une sélection négative et une sélection positive. Les signaux délivrés par le BCR semblent importants. L'engagement du BCR des cellules T1 induirait une sélection négative alors qu'il induirait une sélection positive de T2 (Petro et al., 2002). Toute mutation ayant un impact sur les signaux du BCR interfère avec la maturation des B transitionnels (Meffre et al., 2000). Le facteur BAFF (B-cell Activating Factor) est également nécessaire au développement et à la survie des cellules B en périphérie. Les modèles murins déficients pour BAFF montrent une diminution importante du nombre de cellules B en périphérie car elles ne parviennent pas à se différencier en T1 et donc à devenir matures (Patke et al., 2004; Hoek et al., 2009). De plus, la sélection par BAFF semble vitale pour l'élimination des cellules B auto-réactives. Les souris surexprimant BAFF montrent des symptômes auto-immuns (anticorps anti-noyau, glomérulonéphrites etc.). Il a aussi été démontré que l'absence de Act1 (facteur inhibiteur de BAFF) induit une hyperplasie des cellules B périphériques et le développement de pathologies auto-immune (**Figure 27**) (Giltiay et al., 2010).

Bien qu'il semble qu'une population T3 existe, celle-ci, à priori, n'est pas à l'origine des cellules matures. Ces cellules seraient auto-réactives et ne se seraient pas éliminées par apoptose mais maintenues dans un état d'anergie. L'étude des voies de signalisation montre que ces cellules ont une voie de signalisation spécifique les maintenant en anergie et les rendant incapables de produire une réponse immune après stimulation antigénique (Liubchenko et al., 2012). Les cellules T2 ont une destinée différente en fonction des signaux du BCR. Elles vont se différencier notamment en cellules B de la zone marginale (MZ) ou cellules B folliculaires (FO) (Srivastava et al., 2005).

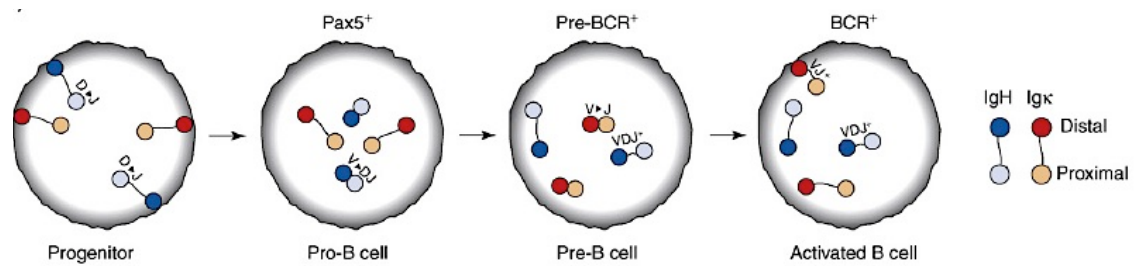


Figure 24. Changements de conformation et repositionnement nucléaire des loci d'Ig pendant le développement B.

Le schéma indique la position des loci IgH et Igk et leur statut de réarrangement à différents stades du développement B (Progéniteur, proB, préB et B activé). Les domaines des loci sont représentés par des cercles de couleur. Les domaines distaux sont colorés en foncé alors que les domaines proximaux sont colorés en clair. Les compartiments répresseurs du noyau sont indiqués en gris. (*Extrait de Fuxa and Skok, 2007*).

b. Cellules B matures

Après le stade transitionnel, les cellules T2 se différencient en cellules B matures pour lesquelles on peut distinguer plusieurs types (**Figure 25**), les cellules de la catégorie B-1 (formées pendant la vie fœtale) et celles de la catégorie B-2 (générées principalement après la naissance). Ces sous-populations de cellules se distinguent les unes des autres par leur localisation, leur fonction, et leur expression phénotypique. Les cellules B-1 sont considérées comme faisant partie de l'immunité innée alors que les cellules B-2 sont connues pour être associées à l'immunité adaptative. Au-delà de ces différences fonctionnelles, le développement des sous-populations B-1 et B-2 est distinct.

- **Les cellules B-1**

Les B-1 ne représentent que 5% des cellules B. Elles résident principalement dans les cavités pleurales et péritonéales et sont quasiment absentes des ganglions lymphatiques (Martin and Kearney, 2001). L'origine de ces cellules B-1 reste encore controversée. Les études montrent que ces cellules se développent principalement pendant la vie fœtale et périnatale (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2006). Elles sont identifiables par l'expression de marqueurs spécifiques tels que CD11b, une forte expression de l'IgM membranaire et une faible expression d'IgD. Les B-1 sont une population de cellules hétérogènes pouvant être divisée en deux sous classes : les cellules exprimant CD5 (Iy-1) sont dénommées B-1a, alors que celles qui ne l'expriment pas sont les B-1b. (Haas, 2015). La formation de ces cellules B-1 a donc principalement lieu avant la naissance, mais continue à l'âge adulte. Cette génération est graduelle dans le temps avec une très forte production pendant la période anténatale et se réduit rapidement à l'âge adulte (Montecino-Rodriguez and Dorshkind, 2012). Les travaux sur ces cellules ont permis de proposer plusieurs modèles pour expliquer le développement des B-1. La première hypothèse suppose que les B-1 et les B-2 se développent à partir de progéniteurs distincts alors que la seconde présume que les B-1 et les B-2 ont pour origine un même précurseur, la distinction se faisant ensuite en fonction des signaux reçus (**Figure 28**).

Il est connu que les cellules B-1 sont des cellules productrices d'anticorps naturels (Reynolds et al., 2015). Elles peuvent générer trois types de réponses en fonction de la situation : (1) en cas d'infection des muqueuses (par un virus de type *influenza*), les B-1a (essentiellement) peuvent être amenées à produire une grande quantité d'anticorps polyréactifs de type IgM ; (2) lors de stimuli dans la cavité péritonéale ou intraveineux (lipopolysaccharides, *Streptococcus pneumoniae*...) des cellules B-1a et B-1b se différencient en cellules sécrétant des IgM ou des IgA, (3) lors d'infection par *Borrelia hermsii* par exemple, le nombre de cellules spécifiques B-1b va s'accroître et majorer la production d'IgM sous forme pentamérique (Baumgarth, 2011).

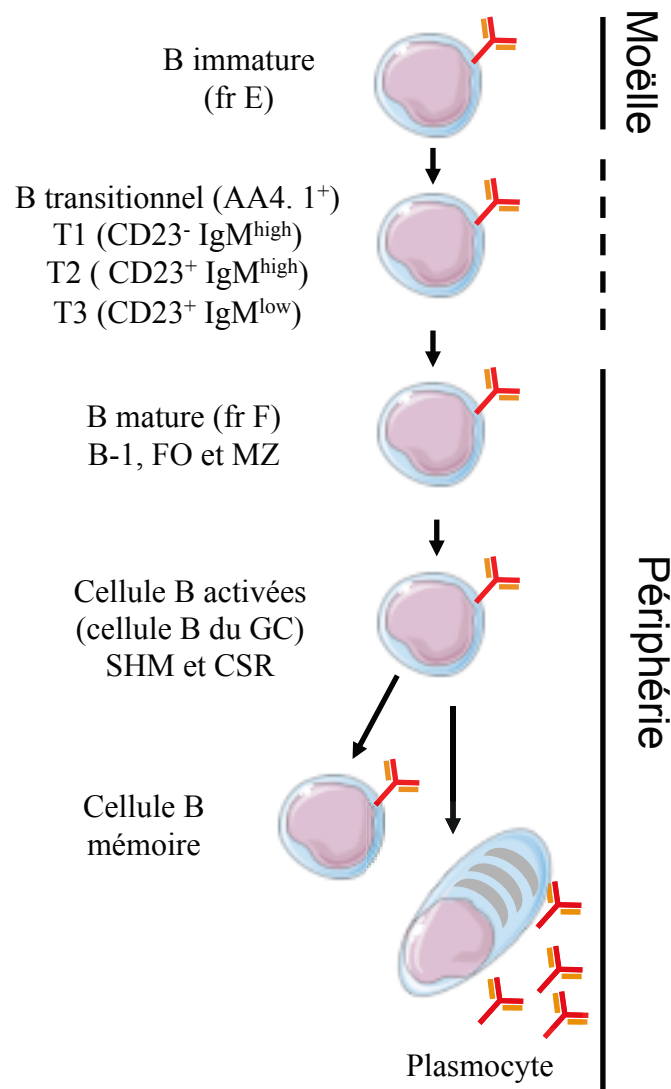


Figure 25. Schéma indiquant les différents stades de développement B en périphérie.

Les cellules B immatures quittant la moelle osseuse sont nommées lymphocytes B transitionnels de trois types : T1, T2 et T3. Ensuite ces cellules se dirigent vers les organes périphériques (rates, plaques de Peyer etc.) où elles prennent la dénomination de cellules B matures. En fonction des interactions et des signaux reçus, des cellules B matures (naïfs) vont se différencier en cellules B activées (ou cellules B du centre germinatif). Au sein du centre germinatif aura lieu la SHM et la CSR. Puis les cellules se différencient en cellule B mémoire ou cellule sécrétrice d'anticorps (plasmocyte) les stades ultimes de différenciation B. SHM : Somatic HyperMutation ; CSR : Class Switch Recombination.

- **Les cellules B-2**

La production de cellules B-2 est plus active après la naissance et se poursuit chez l'adulte. Comme les B-1, ces cellules sont, divisées en deux sous populations : les cellules de la zone marginale (MZ) et les cellules de la zone folliculaire (FO) (**Figure 25**).

L'avenir d'une cellule (ou B-cell fate) *i.e* sa capacité à devenir une cellule de la zone marginale ou une cellule de la zone folliculaire repose sur plusieurs paramètres. Ce choix est guidé par les signaux du BCR (BCR signaling) et par la force de ce signal (BCR signal strength) (*cf.* Chapitre 2.8).

Dans la rate, les cellules de la MZ ne constituent que 5 à 10% des cellules. La dénomination de zone marginale provient de leur localisation à l'interface de la pulpe blanche et la pulpe rouge (**Figure 29**). Elles se caractérisent par une forte expression à la fois d'IgM membranaire, de marqueurs CD21 et CD1d ; en revanche l'expression d'IgD est faible et elles expriment le CD23 à un niveau intermédiaire. En présence de facteurs de co-stimulation les cellules MZ activées par un antigène vont se différencier en cellules productrices d'anticorps selon une activation T dépendante ou T indépendante (Cerutti et al., 2013). Ces cellules sont capables d'effectuer une recombinaison de classe et de générer des cellules à longue durée de vie produisant des anticorps de type IgG ou IgA.

Les FO représentent la majeure partie des cellules B de la rate. Elles sont positionnées dans la pulpe blanche à l'intérieur des follicules primaires (**Figure 29**) (Pillai and Cariappa, 2009). Les follicules sont situés à proximité de zones riches en cellules T permettant l'interaction avec les FO. Les cellules folliculaires répondent préférentiellement à une stimulation immune T dépendante. Dans la moelle osseuse, il existe une autre niche où ces cellules appelées cellules B matures recirculantes (MR B cells) sont agencées en agrégats autour des capillaires sinusoides (Cariappa et al., 2007a). Deux populations de cellules folliculaires sont identifiables phénotypiquement. Les cellules B folliculaires de type 1 (IgD^{high} IgM^{low} CD21^{int} CD23⁺) et celles de type 2 (IgD^{high} IgM^{high} CD21^{int} CD23⁺) (Cariappa et al., 2007b). Les FO de type 2 pourraient être une source de cellules de types MZ.

c. Initiation, formation et maintien des centres germinatifs

- **Formation des centres germinatifs**

Les réponses immunitaires de type T dépendantes, nécessitant la coopération entre une cellule T et une cellule B (principalement folliculaire) engendrent la formation de deux types cellulaires : les cellules productrices d'anticorps (plasmablastes puis plasmocytes) ou les cellules assurant la mémoire immunitaire (cellule B mémoire). Afin de mettre en place une réponse immunitaire correcte, les cellules T et B doivent être activées en liant leur antigène. Les cellules B naïves de types FO sont trouvées à l'intérieur de follicules (**Figure 29**). Ces follicules sont séparés par une région inter-folliculaire et à proximité de ces follicules se trouvent des régions riches en cellules T (**Figure 30**). À l'intérieur des follicules,

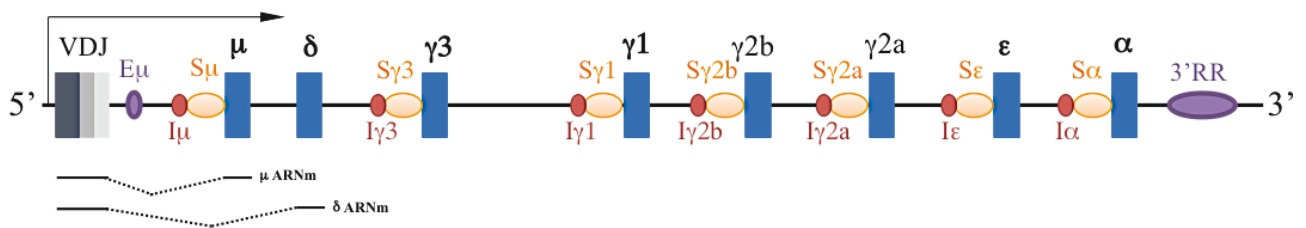


Figure 26. Organisation de la région constante du locus IgH

Chaque région constante sauf δ est précédée d'une région switch (S) et d'un exon non codant (I). Le rond violet entre la région variable et l'exon $I\mu$ représente l'enhancer intronique $E\mu$. L'ovale violet après le gène constant α représente la région régulatrice située en 3' du locus (3'RR). Les transcrits μ et δ sont représentés en dessous des gènes correspondants. Les lignes en pointillés indiquent les éléments éliminés lors de l'épissage. La flèche indique la transcription à partir du promoteur V.

Synthèse bibliographique – Chapitre 2 - Ontogénie et fonction des sous-ensembles de cellules B

les cellules B au repos sont en contact avec des cellules dendritiques folliculaires (FDC). Ces cellules B sont différenciables des B activées par l'expression de marqueurs membranaires. Elles expriment le B220 et l'IgD, mais pas les marqueurs PNA (Peanut Agglutinin), FAS (CD95) et acide α 2,6-N-acetyl-neuraminique reconnu par l'anticorps GL7 (B220⁺ PNA^{low} FAS^{low} GL7) (Smith et al., 1995; Cervenak et al., 2001) (Naito et al., 2007).

La mise en place des réactions des centres germinatifs (GC) est mieux connue grâce à l'étude des déplacements des cellules *in vivo* (Kerfoot et al., 2011; Kitano et al., 2011). L'initiation des GC débute par l'activation d'une cellule B par reconnaissance de son antigène à l'intérieur du follicule. Les cellules B peuvent rencontrer leur antigène sous forme soluble ou sous forme native à la surface d'une « cellule présentatrice d'antigène » (CPA) particulière : le FDC. L'engagement du BCR reconnaissant son Ag présenté par une CPA induit la formation d'une synapse immunitaire favorisant l'apparition rapide d'une polarisation de la cellule B. Cette polarisation impliquant des remaniements du cytosquelette serait un moyen d'optimiser l'activation de la cellule B (Yuseff et al., 2013). Cette activation par l'Ag entraîne la migration du lymphocyte B dans la zone inter-folliculaire à proximité de la zone riche en cellules T. En parallèle les cellules T CD4⁺ spécifiques du même Ag sont activées grâce à une interaction avec APC dans la zone T. Pour cela, le lymphocyte T reconnaît via son TCR (T-cell receptor) un complexe contenant les peptides antigéniques/CMH II. Cette reconnaissance s'accompagne de signaux de co-stimulation permettant aux cellules T d'être activées, de proliférer et de migrer dans la zone inter-folliculaire. Cette zone est le lieu de l'interaction entre cellules B et T conduisant à l'activation complète des cellules B, notamment par l'interaction du récepteur CD40 (exprimé par les cellules B) à son ligand CD40L (exprimé par les lymphocytes T). A ce stade les cellules T migrent de la région inter-folliculaire et prennent la dénomination de T_{FH} (T Follicular Helper). Les cellules B complètement activées (B220⁺ PNA^{high} FAS^{high} GL7⁺ IgD^{low}) ont deux destinées différentes : (1) certaines cellules se différencient en cellules à courte durée de vie sécrétant des anticorps de faible affinité ; (2) les autres cellules migrent vers le centre du follicule, à proximité des FDC, prolifèrent et forment un centre germinatif précoce. En périphérie de ce GC précoce, on trouve les cellules B au repos refoulées qui forment la zone du manteau (**Figure 31**).

Les cellules au centre du GC continuent de proliférer intensément pour former un GC mature polarisé où l'on peut distinguer une zone claire et une sombre (ZC et ZS respectivement). Les cellules B présentes dans ce microenvironnement spécialisé peuvent être identifiées par l'expression de marqueurs spécifiques. Chez la souris les cellules B de la zone sombre expriment les marqueurs CXCR4^{high} CD83^{low} CD86^{low} alors que les cellules B de la zone claire présentent un profil CXCR4^{low} CD83^{high} CD86^{high}.

La zone sombre contient une densité importante de cellules B en prolifération et exprimant peu d'Ig de surface : ces cellules sont appelées centroblastes. Elles améliorent l'affinité des anticorps en modifiant leurs gènes d'Ig déjà réarrangés. Ces modifications d'affinité du récepteur à l'Ag s'effectuent grâce à l'introduction de mutations ponctuelles au sein des régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères d'Ig. Le processus de

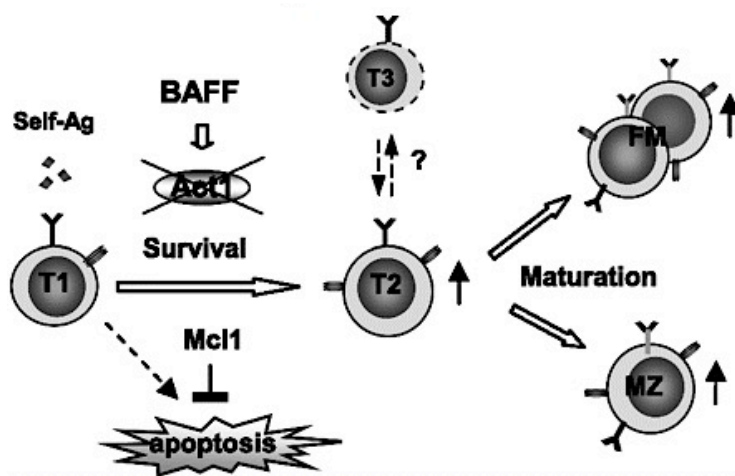


Figure 27. La régulation au stade transitionnel.

Ce schéma montre la régulation au stade B transitionnel. En absence du facteur Act1 (inhibiteur de BAFF), on observe une augmentation du nombre de cellules au stade transitionnel, et donc de cellules potentiellement auto-réactives. BAFF : B-cell Activating Factor). (Extrait de Giltiy et al., 2010).

Synthèse bibliographique – Chapitre 2 - Ontogénie et fonction des sous-ensembles de cellules B

mutation nommé SHM nécessite l'intervention de l'enzyme AID (Activation-Induced Cytidine Deaminase). A l'issue de cette étape de SHM les cellules se dirigent vers la zone claire du GC.

La zone claire a une densité de cellules plus faible, les lymphocytes B qui y siègent (appelés centrocytes) ont effectué une étape de maturation d'affinité. La ZC comprend également des FDC, des T_{FH} et des macrophages (Victoria and Nussenzweig, 2012). Les cellules B expriment à nouveau une Ig de surface et subissent une sélection. Celle-ci repose sur la capacité du BCR à reconnaître l'antigène après la SHM et à recevoir les signaux de survie. Si les cellules expriment un BCR de haute affinité, la capture de l'antigène présenté par les FDC est efficace et induit l'exposition une densité importante du complexe peptide antigénique-CMH II (CMH-II pour majeur d'histocompatibilité de classe II). Cette « activation » permet ensuite à la cellule B de se comporter comme une CPA et de présenter complexe peptide antigénique-CMH II aux cellules T. Cette présentation induit une forte activation des T_{FH} qui en retour, fourniront les signaux de survie et d'activation nécessaires aux lymphocytes B. En revanche, les cellules exprimant un BCR de faible affinité seront moins aptes à capter et donc à présenter efficacement l'Ag aux T_{FH} , ne recevront donc pas les signaux de survie et, en conséquence seront contre-sélectionnées et éliminées par apoptose (**Figure 31**). Certains centrocytes de haute affinité retournent dans la ZS afin de subir une nouvelle étape de prolifération/mutation ; cette étape permettrait de leur donner un avantage sur les autres cellules B exprimant un BCR de faible affinité (De Silva and Klein, 2015). En parallèle de la sélection positive, les cellules effectuent la recombinaison de classe (CSR) permettant à une cellule exprimant une IgM/IgD de surface de changer d'isotype (IgA, IgE, IgG). Suite à ces deux événements géniques, les cellules B se différencient en plasmocytes ou en cellules B mémoire à longue durée de vie et quittent le GC.

- **Facteurs régulateurs des centres germinatifs**

La mise en place des centres germinatifs est initiée rapidement et se produit à l'extérieur des follicules en modulant l'expression de facteurs transcriptionnels spécifiques et interconnectés. BCL-6 (B cell lymphoma 6) est un répresseur transcriptionnel et est considéré comme un facteur régulateur majeur des GC. En son absence, les cellules n'entrent pas dans les follicules (Kitano et al., 2011), ne surexpriment pas CXCR4 (ce dernier étant nécessaire aux cellules B de la zone sombre). Ce facteur est donc indispensable à la migration des cellules vers l'intérieur des follicules. Parmi les fonctions de BCL-6, on peut retenir quatre fonctions importantes pour la réaction du GC : (1) BCL-6 inhibe l'expression du facteur anti-apoptotique BCL-2 (B cell lymphoma 2), ceci permet le maintien d'un certain niveau de vigilance, lors du processus d'hypermutation somatique en assurant un état pro-apoptotique. (2) BCL-6 inhibe l'expression de *p53* assurant une tolérance aux dommages de l'ADN des cellules du GC lors de la SHM induite par l'enzyme AID. (3) BCL-6 inhibe le facteur BLIMP-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) nécessaire à la différenciation plasmocytaire et régule ainsi la sortie des cellules du GC. (4) BCL-6 dérégule certains médiateurs du BCR tel que CD72 (Basso et al., 2010; Victoria and Nussenzweig, 2012).

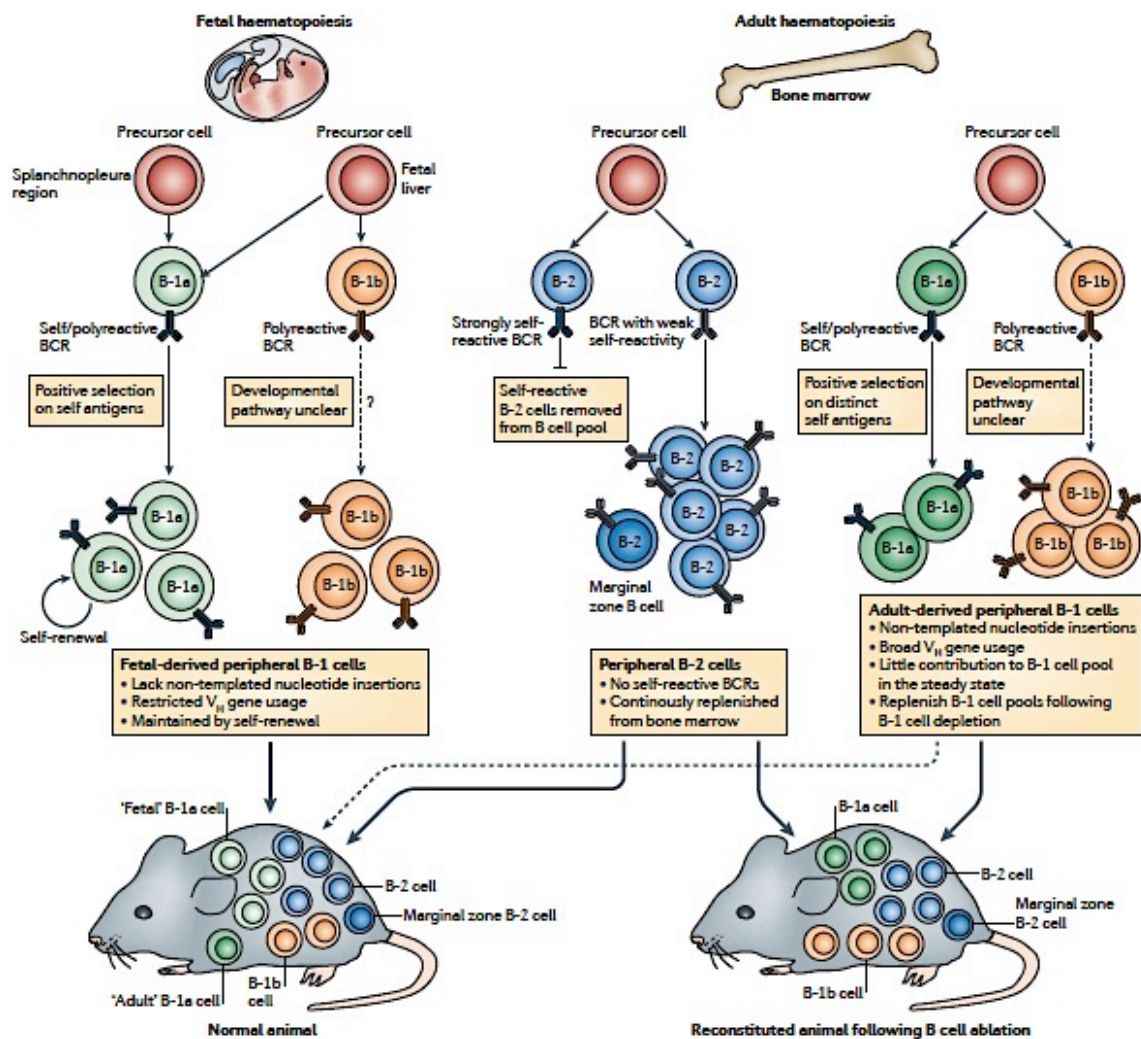


Figure 28. Modèle exposant le développement des cellules B1 et B2.

Ce modèle expose les différentes étapes aboutissant à la production de cellules B1 et B2 avant et après la naissance. (Extrait de Baumgarth, 2011).

L'expression de BCL-6 est modulée par d'autres facteurs tels que MEF2B (Myocyte-specific Enhancer Factor 2B), IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) (Basso and Dalla-Favera, 2015) (**Figure 32**).

Le facteur de transcription c-MYC, important pour la prolifération des cellules, participe également à la formation des GC. Son activité peut être scindée en plusieurs programmes, il est actif lors de l'initiation des GC, il est inhibé dans la zone sombre et réactivé dans certaines cellules B de la zone claire, notamment chez celles destinées à revenir dans la zone sombre (Calado et al., 2012; Dominguez-Sola et al., 2012).

d. La mémoire immunitaire

La présence d'anticorps spécifiques est une condition *sine qua non* de la protection immune de l'hôte. La sécrétion de ces anticorps par les plasmocytes à longue durée de vie constitue la première ligne de défense lors d'une réinfection. Mais si la quantité d'anticorps n'est pas suffisante pour enrayer l'infection, la mémoire immunitaire spécifique vient compléter le système de défense. Comparée à la réponse humorale primaire, la réponse mémoire est plus rapide et de plus grande intensité. Ainsi, les cellules B mémoires, ayant la plupart du temps déjà été sélectionnées lors d'une réaction de GC, expriment un BCR de haute affinité pour l'Ag et se différencient rapidement en cellules productrices d'anticorps après un second « challenge antigénique ». Contrairement à une réponse primaire, ces anticorps présentent une meilleure affinité pour l'Ag et peuvent être d'isotype autre que IgM, *i.e* produit après la CSR. Les cellules qui produisent ces anticorps sont généralement issues d'un GC ; cependant, on sait qu'il existe des cellules B mémoires (d'isotype IgM ou autre) produites de manière indépendante des GC (Pape et al., 2011; Taylor et al., 2012; Kurosaki et al., 2015) (**Figure 33**). Cependant, l'étude de ces cellules mémoires chez la souris est difficile. En effet, chez l'homme on trouve un marqueur de cellules B mémoires CD27 mais celui-ci est absent chez la souris.

Le mécanisme permettant la différenciation d'une cellule B de haute affinité en une cellule B mémoire reste à ce jour méconnu. Le facteur BCL-6 bloque la différenciation de ces cellules en plasmocytes ou en B mémoire. L'expression du facteur de transcription BLIMP-1 codé par *Prdm1* (PR domain zinc finger protein 1) permet la différenciation en plasmocytes.

e. Les cellules sécrétrices d'anticorps : les plasmocytes

A ce jour, deux types de cellules sécrétrices d'anticorps sont connues : les plasmablastes et les plasmocytes (**Figure 25**). La population de plasmocytes est divisée en deux sous-populations : les plasmocytes à courte durée de vie et ceux à longue durée de vie. Ces cellules sécrètent de manière constitutive les immunoglobulines solubles. Cette production permanente constitue la première ligne de défense contre une infection.

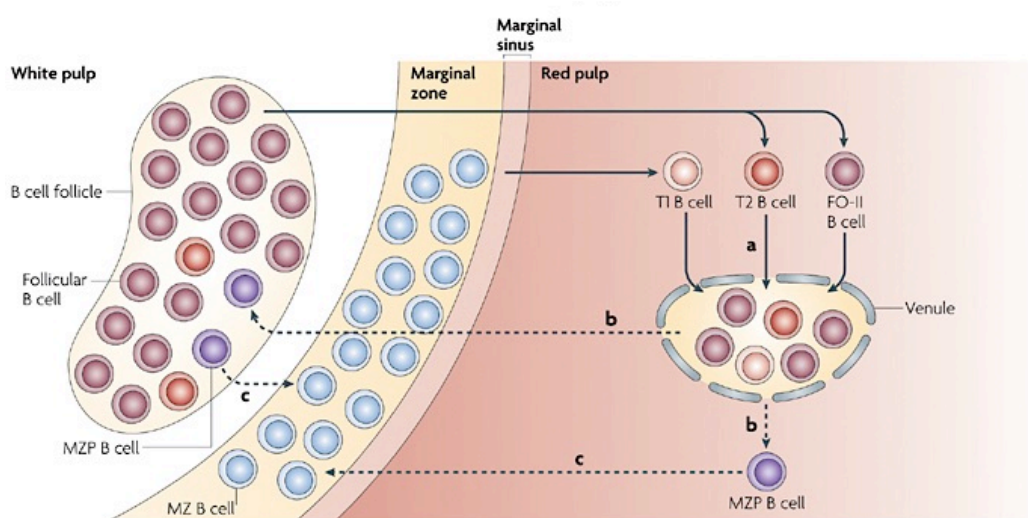


Figure 29. Schéma indiquant la localisation des cellules dans la rate.

Ce schéma présente la position spécifique des différents types cellulaires dans la rate. Les cellules B de la zone marginale (MZ) sont positionnées entre la pulpe blanche et la pulpe rouge. Les cellules B folliculaires sont situées dans les follicules B au sein de la pulpe blanche. MZP : Précurseur de la Zone Marginale. (*Extrait de Pillai and Cariappa, 2009*)

Lors de l'activation des cellules B par un antigène, certaines sont capables de proliférer rapidement, elles font la commutation isotypique et se différencient en plasmablastes à courte durée de vie. Ces plasmablastes expriment fortement IRF4 et XBP-1 (X Box Protein 1) et un niveau intermédiaire de BLIMP1 (IRF4^{high} XBP1^{high} BLIMP1^{int} B220^{int} CD138⁺). La production d'anticorps par ces cellules est modérée. Les cellules B activées et de haute affinité des GC vont quitter ce microenvironnement soit en tant que B mémoire, soit en plasmocytes exprimant fortement IRF4, XBP-1 et BLIMP-1 (IRF4^{high} XBP1^{high} BLIMP1^{high} B220^{low} CD138⁺). Ces plasmocytes sécrètent des Ig solubles en grande quantité. BLIMP1 est exprimé à la fois dans les plasmablastes et les plasmocytes, cependant les études n'ont pas encore clairement démontré que les plasmocytes pourraient dériver des plasmablastes (Nutt et al., 2015). Les plasmablastes sont principalement trouvés dans la rate, les ganglions lymphatiques, la lamina propria, les sites inflammatoires et le sang ; les plasmocytes sont eux localisés dans la rate, les ganglions lymphatiques et surtout la moelle osseuse. Le « homing » des plasmocytes, *i.e* le mécanisme permettant aux cellules de retourner dans la moelle osseuse et de les y retenir, est mal connu. Il semble que ces cellules migrent et restent dans cette niche sous l'influence de chemokines, notamment CXCL12 ; ce phénomène nécessite donc la présence du récepteur CXCR4 à la surface des plasmocytes.

4- La transmission du signal par le BCR : régulation du « B-cell fate »

Le destin de la cellule B et ses capacités à améliorer l'affinité de ses immunoglobulines pour un antigène reposent sur l'expression et le signal délivré par son BCR. (1) La fonction première du BCR est de transmettre les signaux (« B cell signalling ») qui régulent le « B-cell fate » ; en son absence le développement B s'arrête au stade pré-B (Kitamura et al., 1991). (2) Le BCR est utilisé pour intégrer l'antigène à l'intérieur de la cellule afin qu'un fragment soit présenté au sein du CMH II.

a. Le pré-BCR et phase précoce du développement

La transition du stade pro-B à pré-B est conditionnée par un réarrangement VDJ_H productif qui permet l'expression d'une chaîne lourde μ fonctionnelle à la surface de la cellule sous la forme d'un pré-BCR (**Figure 11**). Ce récepteur comprend deux chaînes lourdes μ identiques, chacune associée à une pseudo chaîne légère composée des protéines V_{préB} et $\lambda 5$ ainsi que des molécules de transduction du signal Ig α et Ig β . L'expression du pré-BCR est le premier point de contrôle important du développement B. (1) Il permet d'engager un programme moléculaire induisant la prolifération et la différenciation en cellule pré-B (Herzog et al., 2009). (2) La signalisation par le pré-BCR induit une sous-expression des protéines constituant la pseudo-chaîne légère (Parker et al., 2005). (3) Le pré-BCR participe à l'exclusion allélique en bloquant le réarrangement V_H vers DJ_H sur le second allèle IgH. (4) Le signal transmis par le pré-BCR engage le réarrangement de la chaîne légère

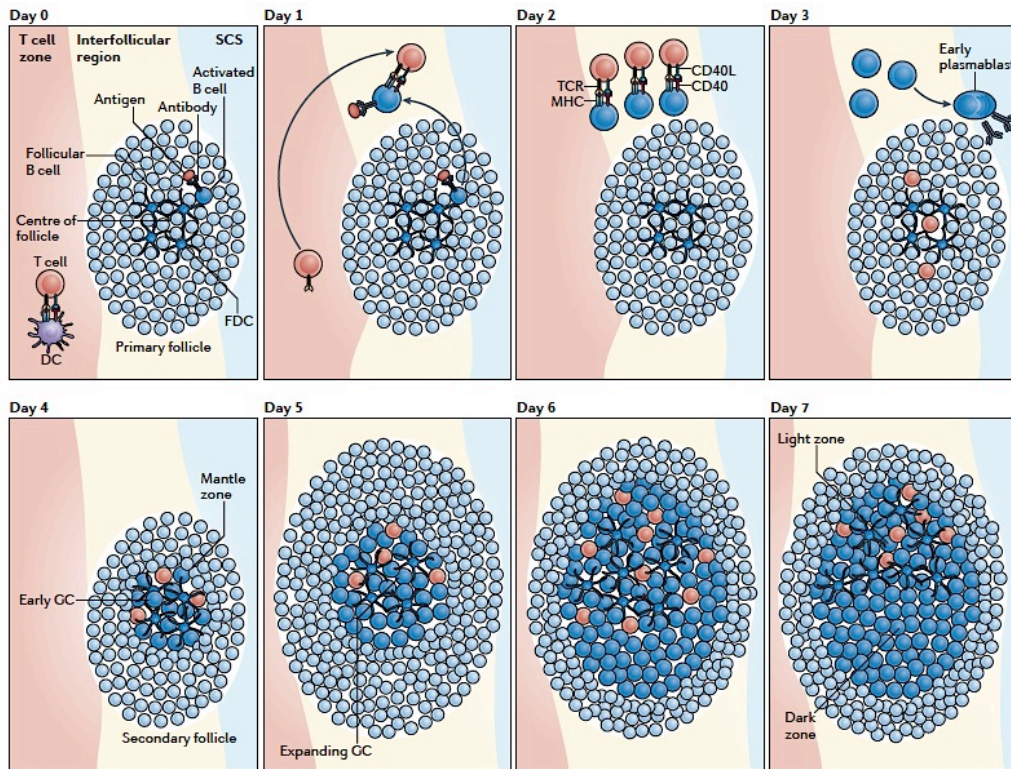


Figure 30. Schéma de la mise en place d'un centre germinatif.

Ce schéma résume jour par jour la formation d'un centre germinatif suite à l'activation des cellules B et T par leur antigène. SCS : Sinus Sous C capsulaire, TCR : Récepteur des cellules T, MHC : Complexe Majeur d'Histocompatibilité, FDC : Cellule Dendritique Folliculaire, DC : Cellule Dendritique, GC : Centre Germinatif. (Extrait de (De Silva and Klein, 2015)

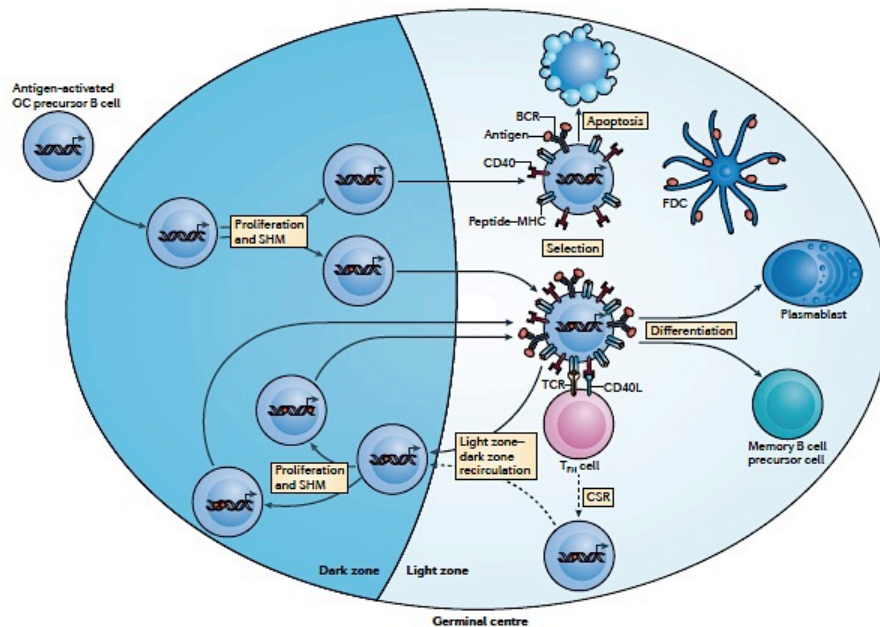


Figure 31. Le centre germinatif: les populations cellulaires et les étapes du développement.

Ce schéma décrit le cheminement des cellules ainsi que les différents évènements ayant lieu au sein du centre germinatif. (Extrait de De Silva and Klein, 2015)

Synthèse bibliographique – Chapitre 2 - Ontogénie et fonction des sous-ensembles de cellules B

(Reth et al., 1987). Les travaux de l'équipe de Hendricks indiquent que les signaux provenant du pré-BCR modifient la conformation du locus kappa en augmentant l'accessibilité du locus notamment les régions des segments $V\kappa$ (Stadhouders et al., 2014).

La cascade de signalisation induite par le BCR a été très étudiée, contrairement à celle induite par le pré-BCR. Il est intéressant d'analyser le mode d'activation de ces récepteurs, les signalisations mises en jeu et les caractéristiques communes qu'ils partagent.

L'activation du BCR est effective au moment où le ligand se fixe. Pour le pré-BCR, le mécanisme d'activation est encore incertain, il pourrait fixer certains ligands exprimés par les cellules stromales tels que l'héparane sulfate (chez la souris) ou la galectine-1 (chez l'homme). D'autres suggèrent que l'activation se fait de manière autonome par auto-association sans que l'environnement ait un impact (Rolink et al., 2000). Ce mécanisme est en accord avec une étude structurale (Bankovich et al., 2007). Par ailleurs, un site de N-glycosylation (N46) a été identifié sur la chaîne μ comme étant important pour la formation du pré-BCR et pour sa fonction. En son absence, $\lambda 5$ est incapable de se fixer à la chaîne lourde (Ubelhart et al., 2010).

Le signal induit par le pré-BCR est relayé à l'intérieur de la cellule par les sous-unités $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ (**Figure 34**). En fonction de voies mises en jeu, cela induit la prolifération, la survie ou la différenciation des cellules. Les voies de signalisation activées par le pré-BCR s'engagent en deux temps : une expansion clonale puis une différenciation. Les voies d'activation du pré-BCR et du BCR mettent en jeu des kinases, notamment Syk et Lyn. La phosphorylation des co-récepteurs CD19, $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ est un pré-requis pour le fonctionnement de la cascade de signalisation.

(1) Expansion clonale : après activation du pré-BCR, une voie précoce permet à la cellule de recevoir les signaux de survie et de prolifération (**Figure 34 A**). Ces signaux nécessitent l'activation de la PI3K (PhosphoInositide 3-Kinase) par le pré-BCR et par la fixation de l'IL7 (Interleukine 7) à son récepteur. Bien que l'IL7 joue essentiellement son rôle au stade pro-B pour favoriser la prolifération, la survie et l'engagement dans la lignée B (IL7 permet l'expression de PAX5), IL7 est également nécessaire au stade « large pre-B », immédiatement après expression du pré-BCR. L'activation de la PI3K nécessite en amont la phosphorylation de motifs particuliers présents sur CD19 ou BCAP (B Cell Adaptator Protein). Les cellules B expriment préférentiellement les PI3K de la classe IA. Cette famille forme des hétérodimères composés d'une sous-unité catalytique p110 et une sous-unité régulatrice p85, p55 ou p50. Les sous-unités p110 α , p110 δ et p85 α sont les sous-unités les plus fréquemment rencontrées lors de la cascade de signalisation du pré-BCR (Reth and Nielsen, 2014; Cantrell, 2015). Après phosphorylation, PI3K lie ces motifs et permet l'activation de sa sous-unité catalytique. Cela permet à la cellule de survivre et de proliférer suite à l'activation de AKT (connue sous le nom PKB Protein kinase B) et des kinases MAPK/Erk (Mitogen-activated protein kinases) par la PI3K (Gold et al., 1999) qui vont moduler les facteurs pro ou anti-apoptotiques (BIM, BAM, BCL2) et les facteurs du cycle cellulaire (p21, p27, Cyclines etc.).

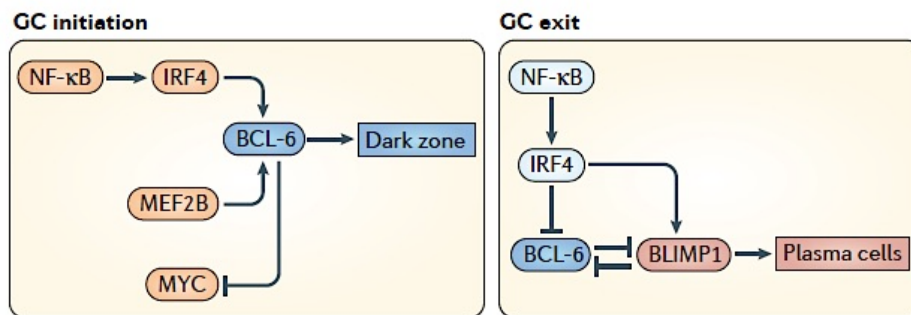


Figure 32. Les acteurs du centre germinatif.

La réaction du centre germinatif fait intervenir un certain nombre de facteurs et modulateurs de la transcription. Ce schéma présente la régulation de BCL-6 qui est impliquée au cours de la formation de la zone sombre (à gauche). A droite, la régulation conduisant à la différenciation en plasmocytes. IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4, BCL-6 : B Cell Lymphoma 6, MEF2B : Myocyte-specific Enhancer Factor 2B, BLIMP1 : B lymphocyte-induced Maturation Protein 1, NF-κB : Nuclear factor-κB (Extrait de Basso and Dalla-Favera, 2015).

(2) Phase de différenciation : lors de la phase tardive seule la voie de différenciation est active (**Figure 34 B**). Cette voie met en jeu la protéine SLP-65 (SH2 domain containing Leukocyte Protein of 65 kDa) qui va bloquer la cascade de signalisation induite par la PI3K et induire d'autres facteurs de différenciation (Cantrell, 2015). Ainsi, la signalisation par SLP-65 diminue l'expression des protéines (VpréB et $\lambda 5$) et dans le même temps initie la recombinaison aux locus de chaîne légère. Les facteurs activés dans cette voie rendent le locus κ accessible (IRF4 induit la transcription germinale au locus kappa) et activent les enzymes clés de la recombinaison (RAG) (Reth and Nielsen, 2014).

Le signal du pré-BCR est donc crucial lors de l'ontogénie B précoce. En effet, tous les modèles murins impactant l'assemblage du pré-BCR (défaut de transcription, mutation etc.) ou la transmission de son signal (protéines associées au pré-BCR, protéines des voies de signalisation etc.) présentent une altération voire un blocage du développement B aux stades précoces.

b. Le signal du BCR aux stades B immatures et périphériques

Les cellules immatures exprimant un BCR vont subir des mécanismes de sélections afin de vérifier que le BCR qu'elles ont produit n'est pas auto-réactif. Si cela est le cas les cellules peuvent modifier leur BCR par le mécanisme de « receptor editing ». Si le nouveau BCR présente toujours une certaine affinité pour des protéines ou d'autres épitopes endogènes, la cellule est éliminée par apoptose ou rendue inactive en entrant en phase d'anergie.

Les cellules B immatures exprimant un BCR quittent la moelle osseuse pour se diriger vers la rate. Le mécanisme de sélection permettant aux cellules de se différencier en cellules B-1 de la zone marginale ou folliculaire n'est pas complètement connu mais les études semblent montrer que la force du signal du BCR a un rôle prédominant. Ainsi un signal fort serait en faveur d'une différenciation en cellule B-1 alors qu'un signal plus faible conduirait les cellules à se différencier en cellules B folliculaires et un signal très faible conduisant à la différenciation en cellules B de la MZ. Les mutations diminuant le « BCR signaling » induiraient une diminution des sous populations B-1 et FO mais pas des cellules B de la MZ (Allman and Pillai, 2008; Pillai and Cariappa, 2009).

L'immunoglobuline de surface ou BCR est capable de reconnaître une grande variété de structures. Ce récepteur a deux fonctions dans l'activation des cellules B : (1) la fixation d'un antigène au BCR induit une cascade de signalisation intracellulaire. Celle-ci met en jeu des facteurs similaires à ceux engagés lors de l'activation du pré-BCR tels que les SRC kinases (Syk, Lyn), le facteur BLNK (B-cell linker ou SLP-65), les enzymes PI3K et PLC γ 2 (PhosphoLipase C γ 2)etc. (Laffleur et al., 2014a). (2) la fixation d'un antigène au BCR induit l'internalisation du complexe, et son transport intracellulaire vers les lysosomes où l'Ag peut être fragmenté. Les peptides antigéniques générés, associés au complexe majeur

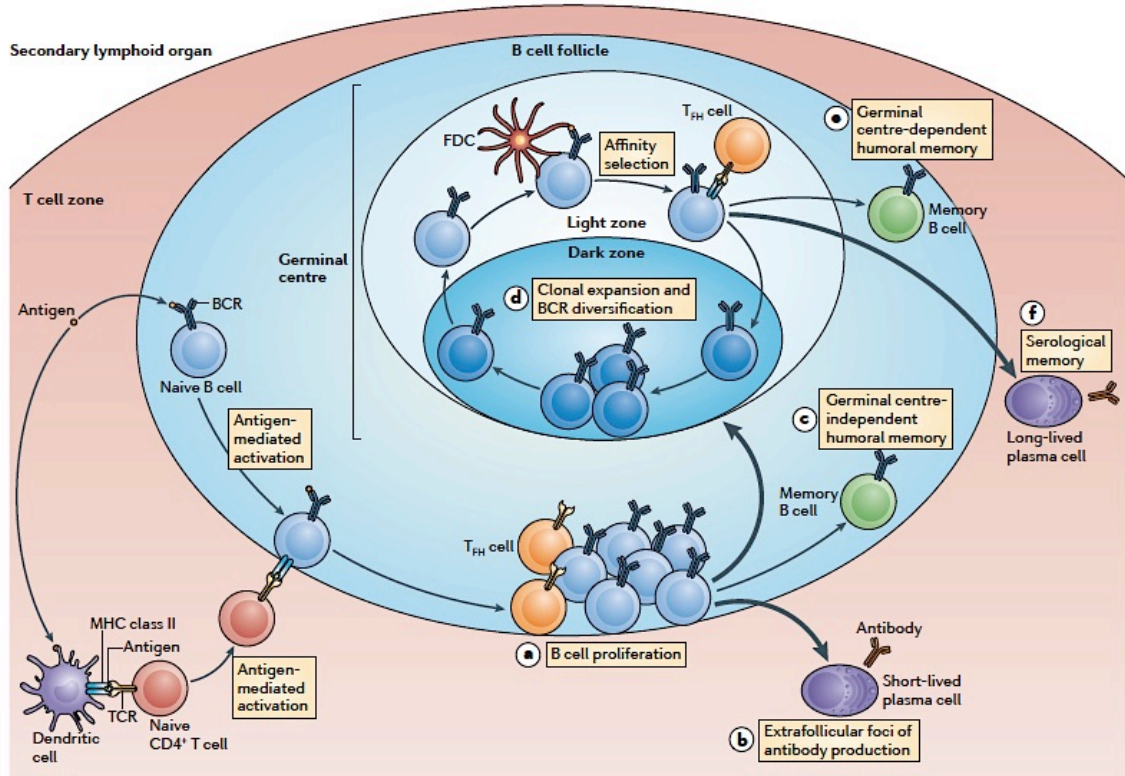


Figure 33. Génération des cellules B mémoires.

Les cellules B et T activées par leur antigène migrent à l'extérieur du follicule. (a). Les cellules B prolifèrent. Une partie des cellules B ayant proliféré se différencient en plasmocytes à courte durée de vie (b) ou cellules B mémoires (c), les autres repartent vers le follicule où elles formeront un centre germinatif (d). A la sortie de la zone claire (du centre germinatif) les cellules se différencient en cellules B mémoires (e) ou en plasmocytes à longue durée de vie (f). FDC : Cellule Folliculaire Dendritique, BCR : B Cell Receptor, TCR : T Cell Receptor, TFH : T Helper Follicular, CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité. (Extrait de Kurosaki et al., 2015).

d'histocompatibilité de classe II, sont exposés à la surface de la cellule B et permettent une interaction avec les cellules T (*via* leur récepteur de surface ou TCR), étape indispensable à l'activation de la cellule B.

5- AID, un acteur majeur de deux événements clés du développement B en périphérie : SHM et CSR

La génération d'anticorps hautement spécifiques est une question centrale de l'immunité adaptative. Deux phénomènes sont critiques pour la génération de ces anticorps : la maturation d'affinité (SHM) et la commutation de classe (CSR). Ces deux événements dépendent d'altérations génétiques au sein du locus IgH. La capacité des cellules à modifier leur ADN est exceptionnelle notamment à cause des conséquences que pourraient avoir ces altérations génétiques (e.g cancer). Les chercheurs pensaient initialement que la SHM et la CSR faisait intervenir des enzymes différentes (Weill and Reynaud, 1996). La découverte de l'enzyme AID (Activation-Induced Deaminase) en 1999 par l'équipe d'Honjo a prouvé que cette enzyme était responsable de ces deux événements (Muramatsu et al., 1999, 2000). Simultanément, dans l'équipe de Durandy, des analyses génétiques chez des patients atteints du syndrome d'hyper-IgM ont identifié le gène *Aicda* comme nécessaire à la commutation de classe (Revy et al., 2000). La diversité des anticorps est donc produite à deux niveaux : le premier lors du réarrangement V(D)J qui permet la production d'un répertoire primaire et le second lors de la SHM et de la CSR aboutissant à la production d'un répertoire secondaire (Pavri and Nussenzweig, 2011).

a. AID : structure, régulation de l'expression, localisation, stabilité, fonction, et recrutement

- **Structure**

Une seule enzyme est donc responsable de la création du répertoire secondaire : AID. Cette enzyme est une cytidine déaminase qui convertit les cytosines en uraciles de l'ADN. Le gène *Aicda* code cette petite protéine de 26 kDa composée de quatre domaines (**Figure 35**). AID est très similaire aux protéines de la famille APOBEC (APOLipoprotein B mRNA Editing Catalytic Component). Bien que les protéines de cette famille aient des structures similaires, elles ont des fonctions distinctes et AID ne peut pas être substituée par une autre protéine de la même famille (Rebhandl et al., 2015).

Les analyses génétiques des patients atteints de formes diverses du syndrome d'hyper-IgM ont identifié différentes mutations dans les régions codantes du gène *Aicda* (Durandy et al., 2006). De plus les études des mutants AID chez la souris indiquent que les mutations peuvent être classées en deux catégories : (1) les mutants de la partie C-terminale montrent une altération de la commutation de classe ; (2) les mutations de la partie N-terminale causent une perte des deux processus CSR et SHM.

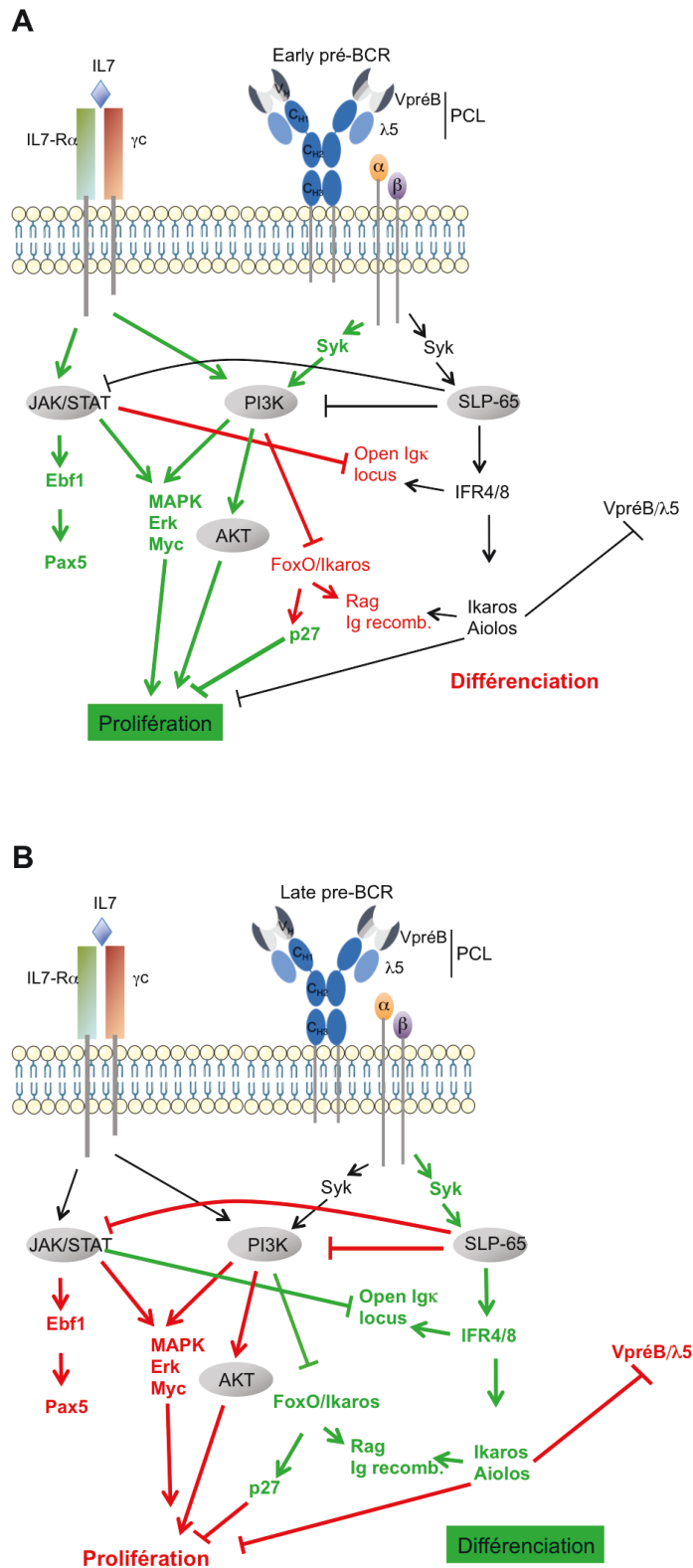


Figure 34. Cascades de signalisation après activation du pré-BCR

A et B représente les cascades de signalisation engagées suite à l'activation du pré-BCR. A décrit les mécanismes impliqués lors de la phase précoce d'activation, la survie et la prolifération sont privilégiées. En phase B (phase tardive) les cellules activent les voies de survie et de différenciation. Les couleurs indiquent si les voies sont activées (vert) ou réprimées (rouge). Voir détails dans le texte. PCL :Pseudo Chaîne légère (*Inspiré de Reth and Nielsen, 2014; Alt F.W et al., 2015*).

- **Régulation de l'expression, localisation et stabilité de AID**

La déamination des cytosines par AID est un processus potentiellement dangereux à l'origine de tumeurs (Storck et al., 2011). AID est normalement exprimée dans les cellules B du centre germinatif au moment où l'hypermutation somatique et la recombinaison de classe ont lieu. AID est une protéine dite « navette », elle s'accumule dans le cytoplasme mais exerce sa fonction dans le noyau des cellules (Ito et al., 2004; Patenaude and Di Noia, 2010). AID a récemment été trouvée associée avec la nucléoline (protéine nucléolaire C23) et la nucléophosmine (phosphoprotéine nucléolaire B23). Cette localisation nucléolaire pourrait avoir un rôle fonctionnel : les mutations qui abolissent la localisation de AID dans ces structures induisent une diminution de la CSR (Hu et al., 2013).

Cette « dangereuse » enzyme est finement régulée. Au stade B au repos, *Aicda* est réprimé par hyperméthylation de son promoteur. Puis lors de l'activation des B, le gène est déméthylé et le locus s'enrichit des motifs H3K9ac ; H3K14ac et H3K4me3. Après la CSR et la SHM, *Aicda* doit être dérégulé probablement par méthylation.

Le contrôle de l'expression et de la fonction de AID implique plusieurs mécanismes (Storb, 2014). (1) Tout d'abord, une régulation de l'expression s'exerçant par le biais de miRNA (micro-ARN). Plusieurs miRNA impliqués dans la stabilisation de l'ARN messager (ARNm) sont à ce jour décrits : miR-155, miR-181b, miR-361 et miR-93 (Vaidyanathan et al., 2014). Les miRNA sont de petits ARN, simples brins et non codants ARN. Ces miRNA se fixent sur la partie 3'-UTR (3'-UnTranslated) de l'ARNm de AID et le stabilisent. L'expression de miR-155 est faible dans les cellules B au repos, puis augmente en même temps que l'expression de AID dans les cellules B activées. Ce miRNA favorise l'activité de AID (Alt F.W et al., 2015).

(2) La protéine DnaJ1² permet le repliement et la stabilisation de AID. Lorsque cette protéine est absente, le niveau d'AID et de CSR sont réduits.

(3) AID peut être phosphorylé sur la sérine 3 et 38, la thréonine 27 et 140 et la tyrosine 184. Ces phosphorylations influencent l'activité de AID lors de la SHM et la CSR. Pour exemple, la phosphorylation de la sérine 38 et la thréonine 140 augmente l'activité de l'enzyme. Au contraire la phosphorylation de la sérine 3 réduit son activité. Les étapes de phosphorylation sont réalisées par la PKA ou la PKC (Protéine Kinase A ou C).

(4) La dégradation de AID est un processus rapide. De plus, sa stabilité semble être liée à sa localisation dans la cellule. Ainsi, dans le noyau la demi-vie de AID est réduite (8h) par rapport à celle du cytoplasme (20h). Deux voies de dégradation de AID ont été décrites : (1) une voie nécessitant la poly-ubiquitination dans le noyau puis la dégradation par le protéasome (Aoufouchi et al., 2008) ; (2) une voie indépendante de l'ubiquitine et de l'ATP mais faisant intervenir la protéine REG-γ et le protéasome (Uchimura et al., 2011).

² La protéine DnaJ1 fait partie de la famille des protéines chaperonnes HSP40.

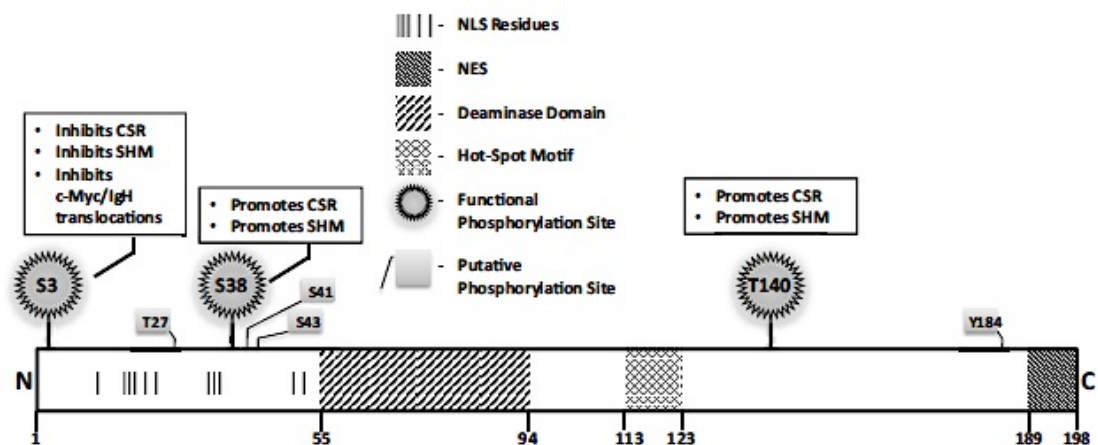


Figure 35. Description des domaines de AID et leurs fonctions.

Ce schéma décrit la structure primaire de AID. Les domaines, résidus et motifs importants pour la fonction de AID sont indiqués. CSR : Class switch Recombination ; SHM : Somatic HyperMutation ; NLS : Nuclear Localization Signal ; NES : Nuclear Export Signal ; S :Serine ; T : Threonine ; Y : Tyrosine. (Extrait de (Vaidyanathan et al., 2014).

Une question importante demeure : comment l'expression d'AID peut-elle être principalement confinée dans les cellules B activées du centre germinatif ? Des travaux ont pu mettre en évidence que cette enzyme pouvait être exprimée dans des tissus non-lymphoïdes, mais son rôle est mal connu (Rommel et al., 2013). Certaines équipes suggèrent qu'elle pourrait impacter sur le programme épigénétique en déaminant les 5-méthyl ou 5-hydroxyméthyl-cytosines en thymines ou en 5-hydroxy-thymines respectivement (Fritz and Papavasiliou, 2010).

- **Fonction**

Quand AID a été découverte, l'homologue connu le plus proche était APOBEC1, une déaminase de l'ARN (Muramatsu et al., 2000). A partir de ces observations, il a été supposé que AID était également une déaminase de l'ARN. Par ailleurs d'autres équipes ont suggéré que la cible de AID était l'ADN. Les études ont montré que AID ne cible pas l'ADN double brin mais plutôt l'ADN simple brin (Bransteitter et al., 2003; Dickerson et al., 2003; Pham et al., 2003). Ces données ont été renforcées par la mise en évidence de dU (désoxyuracil) au sein du locus d'Ig induit par AID (Maul et al., 2011) ainsi que par étude récente de RNA-seq (séquençage d'ARN en haut débit) qui n'apporte aucune preuve du ciblage de l'ARN par AID (Fritz et al., 2013). Enfin, à l'aide d'études biochimiques sur les substrats d'AID, l'équipe de Kohli explique comment AID arrive à cibler spécifiquement l'ADN (Nabel et al., 2013). Cependant l'équipe d'Honjo continue de publier des données sur le ciblage de l'ARN par AID (Liang et al., 2013).

Sur le plan mécanistique, on remarque que les deux processus (SHM et CSR) présentent le même substrat (ADN) et nécessitent la transcription. Le rôle de la transcription de la molécule d'ADN pour son ciblage par AID a fait l'objet de très nombreuses études et reste à ce jour mal connu : une hypothèse suggère que « l'accessibilité » à AID serait facilitée sur l'ADN simple brin (créé par la « boucle de transcription »). Sur l'aspect biochimique, l'action de AID est bien décrite : l'enzyme va déaminer une cytosine (C) en uracile (U) sur des sites préférentiels de l'ADN appelés « hotspots » (**Figure 36**). Ces courtes séquences portent un motif particulier WRCY (W = dA/dT ; R = dA/dG ; Y = dT/dC/dA) (Hwang et al., 2015). La lésion créée par AID forme un mésappariement dU:dG qui est pris en charge par les systèmes de réparation de l'ADN BER (Base Excision Repair) ou MMR (Mismatch Repair). Selon le cas, les mésappariements et/ou lésions aboutissent à des mutations lors de la SHM ou en des cassures doubles brins lors de la CSR.

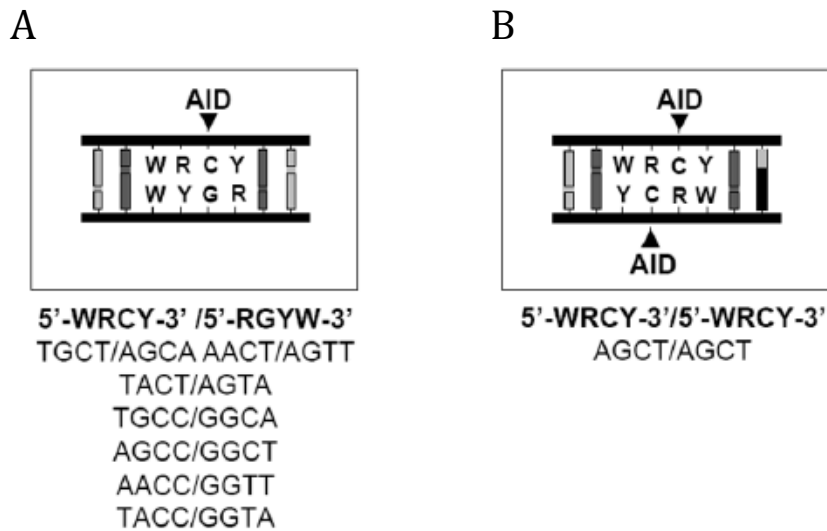


Figure 36. Exemple de séquences ciblées par AID lors de la maturation d'affinité ou la recombinaison de classe

Au cours de la SHM et de la CSR, l'enzyme AID déamine les résidus cytosines (C) en uraciles (U) sur des sites préférentiels de l'ADN appelés « hotspots ». Ces courtes séquences portent un motif particulier WRCY (W = dA/dT ; R = dA/dG ; Y = dT/dC/dA). (A) exemple de motifs ciblés par AID. Dans cette configuration, une seule déamination est possible dans ce motif double brin. (B) Dans ce motif, AID peut cibler les deux brins d'ADN comme indiqué sur la figure. Les régions switch contiennent une densité importante de ce motif AGCT souvent répétés en tandem. SHM : Somatic HyperMutation ; CSR : Class Switch Recombination ; AID : Activation-Induced Deaminase (*Extrait de Basu et al., 2009*).

- **Recrutement/ Ciblage de l'ADN simple brin par AID**
 - **Mécanisme d'action de AID lors de la SHM et CSR : caractéristiques communes**

Bien que la transcription soit une étape clé pour le ciblage par AID, les mécanismes conduisant à l'accessibilité de l'ADN pendant les processus de SHM et de CSR ne sont pas clairement élucidés. Dès la fin des années 1990 (avant la découverte de AID), plusieurs études indiquent clairement que la SHM requiert la transcription. En effet, le nombre de mutations diminue lorsque le promoteur en amont de l'exon de la région variable est supprimé (Fukita et al., 1998) ; une équipe indique qu'un déplacement du promoteur déplace également le spectre de mutations (Tumas-Brundage and Manser, 1997) ; plusieurs études prouvent également que le taux de mutation est corrélé au taux de transcription (Bachl et al., 2001). Il est donc apparu pertinent de rechercher des partenaires de AID parmi les acteurs de la machinerie de transcription. Les études de ChIP ont permis d'identifier plusieurs partenaires de AID, co-localisés au niveau des sites d'initiation de la transcription, tels que l'ARN polymérase II (ARN pol II) (Nambu et al., 2003) et Spt5 (SuPpressor of Ty5 homolog) un facteur associé à l'ARN pol II (Pavri et al., 2010). Finalement plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer l'exposition de l'ADN sous forme simple brin : (1) la présence de R-loops, structures accompagnant la machinerie de transcription dirigée par l'ARN pol II. Ces R-loops sont des hybrides ARN/ADN contenant le brin matrice et sont retrouvées au niveau des régions switch du locus IgH mais pas dans les régions variables. La capacité à générer des R-loops est attribuée à la composition en bases des régions switch, en particulier des régions riches en purines dans le brin non codant (Zarrin et al., 2004). (2) La présence de supers-enroulements négatif de l'ADN qui se forment à l'arrière des bulles de transcription. Ces structures sont mutées sur les deux brins mais uniquement *in vitro* (**Figure 37**) (Storb, 2014). (3) Le phénomène de « pause » de l'ARN polymérase II juste en aval du site d'initiation de la transcription, *i.e* que l'ARN pol II s'éloigne du site d'initiation de la transcription avant de reprendre par l'étape d'élongation (Wang et al., 2014). En effet, AID interagit avec une forme phosphorylée (sur la sérine 5) de la RNA Pol II correspondant à un statut « en pause » du complexe de transcription (Cogne, 2013). Cette phase de pause, se produisant 400 à 500 bases en aval du site d'initiation de la transcription, coïncide avec le niveau maximal de la fréquence d'hypermutation d'un segment VDJ réarrangé (**Figure 10A**) ; sur ce même profil, la fréquence de SHM diminue ensuite progressivement lorsque la polymérase reprend son activité. Lors de la CSR, la « pause » de l'ARN polymérase est augmentée au niveau des régions switch, un phénomène qui peut être expliqué par les répétitions de séquences propres à ces régions et les structures secondaires rencontrées telles que les R-loops (Cogne, 2013).

Les structures secondaires qui sont générées pendant la transcription sont des cibles potentielles de AID. Elles sont d'autant plus ciblées si elles sont stabilisées soit par la composition de la séquence (c'est le cas des régions riches en G qui peuvent former des structures en G-quadruplexe ou les régions switch qui forment des R-loops) soit par la présence de protéines de stabilisation. Il a été montré que AID peut déaminer les deux brins,

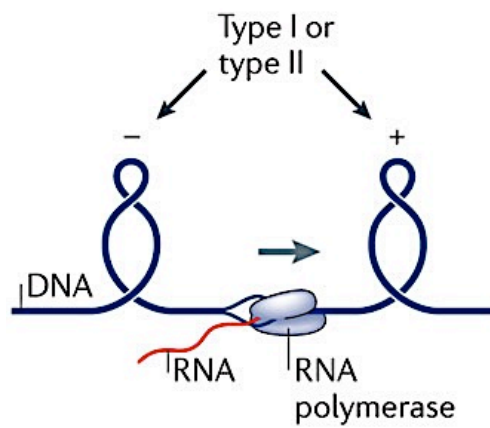


Figure 37. Super-enroulement de l'ADN lors de la transcription.

Lors de la transcription, l'ADN situé devant l'ARN polymérase devient super-enroulé, c'est la conformation « positive ». A l'arrière de la machinerie de transcription, l'ADN s'enroule également sur lui-même mais forme une structure super-enroulée dite « négative ». (*Adapté de Jeppsson et al., 2014*)

cependant seul le brin non codant serait immédiatement accessible à AID grâce à la fixation de facteurs spécifiques stabilisant sa structure tels que RPA (Replication Protein A). De plus, la fixation de AID nécessite sa phosphorylation sur la sérine 38 par la kinase PKA (Vaidyanathan et al., 2014).

Une autre hypothèse pouvant expliquer le recrutement de AID sur le brin non codant pourrait être la présence de transcrits « antisens » dans les régions ciblées par AID (régions S et exons variables réarrangés) alors que ces transcrits sont absents dans les gènes constants (Perlot et al., 2008). Cependant le rôle de ces transcrits antisens dans le ciblage de AID lors de la SHM ou la CSR n'est actuellement pas établi (Haddad et al., 2011).

C'est dans les deux contextes (CSR et SHM) que l'équipe de Alt a proposé qu'un complexe moléculaire nommé RNA exosome permettrait de dégrader/déplacer l'ARN et rendrait le brin matrice accessible à AID (Basu et al., 2011) (**Figure 38**) (Pefanis and Basu, 2015). Selon ces travaux, la fixation du RNA exosome et la dégradation de l'ARN associé au brin matrice est elle-même dépendante de la présence de AID.

▪ « Ciblage » par AID lors de la SHM

Les dernières données de la littérature concernant les facteurs associés à la fixation d'AID sur l'ADN simple brin sont imprécises. Concernant la SHM, il semble établi que simultanément à la progression de la bulle de transcription, le brin non codant est exposé à AID car stabilisé par l'un de ses partenaires : RPA. L'exposition du brin matrice semble quant à elle plus complexe à expliquer car ce dernier subit des super-enroulements (positifs et négatifs, visualisés uniquement *in vitro*) de part et d'autre de la bulle de transcription, des structures difficilement ciblées par AID. Wang a établi un modèle qui pourrait expliquer le ciblage de AID lors de la SHM : dans ce modèle, il suggère que plusieurs complexes de transcription sont présents sur la région d'intérêt. Ces complexes débuteraient une phase de transcription mais seraient rapidement arrêtés par une diminution des facteurs nécessaires à l'élongation ou des structures particulières de l'ADN. Dans son hypothèse, le ciblage du brin matrice et du brin non codant ne se ferait pas simultanément. Ainsi, lors de l'arrêt précoce de la transcription, l'ADN non codant simple brin est exposé à AID alors que l'ADN matrice est inclus dans un complexe ADN/ARN. Ensuite, l'ADN non codant serait protégé contre le ciblage de AID alors que l'ARN du complexe ADN/ARN est dégradé permettant le ciblage par l'enzyme (Wang et al., 2014).

Lors de la maturation d'affinité, on retrouve des modifications de l'ADN et des histones. L'hypométhylation de l'ADN (*i.e* la décondensation) semble être un prérequis pour favoriser les motifs acétylés des histones et faciliter le recrutement de la machinerie de la SHM.

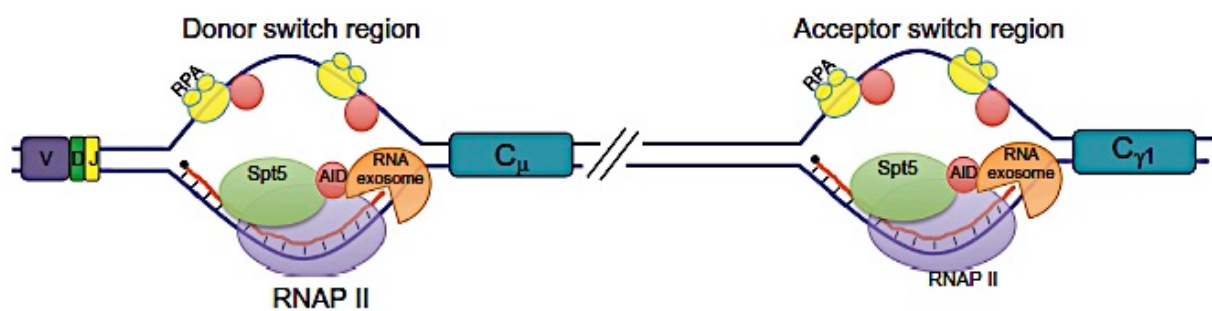


Figure 38. Ciblage des régions switch par AID lors de la commutation de classe vers $\gamma 1$

La transcription germinale des régions switch initiée à partir des promoteurs I induit la formation de R-loops. Le recrutement d'AID (rouge) sur le brin non codant nécessite la présence de la protéine RPA (jaune). Sur le brin matrice, lors de la « pause » de la RNA pol II (violet), AID est recruté *via* l'interaction avec de nombreux facteurs ; le seul ici représenté est Spt5 (vert) et l'exosome ARN (orange). (*Adapté de Pefanis and Basu, 2015*).

▪ « Ciblage » par AID lors de la CSR

Le recrutement de AID lors de la CSR comporte quelques similitudes avec la SHM mais il existe aussi d'importantes différences qui peuvent être liées à la nature des partenaires protéiques mais également à la structure des régions ciblées.

Lors de la CSR, RPA et d'autres éléments tels que CTNBL1 (Catenin, Beta Like 1) PTBP2 (Polypyrimidine Tract Binding Protein 2) et 14-3-3 ont été identifiés comme se fixant à AID (Sun et al., 2013). Ce complexe protéique se fixe sur le brin non codant lorsqu'il est exposé par la RNA pol II et sa bulle de transcription (Pavri and Nussenzweig, 2011) ; de la même façon que pour la SHM, la déamination intervenant sur le brin matrice par un tel complexe incluant AID reste difficile à expliquer et nécessite vraisemblablement la dégradation de l'ARN associé par le RNA exosome.

Les régions switch (S) disposées en amont de chaque gène constant (sauf δ) s'étendent sur 1 à 12 kb (selon le gène) et sont constituées principalement de répétitions contenant des séquences riches en purines situées sur le brin non codant (**Figure 26**). Ces régions sont également riches en « hotspots » (WRCY) ciblés par AID (**Figure 36**).

Tout comme le processus de SHM, la commutation de classe nécessite que les régions S soient transcrites pour être ciblées par AID. Chaque région S est en effet précédée par un promoteur germinale I (pour Intervening) (**Figure 26**) sensible à des stimuli différents. Pour exemple, une interaction entre une cellule B (exprimant la molécule de surface CD40) et un lymphocyte T (exprimant le ligand CD40L et produisant de l'IL4) stimule fortement la transcription des promoteurs germinaux I_{μ} , $I_{\gamma 1}$ et I_{ϵ} . Il s'en suit un événement de CSR vers IgG1 ou IgE (Hwang et al., 2015). Ces transcrits initiés aux promoteurs I sont appelés transcrits « germinaux ou stériles » car ils sont produits avant l'évènement de CSR et ne permettent pas la production d'une protéine fonctionnelle. La composition en bases des régions S, en particulier la présence de purines (en majorité des G sur le brin non codant) ; permet la formation de R-loops³ pendant l'étape de transcription (Yu et al., 2003). Dans ces structures, le brin codant reste associé à son ARN et forme un hybride ADN/ARN dont la relative stabilité permet le maintien (temporaire) du brin non codant sous la forme d'une boucle simple brin (**Figure 38**) (Roy et al., 2008). Dans le cas de la CSR, l'exposition du brin non codant à AID et ses cofacteurs a fait l'objet de plusieurs démonstrations (Chaudhuri et al., 2003).

Contrairement aux régions variables et aux régions switch, les régions constantes sont épargnées par les attaques de AID et cette asymétrie est corrélée avec la présence de la polymérase II en « pause » dans ces régions V et switch. Cette « pause » se produit fréquemment à proximité des sites d'initiation de la transcription et dans les régions switch. Ces deux régions sont enrichies de marques d'activation particulières de la chromatine. On trouve des motifs liés aux modifications des histones tels que l'hyperacétylation des histones

³ Le « R » de R-loops indique par opposition au D-loops que l'ARN participe pour moitié (hétéroduplex ADN/ARN)

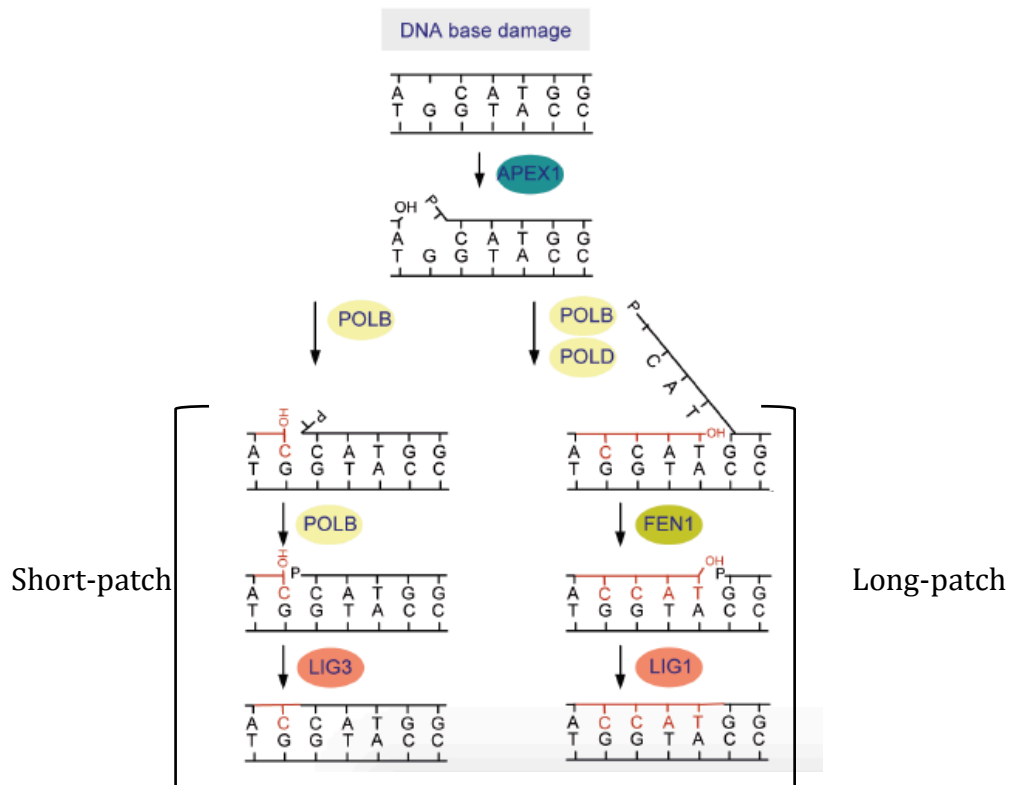


Figure 39. Les voies de réparation BER

Lors d'un mésappariement induit par AID, la voie de réparation BER intervient pour réparer la lésion. La première étape permet d'éliminer « l'erreur » par UNG et une endonucléase (APEX1) simple brin et de créer un site abasique. Ensuite deux voies se distinguent. (A gauche) la voie dite « short-patch » où la polymérase β permet de remplacer la base absente puis une ligase permet de refermer le brin. (A droite) la voie dite « long-patch » où le brin portant la mutation va être resynthétisé sur 2 à 10 pb par les polymérases $\beta/\delta/\epsilon$. Ensuite l'enzyme FEN 1 élimine l'ancien brin, puis le nouveau brin est fermé par une ligase. BER : Base Excision Repair ; UNG : Uracil DNA-Glycosylase ; FEN 1 : flap structure-specific endonuclease 1 ; APEX1 : APEX nuclease 1 (*Adapté de Robertson et al., 2009*)

H2B, H3 et H4 (e.g H2BK5ac, H3K27ac etc.) et la méthylation de H3 (H3K4me3). La phosphorylation de la sérine 5 sur l'ARN pol II est aussi une marque d'activation. Au contraire les marques de chromatine inactive sont H3K36me3, H4K20me1 ainsi que la phosphorylation de la sérine 2 sur l'ARN pol II. En étudiant précisément le profil épigénétique des régions switch et des gènes constants, il apparaît que le motif H3K4me3 pourrait être l'une des marques permettant le ciblage de AID (Wang et al., 2009; Stanlie et al., 2010; Jeevan-Raj et al., 2011; Cogne, 2013).

Les marques « actives » des histones sont présentes dans la région switch μ , même au stade B au repos indiquant que la région « donneuse » est ouverte et prête pour la CSR. Après l'activation de la cellule B, la région « acceptrice » perd les marques d'histones répressives, telles que H2K9me3 et H3K27me3 (Li et al., 2013).

b. Induction de la SHM après déamination par AID

Le processus de maturation d'affinité introduit des mutations ponctuelles dans la région variable des locus des chaînes lourdes et légères réarrangées. Ce processus se produit majoritairement au sein des cellules B activées du centre germinatif. Les mutations provoquées par AID s'accumulent dans une zone s'étalant de 100 à 200 pb en aval du site d'initiation de la transcription jusqu'à 1,5 à 2 kpb après ce site avec un pic à 400-500 pb (**Figure 10A**) (Peled et al., 2008; Keim et al., 2013). La fréquence de ces mutations est très importante, elle est de l'ordre de 10^{-4} par pb (10 mutations pour 1000 pb) alors que le niveau basal dans le génome est estimé à 10^{-9} mutations par pb. On sait par ailleurs que les hypermutations somatiques s'accumulent dans les CDR (Régions déterminant la Complémentarité). Les mutations sont la résultante de la prise en charge des mésappariement dU:dG qui découlent directement de la déamination des cytosines sur l'ADN simple brin par AID.

De tels mésappariements peuvent être pris en charge par les voies de réparation BER (Base Excision Repair) (**Figure 39**) ou MMR (Mismatch Repair) qui conduisent à une réparation sans erreur dans une cellule non B (**Figure 40 Phase 0**); dans les cellules B subissant le processus de SHM, ces réparations sont infidèles. La machinerie de réparation MMR fait intervenir plusieurs facteurs : le mésappariement est reconnu par l'hétérodimère MSH2/MSH6 (MutS Homologue 2 et 6), puis un complexe MLH1/PMS2 (MutL Homologue 1/Post Meiotic Segregation 2) est recruté. Le fragment contenant l'uracile est par la suite éliminé par EXO1 (Exonucléase 1). Enfin la polymérase δ « error-free » liée au facteur PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) synthétise un nouveau brin qui est ligaturé par une enzyme de type ligase (Hwang et al., 2015).

Pendant la SHM, on distingue plusieurs situations selon le mode de prise en charge du mésappariement : (1) si le mésappariement n'est pas éliminé avant la réplication de l'ADN (phase S), l'ADN polymérase fidèle va générer une mutation de type transition dans l'une des deux cellules filles. Initialement la paire de base était C/G et devient A/T après la réplication

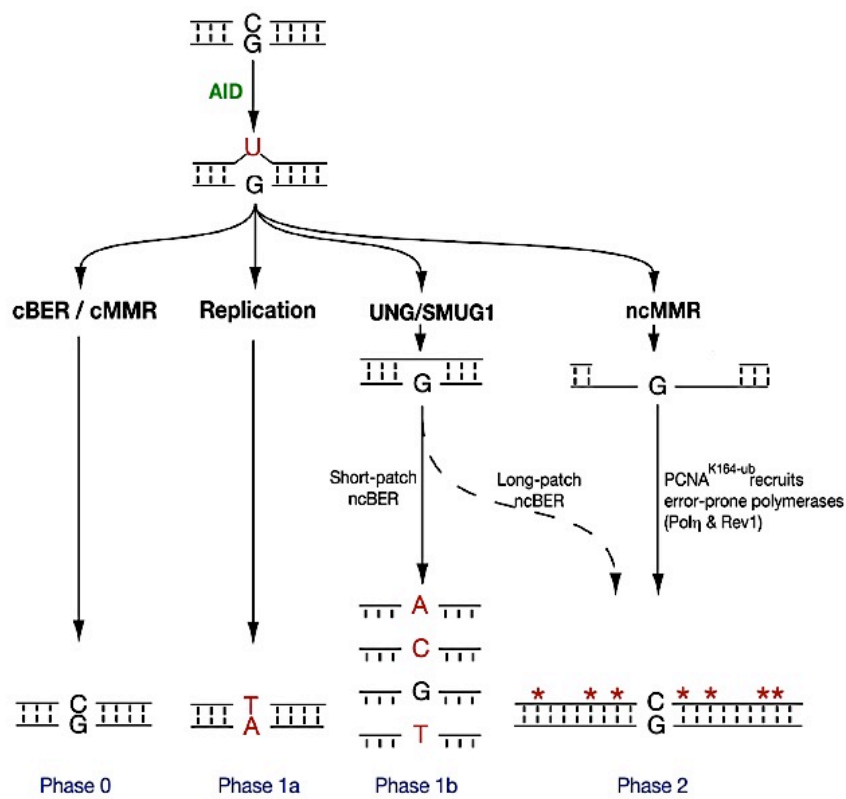


Figure 40. Prise en charge des mésappariements lors de l'hypermutation somatique

Lorsqu'un mésappariement est créé suite à la déamination par AID, plusieurs voies de réparations vont être engagées. (Phase 0) Les voies cBER et cMMR vont réparer en remplaçant l'uracile par la base initialement en place *i.e* une cytosine. (Phase 1a) Lors de la réplication, le mésappariement est toujours présent. Au moment de la réplication, l'uracile sera reconnu comme une thymine et la polymérase va générer une transition. (Phase 1b) Le mésappariement est pris en charge par la voie ncBER short-patch. Après excision de la base une polymérase infidèle va insérer une base aléatoirement et générer une transition ou une transversion. (Phase 2) Le mésappariement est pris en charge par les voies ncBER long-patch ou ncMMR. Le brin portant la mutation est en partie supprimé et resynthétisé par une polymérase infidèle (pol η). L'action de cette polymérase va générer des mutations sur l'ensemble du brin resynthétisé. cBER : Classical Base Excision Repair ; cMMR : Classical MisMatch Repair ; ncBER : Non-Classical Base Excision Repair ; ncMMR : Non-Classical MisMatch Repair ; UNG : Uracil DNA-Glycosylase). (Adapté de Alt F.W et al., 2015).

(**Figure 40 Phase 1a**). (2) le mésappariement peut être pris en charge par la voie BER mais la réparation ne se fait alors pas selon la voie classique (**Figure 39**). En effet, après excision de la base dans la voie BER « short-patch », des polymérases infidèles vont insérer une base de manière aléatoire créant ainsi des transitions ou des transversions (**Figure 40 Phase 1b**). (3) la voie BER « long-patch » ou la voie MMR interviennent mais la réparation est réalisée par des polymérases infidèles « error-prone » (Pol η , etc.) La réparation est infidèle sur l'ensemble du brin nouvellement synthétisé créant ainsi plusieurs mutations ponctuelles (**Figure 40 Phase 2**) (Peled et al., 2008; Alt F.W et al., 2015; Hwang et al., 2015).

c. Mécanisme de la recombinaison de classe

Il est essentiel qu'une cassure double brin se produise dans chaque régions S (donneuse et acceptrice) afin que la recombinaison de classe puisse s'opérer (**Figure 10B**). Au cours de la CSR, la recombinaison intervient généralement entre la région switch μ (la région donneuse) sauf dans de rares cas très particuliers et une région acceptrice en aval S γ , S ϵ ou S α ; dans certains cas, les régions S γ ou S ϵ peuvent également servir de région donneuse lors d'une seconde CSR ou lorsque la région switch μ est tronquée (Zhang et al., 2010; Xu et al., 2012; Wu and Zarrin, 2014). L'importance de ces régions pour le processus de CSR a été mise en évidence par de nombreuses études. La suppression partielle ou totale de la région switch μ induit respectivement une diminution ou une abolition de la CSR (Luby et al., 2001; Khamlichi et al., 2004). Initialement Luby avait indiqué que les régions switch étaient importantes mais pas obligatoires pour une commutation de classe efficace. Cependant dans son modèle, la suppression de switch μ n'est que partielle laissant une partie contenant une région riche en G. De plus, la CSR est dépendante du sens d'orientation de la région switch. Dans l'étude menée par Shinkura, la CSR dirigée vers IgG1 est diminuée de 75% lorsque le sens de la région switch γ 1 est inversé (Shinkura et al., 2003).

Les mésappariements initiés par AID dans les régions S sont pris en charge par UNG (Uracil DNA-Glycosylase) qui enlève la base uracile ; le site abasique est reconnu par une endonucléase (AP1) qui clive la chaîne carbonée créant ainsi un « nick ». La présence de régions « hotspots » répétées en tandem dans les régions switch permet des déaminations par AID fréquentes sur les deux brins. Cette particularité favorise des « nick » très proches sur les deux brins des régions S et induisent des cassures doubles brins plus ou moins décalés. Dans le cas où les « nick » sont trop éloignés les uns des autres, la cassure double brin est générée par l'action la voie MMR (Stavnezer and Schrader, 2014). Dans cette voie, le mésappariement est reconnu par l'hétérodimère MSH2-MSH6 puis permet le recrutement de MLH1-PMS2 et l'exonucléase 1. Les activités exonuléasiques induisent la formation de cassures simples brins permettant l'entrée de nouvelles nucléases qui vont générer des cassures doubles brins.

Les cassures doubles brins sont reconnues par le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1). Le facteur Nbs1 permet le recrutement de la kinase ATM (ataxia Telangiectasia

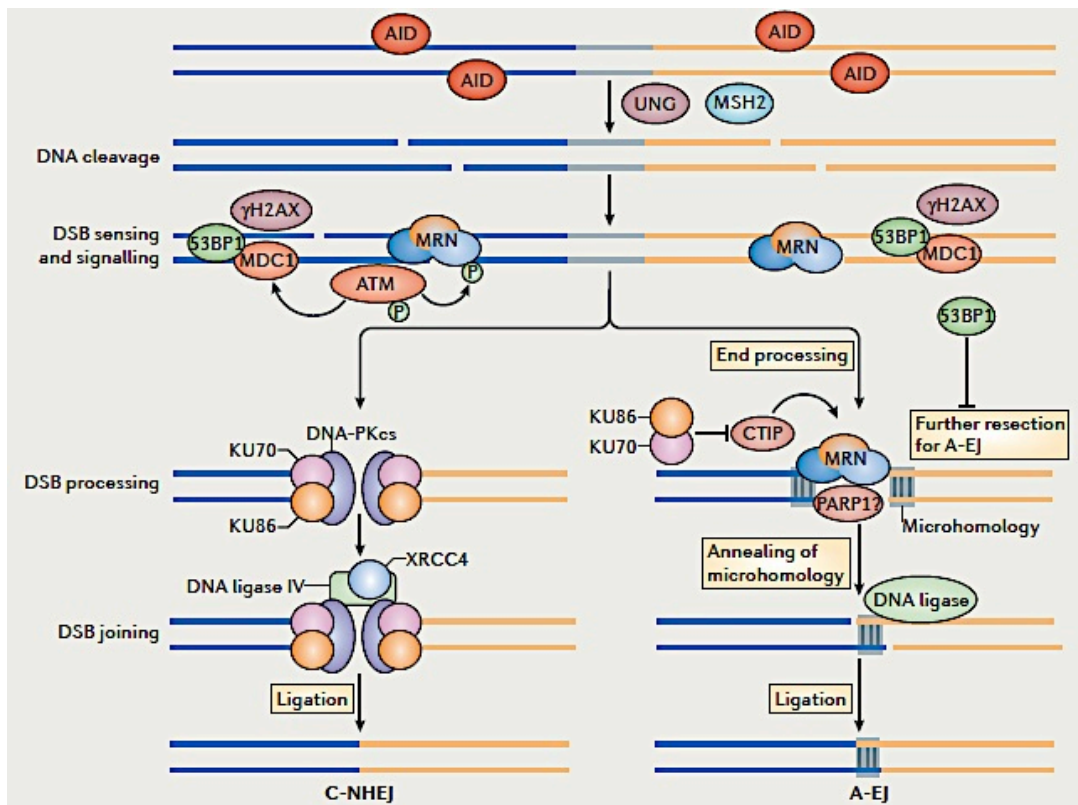


Figure 41. Résolution des cassures doubles brins par les voies C-NHEJ et A-EJ

Les cassures doubles brins générées après la déamination par AID permettent la jonction entre deux régions switch. Cette résolution se fait soit par la voie C-NHEJ (à gauche) soit par la voie A-EJ (à droite). C-NHEJ : Classical Non Homologous End Joining ; A-EJ : Alternative End joining. (Extrait de Xu et al., 2012).

Mutated) qui va phosphoryler l'histone H2AX (γ -H2AX) et permettre le recrutement des facteurs 53BP1 (p53-Binding Protein1), Nbs1 et MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1). Un rapprochement des régions S destinées à recombiner (la région S μ et une autre région S située entre 60 et 160 kpb plus en aval) est indispensable à la CSR. Ce recrutement spécifique d'une lésion d'ADN double brin, s'effectue dans une « synapse » regroupant les deux régions S amenées à recombiner (**Figure 41**).

La jonction (ligature et réparation) entre les deux régions S peut être effectuée par deux voies : (1) La voie C-NHEJ (Classical Non-Homologous End Joining) et la voie A-EJ (Alternative End joining).

La voie de réparation C-NHEJ est la voie majoritairement utilisée pour résoudre les jonctions S lors de la CSR. Elle est composée de nombreux acteurs protéiques tels que Ku70, Ku80, DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit), Cernunnos, XRCC4 et l'ADN ligase IV. L'absence de l'un de ces facteurs diminue la CSR mais ne l'abolit pas totalement car il existe une seconde voie de réparation alternative, la voie A-EJ (Vaidyanathan et al., 2014) (**Figure 41**). Dans la voie A-EJ les cassures doubles brins sont résolues à l'aide notamment des facteurs MRN et CtIP (CtBP-interacting protein) (**Figure 41**).

L'analyse de la composition des jonctions S permet de connaître la voie de réparation mise en jeu. En effet des jonctions directes ou des jonctions laissant apparaître quelques bases d'homologie (également appelées micro-homologies, en général inférieures à 5 bases) proviennent de la réparation par la voie classique NHEJ. En revanche si ces micro-homologies présentent plus de 5 bases en commun, la voie de réparation utilisée est la voie A-EJ. Au sein des régions switch réarrangées, il est possible de trouver des jonctions complexes issues de plusieurs régions S : ce phénomène peut être expliqué par des évènements de CSR successifs.

d. Cas particulier du *trans*-CSR

La commutation de classe est définie comme une recombinaison intra-allélique permettant à deux régions switch d'être assemblées afin de modifier l'isotype produit par la cellule B. La CSR « classique » est donc un phénomène génétique réalisant une recombinaison en *cis*. Un phénomène de recombinaison inter-allélique, appelée *trans*-CSR, a été mise en évidence pour la première fois chez le lapin : dans cette étude, Kingzette montre que ce processus se produit à une fréquence relativement élevée, environ 7% des hybridomes à IgA analysés (Kingzette et al., 1998). Quelques années plus tard, ce phénomène est observé *in vivo* dans des modèles murins portant des allèles IgH d'haplotypes différents (a et b). Ces études ont mis en évidence les produits de recombinaison par *trans*-CSR (protéines et ADN) et ont évalué leur fréquence : chez la souris, le *trans*-CSR survient dans environ 10% des cas vers IgA et peut culminer à 17% dans le cas pour l'isotype IgG3 (Reynaud et al., 2005; Dougier et al., 2006). Ce phénomène, bien que soupçonné, n'avait jamais été mis en évidence

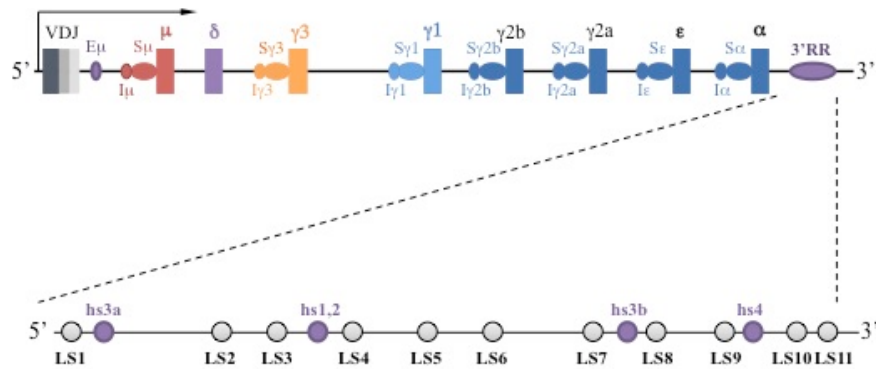
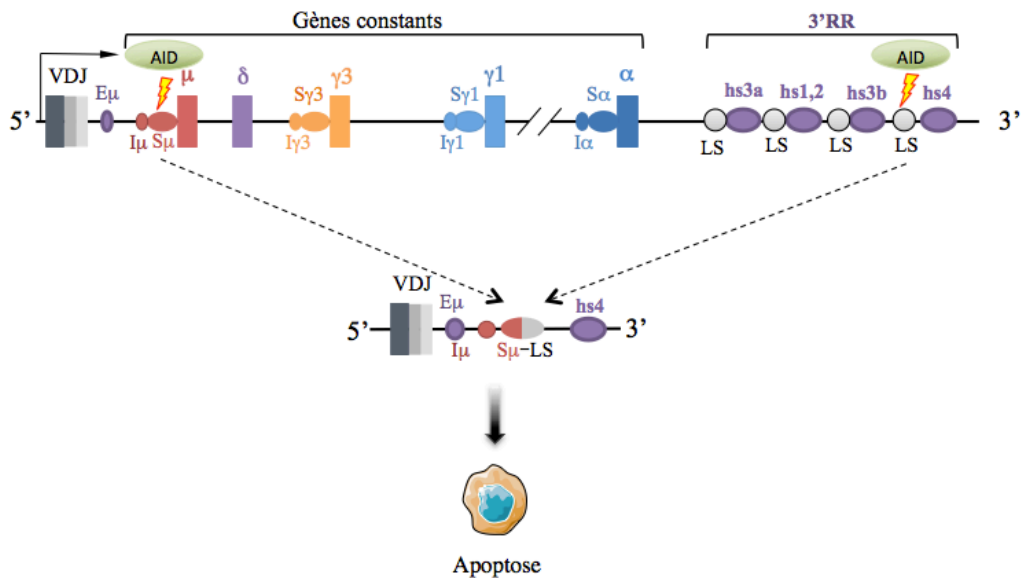
A**B**

Figure 42. Régions LS et recombinaison suicide au locus IgH murin

A. Les 11 régions LS (Like-Switch) sont situées au sein de la région régulatrice 3' du locus IgH distribuées entre les activateurs transcriptionnels (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4). B. Schéma représentatif du mécanisme de LSR (recombinaison suicide au locus IgH). Le ciblage par AID (vert) d'une région switch (ici μ) et d'une région LS induit une recombinaison qui élimine l'ensemble des gènes constants et conduit à la mort de la cellule par apoptose. (*Adapté de Péron et al., 2012*).

chez l'homme. J'ai contribué à une étude rapportant le phénomène de *trans*-CSR l'homme : ces résultats ont fait l'objet d'une publication présentée dans la partie Annexes [Article 4].

e. Nouvelles cibles de AID : les régions LS en 3' du locus IgH

Un nouveau processus de recombinaison, appelé « recombinaison suicide du locus IgH » (ou LSR pour locus suicide recombination) a été mis au jour récemment dans notre laboratoire. Ce mécanisme, dépendant de AID, supprime par recombinaison la totalité de la région incluant les gènes constants IgH. La région régulatrice 3' du locus IgH (3'RR) (*cf.* chapitre 3.5) contient des séquences répétées et conservées partiellement similaires aux régions switch (Chauveau and Cogné, 1996; Sepulveda et al., 2005). Ces régions appelées LS (Like Switch) sont au nombre de 11 au sein de la 3'RR de souris (**Figure 42**). Les auteurs ont mis en évidence que des ARN (transcrits par la RNA pol II) survenaient dans la 3'RR de souris après stimulation des cellules B. De la même façon que pour les régions S et les segments variables réarrangés des gènes d'Ig, la transcription de 3'RR de souris permet un ciblage des régions LS par AID. En effet, il s'est avéré que la 3'RR est mutée, les régions LS apparaissant plus affectées (0,28%) que les activateurs transcriptionnels (0,11%) ; le taux global de mutation étant proche de celui trouvé dans la région S μ (0,42%) (Péron et al., 2012a). Enfin, ces régions sont capables de recombiner et de former une jonction directe entre la région S μ et une région LS. Cette recombinaison a pour conséquence l'élimination complète des gènes constants et donc l'abolition de l'expression du BCR ; ce dernier étant nécessaire à la survie des cellules B, il a été proposé que les cellules B ayant effectué la LSR soient incapables de survivre (Péron et al., 2012b). L'intérêt physiologique de ce processus pourrait être l'élimination de certaines cellules B activées et participerait ainsi à la régulation de l'homéostasie des cellules B. Il est par exemple envisageable qu'une cellule B autoréactive puisse être « activée à outrance » puis physiologiquement éliminée par le mécanisme de LSR.

f. AID et cancer

Bien que le rôle physiologique de AID soit de participer à la diversification du répertoire d'anticorps, cette enzyme, en générant des mésappariements et éventuellement des lésions à l'ADN, peut également devenir une menace pour l'intégrité du reste du génome de la cellule B.

En général, le ciblage de AID est spécifique aux gènes d'immunoglobulines appelés gènes « on-targets ». Cependant de nombreux exemples montrent que AID peut également cibler des gènes non-Ig (Storck et al., 2011; Kato et al., 2012). Ces cibles illégitimes de AID sont appelées gènes « AID off-targets ». Il est également reconnu que l'expression de AID n'est pas cloisonnée aux cellules B (Rommel et al., 2013). En effet, AID est également exprimée dans les ovaires et les testicules (Schreck et al., 2006). Parmi les gènes AID off-

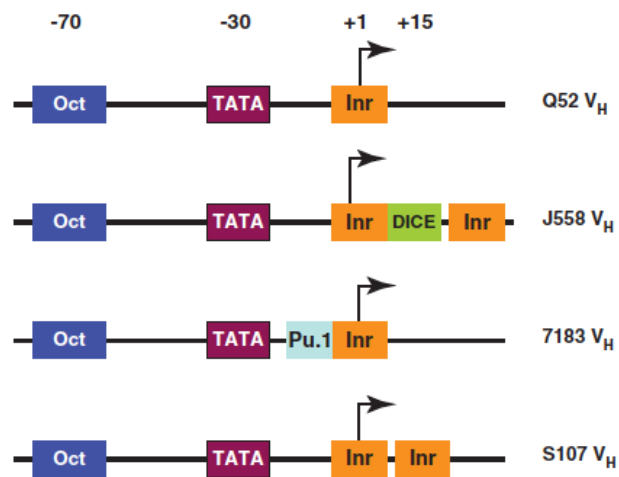


Figure 43. Diversité et architecture des promoteurs V_H

Les promoteurs V_H possèdent la même structure de base. Le motif octamérique ATGCAAAT (OCT) est situé à -70 pb du site d'initiation de la transcription (TSS), la TATA box à -30 pb et l'élément initiateur (Inr) sont représentés. Certaines familles de V_H possèdent des sites de fixation supplémentaires pour Pu.1, DICE (Downstream Immunoglobulin Control Element) et/ou Inr. (*Extrait de Roy et al., 2011*).

targets, on compte un nombre conséquent d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs. Les lésions occasionnées par AID sur les off-targets peuvent conduire à des mutations ou des recombinaisons qui peuvent juxtaposer un oncogène à proximité d'une séquence régulatrice. Ces événements peuvent aboutir à une dérégulation du gène cible et, à terme, à l'émergence d'une tumeur.

- **Les cibles illégitimes de AID : les gènes AID « off-targets »**

Depuis les années 80, les études sur les cancers du lignage B ont mis en évidence de nombreuses translocations d'oncogènes aux locus des gènes d'Ig (*c-myc*, *Bcl2* etc.). Ces événements, issus de recombinaison inter-chromosomiques, sont fréquemment associés à des types particuliers de cancers. Ces translocations sont en partie associées à des erreurs du système impliqué dans le remodelage des gènes d'Ig, avec pour origine des cassures doubles brins. Ainsi, les translocations peuvent être divisées en plusieurs groupes : (1) les translocations ayant pour origine des cassures issues des recombinaisons V(D)J, responsables notamment des lymphomes folliculaires. Ce lymphome se caractérise par la translocation de *Bcl2* dans les segments J_H qui induit l'expression ectopique de l'anti-apoptotique BCL2 dans les centres germinatifs. (2) Les translocations issues d'un dérèglement du mécanisme de CSR, notamment dans certains lymphomes de Burkitt (Alt F.W et al., 2015). Cette translocation place l'oncogène *c-myc* au sein du locus IgH dans 80% des cas et au sein d'Igk ou d'Igλ dans les autres cas. Cette translocation a pour conséquence l'expression ectopique de c-MYC dans les cellules B du GC. De manière très intéressante, chez les modèles murins développant spontanément ce type de lymphome, la suppression de AID est suffisante pour bloquer la génération des translocations *c-myc* : *IgH* (Robbiani et al., 2008).

Au-delà des translocations induites par des cassures doubles brins, les oncogènes exprimés dans le lignage B peuvent subir des mutations somatiques aberrantes, à l'origine de dérégulations. Cependant, les gènes off-targets des cellules B (*Bcl6*, *Pax5*, *Pim1* etc.) sont ciblés par AID dans un contexte physiologique, au moment de la réaction du GC (Pasqualucci et al., 1998, 2000). Il est toutefois difficile de prédire si ces mutations présentent un rôle fonctionnel ou si elles « accompagnent passivement » le processus de maturation de la réponse immune B. L'équipe de Schatz a étudié, chez la souris, l'activité de AID par le séquençage de 150 gènes (off-targets) exprimés dans les cellules B du GC. L'étude a été réalisée dans un contexte de cellules B sauvages ou déficientes pour les voies de réparation de l'ADN (*Msh2* et *Ung* KO). L'étude révèle une forte activité de l'enzyme sur environ 40% de ces gènes, et de manière surprenante, environ 25% des gènes analysés ne semblent pas « surveillés » par les systèmes de réparation et accumulent les mutations dans les cellules B du GC. (Liu et al., 2008; Fear, 2013).

Ces gènes off-targets partagent des caractéristiques avec les gènes d'Ig. (1) L'analyse par séquençage de ces gènes en comparaison des gènes d'Ig montre que leur séquence présente d'abondantes répétitions, avec des motifs ciblés par AID (« hotspots »). (2) Tout comme pour les cibles légitimes d'AID, les mutations sont distribuées sur environ 2 kb en

aval du site d'initiation de la transcription. (3) La marque épigénétique H3K4me3 suit le même profil que la fréquence d'hypermutation sur les gènes d'Ig (*i.e* une fréquence de SHM élevée est corrélée à une marque H2K4me3). Cette similitude est retrouvée dans les gènes off-targets (Kato et al., 2012).

- **Expression ectopique de AID**

En dehors des cancers des cellules du lignage B, la surexpression ou la dérégulation de l'activité de AID, peut induire d'autres cancers comme les cancers gastriques, hépatiques, sein, ovaires, poumons ainsi que des lymphomes T (Rebhandl et al., 2015). Dans les cancers colorectaux, AID peut cibler le gène *Apc* (adenomatous polyposis coli). Les cellules de l'épithélium gastrique infectées par *Helicobacter Pylori* ont une surexpression du gène *Aicda* codant AID, provoquant des mutations du gène *p53*.

- **Régulation spatiale de AID et de ses gènes cibles dans le noyau**

Un évènement de translocation suppose que, à un instant donné, les chromosomes qui portent les cassures de l'ADN soient juxtaposés. Il est plausible que les loci des gènes d'Ig et les loci des gènes off-targets soient physiologiquement à proximité lors de leur déamination par AID (Robbiani and Nussenzweig, 2013). Pour exemple, dans une étude dynamique par RNA-FISH, l'équipe de Fraser a montré une re-localisation dynamique des loci *c-myc* et *IgH* au cours des premières minutes qui suivent l'activation de cellules B (Osborne et al., 2007). La variable dynamique de ce processus est probablement importante, en effet une autre étude par DNA-FISH montre que les gènes off-targets ne sont pas statistiquement plus proches dans des cellules triées du GC (Gramlich et al., 2012). Des techniques récentes de biologie moléculaire (4C, 5C, 3D-FISH etc.) sont utilisées afin d'étudier l'architecture nucléaire et la position relative des gènes entre eux. Une étude de l'équipe de Skok montre que les gènes off-targets se rapprochent mutuellement dans un modèle de cellules B stimulées pour la CSR (Rocha et al., 2012). Des équipes suggèrent que l'activité d'AID impliquée dans des processus tumoraux est influencée par les microenvironnements nucléaires qui partagent des caractéristiques communes notamment en matière de régulation d'architecture et de transcription. Ainsi des structures réalisant des interactions à longue distance et ayant une grande activité transcriptionnelle maintenant nommées super-enhancers (*cf.* Chapitre 3.7) prôneraient le ciblage par AID (Qian et al., 2014).

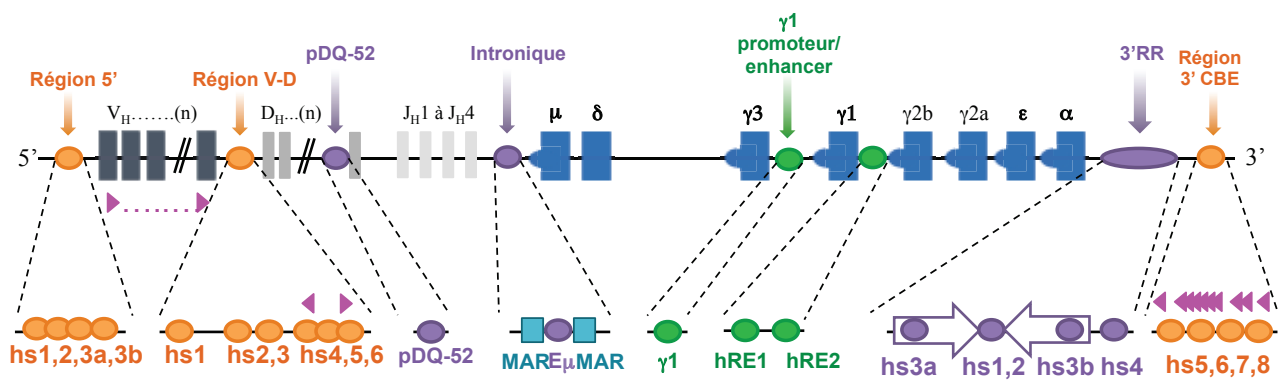


Figure 44. Carte du locus IgH murin

Plusieurs éléments régulateurs sont dispersés le long du locus IgH. Les rectangles gris représentent les segments de la région variable (V, D et J). Les rectangles bleus symbolisent les gènes constants. Les cercles représentent les régions régulatrices confirmées ou non. En orange, les régions étudiées dans des modèles murins KO, n'ont pas de rôle défini (région 5') ou sont des isolateurs (région V-D et région 3' CBE). En violet, les éléments ayant une action activatrice confirmée dans la littérature (pDQ-52 ; l'enhancer intronique E_{μ} ; la 3'RR). En vert, les éléments suspectés comme ayant une activité régulatrice mais non caractérisée ($\gamma 1$ promoteur/enhancer et les sites hRE1-hRE2). En rose sont représentés des sites CBE. De nombreux CBE sont dispersés entre les segments V_H ; deux sont répertoriés dans la région intergénique V-D (CBE1 et CBE2 au niveau de hs4 et hs5 respectivement). Enfin, dix autres sites de liaison au CTCF sont localisés dans la région 3' CBE. MAR : Matrix Attachment Region ; 3'RR : 3' Regulatory Region ; CBE : CTCF Binding Element.

Chapitre 3 Les contrôles du locus IgH : expression, position, interaction

Dans les cellules eucaryotes, les boucles et la compaction de la chromatine, les activateurs transcriptionnels, les isolateurs et les régions de contrôle du locus IgH influencent l'expression des gènes sur de grandes distances génomiques. De nombreux modèles murins ont été générés afin d'étudier l'influence de tous ces éléments sur l'expression, la position et les interactions du locus IgH.

1- Description des éléments *cis*-régulateurs

De nombreux éléments *cis*-régulateurs sont clairement identifiés au sein du locus IgH. De très nombreux promoteurs sont répartis sur le locus entier. On trouve également des activateurs transcriptionnels majeurs ou « enhancers », situés d'une part dans l'intron entre J_H et C_μ et d'autre part dans la région régulatrice en 3' du locus (3'RR), ainsi que des isolateurs de la chromatine également appelés « insulators ou silencers ».

a. Les promoteurs

Les promoteurs présents au sein du locus IgH peuvent être regroupés dans 2 familles : ceux situés en amont des segments V, D, J et ceux situés à proximité des gènes constants. A partir de ces nombreux promoteurs, une multitude de transcrits sont initiés tout au long du développement B. On trouve ainsi des transcrits germinaux (sens et antisens) dans les segments V_H , D_H , J_H , en amont des gènes constants et dans la région régulatrice 3' du locus (Péron et al., 2012a).

- Les promoteurs V_H

Des promoteurs sont présents en amont de chaque segment V_H . Les premières études sur des lignées cellulaires suggéraient qu'ils n'étaient pas fonctionnels avant les réarrangements. Dans les années 1980, Alt et son équipe ont démontré qu'ils étaient actifs et que cette activité concerne toutes les familles de segments V_H . Le promoteur se situe environ 250 pb en amont des segments variables. Il se compose d'une « TATA box » située 30 pb en amont et d'une séquence octamérique très conservée ATGCAAAT située 70 pb en amont du site d'initiation de la transcription (**Figure 43**) (Roy et al., 2011). Toute mutation affectant ce motif

provoquent une forte diminution de la transcription (Poellinger et al., 1989). Cette séquence est le lieu de fixation de facteurs de la famille POU : Oct-1 (facteur ubiquitaire) et Oct-2 (spécifique des cellules B) (Ryan and Rosenfeld, 1997; Roy et al., 2011; Wu et al., 2014).

- **Le « promoteur-enhancer » pDQ52**

La majorité des segments D_H possèdent leur promoteur, ceux-ci sont considérés comme faibles à l'exception du « promoteur-enhancer » (nommé pDQ52) situé en amont du dernier segment D_H qui est actif très tôt au cours de l'ontogénie B (**Figure 5 et 44**). Le transcrit initié à partir de ce promoteur est appelé « $\mu 0$ », il se produit avant le réarrangement D_H vers J_H et son expression est 20 fois supérieure à celle des autres promoteurs D_H d'où son nom de promoteur-enhancer (Alessandrini and Desiderio, 1991). L'équipe de Sen a détecté des transcrits antisens dans les segments D_H , notamment au voisinage de pDQ52 (Chakraborty et al., 2007) et a montré que les promoteurs D_H sont bidirectionnels. La délétion de pDQ52 n'a pas d'impact majeur sur la recombinaison D_H vers J_H mis à part une sous-utilisation des segments J_{H3} et J_{H4} (Afshar et al., 2006); ces données laissent supposer une fonction redondante de cet élément.

- **Les promoteurs I en amont des gènes constants**

Tous les gènes codant les régions constantes (sauf $C\delta$) sont précédés d'un promoteur « germinal » appelé I (Intervening). La transcription initiée à partir de ces promoteurs génère un transcrit qui s'étend jusqu'à la fin du gène constant (**Figure 10B**). La fonction première proposée pour ces promoteurs est la transcription de la région S, un prérequis indispensable à la CSR. La forme mature de ce transcrit est épissée puis polyadénylée. Le rôle de l'épissage de ces transcrits reste quelque peu énigmatique : il pourrait faciliter la formation des R-loops en excisant la région S et par conséquent faciliter l'accessibilité à AID (Perlot and Alt, 2008; Hackney et al., 2009). Les promoteurs I des régions S « acceptrices » sont inductibles par des stimuli différents : par exemple, le traitement avec du LPS (LipoPolySaccharide) de cellules *in vitro* induit la transcription à partir des promoteurs $I\gamma 2b$ et $I\gamma 3$ avant la CSR vers $IgG2b$ et $IgG3$. En revanche, un traitement avec du LPS et de l'IL-4 inhibe la transcription initiée à partir de $I\gamma 2b$ et $I\gamma 3$ au profit d'une transcription et de la CSR vers $IgG1$ et IgE (Chaudhuri et al., 2007)

Des transcrits antisens ont été détectés dans les régions S, ces derniers seraient initiés en amont du premier exon constant. Le rôle et la régulation de ces transcrits son mal connus, ils pourraient faciliter la CSR en modulant l'accessibilité de la région à AID (Perlot et al., 2008).

b. Les activateurs et isolateurs transcriptionnels : généralités

Le locus de chaîne lourde d'Ig est parsemé de nombreux éléments régulateurs de la transcription. Ils sont de deux types : (1) les activateurs transcriptionnels ou « enhancers » et les isolateurs de la chromatine.

- **Les enhancers**

Le premier activateur transcriptionnel découvert en 1983 dans les cellules de mammifères fut l'enhancer intronique du locus IgH ($E\mu$) (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983).

Les enhancers sont de petites séquences contenant des sites de fixation aux facteurs de transcription. Ils activent leurs gènes cibles parfois séparés par de longues distances et ne sont pas influencés par leur orientation. L'activité des enhancers peut être restreinte à des tissus, des types cellulaires ou à un environnement particulier. Ces éléments sont identifiés à l'aide de leurs marques chromatiniennes spécifiques (H3K4me1, H3K4me2 et H3K27ac) ainsi que leur sensibilité à l'enzyme DNase I. Ces régions d'ADN de taille variable, en moyenne 250pb, sont caractérisées par une chromatine « ouverte » pouvant fixer des facteurs spécifiques tels que l'acétyltransférase p300, le complexe cohésine et/ou CTCF. Elles sont susceptibles d'entrer en jeu dans des boucles de régulation en reliant les facteurs aux promoteurs (Pennacchio et al., 2013). Les enhancers peuvent être transcrits en ARN (eARN) mais ne codent aucune protéine ; la régulation et la fonction de ces eRNA sont inconnues, certaines équipes suggèrent qu'ils pourraient coopérer dans l'accessibilité de la chromatine et/ou dans les interactions à longue distance (Lai and Shiekhatar, 2014).

- **Les isolateurs de la chromatine**

Ces éléments suppriment l'expression de leurs gènes cibles et/ou confinent ces gènes dans des régions spécialisées pour les « éteindre » (Kolovos et al., 2012). On peut classer ces structures en deux groupes : (1) le groupe des silencers qui limitent/bloquent l'expression d'un gène, (2) les isolateurs qui contrôlent l'action des enhancers ou des silencers.

Les isolateurs peuvent être différenciés en deux catégories : (1) ceux qui bloquent l'action des enhancers en étant situés entre le promoteur et l'enhancer ; (2) ceux qui fonctionnent comme une barrière grâce à la création de boucles (Gaszner and Felsenfeld, 2006; Kolovos et al., 2012).

c. Les enhancers et isolateurs transcriptionnels au sein du locus IgH

Les analyses phylogénétiques suggèrent que les éléments *cis*-régulateurs ont pu être acquis au cours de l'évolution. L'étude de l'organisation du locus IgH dans différentes espèces prouve que l'acquisition des enhancers s'est faite progressivement afin de contrôler les modifications s'opérant sur l'ADN : recombinaisons VDJ, SHM et CSR (Pinaud et al., 2011).

Au niveau du locus IgH murin, les éléments *cis*-régulateurs (activateurs ou isolateurs) peuvent être classés en sept régions (**Figure 44**). Six de ces régions sont officiellement reconnues pour avoir un rôle régulateur. On peut ainsi distinguer des régions d'attachement à la matrice nucléaire (MARs) et des sites hypersensibles à la DNase I (hs) :

-Quatre sites situés en 5' du premier segment V_H : 5' hs1 ; hs2 ; hs3a ; hs3b (Pawlitzy et al., 2006)

-Six sites localisés dans la région intergénique $V_H - D_H$: hs1 ; hs2 ; hs3 ; hs4 ; hs5 ; hs6 (Featherstone et al., 2010).

-Le « promoteur-enhancer » pDQ52 au niveau du dernier segment D_H (Alessandrini and Desiderio, 1991).

-L'enhancer intronique E_μ associé à deux régions MARs. Il est localisé entre J_{H4} et C_μ (Perlot and Alt, 2008).

-Deux régions récemment décrites, hRE1 et hRE2, situées entre $C\gamma 1$ et $C\gamma 2b$ (Predeus et al., 2014).

-La région régulatrice en 3' du locus appelée 3'RR et située après $C\alpha$; cette structure contient 4 sites hs : hs3a ; hs1,2 ; hs3b ; hs4 (Perlot and Alt, 2008).

-La région située en aval de la 3'RR contenant trois sites hs : hs5 ; hs6 ; hs7 ; hs8 (Garrett et al., 2005; Nicolás and Chaudhuri, 2013).

Parmi ces régions, certaines ont des fonctions clairement connues d'autres font l'objet d'études intensives. Au cours des vingt dernières années, notre laboratoire a largement contribué à la description de la structure et des fonctions de plusieurs de ces régions régulatrices, notamment les régions majeures E_μ et la 3'RR.

2- La région régulatrice en 5' du locus

La dimension et la structure du locus IgH laissent suspecter l'existence d'éléments *cis*-régulateurs autres que E_μ et la 3'RR, notamment en 5' du locus. L'étude menée par Pawlitzy montre la présence d'éléments sensibles à la DNase I dans une région de 26 à 30 kpb en amont du premier segment V_H (**Figure 44**) (Pawlitzy et al., 2006). Ce segment est constitué de quatre sites hs (hs1 ; hs2 ; hs3a ; hs3b). Tous ont été détectés dans plusieurs types cellulaires sauf hs1 qui semble restreint aux cellules pro-B. Par ailleurs, la séquence de

hs1 montre des motifs de fixation des facteurs, PU.1, E2A et PAX5 (facteurs impliqués dans la recombinaison V(D)J).

Les prédictions d'un quelconque rôle de ces éléments 5' sur la régulation du locus IgH ont été invalidées par l'établissement de modèles murins portant la délétion de hs1 ou des quatre éléments. En effet, ces derniers ne montrent aucun défaut de développement des cellules du lignage B : les recombinaisons V(D)J, l'utilisation des V_H proximaux ou distaux, l'exclusion allélique et la CSR (vers $\gamma 1$ et $\gamma 3$) ne sont pas altérés. Le seul phénotype observable chez les souris hs1 KO est un développement neurologique anormal dans 20% des souris homozygotes. Ceci suppose que ces éléments influencent essentiellement l'expression de programmes géniques différents de ceux du lignage B, par exemple des gènes situés en amont du locus IgH. Il n'est cependant pas exclu que cette région puisse moduler la position du locus IgH dans le noyau (Kosak et al., 2002), ou serve d'élément isolateur pendant l'ontogénie B afin de définir les limites 5' du locus (Perlot et al., 2010).

3- La région intergénique V_H-D_H

Entre le dernier segment V_H ($V_H7183.1.1$) et le premier segment D_H (DFL16.1) se situe une région intergénique d'environ 90 kb. Cette région contient deux gènes *Adam6a* et *Adam6b* (A Disintegrin And Metalloproteinase domain 6a et -b) présentant une forte homologie de séquence. La région intergénique est en partie constituée d'une duplication en tandem expliquant la forte similitude de ces gènes (Featherstone et al., 2010). D'autres sont également présents dans la région intergénique V_H-D_H et il est supposé que ces transcrits soient ceux issus des segments D_H . L'équipe de Corcoran montre que cette transcription diminue rapidement, elle est même indétectable à environ 41 kpb du premier segment V_H . Ces observations sont en accord avec l'hypothèse d'une transcription séquentielle, dans un premier temps, de la région D_H puis, dans un second temps, de la région V_H . En effet, ces données suggèrent qu'une partie de cette région intergénique V-D empêche la transcription antisens de se propager jusqu'à aux régions des segments V_H . L'analyse de cette large région intergénique a mis au jour six sites hs (**Figure 44**). Le premier (hs1) est localisé à proximité du dernier segment V_H ($V_H7183.1.1$), les autres (hs2 à hs5) sont situés juste en amont des segments D_H . Les sites hs4 et hs5 contiennent chacun un CBE (CTCF Binding Elements) caractéristique des isolateurs de la chromatine (Featherstone et al., 2010).

Il est établi que les réarrangements VDJ sont spécifiques à la lignée B ; cependant, les précurseurs des lymphocytes T présentent au moins en partie, des réarrangements DJ_H . Dans les conditions physiologiques le réarrangement d'un segment V_H sur ce segment DJ_H n'a jamais lieu dans un lymphocyte T.

Giallourakis et collaborateurs ont créé un modèle murin où la totalité de la région intergénique V_H-D_H est supprimée. Chez ces animaux, la mutation ne montre aucun impact apparent sur le développement des lymphocytes T ou B mais met en évidence une augmentation des transcrits germinaux D_H antisens et la présence concomitante de longs

transcrits antisens V_H dans des thymocytes des animaux mutants. De manière très surprenante cette mutation provoque le réarrangement V_H vers DJ_H dans des thymocytes (Giallourakis et al., 2010). Cette région intergénique porte donc des éléments régulateurs qui occupent un rôle important sur la restriction au lignage B des réarrangements de V_H vers DJ_H . Ces éléments « éteignent » la transcription initiée dans la région D_H par un mécanisme régulateur du type isolateur empêchant les transcrits D_H de progresser vers les V_H .

Plus récemment, afin de mieux caractériser cette région, un autre modèle murin a été créé dans lequel les deux CBE (à proximité de $hs4$ et $hs5$) sont supprimés. Cette partie de la région intergénique est nommée IGCR1 (InterGenic Control Region-1). Ce modèle indique, comme le modèle précédent, que IGCR1 est impliqué dans le contrôle de la transcription germinale séquentielle DJ_H puis V_H . De plus, il montre clairement que cette petite région est impliquée dans la formation de boucles qui incluent l'enhancer intronique E_μ et la 3'RR (Guo et al., 2011a).

4- La région intronique E_μ

a. L'enhancer E_μ

L'activateur intronique E_μ , situé entre les exons J_H et C_μ a été le premier activateur transcriptionnel eucaryote décrit (**Figure 44**). Il est constitué d'un élément central de 220 pb, nommé « core E_μ » (c E_μ) encadré par deux régions d'attachement à la matrice (MARs) d'environ 310-350 pb. Les études préliminaires sur cet enhancer spécifique du lignage B indiquent qu'il a une activité très importante dans les stades précoces du développement lymphocytaire. Cet activateur contient de nombreux sites de fixation à des facteurs ubiquitaires ou B spécifiques ayant un rôle activateur ou inhibiteur (Ernst and Smale, 1995).

Depuis sa découverte dans les années 1980, E_μ a été étudié intensivement. De nombreux modèles murins déficients pour tout ou partie de la région E_μ ont été créés et indiquent que E_μ serait nécessaire lors du réarrangement VDJ notamment en modulant l'accessibilité des régions devant réarranger. En 1999, Sakai montre qu'en l'absence du c E_μ , les réarrangements V_H vers DJ_H sont diminués et il observe une forte réduction du nombre de cellules B en périphérie et l'expression d'IgM à la surface des cellules est altérée (Sakai et al., 1999).

On sait qu'avant le réarrangement D_H vers J_H des transcrits germinaux (sens) sont initiés à partir de E_μ (transcrit I_μ) et à partir de pDQ52 (transcrit $\mu 0$) (Lennon and Perry, 1985; Alessandrini and Desiderio, 1991). Plus récemment, des transcrits germinaux sens et antisens ont été localisés dans les régions V_H (Bolland et al., 2004). Sachant que l'absence de la région E_μ affecte les réarrangements VDJ, Perlot et ses collaborateurs ont analysé l'impact de la délétion du c E_μ sur la transcription germinale et donc sur l'accessibilité du locus, la SHM et la CSR (**Figure 45A**). Dans ce modèle, le développement B est affecté. En effet, le nombre de cellules pro-B est augmenté au dépend du nombre de pré-B ; en périphérie il est

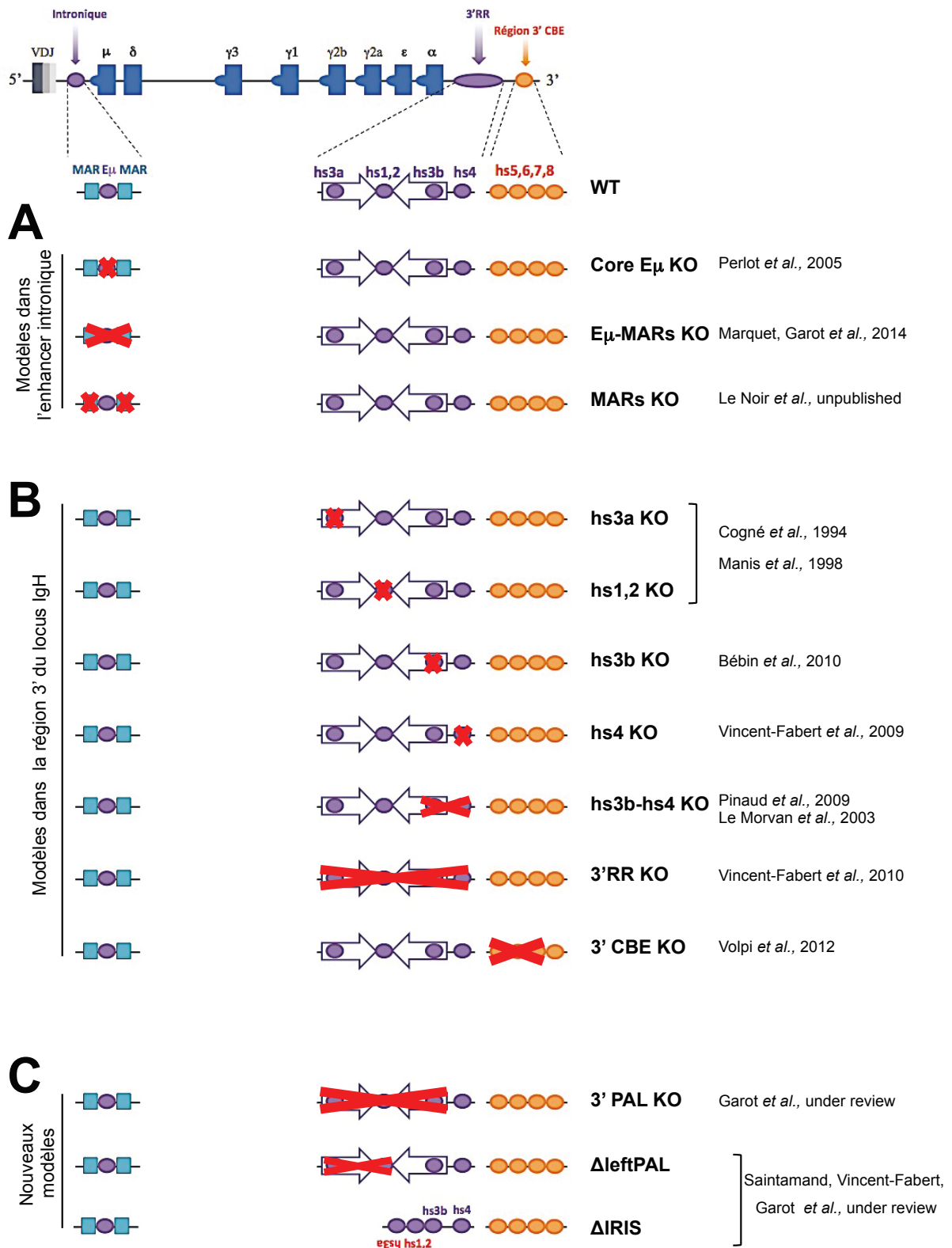


Figure 45. Modèles murins générés pour étudier les régions MARS, core E μ , 3'RR et 3'CBE.

Ce schéma répertorie les différents modèles murins créés afin d'étudier les éléments régulateurs au locus IgH. (A) Les délétions dans la région de l'enhancer intronique E μ . (B) Les modèles déficients dans la partie 3' du locus. (C) Les nouveaux modèles en cours d'étude au laboratoire.

observé une diminution du nombre de cellules B matures. Par ailleurs l'expression de l'IgM membranaire ne semble pas modifiée au stade B matures, dans la rate. Chez ces animaux, les transcrits germinaux $I\mu$ et $\mu 0$ sont fortement diminués alors que ceux produits dans les régions V_H ne sont pas atteints. Ce défaut de transcription est corrélé à une diminution des réarrangements (mais pas un blocage) majoritairement de D_H vers J_H , l'altération des recombinaisons de V_H vers DJ_H provenant d'une altération des réarrangements précédents DJ_H (prérequis). Ces observations sont en accord avec une autre étude qui indique que la région $E\mu$ (et non le promoteur-enhancer $pDQ52$) est impliquée dans l'assemblage des segments de la région variable en contrôlant les recombinaisons D_H vers J_H (Afshar et al., 2006). Cette étude précise que l'enhancer $cE\mu$ contrôle également la transcription antisens (initiée en amont de cette région) nécessaire à l'accessibilité des régions J_H et D_H devant recombiner. Ces modèles montrent par ailleurs que $E\mu$ ne régule pas les transcrits germinaux des régions V_H (Bolland et al., 2004).

L'analyse des événements de CSR et SHM dans le modèle de délétion de $cE\mu$ indiquent que cet élément est totalement dispensable lors de ces processus (Perlot et al., 2005). D'autres modèles murins associant la délétion de la région $E\mu$ à un segment VDJ préalablement réarrangé (modèle B1-8 V_H) indiquent cependant que cette région pourrait contribuer au recrutement de la machinerie SHM/CSR au locus IgH (Li et al., 2010).

Au-delà de la transcription germinale des régions à recombiner, des marques épigénétiques sont associées à l'accessibilité du locus pour les recombinaisons VDJ. Les travaux de Chakraborty montrent qu'en l'absence de l'enhancer intronique $cE\mu$, des marques de chromatine actives H3K9ac sont très affectées alors que d'autres telle que H3K4me2 sont moins atteintes. Ces données suggèrent une activation du locus de manière séquentielle avec des phases dépendantes de $E\mu$ et d'autres indépendantes (Chakraborty et al., 2009).

Le fait que $E\mu$ soit un élément clé contrôlant les premières recombinaisons au locus IgH a rendu particulièrement difficile l'étude du rôle de cet activateur sur les événements ultérieurs à la recombinaison VDJ. Afin de palier à ce problème, l'équipe de Eckhardt a utilisé un locus IgH remanié par l'insertion d'un segment VDJ_H fonctionnel car pré-assemblé (modèle B1-8 V_H). Chez des animaux hétérozygotes, l'allèle fonctionnel B1-8 V_H (dépourvu ou non de la région $E\mu$) est étudié en compétition avec un allèle sauvage normal (non réarrangé) (Li and Eckhardt, 2009). Dans ce modèle, le phénomène d'exclusion allélique est altéré en l'absence de la région $E\mu$, autorisant la production de deux chaînes lourdes différentes par la même cellule B mature. Dans cette étude, la description du maintien de l'exclusion allélique par l'activateur $E\mu$ n'étant pas accompagnée d'un mécanisme moléculaire convaincant, nous avons étudié, dans un modèle de souris nommé $E\mu$ full length KO, le rôle de cette région aux stades B précoces et (pré-B à B immature) (**Figure 45A**). Les résultats obtenus à partir de ces animaux ont fait l'objet d'un article présenté dans la partie Résultats [**Article 1**].

b. Les régions d'attachement à la matrice (MARs)

Les loci d'Ig (IgH et Igκ) contiennent d'autres éléments régulateurs appelés régions MARs. Caractérisées pour la première fois dans les années 1970, le rôle exact des MARs demeure mal défini ; cependant, ces éléments connaissent un regain d'intérêt concomitant à l'intérêt porté à l'organisation structurée du génome au sein du noyau. Les MARs sont de courtes régions d'ADN riches en bases A/T ou G/C d'environ 200 à 1000 pb situées préférentiellement dans les télomères et certaines régions transcrites (Kisseljova et al., 2014). Plusieurs fonctions leur sont associées : (1) l'augmentation de la transcription. En effet, les MARs contiennent des sites de fixation pour la topoisomérase II. Cette enzyme permet de « dénouer » l'ADN et rend accessibles les gènes à proximité. (2) Elles modulent l'organisation de la chromatine en se fixant à la matrice nucléaire et en créant des boucles à l'intérieur desquelles des interactions sont possibles entre les enhanceurs, les promoteurs et les séquences codantes (Goebel et al., 2002; Yokota and Kanakura, 2014). Les MARs participeraient ainsi à la structuration de la chromatine en domaines fonctionnels.

On peut classer les MARs en deux catégories : (1) celles qui sont fixées en permanence à la matrice nucléaire sont appelées « MARs constitutives ». (2) Celles qui s'associent à la matrice de manière réversible en fonction du type cellulaire et du statut d'activation de la cellule sont nommées « MARs facultatives » (Gluch et al., 2008).

Au sein des loci d'Ig, plusieurs régions d'attachement à la matrice ont été répertoriées. Au locus kappa, l'enhancer intronique iEκ situé entre Jκ et Cκ est flanqué d'une MAR en amont de l'activateur. La suppression de cette MAR kappa induit un réarrangement précoce d'un segment Vκ sur un segment Jκ ainsi qu'une diminution des hypermutations somatiques de l'exon VJ, réarrangé qui lui est associé (Yi et al., 1999). Au locus IgH, deux MARs associées en 5' et en 3' de l'enhancer intronique Eμ sont décrites (**Figure 44**). Elles sont classées dans la catégorie des MARs facultatives et s'étendent sur 310 à 350 pb.

Parmi les facteurs capables de lier les régions MARs, seulement deux groupes de protéines ont été décrits pour lier les MARs encadrant l'activateur cEμ du locus IgH : (1) La famille SATB (Special AT-rich sequence-Binding) regroupe SATB1 et SATB2. (2) La famille ARID (AT-Rich Interaction Domain) est composée de 15 protéines. La protéine SATB1 est nécessaire dans la lymphopoïèse B et T.

La suppression de *Satb1* cause un défaut sévère du développement des cellules T immatures (CD3⁻ CD4⁻ et CD8⁻) et une diminution du nombre absolu de lymphocytes B (Yokota and Kanakura, 2014). La protéine SATB2 est moins connue, elle présente une forte homologie avec SATB1 et semble être plus spécifique du lignage B car exprimée au stade pré-B (Dobrevna et al., 2003).

La protéine ARID-3a, également connue sous le nom BRIGHT (B cell Regulator of IgH Transcription) est exprimée dans le lignage B mais également à des stades précoces de l'hématopoïèse chez l'embryon et occupe des fonctions pléiotropes. Le fait que ARID-3a joue un rôle primordial pour le développement de certains progéniteurs hématopoïétiques a limité l'étude de ce facteur dans les cellules du lignage B (An et al., 2010; Webb et al., 2011; Ratliff et al., 2014). L'expression de ARID-3a varie au cours du développement B : fortement exprimé aux stades pro et pré-B, réprimé dans les cellules B périphériques, ce facteur est à nouveau fortement exprimé dans les cellules B du GC et les plasmocytes (Ratliff et al., 2014). Au-delà de son effet sur les précurseurs, la fonction de ARID-3a dans le lignage B reste encore à préciser : il est vraisemblable que ce facteur influence la différenciation des populations B périphériques (B-1, MZ et FO B) mais le mode d'action demeure mal décrit (Oldham et al., 2011). Un nouveau membre de la famille ARID, nommé ARID-3c, exprimé dans le lignage B, pourrait exercer des fonctions de co-activation de ARID-3a pour augmenter la transcription de la chaîne lourde (Tidwell et al., 2011).

La proximité des régions MARs de l'élément cE μ laissait supposer un rôle co-activateur de ces régions à celui de l'enhancer intronique. Dans une étude comparative de différents modèles de souris KO dans la région E μ , Sakai montre qu'il n'en n'est rien car l'absence des MARs (le cE μ toujours présent) n'affecte ni les réarrangements VDJ, ni le développement des cellules B en périphérie. Au locus Ig Kappa, la situation est légèrement différente car la suppression de la MAR en amont de l'activateur intronique iE κ provoque une augmentation des recombinaisons VJ κ et une légère diminution des hypermutations somatiques de la chaîne légère. Si les régions MARs des loci des gènes d'Ig sont indispensables au développement B dans sa globalité, elles n'exercent pas moins des fonctions précises qui pourraient être : (1) le cloisonnement de la région intronique (au locus Ig κ et peut être IgH) afin de prévenir ou favoriser un événement spécifique au locus (un réarrangement précoce ou une expression dans un tissu non lymphoïde) ; (2) *via* la fixation de partenaires protéiques spécifiques, la formation de boucles de régulation permettant le dialogue entre les enhanceurs, les promoteurs et les séquences codantes.

J'ai participé à deux études concernant rôle des MARs de la région E μ à l'aide d'un modèle murin déficient pour les deux régions flanquantes nommé MARs_{E μ} KO (**Figure 45A**). Une première étude souligne l'importance de ces régions comme régulateur spatial du processus de SHM aux loci des gènes d'Ig. Une seconde étude montre l'implication des MARs_{E μ} sur la mutation des gènes « off-targets » de AID et par conséquent un rôle dans la tumorigenèse du lignage B. Ces 2 études font l'objet de résultats préliminaires présentés dans la partie Résultats.

5- La région régulatrice en 3' du locus (3'RR)

a. Composition et structure de la 3'RR

- **Les éléments hs de la 3'RR**

La mise en évidence de lignées cellulaires, déficientes pour $E\mu$, continuant d'exprimer les gènes IgH (Zaller and Eckhardt, 1985) ont démontré que l'élément intronique n'était probablement pas le seul activateur transcriptionnel au locus IgH. En effet, une baisse importante de la transcription de la chaîne lourde a été observée dans d'autres lignées présentant une délétion d'une partie en aval du gène constant $C\alpha$ (Gregor and Morrison, 1986; Gregor et al., 1986) ; ces observations ont plaidé en faveur de l'existence d'une région régulatrice en 3' du locus.

En analysant de manière plus approfondie le locus IgH du rat, un enhancer spécifique des lymphocytes B a été identifié à environ 25 kb en aval du dernier gène constant α (Pettersson et al., 1990). En 1991, Eckhardt et son équipe découvrent chez la souris un élément homologue à l'enhancer du rat (82% d'homologie) localisé à environ 12,5 kb de l'exon de membrane de $C\alpha$ (Lieberson et al., 1991). Cet élément nommé $3'\alpha E$, est identifié comme un activateur transcriptionnel plus faible que $cE\mu$. L'équipe de Birshstein précise que cet enhancer est composé de deux sites hypersensibles à la DNase I nommés $hs1$ et $hs2$ (Giannini et al., 1993). Il présente de part et d'autre des séquences répétées-inversées (Dariavach et al., 1991). Un second activateur est identifié entre $C\alpha$ et l'élément $hs1,2$, son activité est relativement faible comparée à celle de $E\mu$, il est nommé $C\alpha 3'$ (Matthias and Baltimore, 1993). Enfin au milieu des années 90, deux autres activateurs sont identifiés successivement en aval des sites $hs1$ et $hs2$. Ces sites sont nommés $hs3$ et $3'\alpha hs4$ en référence à ceux découverts précédemment (Madisen and Groudine, 1994). De faible activité, $hs3$ est un homologue quasi-parfait de $C\alpha 3'$. Le dernier enhancer ($3'\alpha hs4$) est décrit comme ayant une activité comparable à celle de $E\mu$ (Michaelson et al., 1995).

Ainsi, la région régulatrice 3' du locus IgH de souris (3' RR), considérée comme une région de contrôle du locus (LCR), est localisée en aval du gène $C\alpha$; elle est composée des quatre éléments *cis*-régulateurs correspondant à des sites hypersensibles à la DNase I. Aujourd'hui les enhancers de la 3'RR sont connus sous la nomenclature suivante: **hs3a** ($C\alpha 3'$) ; **hs1-2** ($3'\alpha E$) ; **hs3b** ($hs3$), **hs4** ($3'\alpha hs4$) (**Figure 44**) (Birshstein et al., 1997).

- **Structure de la 3'RR**

Chez la souris, la 3'RR composée de quatre enhancers, s'étend sur une région de 28 kb après l'exon de membrane $C\alpha$. Chez l'homme comme chez les grands singes, la duplication des gènes constants en deux « blocs » au cours de l'évolution s'est accompagnée de la duplication de la région 3'RR : le locus IgH contient donc deux régions 3'RR indépendantes situées en aval des gènes constants $\alpha 1$ et $\alpha 2$. Chacune de ces 3'RR ne contient

que trois enhancers (hs1,2 ; hs3 et hs4). La 3'RR présente une architecture « quasi-palindromique » dans laquelle la distribution des enhancers pourrait jouer un rôle fonctionnel. Au centre de cette structure se trouve l'activateur hs1-2 à partir duquel s'étendent deux régions inversées répétées d'environ 10 à 12 kb qui incluent les enhancers hs3a et hs3b (**Figure 44**) (Chauveau and Cogné, 1996). Ces deux activateurs présentant 97% d'homologie, sont orientés en sens inverse. Comparée à la souris, la région quasi-palindromique est plus courte chez l'homme et ne s'étend que sur environ 6 à 8 kb (Birshtein, 2014).

En résumé la 3'RR contient plusieurs enhancers organisés en deux modules structuraux. (1) La région palindromique contenant les activateurs (hs3a ; hs1,2 ; hs3b dans l'ordre) et (2) l'activateur hs4 situé en aval de ce quasi-palindrome. A l'intérieur de cette région régulatrice se trouvent des séquences LS (Like-Switch) présentant une forte homologie avec les régions switch (*cf.* chapitre 2.5.e).

Les fonctions de la région palindromique sont méconnues mais la conservation de la structure globale de cette région chez les mammifères sans pression de sélection exercée sur la nature des séquences des régions répétées et inversées (Sepulveda et al., 2005; Addabbo D' et al., 2011) suggère un rôle fonctionnel important. Nous avons créé au laboratoire un modèle de souris dépourvu de la région quasi-palindromique de la 3'RR IgH incluant les enhancers hs3a ; hs1,2 et hs3b et étudié l'impact de cette délétion sur le développement B. Cette étude, comparant des modèles déficients pour divers modules de la 3'RR fait l'objet d'un article soumis pour publication présenté dans la partie Résultats [**Article 2**].

b. Cinétique d'activation de la 3'RR au cours de l'ontogénie B

L'activité des enhancers de la 3'RR a historiquement été évaluée par des expériences de transfections de gènes rapporteurs dans des lignées cellulaires représentatives d'un stade du développement B. Cette méthode permet de comparer la capacité à activer la transcription d'un ou de plusieurs enhancers combinés et apporte des éléments de réponse sur la synergie ou les antagonismes de ces éléments.

Seul hs4 montre une activité dans les lignées pré-B, et cet activateur est également actif au stade plasmocyte (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995). Lorsque l'activité individuelle des enhancers 3' est comparée à celle de l'enhancer intronique E μ , on remarque qu'elles sont faibles à l'exception de hs4. Tous les enhancers de la 3'RR semblent actifs dans les lignées de plasmocytes. Aux stades précoces (lignées B de la moelle osseuse), les activateurs hs1-2 ; hs3a ou hs3b ne sont pas décrits comme actifs, en revanche ils le sont dans des lignées représentatives des stades matures.

Dans une large étude menée dans notre laboratoire en 1998, Chauveau et collaborateurs utilisent un gène rapporteur CAT (chloramphenicol acetyl transferase) sous la dépendance un promoteur V_H et d'une multitude de combinaisons d'éléments régulateurs IgH. Ces travaux confirment que hs3a et hs1-2 sont essentiellement actifs dans des cellules de

phénotype B mature ou plasmocytaire et que leur activité est faible par comparaison à E_{μ} (l'activité de hs3a équivalant à 15% de E_{μ} , et 25% pour hs1-2). De plus, l'étude montre des effets synergiques entre les éléments de la 3' RR qui atteignent un maximum lorsque l'enhancer hs1,2 est encadré par deux éléments hs3, en orientation inverse de façon à mimer la configuration génomique. Cet effet peut être observé dans des lignées B matures mais il est renforcé dans les lignées plasmocytaires (Chauveau et al., 1998; Ong et al., 1998). Ces résultats suggèrent donc que la structure palindromique exerce un rôle fonctionnel important, mis en évidence par une forte activation de la transcription dans ce système. Enfin, ces études montrent que l'association des activateurs de la 3'RR (dans leur configuration génomique) à E_{μ} , dans des cellules de phénotype pré-B, présente également un effet synergique évident. Dans les lignées B représentatives des stades précoces, E_{μ} et hs4 semblent être les seuls enhanceurs actifs, ils pourraient même exercer une action antagoniste. Aux stades plus matures les enhanceurs hs3a, hs1-2 et hs3b deviennent progressivement actifs pour culminer dans les lignées plasmocytaires. La configuration des enhanceurs rappelant celle du locus IgH (**Figure 44**), combinant l'activateur intronique et la 3'RR, semble être optimale.

c. Les fonctions de la 3'RR au cours de l'ontogénie B

Les données de la littérature montrent que les enhanceurs de la 3'RR sont nécessaires pour l'expression des gènes du locus IgH, ils sont spécifiques des lymphocytes B et fonctionnent en synergie. Tous ces paramètres et leur configuration suggèrent que ces éléments forment une LCR (Locus Control Region) (Li et al., 2002; Dean, 2006). Les données actuelles sur la régulation des gènes complexes suggèrent que cette région pourrait participer à la formation d'un « super-enhancer » (*cf.* chapitre 3.7).

- **Etudes dans des lignées cellulaires**

Bien que figées à un stade cellulaire donné, les délétions spontanées dans les lignées cellulaires ou les transgènes insérés sous la forme de « miniloci » ont apporté des informations utiles pour définir la fonction des éléments régulateurs IgH. Par exemple, la délétion spontanée des activateurs hs3a et hs1-2 dans une lignée pré-B n'affecte ni l'expression de la chaîne lourde μ , ni la commutation de classe (CSR) (Saleque et al., 1999). Pour autre exemple, une double délétion des éléments hs3b-hs4 dans un minilocus indique que ces deux derniers éléments seraient de meilleurs activateurs du promoteur V_H au stade plasmocyte qu'au stade B immature (Shi and Eckhardt, 2001). D'autres modèles transgéniques ont quant à eux révélé des informations qui se sont avérées erronées au regard des modèles KO. En effet, la délétion des éléments hs3b et hs4, décrite comme critique pour l'hypermutation somatique dans un transgène (Terauchi et al., 2001), s'est par la suite trouvée sans aucun effet lorsque réalisée dans le contexte du locus entier (Le Morvan et al., 2003).

Par la suite, la génération de modèles murins portant des délétions ou des remplacements d'éléments de la 3'RR a permis de mieux appréhender les fonctions de la 3'RR.

- **Analyse des modèles de souris transgéniques**

La cinétique d'activation de ces éléments régulateurs IgH a été facilitée par l'utilisation de modèles animaux transgéniques, le transgène pouvant être considéré comme un gène rapporteur (Chauveau et al., 1999).

L'insertion d'un transgène GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle des enhanceurs du locus IgH ($E\mu$ et 3'RR) montre que l'expression n'est permise que dans les cellules B (du stade pro-B au stade mature) (Guglielmi et al., 2003a, 2003b). Ces modèles sont cependant limités à des études d'expression aux stades B précoces car le gène GFP se trouve rapidement inactivé par méthylation dans les cellules B matures.

- **Analyse des modèles de souris Knock in et Knock out**

- **Travaux sur hs1,2 et hs3a**

En 1994, l'équipe de Alt remplace, chez la souris, l'enhancer hs1-2 par une cassette de résistance à la néomycine (néo^R) (**Figure 45B**). Ces souris présentent des recombinaisons VDJ et une expression de l'IgM membranaire normale. En revanche les transcrits germinaux des régions S, les transcrits post-CSR, la commutation de classe et la sécrétion d'Ig sont affectés. Ces observations sont valables pour tous les isotypes sauf IgA (moins affecté) et IgG1 (peu voire pas affecté) (Cogné et al., 1994). Ces résultats sont contredits quelques années plus tard, par la même équipe, qui montre que la délétion « propre » des éléments hs1-2 ou hs3a, n'affecte pas la transcription germinale et la CSR (Manis et al., 1998). (**Figure 45B**).

Ces résultats contradictoires s'expliquent par un effet « perturbateur » de l'insertion du gène de résistance à la néomycine et non par la délétion des éléments activateurs *per se*. Ces modèles indiquent cependant que l'insertion de la cassette de sélection perturberait la CSR vers la plupart des isotypes mais que la CSR vers IgG1 et IgA pourrait être moins affectée. Les auteurs de ces études ont suggéré que la CSR vers ces isotypes pourrait être contrôlée par des éléments autres que ceux de la 3'RR.

En conclusion, ces travaux *in vivo* montrent que la délétion individuelle de hs3a ou hs1,2 n'a pas de conséquence sur le développement B ni sur les événements de recombinaison associés.

▪ Travaux sur hs3b

La suppression de l'enhancer hs3b chez la souris n'induit pas de phénotype particulier (**Figure 45B**). Les données *in vivo* indiquent que le taux sérique d'Ig est légèrement diminué pour les isotypes IgG2a et IgG1. Ces différences peuvent s'expliquer par des différences mineures de fond génétique entre les animaux KO et wt. Cette étude révèle que l'activateur hs3b exerce des fonctions redondantes qui ne peuvent pas être mises en évidence par sa délétion exclusive (Bébin et al., 2010).

▪ Travaux sur hs4

Bien que la proportion de cellules B dans le compartiment médullaire ne soit pas significativement modifiée chez les animaux présentant une délétion de l'élément hs4 (**Figure 45B**), ce modèle présente une légère baisse du nombre et de la proportion de cellules B spléniques. La caractéristique majeure des cellules B matures chez ces animaux est une diminution de l'expression du BCR (Vincent-Fabert et al., 2009). En revanche, la production d'Ig sérique ou sécrétée *in vitro* est normale.

En conclusion, seule la suppression individuelle de l'élément hs4 présente un phénotype particulier, suggérant que cet élément occupe des fonctions spécifiques non redondantes. Le mode d'action synergique des activateurs 3'IgH, préalablement démontré dans les lignées cellulaires, méritait d'être étudié par la réalisation de délétions multiples chez l'animal.

▪ Etudes des délétions multiples

Parmi les nombreux modèles murins réalisés par notre laboratoire, le KO des deux activateurs distaux hs3b et hs4 (**Figure 45B**) a confirmé l'intérêt de l'étude des délétions combinées pour approcher les fonctions de la région régulatrice 3'IgH. Chez ces animaux, l'expression de l'IgM membranaire est diminuée dans les cellules B en périphérie. L'analyse des transcrits de la chaîne lourde μ indique une diminution dans les splénocytes (cellules B au repos).

In vivo, la production de certaines Ig sériques (IgG2a, IgG2b, IgG3 et IgE) est fortement diminuée, la production d'IgM, IgG1 et IgA n'est pas significativement affectée. Les stimulations *in vitro* de splénocytes en présence de cytokines révèlent une diminution de la CSR vers les isotypes correspondants. L'origine du défaut de CSR est identifiée comme une diminution de la transcription germinale des régions S acceptrices en amont des gènes C γ 2b, C γ 3, C ϵ et C α . La transcription normale de la région donneuse S μ et acceptrice C γ 1 indique que ces régions sont régulées indépendamment des éléments ciblés (Pinaud et al., 2001).

Synthèse bibliographique – Chapitre 3 - Les contrôles du locus IgH: expression, position, interaction

En revanche, les réarrangements des segments VDJ ne sont pas affectés et ne sont pas retardés par cette délétion suggérant une régulation indépendante de la région régulatrice distale. Il en est de même pour le processus d'hypermutation somatique qui survient à une fréquence similaire à celle des animaux sauvages, soit environ 14 mutations pour 1000pb dans les introns en aval des segments réarrangés des cellules B des centres germinatifs (Le Morvan et al., 2003)

En conclusion, les enhanceurs distaux hs3b et hs4 ne sont pas indispensables lors de l'assemblage VDJ et des mutations somatiques. Ces derniers semblent moduler l'expression de la chaîne lourde μ et donc potentiellement du BCR dans les cellules B au repos. Les éléments hs3b et hs4 semblent jouer un rôle prépondérant dans les cellules B activées en contrôlant la transcription germinale qui précède la CSR vers la majorité des isotypes.

De par sa composition en séquences répétées, la délétion de la totalité de la région 3'RR chez la souris a été considérée comme particulièrement difficile voire impossible. Un groupe de notre laboratoire a cependant réussi ce tour de force en supprimant une région de 28 kpb englobant les 4 activateurs transcriptionnels (de hs3 à hs4). (**Figure 45B**). Dans ce modèle, un phénotype majeur est observé *in vivo* avec une diminution drastique de toutes les Ig sériques. *In vitro*, la stimulation de splénocytes montre une quasi-abolition de la CSR vers tous les isotypes corrélée à une forte réduction des transcrits germinaux des régions S acceptrices mais également de la région S donneuse S μ hs4 (Vincent-Fabert et al., 2010a).

Les données d'hypermutations somatiques dans ces souris 3'RR KO indiquent clairement que la maturation d'affinité au locus IgH est altérée. Le nombre de séquences mutées et la fréquence de mutations sont quasiment abrogés. On ne trouve que 5% de séquences mutées contre 94% dans les animaux contrôles. La fréquence de mutation, atteignant normalement 13‰ chez des souris sauvages, diminue à seulement de 0,22‰ chez les mutantes (Rouaud et al., 2013). La transcription IgH primaire (initiée au promoteur VH du segment réarrangé de la chaîne lourde et non-épissé) est, quant à elle, diminuée de 40% dans les animaux mutants indiquant un effet régulateur de la 3'RR sur la transcription du locus dans les cellules B du GC. Des études par CHIP témoignent également que la fixation de AID dans la région cible de la SHM (en aval des segments J_H) mais également dans la région cible de la CSR (S μ) est fortement diminuée en l'absence de la 3'RR.

Ces données confirment que la 3'RR est importante pour le recrutement de AID. Le mode de recrutement de AID sur la 3'RR n'est pas connu ; il est également important de noter que cette région est elle-même une cible de l'enzyme (Péron et al., 2012a).

Globalement, l'élimination complète de la 3'RR affecte les processus génétiques en périphérie, la CSR et la SHM. Tous les isotypes sont affectés par cette délétion y compris IgG1. Le taux de CSR résiduelle pour IgG1 dans les animaux 3'RR pourrait s'expliquer par un mécanisme de sélection des cellules porteuses de cet isotype (le plus représenté dans le sérum), celles-ci pourraient par exemple présenter un avantage de survie. Une autre explication mécanistique pourrait être liée à la grande longueur de la région S γ 1 (12kb chez

la souris) ; il est envisageable que, même transcrite faiblement, cette région contienne suffisamment de cibles déaminables par AID pour aboutir à des cassures doubles brins en nombre suffisant pour la CSR. Enfin une troisième hypothèse serait que d'autres éléments pourraient intervenir dans la régulation de la CSR vers cet isotype (notamment les activateurs intergéniques hRE1 et hRE2).

D'autres travaux utilisant les souris 3'RR KO se poursuivent actuellement. Les données de ces études font l'objet de publications ou de manuscrits en cours d'écriture présents dans la partie Annexes [**Article 1**] et [**Manuscrit 2**].

Récemment, trois nouveaux modèles murins ont été créés au laboratoire afin de préciser les fonctions des modules d'enhancers composant la région 3'RR de souris (**Figure 45C**). Ces modèles portent une délétion totale (3'PAL KO) ou partielle (Δ leftPAL et Δ IRIS) de la région palindromique. Les modèles de délétion partielle nous permettent d'analyser l'impact de la déstructuration de la région quasi-palindromique. En effet, les souris homozygotes dénommées « Δ leftPAL » portent des allèles IgH où la partie gauche de la région quasi-palindromique est supprimée (délétion des enhancers hs3a et hs1,2 et la séquence inversée-répétée). Les animaux dits « Δ IRIS » (IRIS pour Inverted Repeat Intervening Sequences) sont déficients pour les deux régions inversées-répétées. Dans ce dernier modèle les enhancers de la 3'RR sont toujours présents, seul le sens d'orientation de l'activateur hs3a est modifié (dans ce modèle hs3a et hs3b sont orientés dans le même sens). Les résultats issus de ces études sont exposés dans la partie Résultats [**Article 2**] et Annexes [**Manuscrit 2**]. Ces articles sont soumis pour publication.

6- La région isolatrice en aval du locus IgH (3' CBE)

En analysant les marques épigénétiques et notamment les marques d'activation en 3' du locus, l'équipe de Birshstein a mis en évidence trois sites hs supplémentaires en aval de la région régulatrice 3' (**Figure 44**). Ces sites dénommés hs5, hs6 et hs7, dans la continuité de ceux de la 3'RR, sont situés à environ 4 kpb après hs4 et contiennent des sites de fixation à CTCF (il est connu que la présence de CTCF est associée à des sites hs) (Garrett et al., 2005).

Afin de mieux comprendre le rôle de ces éléments potentiellement régulateurs, un modèle d'étude murin a été créé dans lequel les trois enhancers (hs5 à hs7) sont délétés (Volpi et al., 2012). Les auteurs se sont notamment intéressés à l'impact de la mutation sur la formation des boucles au sein du locus IgH. Les mêmes auteurs avaient précédemment montré que cette région était capable d'interagir à distance avec la région située en 5' des segments D_H *via* des sites CTCF dans les cellules pro-B (Degner et al., 2011). Dans le modèle hs5-hs7 KO, les auteurs montrent que cette interaction est fortement réduite dans les cellules pro-B (**Figure 45B**) (Volpi et al., 2012). Ces indications suggèrent que la région 3' CBE participe à la contraction du locus et au choix des segments V_H utilisés lors de la recombinaison VDJ. Globalement, la délétion de ces trois éléments n'a pas d'impact sur

l'expression de la chaîne lourde, l'exclusion allélique et la SHM ; elle affecte la CSR de façon marginale en augmentant légèrement la recombinaison vers IgG1.

Plus récemment, un autre site hs a été décrit et dénommé hs8. Finalement la partie du locus IgH contenant les sites hs5 à hs8 est appelée région 3' CBE (Medvedovic et al., 2013).

7- Notions de super-enhancers

Les enhancers sont définis comme des éléments d'ADN qui activent la transcription de gènes à distance, l'action des enhancers formant une LCR s'opère indépendamment de leur orientation (et de façon proportionnelle au nombre de copies lorsqu'ils sont utilisés comme transgènes). Formés de nombreux sites de fixation pour les facteurs de transcription régulant leur fonction, l'activité des enhancers coïncide avec une hypersensibilité à la DNase I et souvent avec les modifications post-traductionnelles des nucléosomes adjacents. Il est maintenant établi que ces enhancers sont inclus dans des boucles de régulations incluant les promoteurs des gènes cibles (Pott and Lieb, 2015). Les données récentes de ChIP ont permis d'identifier entre 10.10^4 et 15.10^4 activateurs par type cellulaire. Les questions en suspens sont les suivantes : Les enhancers spécifiques d'un type cellulaire sont-ils tous fonctionnels ? Un nombre restreint d'enhancers suffit-il à donner « l'identité » de la cellule, ou bien faut-il un grand nombre de ces régulateurs ?

Quelques articles décrivent une nouvelle classe d'éléments régulateurs appelés « super-enhancers ou stretch-enhancers » (SE), définis comme fixant des facteurs régulateurs forts ou portant des marques de chromatines spécifiques (Whyte et al., 2013). L'identification de ces structures n'est pas clairement établie mais il est envisagé que ces derniers regroupent une « plateforme » formée de plusieurs éléments régulateurs (dont des activateurs transcriptionnels) dans une zone de « chromatine active » définie du noyau. La présence de puissants facteurs de transcription, de marques épigénétiques particulières (telle que H3K27ac), du cofacteur MED1 (Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1) et de BRD4 (Bromodomain-containing protein 4) sur une région au moins dix fois plus grande que celle des enhancers classiques permettrait d'identifier les SE (Hnisz et al., 2013; Lovén et al., 2013).

8- 3'RR et cancer

La capacité d'une cellule B à modifier son génome (recombinaisons et mutations) rend les cibles de ces modifications (les loci des gènes d'Ig) particulièrement sensibles aux translocations qui peuvent s'avérer dramatiques lorsque le partenaire est un oncogène. Ces translocations peuvent survenir à chaque étape du remaniement génique : (1) Des erreurs lors de la recombinaison VDJ induite par le complexe RAG, c'est le cas de la translocation des oncogènes *bcl2* dans les lymphomes folliculaires et *cyclin D1* dans les lymphomes du manteau. (2) La translocation de *c-myc* suite à une dérégulation de la machinerie de la SHM

ou de CSR dans les lymphomes de Burkitt. (3) Les translocations de *cycline D1*, *cycline D3* ou *c-maf* dans les myélomes sont souvent associées à des défauts de CSR (Vincent-Fabert et al., 2010b).

Ces événements de translocation, aboutissant à la formation de loci IgH « aberrants », peuvent par exemple remplacer la région télomérique IgH (en conservant ou non la région E) par un oncogène, ce dernier se trouvant accolé à la région centromérique du locus IgH et sa 3'RR.

Un rôle éventuel de la 3'RR dans la survenue des translocations au locus IgH a logiquement été suggéré puis, au moins en partie, invalidé. En effet, une étude utilisant des modèles de souris dans lequel surviennent spontanément des translocations de *c-myc* au locus IgH montre que ces événements sont indépendants de la région distale de la 3'RR (hs3b et hs4). Cette même étude indique que ces éléments régulateurs, en agissant comme activateurs transcriptionnels, sont cependant essentiels pour l'apparition de tumeurs (de phénotype B matures) *via* la surexpression de l'oncogène (Gostissa et al., 2009).

Parallèlement à la question du ciblage du locus IgH par la 3'RR, la question de l'activation des oncogènes par cette région a fait l'objet de nombreuses études. Entre autres, de nombreux modèles murins juxtaposant la 3'RR (aux loci ou sous la forme de transgènes) et des gènes fréquemment transloqués au locus IgH, ont démontré les capacités de cette dernière à déréguler les oncogènes et ont confirmé la spécificité du lignage B.

Pour exemples, chez la souris, l'insertion ciblée des activateurs de la 3'RR en aval du gène *Bcl2* induit l'apparition de tumeurs de type lymphomes folliculaires (Xiang et al., 2011). De nombreux modèles mimant la juxtaposition de *c-myc* et de la 3'RR (identifiée comme un super-enhancer) développent des lymphomes de type Burkitt (dans la majorité des cas) (Wang and Boxer, 2005; Truffinet et al., 2007) mais également d'autres types de tumeurs de type plasmablastique (Truffinet et al., 2007). Il faut noter que le fond génétique du modèle employé et les mutations et/ou autres oncogènes associés aux dérégulations de *c-myc* induites par la 3'RR, peuvent modifier la nature des tumeurs de lignage B. Pour exemple, l'association du transgène *c-myc-3'RR* à l'inactivation d'un point de contrôle du cycle cellulaire (forme active de la kinase *cdk4* ou inactivation de *p53*) ou à une délétion de *p53* conduit à l'émergence de lymphomes du manteau (MCL) (Vincent-Fabert et al., 2012; Rouaud et al., 2012a).

Une action « trans-modulatrice » de la 3'RR a également été suggérée : dans ce cas, la région régulatrice IgH pourrait influencer l'expression ou la mutation de gènes (en particulier des oncogènes surexprimés ou des cibles illégitimes de AID), placés sur des chromosomes différents. Le modèle, récemment établi au laboratoire, utilise un modèle de souris qui combine la suppression de la 3'RR à un transgène contenant l'oncogène *c-myc* humain sous la dépendance de l'activateur transcriptionnel du locus $Ig\lambda$; ce modèle développe préférentiellement des tumeurs de lignage B plus « immatures » que celles observées spontanément en l'absence de 3'RR (Saad et al., 2015). Dans une étude à laquelle j'ai

Synthèse bibliographique – Chapitre 3 - Les contrôles du locus IgH: expression, position, interaction

contribué, nous avons recherché, dans les cellules B tumorales, une éventuelle influence « en *trans* » de la 3'RR sur les mutations survenant à la fois dans le transgène *c-myc* humain et dans le gène *c-myc* endogène. Notre étude a fait l'objet d'un manuscrit soumis pour publication [**Manuscrit 3**].

Résultats

Résultats

Article 1. The E μ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgV_H repertoire and immune response *in vivo*.

Marie Marquet, Armand Garot, Sébastien Bender, Claire Carrion, Pauline Rouaud, Sandrine Lecardeur, Yves Denizot, Michel Cogné and Eric Pinaud.

The Journal of Immunology, 2014, volume 193, numéro 3, pages 1171-1183.

Article 2. Sequential activation and Distinct functions for Distal and Proximal modules within the IgH 3'RR region.

Armand Garot, Marie Marquet, Alexis Saintamand, Sébastien Bender, Sandrine Le Noir, Pauline Rouaud, Claire Carrion, Zéliha Oruc, Anne-Gaëlle Bébin, Jeanne Moreau, Yves Denizot, Frederick W Alt, Michel Cogné and Eric Pinaud.

En révision à Proceedings of the National Academy of Sciences.

Résultats préliminaires (non publiés) : caractérisation des éléments régulateurs des mutations somatiques

Etude 1 : Contrôle des mutations somatiques des gènes d'Ig par les régions MAR_{S μ}

Etude 2 : Implication des éléments régulateurs IgH (E μ et 3'RR) sur les « dommages collatéraux » infligés aux oncogènes du lignage B

Article 1

The E μ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgV_H repertoire and immune response *in vivo*.

Marie Marquet, Armand Garot, Sébastien Bender, Claire Carrion, Pauline Rouaud, Sandrine Lecardeur, Yves Denizot, Michel Cogné and Eric Pinaud.

The Journal of Immunology, 2014, volume 193, numéro 3, pages 1171-1183.

Ces résultats ont fait l'objet de communications affichées sous forme de posters.

Marie Marquet, Armand Garot, Sébastien Bender, Claire Carrion, Pauline Rouaud, Sandrine Lecardeur, Yves Denizot, Michel Cogné and Eric Pinaud. The E μ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgV_H repertoire and immune response *in vivo*. 4th Workshop « Genome Structure and Functions », 18-19 avril 2013, Toulouse.

Marie Marquet, Armand Garot, Sébastien Bender, Claire Carrion, Pauline Rouaud, Sandrine Lecardeur, Yves Denizot, Michel Cogné and Eric Pinaud. Defining its role beyond D to J_H recombination : E μ region is not involved in V_H usage but drives H chain expression. 3rd Workshop « Normal and Neoplastic B cells », 19-22 septembre 2013, Ile d'Oléron.

Les travaux sur l'enhancer intronique E μ sont nombreux et son rôle au cours de l'ontogénie B est mieux connu (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983; Serwe and Sablitzky, 1993; Ernst and Smale, 1995; Sakai et al., 1999; Perlot et al., 2005; Afshar et al., 2006; Li and Eckhardt, 2009).

La délétion du « core » E μ dans des lignées ou des modèles murins altère le réarrangement VDJ. Ce défaut d'assemblage est induit par une diminution des recombinaisons D_H vers J_H et V_H vers DJ_H. Nous savons que les réarrangements des segments composant la région variable sont dépendants de transcrits germinaux associés à l'accessibilité. Ces transcrits sens et antisens sont produits séquentiellement avant les recombinaisons. En l'absence de l'enhancer, la transcription sens initiée à partir du promoteur-enhancer pDQ-52 (μ 0) ainsi que les transcrits antisens dans les segments D_H et J_H sont fortement réduits. En revanche, les transcrits produits dans les segments V_H sont peu affectés (Perlot et al., 2005) ; seuls les transcrits germinaux des segments V_H proximaux semblent légèrement diminués (**Figure 5A**) (Chakraborty et al., 2009). Par ailleurs, l'étude de l'équipe de Eckhardt montre, dans un modèle hétérozygote porteur d'une chaîne lourde préalablement réarrangée, qu'un allèle (transgénique) déficient pour E μ présente un désavantage d'expression au stade pré-B (Li and Eckhardt, 2009).

Résultats

Afin de préciser la fonction de l'activateur intronique nous avons créé et analysé un modèle murin portant la délétion de la région E μ (le core enhancer et ses MARs flanquantes). Nous avons examiné l'impact de cette délétion sur le développement B, le répertoire V_H, le devenir des cellules B en périphérie et la capacité de ces souris à produire une réponse immune.

Dans cette étude, j'ai participé à l'analyse du modèle à plusieurs niveaux. J'ai largement contribué à l'entretien de la lignée d'animaux KO. J'ai également effectué l'étude par cytométrie en flux des populations lymphocytaires B dans les différents compartiments. J'ai ensuite préparé les échantillons de cellules pré-B triées afin d'étudier la composition du répertoire V_H. Enfin, j'ai apporté ma contribution lors du dosage d'Ig sériques par ELISA.

The E μ Enhancer Region Influences H Chain Expression and B Cell Fate without Impacting IgV_H Repertoire and Immune Response In Vivo

Marie Marquet,* Armand Garot,*¹ Sébastien Bender,*^{†,1} Claire Carrion,*
Pauline Rouaud,* Sandrine Lecardeur,* Yves Denizot,* Michel Cogné,*[‡] and
Eric Pinaud*

The IgH intronic enhancer region E μ is a combination of both a 220-bp core enhancer element and two 310–350-bp flanking scaffold/matrix attachment regions named MAR_{S μ} . In the mouse, deletion of the core-enhancer E μ element mainly affects VDJ recombination with minor effects on class switch recombination. We carried out endogenous deletion of the full-length E μ region (core plus MAR_{S μ}) in the mouse genome to study V_H gene repertoire and IgH expression in developing B-lineage cells. Despite a severe defect in VDJ recombination with partial blockade at the pro–B cell stage, E μ deletion (core or full length) did not affect V_H gene usage. Deletion of this regulatory region induced both a decrease of pre–B cell and newly formed B cell compartments and a strong orientation toward the marginal zone B cell subset. Because Ig μ H chain expression was decreased in E μ -deficient pre–B cells, we propose that modification of B cell homeostasis in deficient animals was caused by “weak” pre–B cell and BCR expression. Besides imbalances in B cell compartments, Ag-specific Ab responses were not impaired in animals carrying the E μ deletion. In addition to its role in VDJ recombination, our study points out that the full-length E μ region does not influence V_H segment usage but ensures efficient Ig μ -chain expression required for strong signaling through pre–B cells and newly formed BCRs and thus participates in B cell inflow and fate. *The Journal of Immunology*, 2014, 193: 1171–1183.

Immunoglobulin H chain expression is critical for several major branch points of B lymphocyte development and is linked to a complex program of Ig gene activation. This B cell development program coordinates transcription and accessibility to major DNA remodeling events, including intragenic recombinations, within the IgH locus. At early stages of B cell development and independently of Ag stimulation, VDJ recombination assembles segments encoding the IgH V region. Ag-dependent activation of mature B cells can lead to a second type of rearrangement called class switch recombination (CSR) that allows B cells to express Ig H chains with different constant regions without altering the V region specificity.

VDJ recombination is a dynamic and tightly ordered process (1): first, D_H to J_H recombination occurs simultaneously on both alleles in pre-pro–B cells; second, pro–B cells undergo V_H to DJ_H recombination on one allele and, sequentially, on the second one when the first VDJ rearrangement fails to encode a functional μ H chain (2). At the pre–B cell stage, a functional μ H chain associates with surrogate L chains (SLCs), resulting in membrane assembly of the pre-BCR. Pre-BCR signals developmental progression beyond the pre–B cell stage, eventually inhibiting a second V_H to DJ_H rearrangement at the IgH locus, inhibiting expression of surrogate L chains, and allowing completion of V_L to J_L rearrangements of Ig L chains (first at Ig κ and then at Ig λ loci) (3).

The IgH intronic enhancer E μ , the first eukaryotic enhancer described (4–7), includes a 220-bp core enhancer region (cE μ) and two flanking matrix attachment regions (MARs) (8, 9). Targeted deletion of the E μ enhancer region either in the B cell lineage (10–12) or in the mouse germline (13, 14) caused a severe defect in VDJ rearrangements, presumably linked to a reduction of D_H to J_H recombination efficiency, although V_H to DJ_H recombination was also impaired. A role proposed for the E μ enhancer region during VDJ recombination was to promote accessibility of targeted regions to recombination machinery. Before any recombination event, E μ deletions impaired regulatory transcription associated to accessibility. Indeed, sense $\mu 0$ transcripts (initiated at the D_HQ52 region) (13, 14) and antisense transcripts going through J_H and D_H regions (14, 15) were severely impaired in knockout (KO) models. At the same stages cE μ was also implicated in chromatin remodeling of D_H and J_H regions (16). Beyond a severe VDJ recombination defect, endogenous deletions including at least the cE μ region did not severely reduce V_H gene germline sense and antisense transcription (13–15), although a substantial decrease in germline transcription within proximal V_H regions in the absence of cE μ (16) raised once more the question of influence

*Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7276, Université de Limoges, 87025 Limoges, France; [†]Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Centre de Référence des Amyloses, 87042 Limoges, France; and [‡]Institut Universitaire de France, 75005 Paris, France

¹A.G. and S.B. contributed equally to this work.

Received for publication October 25, 2013. Accepted for publication June 2, 2014.

This work was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer Grant SL220100601332, as well as by grants from the Conseil Régional du Limousin and the Ligue Contre le Cancer, Comités de la Région Limousin. M.M. was supported by a Ph.D. joint scholarship from the Centre National de la Recherche Scientifique and the Région Limousin. A.G. is supported by a Ph.D. scholarship from the Région Limousin.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Eric Pinaud, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7276, Université de Limoges, Faculté de Médecine, 2 Rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France. E-mail address: eric.pinaud@unilim.fr

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: cE μ , core-enhancer element of the E μ regulatory region; CSR, class switch recombination; ES cell, embryonic stem cell; FO, follicular; GC, germinal center; KO, knockout; MAR, matrix attachment region; MZ, marginal zone; *neoR*, neomycin-resistant; PNA, peanut agglutinin; SLC, surrogate L chain.

Copyright © 2014 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/14/\$16.00

of the intronic enhancer region on IgV $_H$ segment usage and consequences on B cell repertoire.

Most of the mouse models targeting the E μ region supported the conclusion that its activity was restricted to the pre-B cell stage (10–13, 17). In contrast, a mouse model carrying a pre-rearranged VDJ segment knocked in the IgH locus led to the suggestion that E μ (full-length region) was needed at the pre-B cell stage to maintain efficient IgH allelic exclusion (18). In mature B cells, the E μ region (cE μ or full length) was proven totally dispensable for normal IgH chain expression (13, 18, 19). In activated B cells, E μ deletion in the endogenous locus decreases but does not abolish CSR, while being totally dispensable for somatic hypermutation (13, 19, 20). In the present study we report that endogenous deletion of the E μ region (full-length E μ including flanking MARs or cE μ alone) in the mouse germline, although affecting as expected VDJ recombination in pre-B cells, had no associated effect on IgV $_H$ gene repertoire. Pre-B and immature/transitional B cells revealed an impact of this deletion on H chain expression, likely responsible for the strong reduction of newly formed B cell inflow and biased B cell fate. This last finding corroborated very recent data published by Peng and Eckhardt (21) underlining a role for the E μ enhancer in selection at the pre-B to immature B cell transition. Despite imbalanced peripheral B cell subsets, Ig isotype-specific immune responses to both T-dependent and T-independent Ags were not impaired in animals carrying the full-length E μ deletion.

Materials and Methods

Full-length E μ and cE μ KO mice

To generate the full-length E μ KO model, a dedicated targeting vector was provided by Dr. F.W. Alt (12). The 5' homology arm was a 1.7-kbp HindIII-XbaI genomic DNA fragment located upstream from the 5' MARs; the 3' homology arm was a 1-kbp XbaI-PvuII genomic DNA fragment located downstream from the 3' MARs. For in vitro selection, a neomycin-resistant (*neoR*) cassette, flanked by *loxP* sites, was inserted between homology arms. *neoR* gene expression was driven by the *Herpes simplex* thymidine kinase promoter. Moreover, upstream from the 5' homology arm, a thymidine kinase gene, driven by the phosphoglucoquinase promoter, was included to permit negative selection against random integration. The linearized vector was used to transfect the mouse embryonic stem (ES) cell line E14 by electroporation. Transfected clones were selected with 300 mg/ml Geneticin and 2 mM ganciclovir. One appropriately targeted clone showing homologous recombination was injected into C57BL/6 blastocysts to generate chimeric mice. Successful germline transmission was checked by Southern blot. Offspring positive for heterozygosity (E $\mu^{neoR/wt}$) were mated with *cre*-expressing mice to induce deletion of the *neoR* gene. Efficient *cre*-mediated deletion was tested by Southern blot and PCR. The heterozygous E $\mu^{\Delta/wt}$ mice were bred to obtain homozygous E $\mu^{\Delta/\Delta}$ mice. Studies on homozygous (E $\mu^{\Delta/\Delta}$) mice were performed on animals maintained in a mixed 129/C57BL/6 background; such mutants were compared with a wild-type (wt) strain of the same background (mixed 129/C57BL/6) carrying two IgH alleles of "a" haplotype. To generate heterozygous mutant mice, the E $\mu^{\Delta/\Delta}$ strain was bred to wt C57BL/6 mice to generate heterozygous animals (E $\mu^{\Delta/wt}$); in this case, control mice (F $_1$) were obtained by mating wt 129 to wt C57BL/6 pure strains.

Core E μ -deficient animals (cE $\mu^{\Delta/\Delta}$ mice) were provided by Dr. Fred Alt and maintained in the same housing conditions as the full-length E μ -deficient line.

Animal facilities and ethics

Experimental (wt and mutant) animals were housed at 21–23°C with a 12-h light/dark cycle. All experiments, approved as part of a protocol registered under no. CREAL 7-07-2012, were performed according to the guidelines of the Comité Régional d'Ethique de l'Expérimentation Animale du Limousin.

Southern blots

Genomic Southern blots were performed as follows: 20 μ g genomic DNA was digested by SacI or BamHI and submitted to electrophoresis on a 0.7%

agarose gel. DNA was transferred to nylon membranes (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) by capillarity. Blots were hybridized with [32 P]-labeled probes generated by random priming. 5' (X, 0.8-kbp SacI-SphI fragment) and 3' (Y, 0.8-kbp XbaI-BamHI fragment) probes are shown in Fig. 1.

For IgH rearrangement status, B splenocytes were purified by magnetic sorting with B220-coupled beads (Miltenyi Biotec) and 20 μ g genomic DNA was digested by StuI and hybridized with a 0.468-kbp HindIII-NaeI fragment containing the J $_H4$ segment and with a 0.8-kbp XbaI-BamHI fragment specific to the μ C region for normalization.

PCR genotyping of mutant animals

PCR experiments for CRE-mediated deletion were conducted with a specific forward (5'-TGGGGCACTTTCTTTAGATTTG-3') and two reverse primers (5'-AATAGCCTTGCCACATGACC-3' and 5'-CGTAACTCCTCTTCAGACC-3') located, respectively, in cE μ and the *neoR* gene. DNA was denatured 5 min at 94°C and then submitted to 33 cycles consisting of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 60 s. Amplification products were analyzed on a 2% agarose gel. Expected sizes of amplified products were 556 and 249 bp, respectively, for wt and E μ^{neoR} alleles. PCR experiments for E μ full-length deletion were conducted with a specific forward (5'-TGGGGCACTTTCTTTAGATTTG-3') and two reverse primers (5'-AATAGCCTTGCCACATGACC-3' and 5'-ACAATAAGCAGGGCCAGAG-3') located, respectively, in the core E μ and the μ I exon. DNA was denatured 5 min at 94°C and then submitted to 33 cycles consisting of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 60 s. Amplification products were analyzed on a 2% agarose gel. Expected sizes of amplified products were 556 and 369 bp, respectively, for wt and E μ^{Δ} alleles.

Flow cytometry

Single-cell suspensions from fresh organs were washed with 2% FCS-PBS. Lymphoid cells from bone marrow, spleen, peritoneal cavity, and Peyer's patches were labeled with various Abs. For bone marrow cells, Abs recognizing the following markers were used: B220-V450, IgM a -FITC, CD117-PE, CD43-PE, and IgM b -PE. When used for surface staining, the IgM a mAb (clone DS-1, BD Biosciences, San Diego, CA) recognize the "a" IgM allotype expressed at the membrane as a component of the BCR, but it does not recognize the Ig μ -chain as a component of the pre-BCR. For spleen cells, Abs were directed against B220-V450, CD21-PE, CD23-FITC, IgM-PE, IgM a -FITC, IgM b -PE, IgD-FITC, and CD3e-FITC. For the peritoneal cavity, Abs were directed against B220-V450, IgM-PE, and CD5-FITC. For Peyer's patches, Abs were directed against B220-V450, B220-allophycocyanin, IgA-FITC, IgM-PE, peanut agglutinin (PNA)-FITC, FAS-PE (SouthernBiotech [Birmingham, AL], eBioscience, Sigma-Aldrich [St. Louis, MO], and BD Biosciences). Flow cytometry analysis was performed on a BD LSRFortessa cell analyzer (BD Biosciences).

For intracellular staining, bone marrow B-lineage cells were enriched by positive sorting with magnetic beads coupled to anti-B220 Ab (Miltenyi Biotec); after treatment with anti-CD16/CD32 (BD Biosciences), 2×10^6 cells were stained for surface IgM with FITC-labeled anti-IgM a (clone DS-1, BD Biosciences) and PE-labeled anti-CD25 (clone PC61.5, eBioscience). After washing, cells were treated with a Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) and intracellular staining was performed with allophycocyanin-labeled anti-IgM H chain (clone II/41, eBioscience).

IgV $_H$ repertoire study

Three groups of five mice of each genotype (129/Sv wt and E $\mu^{\Delta/\Delta}$) were used for this study. Bone marrow cells were enriched for Hardy's fractions C' and D (mostly large and small pre-B cell populations) expressing CD25 after magnetic sorting (Miltenyi Biotec). DNA was extracted and IgV $_H$ repertoire diversity was examined using the Immun'Ig test (ImmunID Technologies, Grenoble, France) as described in Rouaud et al. (22). Multiplex PCR assays were performed with forward primers specific for all functional members of a given V $_H$ family and reverse primers specific for a given J $_H$ segment (<http://www.immunid.com>). This assay allows the simultaneous detection and resolution of 92 V-D-J rearrangements. For semiquantitative analysis, PCRs were stopped at their exponential step.

Transcription studies

Bone marrow-enriched pre-B cell fraction (mostly large and small pre-B cells) was prepared with a CD25 isolation kit (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. Resting B cells from spleen of E μ full-length or wt mice were purified using B220-coupled beads from Miltenyi Biotec according to the manufacturer's recommendations.

Total RNA was extracted using TRI Reagent (Ambion). Reverse transcription was performed by using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) on 1 μ g total RNA. Priming for reverse

transcription was done with random hexamers. Real-time PCR using TaqMan Universal or SYBR Green Master mix (Applied Biosystems) was performed on cDNA samples (25 ng per reaction). Data were analyzed by comparing threshold cycle (Ct) values according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The IgH primary transcripts were analyzed with IgH^{wt} TaqMan probe located just downstream from the J_H4 segment (described in Ref. 23). Mature IgH transcripts were amplified with the following primers: μ membrane forward (in μ exon 4), 5'-TGGAACTCCGGAGAGACCTA-3'; μ membrane reverse (in μ membrane exon 1), 5'-TTCCTCCTCAGCATTACCT-3'; relative mRNA levels were normalized to *Cd79a* transcripts with *Cd79a* TaqMan probe (Mm00432423_m1, Applied Biosystems). Mature Ig κ transcripts were amplified with the following primers: sense κ for 5'-ATCTTCCCAC-CATCCAGTGA-3' and antisense κ reverse 5'-TGTCGTTCACTGCCAT-CAAT-3'; relative mRNA levels were normalized to *Gapdh* transcripts with *Gapdh* TaqMan probe (Mm99999915_g1, Applied Biosystems).

Total serum Ig quantification by ELISA

Sera from 8-wk-old $E\mu^{\Delta/\Delta}$ and wt mice were analyzed for the presence of different IgH classes and subclasses by ELISA. Assays were performed in polycarbonate 96-multiwell plates (MaxiSorp; Nunc, Roskilde, Denmark) coated overnight at 4°C (100 μ l/well) with suitable capture Abs diluted in 0.05 M Na₂CO₃ buffer (2 μ g/ml for IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b; 3 μ g/ml for IgG3; and 4 μ g/ml for IgE and IgA). After three successive washes in 0.1% Tween 20/PBS (washing buffer), a blocking step was performed for 30 min at 37°C in 3% BSA/0.2% sodium azide PBS. After three washes, 50 μ l sera (first diluted to 1:50), supernatants, or isotypic standard Igs was diluted into successive wells in 1% BSA/PBS buffer and incubated for 2 h at 37°C. The mouse standard panel included antisera specific for IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, and IgA (SouthernBiotech) and for IgE (BD Biosciences). After three washing steps, 100 μ l/well appropriate conjugated Abs was added and adsorbed during 1.5 h at 37°C. Alkaline phosphatase-conjugated goat antisera specific for mouse Ig classes (SouthernBiotech) were used in 0.1% Tween 20, PBS buffer, either at 1 μ g/ml for IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG3 or at 2 μ g/ml for IgE and IgA. After washing, phosphatase alkaline activity was assayed on 1 mg/ml AP substrate (Sigma-Aldrich) and blocked with the addition of 3 M NaOH. Absorbance was then measured at 405 nm with a Xenius spectrophotometer (SAFAS, Monaco). ELISA assay comparisons between mice were done using the Student *t* test.

Specific Ig isotype response upon Ag stimulation

Animal cohorts included $E\mu^{\Delta/\Delta}$ and control wt mice. Eight-week-old mice ($n = 5$) were used for each experiment. Immunization experiments were performed three times with T-dependent Ag and twice with T-independent Ag with independent groups of mice.

To test T-dependent Ab responses, animals were immunized i.p. with 10 μ g hen egg OVA per animal (Sigma-Aldrich). The first immunization was given in 50% CFA (Sigma-Aldrich); 14 d later, a second immunization was administered in 50% IFA (Sigma-Aldrich). Immunized mice were eye-bled at various intervals during the immunization protocol, and sera were analyzed for the presence of OVA-specific IgM, IgG1, IgG2a, and IgG2b by ELISA.

To test for T-independent Ab responses, mice were immunized i.p. with 50 μ g/animal 2,4-DNP-aminoethyl carboxymethyl-Ficoll (Biosearch Technologies, Novato, CA). The first and second 2,4-DNP-aminoethyl carboxymethyl-Ficoll immunizations (14 d later) were given in 50% IFA (Sigma-Aldrich). Animal sera were analyzed at various intervals during the immunization protocol for the presence of DNP-specific IgM and IgG3 by ELISA.

ELISA assays were performed in polycarbonate 96-multiwell plates (MaxiSorp; Nunc) coated overnight at 4°C with T-dependent or T-independent Ag solutions (100 μ l 10 μ g/ml hen egg OVA [Sigma-Aldrich] in 0.05 M Na₂CO₃ and 100 μ l 10 μ g/ml albumin-DNP [Sigma-Aldrich] in 0.05 M Na₂CO₃, respectively). After three successive washing steps in 0.1% Tween 20/PBS buffer (washing buffer), a blocking step was performed for 30 min at 37°C with 150 μ l 30 mg/ml gelatin (Sigma-Aldrich) in PBS. After three washes, 50 μ l assay sera or control serum (diluted in the appropriate range) was diluted into successive wells in 3 mg/ml gelatin in PBS and incubated 2 h at 37°C. The control serum consisted of a pool of sera from OVA- or DNP-Ficoll-immunized wt mice; the same control sera were used in all ELISA assays. After three washing steps, 100 μ l/well appropriate conjugated Abs was added and adsorbed during 1.5 h at 37°C. Alkaline phosphatase-conjugated goat antisera specific for mouse Ig isotypes IgM, IgG1, IgG2a, and IgG3 (SouthernBiotech) were used at 1 μ g/ml diluted in 0.1% Tween 20/PBS. After washing, alkaline phosphatase activity was assayed using 150 μ l/well of 1 mg/ml AP substrate (Sigma-Aldrich) during 15 min at room temperature. Enzymatic reactions were stopped with 30 μ l/well 3 M NaOH and absorbance was measured at 405 nm in a Xenius spectrophotometer (SAFAS).

For each serum, a ratio to the control sera (assayed on the same 96-multiwell plate) was calculated and gave the OVA-specific Ig titration. Each ELISA titration was done twice. ELISA assay comparisons between mice were done using the Student *t* test.

Results

Replacement and deletion of the full-length $E\mu$ region in the mouse germline

The vector used for ES cell targeting (described in Ref. 12) replaces the 995-bp XbaI genomic fragment (encompassing both the core $E\mu$ element and its flanking matrix attachment regions) with a *pgk-neoR* gene flanked by *loxP* recombination target sequences (Fig. 1A, 1B). After transfection and selection of the E14 ES cell line, three independent clones were identified by Southern blot as correctly targeted by homologous recombination. Hybridization with 5' and 3' probes located outside the targeting construct revealed fragments of the size expected for the $E\mu^{neoR}$ allele, that is, replacement of the full-length $E\mu$ region by the *neoR* cassette (Fig. 1B). Two of these clones were injected into C57BL/6 blastocysts and implanted into foster mothers to derive mouse somatic chimeras. Animals allowing germline transmission of the $E\mu^{neoR}$ mutant allele were bred with a transgenic mouse strain CMV-*cre*, 129/Sv background (24) to delete the *pgk-neoR* via *loxP/cre* recombination in the germline. Efficient and complete deletion of the *pgk-neoR* cassette in the offspring was also verified by Southern blot with the same probes (Fig. 1C). The allele carrying the deletion of the whole $E\mu$ region was named $E\mu^{\Delta}$. Heterozygous $E\mu^{\Delta}$ animals were bred to obtain the homozygous mouse line $E\mu^{\Delta/\Delta}$. For the needs of this study, additional breeding to wt C57BL/6 was done to generate F₁ heterozygous animals $E\mu^{\Delta/wt}$.

Deletion of the full-length $E\mu$ region impairs but does not prohibit B cell development

It was questionable whether endogenous deletion of the full-length $E\mu$ region, larger than the previously described c $E\mu$ deletion (13), could support, even partially, complete B lineage development. In our study we compared B-lineage cell subsets in 2-mo-old 129/Sv wt and homozygous $E\mu^{\Delta/\Delta}$ mice. Early B cell development was severely impaired but not abolished in $E\mu^{\Delta/\Delta}$ animals. B-lineage cell numbers in the bone marrow were decreased \sim 2-fold (9×10^6 compared with almost 21×10^6 in wt; Tables I, II). $E\mu^{\Delta/\Delta}$ mice harbored a partial blockade at pro-B to pre-B cell transition with an increased proportion and number of pre-pro-B precursors (B220⁺/CD117⁺) and pro-B cells (IgM⁻/B220⁺/CD43^{high}) (Fig. 2A, Table I).

To evaluate impairment of VDJ recombination linked to deletion of the whole $E\mu$ region, we analyzed IgM allotype expression by flow cytometry in bone marrow B-lineage cells and splenic B cells of F₁ heterozygous $E\mu^{\Delta/wt}$ and $E\mu^{wt/wt}$ control mice. The total lack of IgM^d-expressing cells observed in $E\mu^{\Delta/wt}$ animals (Fig. 2B, Table II) implied that the allele carrying $E\mu$ deletion was always nonfunctional, likely due to an impaired VDJ recombination process.

Southern blot analysis performed on purified splenic B cell DNA confirmed a VDJ recombination defect in $E\mu^{\Delta/\Delta}$ animals: indeed, all DNA samples from mutant B cells retained a germline J_H-hybridizing StuI fragment (3.9 kbp) whereas all wt samples did not (Fig. 2C). This simple assay revealed that an important proportion of IgH genes in homozygous mutant animals B cells was unrearranged, in contrast to normal peripheral B cells that have almost all undergone D_H to J_H recombination on both alleles (25). This finding that full-length $E\mu$ deletion impaired VDJ recombination was not surprising but entirely consistent with previous models of endogenous deletions that encompass at least the c $E\mu$ region

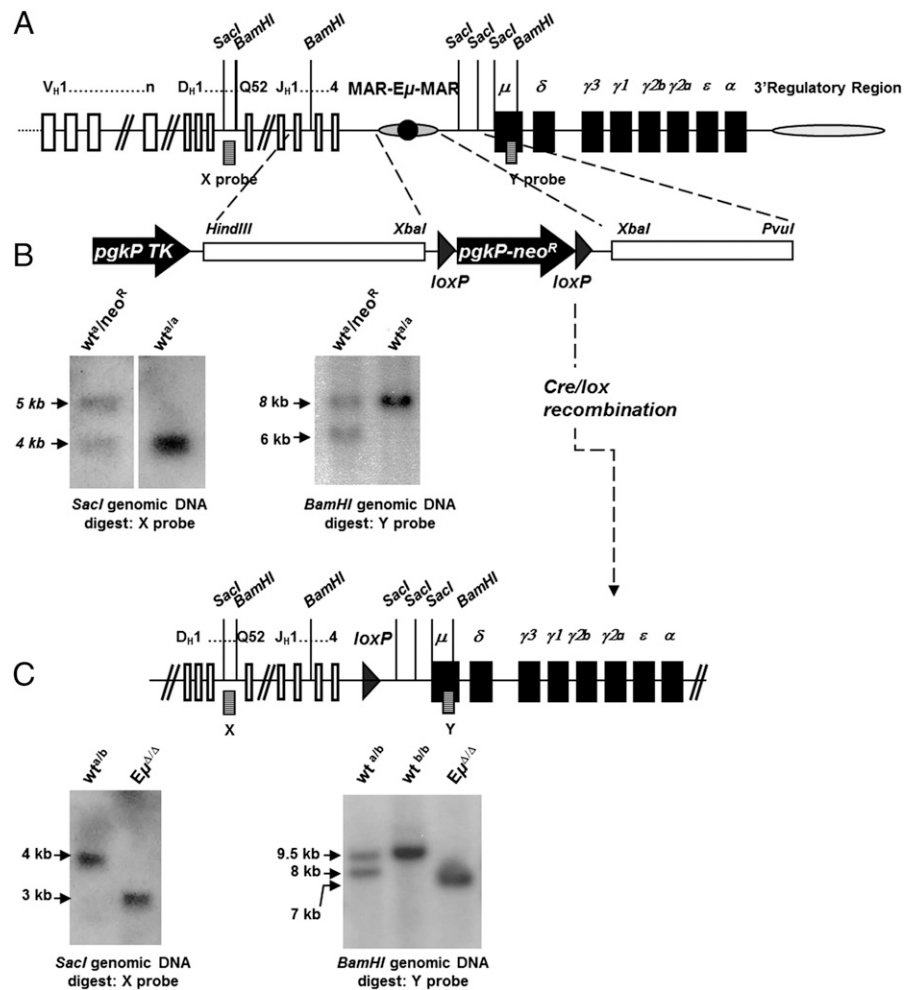


FIGURE 1. Targeting the full-length E μ region. **(A)** Map of the mouse IgH locus. Open rectangles, closed rectangles, and ellipses stand, respectively, for V, D, and J segments, constant regions, and regulatory regions. **(B)** Targeting construct and Southern blot on targeted ES cells or animals with neo^R insertion (N). The 5' probe (X, 0.8-kbp SacI-SpHI fragment) detects a 4-kbp genomic SacI band and a 5-kbp band after homozygous recombination. The 3' probe (Y, 0.8-kbp XbaI-BamHI fragment) detects an 8-kbp genomic BamHI band and a 6-kbp band in the targeted locus. **(C)** Map of the Cre-deleted targeted locus. Southern blot on KO mice DNA: 5' probe distinguishes SacI fragments from neo^R (5 kbp), Cre-deleted (Δ) (3 kbp), and wt mouse (4 kbp); 3' probe distinguishes BamHI fragments from neo^R allele (6 kbp), Cre-deleted allele (7 kbp), and wt allele from two mouse strains (8 kbp in "a" haplotype 129 strain; 9.5 kbp in "b" haplotype C57BL/6 strain).

(10–14). However, the fact that the entire B cell development could be completed in the absence of the full-length E μ region was not reported in the context of the endogenous locus devoid of any prearranged VDJ exon.

Animals devoid of full-length or core E μ region harbor a diversified preimmune IgH repertoire

Because deletion of the full-length E μ region in the mouse germline did not fully block B cell development and allowed significant levels of VDJ recombination, the preimmune IgV_H repertoire could be examined in bone marrow precursor B cells to avoid a bias generated by Ag selection. Enrichment in pre-B cells was a mandatory step for this experiment because this population is drastically reduced in E μ -deficient mice. For this purpose, isolation of bone marrow Hardy's fraction C' and D (large and small pre-B cells) was performed by magnetic sorting based on surface expression of CD25 as previously described (22), resulting in 70–90% enrichment of the population of interest. A 92-primer combination semiquantitative PCR assay, performed on DNA prepared from enriched pre-B cell samples, amplified VDJ rearrangements occurring between a broad variety of IgV_H segments (including distal, middle, and proximal segments; see Fig. 3A, 3C) to the four J_H segments. The ratio of observed amplifications to theoretical amplifications estimates the diversity of VDJ rearrangements. Even if not fully quantitative, this PCR rearrangement assay referenced as Immun'Ig test previously provided a clear estimation of both VDJ recombination efficiency and V_H gene usage based on ImMunoGeneTics classification (<http://www.imgt.org>) in

KO mice models (22). The study was first performed by comparing the repertoires of wt 129/Sv and E μ ^{Δ/Δ} mice (Fig. 3) and second on wt 129/Sv and cE μ ^{Δ/Δ} mice as an additional comparison (Supplemental Fig. 1). Consistent with the VDJ recombination defect observed in both cE μ ^{Δ/Δ} (13) and E μ ^{Δ/Δ} (this study) B-lineage cells, the Immun'Ig test revealed lower rearrangement efficiency in pre-B cells devoid of the E μ region when compared with wt pre-B cells (Fig. 3B, Supplemental Fig. 1B). Nevertheless, when IgV_H family frequencies were compared with their wt counterparts, E μ ^{Δ/Δ} pre-B cells harbored a diversified IgV_H preimmune repertoire; most distal, middle, and proximal V_H segments were significantly rearranged (Fig. 3B, 3D, upper panel). In E μ ^{Δ/Δ} all distal (V_H1 family, formerly called V_HJ558) and middle (V_H3, V_H4, and V_H7–16 families) V_H segments were represented in proportions similar to wt (Fig. 3D, lower panel). When performed on cE μ mice, the repertoire assay also revealed normal usage of most IgV_H families, with all being represented in proportions similar to wt (Supplemental Fig. 1D). Only a modest increase (2-fold) in the use of distal V_H8 segments (also called 3609) was likely due to the nature of the template (pre-B cells in reduced numbers from five mutant animals). Note that only the relative usage of some proximal V_H segments (V_H2 and V_H5 families, respectively, also called V_HQ52 and V_H7183) was inverted in E μ ^{Δ/Δ} when compared with wt 129/Sv mice (Fig. 3D, lower panel). This slight increase in proximal family (V_H2) usage in E μ ^{Δ/Δ} pre-B cells could be linked to fine differences within different 129 substrains (26, 27), and especially the 129/Ola strain (the original genetic background of E14 ES cell line, used for our

Table I. Absolute numbers of B-lineage cell subsets in bone marrow, spleen, peritoneal cavity, and Peyer's patches of 8-wk-old wt and $E\mu^{\Delta\Delta}$ mice

	wt Mice	$E\mu^{\Delta\Delta}$ Mice	<i>p</i> Value
Bone marrow			
Leukocytes ($\times 10^6$)	50.53 \pm 4.03 (6)	37.13 \pm 3.10 (6)	0.025
B220 ⁺ cells ($\times 10^6$)	20.87 \pm 3.69 (6)	9.00 \pm 1.60 (6)	0.015
IgM ⁻ /B220 ⁺ /CD43 ^{low} pre-B cells ($\times 10^6$)	9.24 \pm 2.12 (4)	1.84 \pm 0.45 (4)	0.014
IgM ⁻ /B220 ⁺ /CD43 ^{high} pro-B cells ($\times 10^6$)	3.61 \pm 0.68 (4)	7.46 \pm 1.05 (4)	0.022
B220 ⁺ /CD117 ⁺ cells ($\times 10^6$)	1.65 \pm 0.23 (6)	2.63 \pm 0.33 (6)	0.035
B220 ⁺ /CD117 ⁻ cells ($\times 10^6$)	17.92 \pm 3.56 (6)	4.98 \pm 1.10 (6)	0.006
Spleen			
Leukocytes ($\times 10^6$)	134.30 \pm 9.80 (11)	68.85 \pm 6.60 (11)	<0.0001
B220 ⁺ cells ($\times 10^6$)	56.39 \pm 5.71 (11)	13.21 \pm 1.90 (11)	<0.0001
IgM ⁺ cells ($\times 10^6$)	35.64 \pm 3.99 (6)	10.50 \pm 3.23 (6)	0.001
IgD ⁺ cells ($\times 10^6$)	35.84 \pm 5.47 (4)	10.37 \pm 3.87 (4)	0.009
B220 ⁺ /CD21 ^{high} /CD23 ⁺ MZ B cells ($\times 10^6$)	7.24 \pm 1.05 (9)	4.65 \pm 0.94 (9)	NS
B220 ⁺ /CD21 ⁺ /CD23 ^{high} FO B cells ($\times 10^6$)	42.01 \pm 4.29 (9)	5.32 \pm 0.86 (9)	<0.0001
Peritoneal cavity			
Leukocytes ($\times 10^6$)	2.90 \pm 0.38 (6)	3.36 \pm 0.47 (8)	NS
B220 ⁺ cells ($\times 10^6$)	1.40 \pm 0.30 (6)	1.24 \pm 0.18 (7)	NS
CD5 ⁺ /IgM ⁺ cells ($\times 10^6$)	0.34 \pm 0.07 (6)	0.53 \pm 0.08 (7)	NS
CD5 ⁻ /IgM ⁺ cells ($\times 10^6$)	0.81 \pm 0.23 (6)	0.47 \pm 0.10 (7)	NS
Peyer's patches			
Leukocytes ($\times 10^6$)	11.36 \pm 1.82 (6)	6.39 \pm 0.77 (6)	0.0306
B220 ⁺ cells ($\times 10^6$)	7.11 \pm 0.97 (6)	1.76 \pm 0.29 (6)	0.0004
B220 ⁺ /IgA ⁺ cells ($\times 10^6$)	0.72 \pm 0.14 (5)	0.58 \pm 0.06 (6)	NS
B220 ⁺ /IgM ⁺ cells ($\times 10^6$)	5.56 \pm 1.02 (5)	0.75 \pm 0.16 (6)	0.0006
B220 ⁺ /PNA ^{low} /FAS ^{low} naive B cells ($\times 10^6$)	5.01 \pm 0.78 (6)	0.75 \pm 0.13 (6)	0.0003
B220 ⁺ /PNA ^{high} /FAS ^{high} GC B cells ($\times 10^6$)	1.27 \pm 0.19 (6)	0.83 \pm 0.15 (6)	NS

Means \pm SEM are reported; significance was assessed by a Student *t* test.

gene targeting) known to display a 120-kbp deletion within the proximal V_H region (28). Indeed, usage of proximal V_H5 segments was normal in cE μ -deficient mice (Supplemental Fig. 1D), probably because the cE μ deletion was performed in TC1 ES cells that derive from the 129/Sv substrain (13). Overall, repertoire studies did not reveal any obvious differences in IgV_H segment usage in the absence of the E μ region.

Full-length E μ deletion impairs IgH expression in pre-B and newly formed B cells

At the cellular level, the developmental defect observed in E $\mu^{\Delta\Delta}$ mutant mice induced both a strong blockade at the pre-B cell stage (IgM⁻/B220⁺/CD43^{high}) and a dramatic reduction (~5-fold) of the absolute number of pre-B cell precursors (IgM⁻/B220⁺/CD43^{low}, Table I). If the pro-B cell accumulation could easily be linked to the VDJ recombination defect, the decrease in the pre-B cell compartment was surprising and unsolved. A reasonable explanation for such reduced pre-B cell numbers was a lack of pre-B cell compartment expansion due to impaired pre-BCR signaling (for review, see Refs. 29–31; also, see *Discussion*). Other studies have reported similar drastic pre-B cell depletion in mice devoid of SLC components that express directly an IgM BCR complex at the pre-B cell stage (32–34), but also in a mouse model carrying a “hypomorphic IgH-chain” expressing low levels of the Ig μ -chain at the pre-B cell

stage (35). We then sought to verify whether deletion of the E μ full-length region could lead to similar effects: premature expression of IgM BCR or decreased expression of pre-BCR?

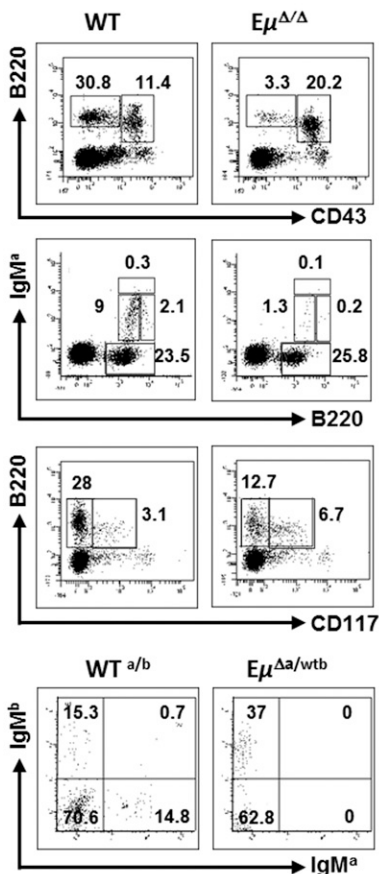
Because E μ full-length deletion affected VDJ recombination efficiency, it was possible that delayed H chain rearrangements in E $\mu^{\Delta\Delta}$ precursors led to premature Ig L chain rearrangements. In the first case, a functional Ig L chain could compete with SLCs and could eventually lead to premature expression of a complete IgM-BCR, similar to what was observed in SLC-deficient mice (32–34). In this case, mimicking SLC-deficient models, “IgM-expressing pre-B-like cells” could be pushed toward immature B cell stages. To test this hypothesis we first analyzed, in sorted wt and E $\mu^{\Delta\Delta}$ pre-B cells, the proportion of cells expressing intracellular L chains by flow cytometry. Although reduced in numbers, E $\mu^{\Delta\Delta}$ pre-B cells did not display increased proportions of Ig κ -expressing cells (Fig. 4A), suggesting that Ig L chain rearrangements were not occurring prematurely in the absence of the full-length E μ region. To confirm this, we looked for the presence of N nucleotide insertions in rearranged L chain junctions, a hallmark of TdT enzyme activity expressed mostly at the pro-B cell stage (36, 37). When compared to wt controls, V κ -J κ junctions cloned out of E $\mu^{\Delta\Delta}$ bone marrow CD25⁺ precursors did not show increased proportions of N nucleotide insertions, suggesting that L chain rearrangements did not occur prematurely

Table II. Absolute numbers of B-lineage cell subsets expressing IgM^a or IgM^b allotypes in bone marrow and spleen of heterozygous 8-wk-old E $\mu^{\Delta\Delta}$ /wt^b and wt^a/wt^b mice

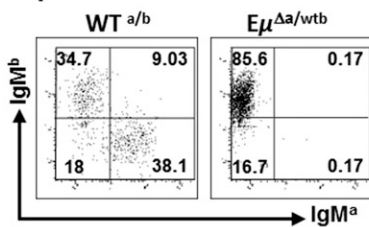
	wt ^a /wt ^b Mice (<i>n</i>)	E $\mu^{\Delta\Delta}$ /wt ^b Mice (<i>n</i>)	<i>p</i> Value
Bone marrow			
B220 ⁺ /IgM ^a cells ($\times 10^6$)	2.90 \pm 0.62 (3)	0.06 \pm 0.01* (3)	0.0104
B220 ⁺ /IgM ^b cells ($\times 10^6$)	2.91 \pm 0.66 (3)	5.25 \pm 0.62 (3)	NS
Spleen			
B220 ⁺ /IgM ^a cells ($\times 10^6$)	11.70 \pm 1.58 (3)	0.03 \pm 0.01* (3)	0.0018
B220 ⁺ /IgM ^b cells ($\times 10^6$)	9.31 \pm 0.71 (3)	22.22 \pm 1.81 (3)	0.0027

Means \pm SEM are reported; asterisks indicate values below background; significance was assessed by a Student *t* test.

A Bone marrow



B Spleen



C Southern blot

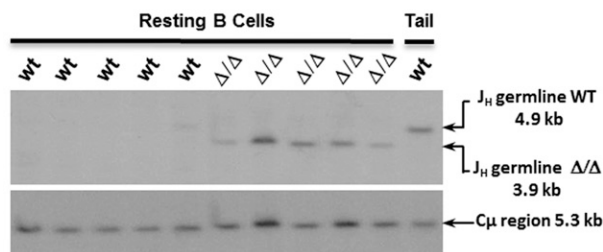


FIGURE 2. Full-length E μ deletion leads to impaired B cell development and VDJ recombination. **(A)** Bone marrow cells of wt and E $\mu^{\Delta/\Delta}$ mice were stained with fluorescent Abs. *Top row*, B220⁺CD43^{high} (pro-B) and B220⁺CD43^{low} (pre-B) cell populations are shown after staining with V450-anti-B220, FITC-anti-IgM^a, and PE-anti-CD43 Abs, gated on the IgM^a-negative population to exclude BCR-expressing cells. *Second row*, Bone marrow B-lineage cells defined as B220⁺IgM⁻ (pro- and pre-B), B220⁺IgM^{low/+} (immature), B220^{+/high}IgM^{high} (transitional), and B220^{high}IgM⁺ (mature recirculating) were stained with V450-anti-B220, FITC-anti-IgM^a Abs and gated on developing lymphocytes based on their size and structure. *Third row*, B220⁺CD117⁺ (pre-pro- and pro-B cells) and

in the absence of the full-length E μ region (Supplementary Table I).

One second possibility, compatible with a normal time course of Ig L chain rearrangements in developing E $\mu^{\Delta/\Delta}$ B-lineage precursors, was that E μ deletion could affect the level of expression of the newly rearranged Ig μ H chain at the pre-B cell stage. In these circumstances, low pre-BCR-expressing populations would fail to expand and normally fill this cellular compartment. To test this hypothesis we compared, at the protein level, Ig μ H chain expression in wt and E $\mu^{\Delta/\Delta}$ pre-B cells (B220⁺/surface IgM⁻/CD25⁺) by intracellular staining and FACS analysis: E μ -deficient precursors displayed a significant reduction of the intracellular Ig μ -chain (Fig. 4B, *top left panel*). The same was true for IgM surface expression on newly generated B cells: surface staining and FACS analysis on transitional I B cells from the spleen (CD19⁺/CD23⁻/CD21⁻) showed a clear reduction of IgM expression level in the absence of the E μ region (Fig. 4B, *top right panel*). Our data clearly indicated that deletion of the whole E μ region led to decreased expression of the newly generated Ig μ H chain in pre-B and newly formed B cells. We also evaluated IgH expression in mature naive B cells subsets from the spleen by surface staining and FACS analysis. In contrast to pre-B and transitional I B cells, splenic marginal zone (MZ) and follicular (FO) B cells subsets from wt and E $\mu^{\Delta/\Delta}$ animals expressed similar levels of surface IgM (Fig. 4B, *bottom panels*), confirming that the full-length E μ region no longer modulated IgH expression in mature B cells.

To determine whether transcription variations accounted for the observed decrease in Ig μ protein expression in pre-B cells, IgH primary transcripts were monitored by quantitative RT-PCR on RNA prepared from either a bone marrow-enriched pre-B cell fraction or resting splenic B cells. Once normalized to the *Cd79a* gene encoding the Ig α molecule, both the primary IgH transcript initiated at the promoter of the rearranged VDJ segment (monitored with a probe located in the intron downstream from the J_H4 segment) and the mature transcript encoding the membrane form of the Ig μ -chain were decreased in pre-B cells sorted from E $\mu^{\Delta/\Delta}$ animals (Fig. 4C). The same quantitative RT-PCR assays performed on RNA from splenic resting mature B cells showed that both primary and mature Ig μ H chain transcripts were found in similar proportions (Fig. 4C). This confirmed that the full-length E μ region modulates H chain transcription and expression specifically at the pre-B and transitional cell stages of B cell development.

B220⁺/CD117⁻ (pre-B, immature, transitional, and recirculating B cells) were stained with V450-anti-B220 and PE-anti-CD117 Abs and gated on developing lymphocytes based on their size and structure. *Fourth row*, IgM allotype expression in bone marrow cells from heterozygous mutant E $\mu^{\Delta a/wtb}$ and control wt^b/wt^b (129/C57BL/6 F₁) animals. Cells were labeled with allophycocyanin-anti-B220, FITC-anti-IgM^a, and PE-anti-IgM^b Abs and gated on developing lymphocytes based on their size and structure. **(B)** IgM allotype expression in splenic B cells from heterozygous mutant E $\mu^{\Delta a/wtb}$ and control wt^b/wt^b (129/C57BL/6 F₁) animals. Cells were labeled with allophycocyanin-anti-B220, FITC-anti-IgM^a, and PE-anti-IgM^b. **(C)** Estimation of *IgH* allele rearrangement status in peripheral B cells. DNA prepared from positively sorted splenic B cells was digested with *StuI*. Fragments corresponding to the germline configuration (4.9 and 3.9 kbp, respectively, for wt and E μ^{Δ} alleles) were detected by Southern blotting using a 0.47-kbp *HindIII*-*NaeI* fragment containing the J_H4 segment as a probe. On the same blot, DNA normalization was performed by hybridization of the 5.3-kbp unrearranged μ C region using a 0.8 kbp *XbaI*-*BamHI* fragment as a probe.

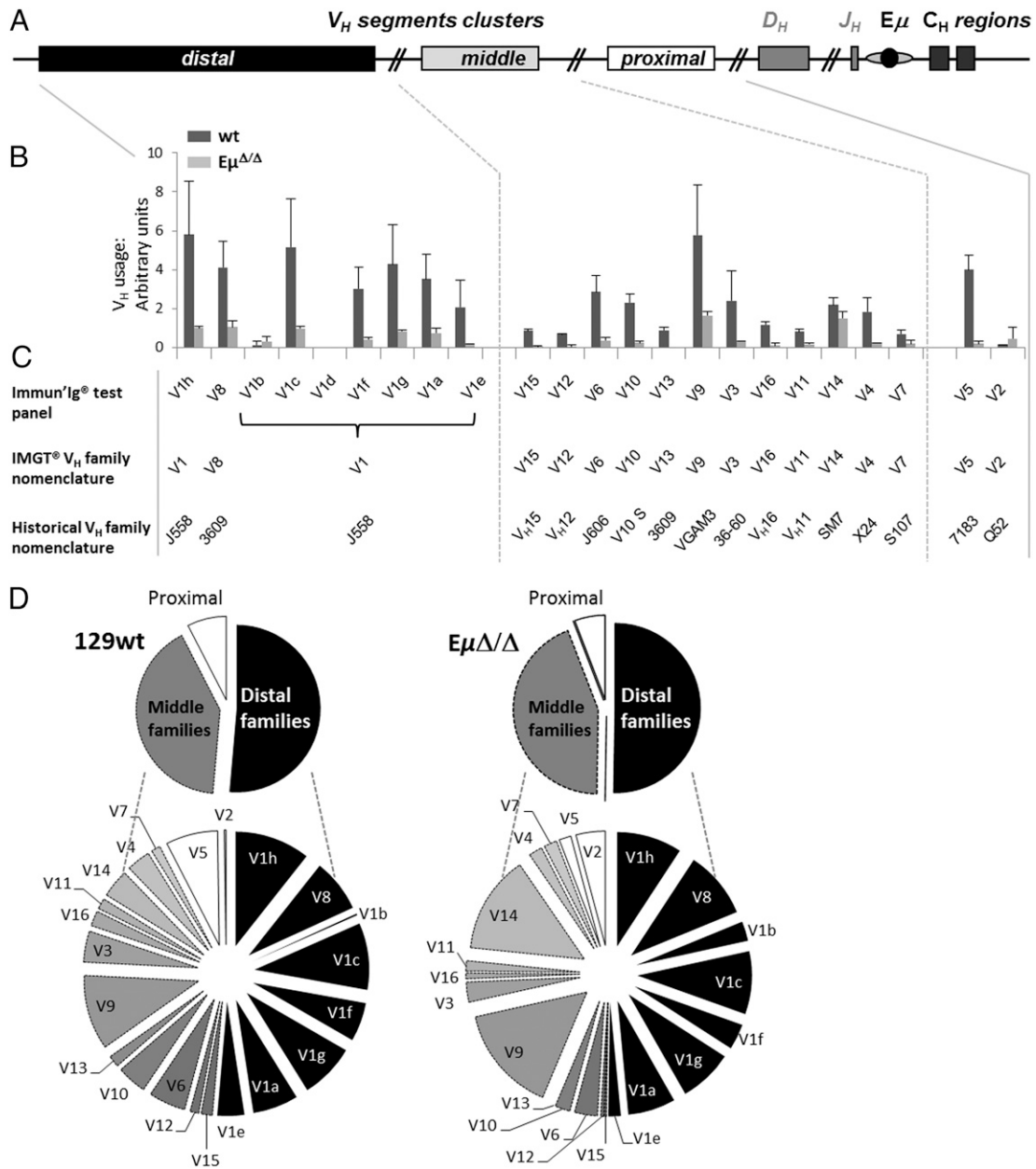


FIGURE 3. IgH preimmune V_H repertoire in wt and full-length $E\mu$ -deficient mice. **(A)** In the IgH locus, the V_H region is divided into three major clusters, including distal, middle, and proximal V_H segments. **(B)** Semiquantitative V(D)J recombination assay performed on pre-B cell DNA from $E\mu^{\Delta/\Delta}$ and 129 wt mice. For each genotype, experiments were performed on three independent DNA samples, with each one prepared from a pool of $CD25^+$ sorted bone marrow cells from three to four age-matched mice (enriched with C' and D Hardy's fractions that correspond to large and small pre-B cell populations). **(C)** Correspondence between V_H family segments detected by the Immun'Ig test, ImMunoGeneTics classification, and historical V_H nomenclature. **(D)** V_H family segment usage in pre-B cells from $E\mu^{\Delta/\Delta}$ and 129 wt mice. Data from (B) are represented as pie chart diagrams, showing proportions (in percentage) of each V_H family segment (according to the ImMunoGeneTics nomenclature). The V_H1 family is subdivided into eight different groups (corresponding to eight independent semiquantitative PCR amplifications); other V_H families (V_{H2} – V_{H16}) are represented by one slice of the chart.

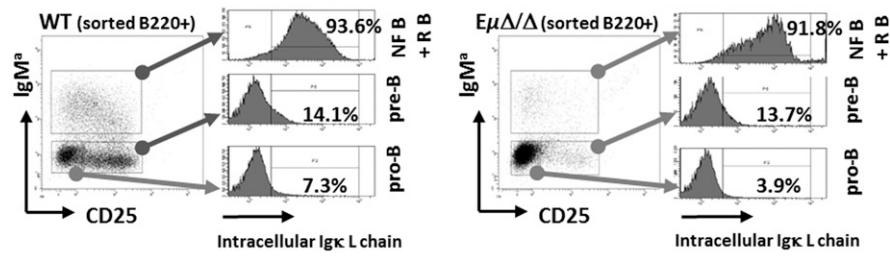
Deletion of the full-length $E\mu$ region modifies peripheral B cell populations

Eight-week-old $E\mu^{\Delta/\Delta}$ mice displayed a drastic reduction in the number of peripheral B cells in the spleen and Peyer's patches (~25% of the absolute number when compared with wt, Table I). This B cell lymphopenia is consistent with the drastic reduction of the B/T cell ratio observed by flow cytometry (Fig. 5A). Such an overall defect in peripheral mature B cells has also been observed in animals carrying germline deletion of the $cE\mu$ enhancer region (13).

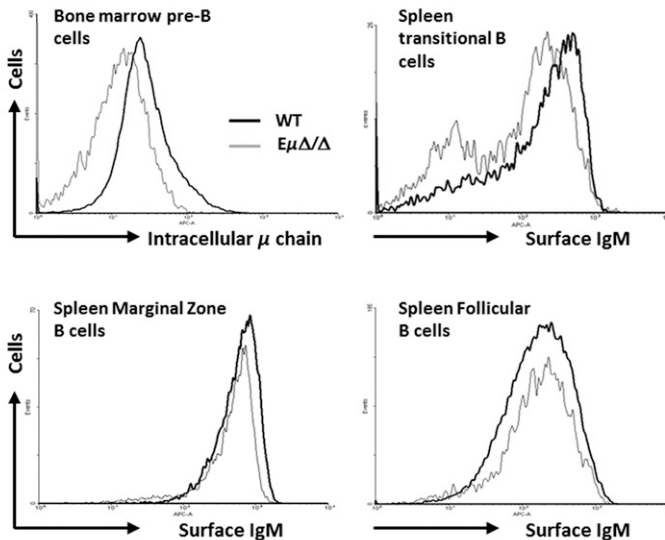
In the peritoneal cavity, despite a decreased proportion of $CD5^+$ B cells (Fig. 5B), absolute numbers of the different B cell subsets were not significantly affected in $E\mu^{\Delta/\Delta}$ mice (Table I).

In Peyer's patches of $E\mu^{\Delta/\Delta}$ mice, when the proportion of IgA-expressing B cells was increased (35% in mutants compared with 15% in wt, Fig. 5C), the absolute number of such switched cells remained comparable to wt counts (Table I). In contrast, both IgM⁺ cell proportions and counts were drastically decreased (Fig. 5C, Table I). Collectively, these data suggested a strong reduction in the inflow of mature B cells in Peyer's patches. Independently, IgA-switched cells did accumulate normally in this organ, suggesting that class switching to IgA was not affected. Examination of germinal center (GC) B cells and their naive counterparts in Peyer's patches corroborated this hypothesis: mutant animals displayed reduced proportions and numbers of PNA^{low}/FAS^{low} naive B cells

A Ig κ L chain expression in B-lineage cells



B Ig H chain expression in B-lineage cells



C Ig κ and H chain transcription

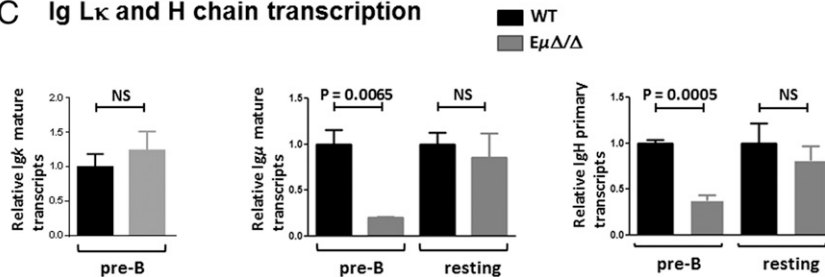


FIGURE 4. Decreased IgH transcription and expression in $E\mu^{\Delta/\Delta}$ precursor B cells. **(A)** Normal Ig κ L chain expression in $E\mu^{\Delta/\Delta}$ pre-B cells. Cytoplasmic Ig κ -chain expression is measured by FACS analysis in wt and $E\mu^{\Delta/\Delta}$ bone marrow B cell subsets. After B220⁺ magnetic sort, newly formed (NF), pre-B, and pro-B cell subsets are gated, based on surface expression of IgM and CD25. The percentage of intracellular κ -expressing cells is shown as a FACS histogram plot for each gate. One significant experiment is shown that was performed on five animals of each genotype. **(B)** IgH expression in wt and $E\mu^{\Delta/\Delta}$ B-lineage cells measured by FACS analysis. *Top left*, Cytoplasmic Ig μ -chain expression in wt and $E\mu^{\Delta/\Delta}$ bone marrow pre-B cell precursors (defined as B220⁺/surface IgM⁻/CD25⁺ cells); one significant experiment is shown that was performed on five animals of each genotype. *Top right*, Surface IgM expression on transitional B cells from the spleen (defined as CD19⁺/CD23⁻/CD21⁻ cells). *Bottom left*, Surface IgM surface expression on MZ B cells from the spleen (defined as CD19⁺/CD21^{high}/CD23⁺ cells). *Bottom right*, Surface IgM surface expression on FO B cells from the spleen (defined as CD19⁺/CD21^{high}/CD23^{high} cells). One significant experiment is shown that was performed on six animals of each genotype. **(C)** Ig κ - and H chain transcription in wt and $E\mu^{\Delta/\Delta}$ B-lineage cells. *Left panel*, Mature Ig κ -chain transcripts (normalized to *Gapdh*) were quantified by quantitative RT-PCR in wt and $E\mu^{\Delta/\Delta}$ pre-B cells. *Middle panel*, Primary transcription of rearranged IgV_H region (normalized to *Cd79a* transcripts) was quantified by quantitative RT-PCR in wt and $E\mu^{\Delta/\Delta}$ pre-B and resting B cells and normalized to *Cd79a* transcripts. TaqMan probe used for quantification was located in the intronic region downstream from the J_H4 segment. *Right panel*, Mature Ig μ -chain transcripts (normalized to *Cd79a* transcripts) were quantified by quantitative RT-PCR in wt and $E\mu^{\Delta/\Delta}$ pre-B and resting B cells. TaqMan probe used for quantification was located in the membrane μ exons. Means and SEM are indicated for each case. Significant differences are indicated with *p* values, according to the Student *t* test.

(mostly) in favor of cells undergoing GC reaction PNA^{high}/FAS^{high} that displayed increased proportions but remained unchanged in numbers (Fig. 5C, Table I).

Interestingly, both proportion and absolute numbers of FO B cells (B220⁺/CD21⁺/CD23^{high}) were strikingly reduced when

the $E\mu^{\Delta}$ allele supported B cell development (Fig. 5A, *bottom panel*, Table I). In contrast to the FO subset diminishment, the number of splenic MZ B cells (B220⁺/CD21^{high}/CD23⁺) was normal in $E\mu^{\Delta/\Delta}$ mice (Table I) such that their proportion was increased relative to FO cells (Fig. 5A, *bottom panel*).

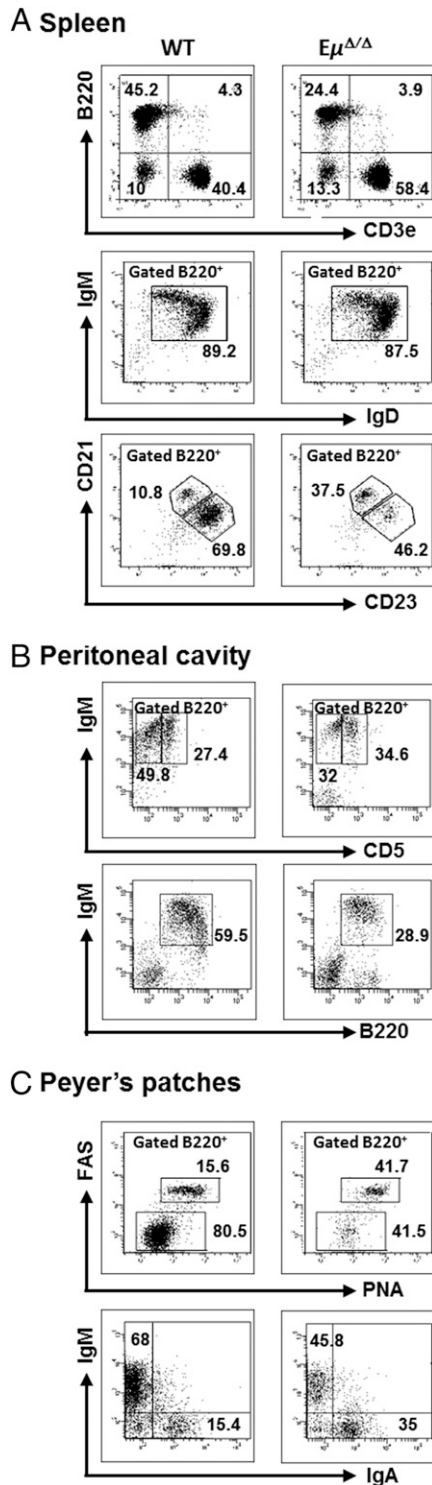


FIGURE 5. Flow cytometry analysis of peripheral B cells in wt and $E\mu^{\Delta/\Delta}$ mice. **(A)** Spleen cells were stained with fluorescent Abs. *Top row*, B220⁺ B cell and CD3e⁺ T cell populations are shown after staining with V450-anti-B220 and FITC-anti-CD3e Abs. *Middle row*, IgM⁺/IgD⁺ mature B cells stained with PE-anti-IgM and FITC-anti-IgD Abs. *Bottom row*, CD21^{high}CD23⁺ MZ and CD21⁺CD23^{high} FO B cells stained with V450-anti-B220, PE-anti-CD21, and FITC-anti-CD23 Abs and gated on the B220⁺ population. **(B)** Peritoneal cavity B cells were stained with fluorescent Abs. *Top row*, Cells defined as IgM⁺CD5⁻ (B2 B cells) and IgM⁺CD5⁺ (B1 B cells) were stained with V450-anti-B220 and FITC-anti-IgM^a Abs and gated on the B220⁺ lymphocyte population. *Bottom row*, Peritoneal IgM⁺B220⁺ mature B cells were stained with V450-anti-B220 and FITC-anti-IgM^a Abs and gated on developing lymphocytes based on their size and structure. **(C)** Peyer's patch cells were stained with

The lack of the full-length $E\mu$ region led to a noticeable decrease in peripheral functional B cells, especially FO B cells, with most resting $E\mu^{\Delta/\Delta}$ peripheral B cells displaying an MZ phenotype. The decreased Ig μ H chain expression found in $E\mu^{\Delta/\Delta}$ bone marrow precursor B cells could explain such consequences in peripheral organs (see *Discussion*).

$E\mu^{\Delta/\Delta}$ animals exhibit normal Ab production and immune responses in vivo

Serum Ab quantification in 8-wk-old $E\mu^{\Delta/\Delta}$ animals revealed a modest but significant effect on the major circulating isotypes IgM and IgG1. When compared with wt mice, homozygous mutant mice showed a 2-fold increase in serum IgM ($1534 \pm 306 \mu\text{g/mL}$ for mutants, $646 \pm 97 \mu\text{g/mL}$ for wt) and a 3-fold decrease in serum IgG1 ($174 \pm 29 \mu\text{g/mL}$ for mutant, $576 \pm 103 \mu\text{g/mL}$ for wt) (Fig. 6A). For all other isotypes, no significant differences were observed using the Student *t* test.

Two independent cohorts of homozygous mutant animals and age-matched wt controls were immunized with T-independent (DNP-Ficoll) and T-dependent (OVA) Ags to evaluate Ag-specific immune responses. After DNP-Ficoll immunization, IgM and IgG3 Ab responses against DNP were measured by ELISA in the serum of challenged mice. In this case, $E\mu^{\Delta/\Delta}$ mutant mice responded as well as did their wt counterparts (Fig. 6B). Similarly, upon OVA challenge, IgM, IgG1, and IgG2a responses were quantified by ELISA in mouse sera. For these T-dependent Ags, no significant differences were observed between wt and $E\mu^{\Delta/\Delta}$ mice (Fig. 6C). Immunization with both Ags revealed that $E\mu^{\Delta/\Delta}$ mutant mice exhibited normal Ag response in vivo.

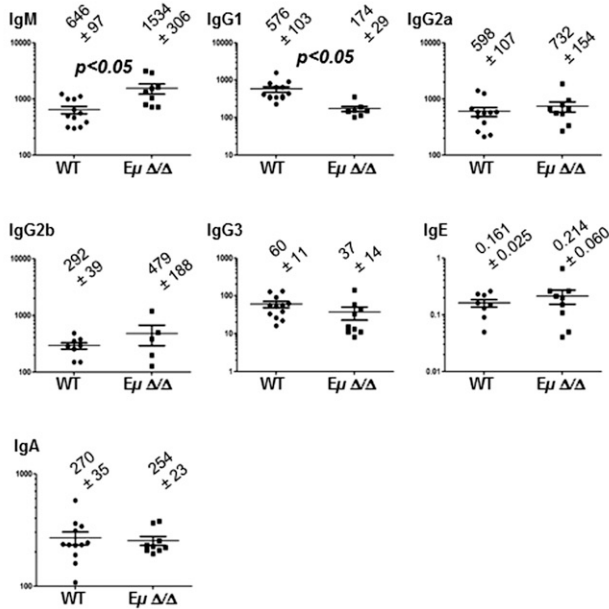
Discussion

Numerous mutant models have been created to study the role of the $E\mu$ intronic enhancer region, each one providing a part of the puzzle. Because our model of full-length $E\mu$ deletion is the first, to our knowledge, carried out in the germline, it specifies some new insights into multiple functions of the intronic enhancer at early stages of B cell development. Our study confirmed that the full-length $E\mu$ region is required to initiate efficient D_H to J_H rearrangements: first, in a heterozygous context ($E\mu^{\Delta/wt}$ animals), B cell development was supported by the wt IgH locus only; second, homozygous mutant animals exhibited a severe (but incomplete) blockade at the pro-B to pre-B cell transition and their peripheral B cells retained unrearranged IgH alleles. Indeed, these consequences of initial steps of VDJ recombination were expected and reminiscent of models devoid of either c $E\mu$ alone or both the 5' MAR plus c $E\mu$ (13, 14). Despite this blockade, full-length $E\mu$ deletion did not abrogate VDJ recombination. Some B cells arose in the peripheral organs but in significantly decreased numbers, arguing for a strong reduction in the dynamic inflow of B cells able to give birth to peripheral B cells.

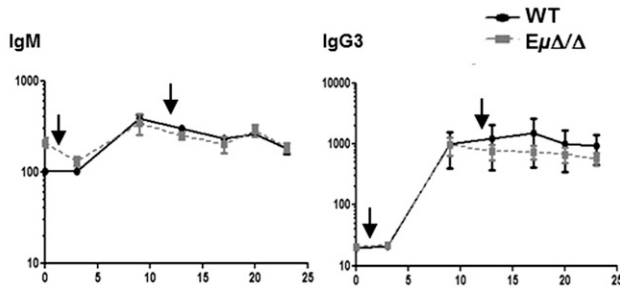
One notable finding of our study is that the decreased efficiency of VDJ recombination does not result in any compromised IgV_H region usage. This specific point is somehow unexpected because $E\mu$ has long been suggested to participate in the long-distance control of accessibility along the V gene cluster, a prerequisite for the V to DJ_H recombination step (10–12). More recently, KO models in the mouse germline refined the activity of the core $E\mu$ enhancer region as a positive regulatory element for D to J

fluorescent Abs. *Top row*, PNA^{high}FAS^{high} GC B cells stained with allophycocyanin-anti-B220, FITC-anti-PNA, and PE-anti-FAS Abs and gated on the B220⁺ population. *Bottom row*, IgM⁺ and IgA⁺ B cell populations stained with V450-anti-B220, FITC-anti-IgM, and PE-anti-IgA Abs and gated on the B220⁺ population.

A Serum Ig concentration ($\mu\text{g/mL}$)



B DNP-specific response



C OVA-specific response

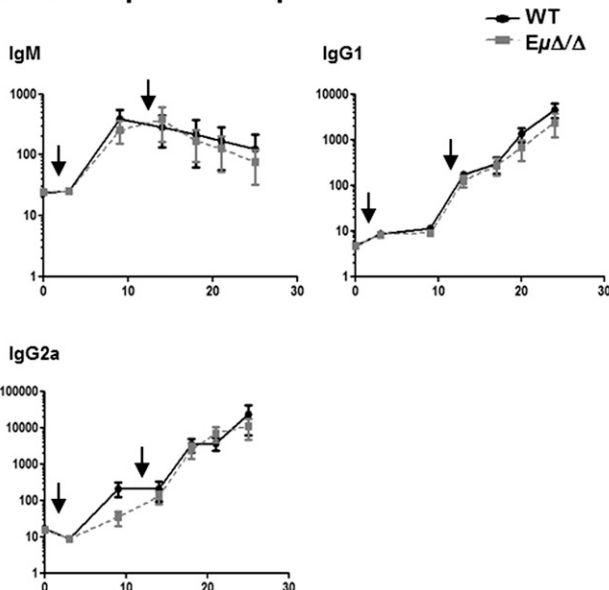


FIGURE 6. Serum Ig and Ag-specific responses in wt and E $\mu\Delta\Delta$ animals. **(A)** Analysis of serum Ig isotype by ELISA for Ig secretion in 8-wk-old mice sera. Wt littermates are shown on the left part of graphs, followed by homozygous E $\mu\Delta\Delta$. Means and SEM are indicated for each case.

recombination (13, 14), replacing the observed V to DJ recombination defect as an outcome of the previous defect (14). Step-wise IgH accessibility to VDJ recombination has also been proven to be dependent on the core E μ enhancer element (16), although the RAG-deficient backgrounds used for such studies could only report on chromatin status in unrearranged precursor B cells. Current models propose that modifications of three-dimensional IgH structures in precursor B cells (loops and locus contraction) orchestrate VDJ recombination (38, 39). Sense and antisense germline transcription within IgV_H regions has been observed prior V_H to DJ_H rearrangement and is proposed to regulate accessibility of such regions (40, 41). Beyond germline transcription accessibility, recombination of distal V_H segments is modulated by several chromatin-modifying enzymes such as EZH2 (42, 43) or transcription factors including PAX5, IKAROS, and YY1 (44–46). YY1 was shown to bind E μ (47) and was proposed to mediate V_H region contraction through this interaction (45); beyond its effect within the IgH locus, YY1 has also recently been shown to interact with EZH2 and modulate the Ig κ L chain repertoire in developing B cells (48). Supporting this hypothesis, a recent study reported YY1-dependent long-range interactions in RAG-deficient pro-B cells between E μ and some PAIR elements located in distal V_H regions (49). It was then tempting to speculate that E μ could regulate usage of distal V_H segments through long-distance interactions mediated by YY1. Surprisingly, our study clearly demonstrated that this is not the case because both full-length E μ and cE μ -deficient pre-B cells display similar proportions of rearranged distal V_H1 family segments (also known as V_HJ558) to wt pre-B cells. According to our results, it is likely that V_H segments (including distal families) come into close proximity to the DJ_H rearranged segment independently of the full-length E μ region (with both MARs and the cE μ enhancer being dispensable). Although we cannot assert that physical interactions do not exist between E μ and accessible V_H segments, our findings can be interpreted, in a provocative hypothesis, that E μ -dependent loops are irrelevant for V to DJ recombination. This hypothesis is sustained by studies carried out in bone marrow RAG-deficient precursors devoid of either cE μ alone or cE μ plus its 5' MAR, showing that the E μ region does not influence germline transcription of distal V_H segments (15, 16, 49). As an alternative looping process, V to J_H linking (in RAG-deficient precursors) could be the result of CTCF/cohesin-mediated loops (28, 39, 50) (because this complex does not bind to the E μ region). Another hypothesis could be that YY1 does enhance physical interactions between V and DJ segments but that anchoring of the rearranged DJ_H segment does not take place within the E μ region (39, 49).

Regarding B-lineage cell homeostasis, deletion of the full-length E μ region in the mouse germline specifies a critical role for E μ in rearranged H chain transcription (and expression) in B-lineage precursors. Our study extends the window of activity for the

Significant differences are indicated with *p* values, according to the Student *t* test. **(B)** Specific-Ab response in serum of wt and E $\mu\Delta\Delta$ mice immunized with DNP-Ficoll. Ab levels, detected by ELISA, are expressed in arbitrary units by comparison with a control serum. Time after immunization is indicated in days. Arrows correspond to Ag injection at days 1 and 14. Each point is the mean (\pm SEM) of serum determinations from five mutant and five wt mice. One representative experiment out of two is shown. **(C)** Specific-Ab response in the serum of wt and E $\mu\Delta\Delta$ mice immunized with OVA. Ab levels, detected by ELISA, are expressed in arbitrary units by comparison with a control serum. Time after immunization is indicated in days. Arrows correspond to Ag injection at days 1 and 14. Each point is the mean (\pm SEM) of serum determinations from five mutant and five wt mice. One representative experiment out of three is shown.

$E\mu$ region beyond the pre-proB– and pro–B cell stages where VDJ rearrangements take place, with substantial activity at the pre–B, immature B, and transitional B cell stages. This emphasizes an important role for this regulatory element on pre-BCR and newly formed BCR expression, with consequences on pre–B cell compartment expansion.

As a reasonable hypothesis, the reduced μ -chain expression at the pre–B cell stage (in newly formed large pre–B cells corresponding to Hardy's C' fraction) observed in our model would lead to decreased surface pre-BCR complexes with, as a consequence, impaired pre–B cell clonal proliferation and, hence, reduced numbers of precursors able to rearrange L chains. However, our model points out that L chain rearrangements (at least κ -chains) do not occur prematurely in the absence of the $E\mu$ region. This confirms that κ loci rearrangements occur in an autonomous manner and are driven by their own regulatory elements (17). At the pro–B cell stage, lack of the $E\mu$ region led to a modest but significant decrease in μ -chain transcription (a 2- and 3-fold decrease for primary and mature IgH transcripts, respectively), similar to what was observed in mouse models carrying pre-rearranged B1-8 V_H genes published by Eckhardt and colleagues (18, 21). Using these dedicated models, Li and Eckhardt (18) proposed that the $E\mu$ region is necessary to maintain allelic exclusion, providing a sufficient level of expression of the newly assembled IgH genes. In a very recent study using the same knock-in mouse models, Peng and Eckhardt (21) also demonstrated that the $E\mu$ region influenced H chain expression in pre–B cells and pointed out a role for this region in pre–B to immature B cell transition. Interestingly, an $E\mu$ -deficient B1-8 allele did not display any H chain expression defect at immature B cell stages (21). In contrast, our present study points out a clear decrease in H chain expression in transitional B cells upon full-length $E\mu$ deletion (Fig. 4B). Indeed, although we could not evaluate immature bone marrow B cells, which were almost absent in $E\mu$ -deficient animals, we clearly showed decreased surface IgM expression in $E\mu$ -deficient transitional (T1) spleen B cells. It can thus reasonably be postulated that a similar decrease affects the immediately upstream immature bone marrow B cells. One possible explanation for such a striking difference could be that the $E\mu$ -deficient B1-8 allele remains unrearranged and therefore might retain some regulatory elements or chromatin marks that could influence H chain expression at immature stages. Additionally, normal H expression in $E\mu$ -deficient B1-8 immature B cells might be linked to the particular B1-8 transgene-associated promoter whose expression might be differently influenced by $E\mu$ at this stage of B cell development. Although low pre-BCR expression (similar to our model) led to decreased signaling, $E\mu$ -deficient B1-8 mice displayed normal pre–B cell counts (18, 21). This last finding was quite unexpected because efficient pre-BCR expression and signaling are required for the burst of pre–B cell proliferation (29, 51). This point is difficult to interpret in a model where B cell development is driven by a single type of H chain. Unlike $E\mu$ mutations in the B1-8 model, our full-length $E\mu$ KO animals obviously displayed a drastic decrease in pre–B cell numbers. The origin of this defect remains difficult to identify because of the scarcity of such cells. Nonetheless, several hypotheses can be considered. First, this decrease could mainly originate from the severe but incomplete blockade at the pro– to pre–B cell transition as a consequence of VDJ recombination. In this case, only very few pro–B cells undergoing IgH functional VDJ rearrangements could enter the pre–B compartment. Despite pre–B cell clonal expansion, this would keep pre–B cell numbers quite low and this shortage would last until immature stages. As a second hypothesis, VDJ recombination blockade might not be as drastic, but the

limited numbers of pre–B cells arising would fail to proliferate owing to low levels of pre-BCR expression. In this case, the reduced inflow of newly formed B cells would be consecutive to a lack of pre–B cell expansion. Even if difficult to confirm, this second hypothesis is supported by several data. First, a significant defect in pre–B cell expansion was observed in mice carrying the hypomorphic IgH allele that lowered H chain expression at this stage (35), although VDJ recombination was not affected in this model. Second, we could speculate that if a proliferative burst occurred on the few pre–B cells arising in our $E\mu$ -deficient mice, the IgH preimmune repertoire would be limited, at a given time, to only a few V_H segments. Our data clearly demonstrate that this is not the case because V_H segments were broadly used in our $E\mu$ KO mice (Fig. 3). Third, partial blockade at the pro–B cell stage might yield significant numbers of pre–B cells because it is admitted that $E\mu$ mostly affects D to J_H and not V to DJ_H recombination (13, 14). Our findings that V_H gene usage was not affected by $E\mu$ deletion supports this statement. All this strongly suggests that pre-BCR expression and consequently pre–B cell expansion is controlled by the $E\mu$ regulatory region.

Looking at peripheral B cell compartments in our full-length $E\mu$ deletion model, one obvious observation was the strong orientation of B cell development toward MZ B cell subsets in the spleen at the expense of the FO B cell subset. We assumed that this subset preference could also be the consequence of variations in IgH expression at early (immature/transitional) stages of B cell development. Many reports supported the hypothesis that peripheral B cell fate depends on pre-BCR and BCR signal strength at early stages (52). It was proposed that weak BCR signaling, above and beyond the Ag-independent tonic signal, prompted developing B cells to assume MZ phenotypes. This was observed in mouse models leading to a decrease in pre-BCR or BCR signaling (53, 54). In our full-length $E\mu$ precursor cells, the newly formed bone marrow B cells expressing low levels of Ig μ H chains would provide weak BCR signals (below the tonic BCR threshold), supporting mostly differentiation into MZ B cell subsets. Such preference for the MZ compartment was also reported in a mouse model carrying a GFP reporter gene knocked-in downstream from $E\mu$ (35). In this model called the “hypomorphic IgH-chain”, the authors described reduced Ig μ H chain expression in pro–B and immature B cells that logically led to MZ B cell fate. Interestingly, the weakly expressed B1-8 V_H knocked-in allele (devoid of MARs and $cE\mu$ regions) also oriented newly formed B cells toward the MZ compartment (19). Surprisingly, even in the absence of SLCs, B lineage cells still progressed through the pre-BCR checkpoint and developed (in reduced numbers) into mature cells that also exhibited a preference for MZ fate (55).

In contrast to our full-length $E\mu$ deletion, the hypomorphic IgH chain mutation confers a defect in Ab response (35), and this effect could logically be linked to decreased IgH expression at mature B cell stages observed in this model. In our full-length $E\mu$ deletion model, decreased IgH expression was no longer observed in resting B cells from the spleen, confirming that full-length $E\mu$ region activity was mostly restricted to immature stages. Indeed, at mature B cell stages, it is admitted that the 3' regulatory region takes the relay for optimal H chain expression, CSR, and somatic hypermutation events (56, 57).

Although some noticeable effects of $E\mu$ deletion on CSR efficiency have been previously reported, it is admitted that $E\mu$ is dispensable for such a process in vivo (13, 19, 20, 58). Because our full-length $E\mu$ KO model modified peripheral B cell fate, we expected Ab responses to be affected. Surprisingly, this was not the case, demonstrating that peripheral B cells devoid of both MARs and $cE\mu$ enhancer are fully competent to enable efficient

T-dependent and -independent Ab responses. This suggests, once more, that regulatory elements involved in Ab responses are within the 3' regulatory region (59, 60).

In conclusion, our mouse model clarifies some important and underrated functions regarding the E μ regulatory region, beyond its direct role in promoting D to J recombination. Our study specifies that V $_H$ segments (including distal families) come into close proximity to the DJ $_H$ rearranged segment independently of the core or the full-length E μ region, but once VDJ recombination has occurred, the rearranged VDJ segment comes under the control of E μ . At this stage, E μ acts as a critical regulatory element that enhances μ H chain expression in pre-B and newly formed bone marrow B cells, supporting pre-B cell expansion and promoting FO B cell fate.

Acknowledgments

We are very grateful to Dr. Frederick W. Alt (Howard Hughes Medical Institute, Children's Hospital, and Harvard Medical School, Boston, MA) for providing the full-length E μ targeting construct and the core E μ -deficient mouse line to proceed to preimmune IgV $_H$ repertoire analysis. We are very grateful to all members of the Service Commun d'Animalerie and Plateforme de Transgenèse of Limoges University for mouse work. We are grateful to Catherine Ouk-Martin and the FACS sorting facility of Limoges University. We are also very grateful to Dr. Jeanne Cook-Moreau for critical reading of this manuscript. We thank Drs. Laurent Delpy, Christophe Sirac, and Sandrine Le Noir for discussions and helpful comments.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Alt, F. W., G. D. Yancopoulos, T. K. Blackwell, C. Wood, E. Thomas, M. Boss, R. Coffman, N. Rosenberg, S. Tonegawa, and D. Baltimore. 1984. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* 3: 1209–1219.
- Thomas, L. R., R. M. Cobb, and E. M. Oltz. 2009. Dynamic regulation of antigen receptor gene assembly. *Adv. Exp. Med. Biol.* 650: 103–115.
- Melchers, F. 2005. The pre-B-cell receptor: selector of fitting immunoglobulin heavy chains for the B-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 578–584.
- Alt, F. W., N. Rosenberg, R. J. Casanova, E. Thomas, and D. Baltimore. 1982. Immunoglobulin heavy-chain expression and class switching in a murine leukaemia cell line. *Nature* 296: 325–331.
- Banerji, J., L. Olson, and W. Schaffner. 1983. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 33: 729–740.
- Gillies, S. D., S. L. Morrison, V. T. Oi, and S. Tonegawa. 1983. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* 33: 717–728.
- Neuberger, M. S. 1983. Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells. *EMBO J.* 2: 1373–1378.
- Cockerill, P. N., M. H. Yuen, and W. T. Garrard. 1987. The enhancer of the immunoglobulin heavy chain locus is flanked by presumptive chromosomal loop anchorage elements. *J. Biol. Chem.* 262: 5394–5397.
- Ernst, P., and S. T. Smale. 1995. Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin μ heavy chain gene. *Immunity* 2: 427–438.
- Chen, J., F. Young, A. Bottaro, V. Stewart, R. K. Smith, and F. W. Alt. 1993. Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *EMBO J.* 12: 4635–4645.
- Serwe, M., and F. Sablitzky. 1993. V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *EMBO J.* 12: 2321–2327.
- Sakai, E., A. Bottaro, L. Davidson, B. P. Sleckman, and F. W. Alt. 1999. Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1526–1531.
- Perlot, T., F. W. Alt, C. H. Bassing, H. Suh, and E. Pinaud. 2005. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 14362–14367.
- Afshar, R., S. Pierce, D. J. Bolland, A. Corcoran, and E. M. Oltz. 2006. Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DJ $_H$ recombination. *J. Immunol.* 176: 2439–2447.
- Bolland, D. J., A. L. Wood, R. Afshar, K. Featherstone, E. M. Oltz, and A. E. Corcoran. 2007. Antisense intergenic transcription precedes Igh D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer E μ . *Mol. Cell. Biol.* 27: 5523–5533.
- Chakraborty, T., T. Perlot, R. Subrahmanyam, A. Jani, P. H. Goff, Y. Zhang, I. Ivanova, F. W. Alt, and R. Sen. 2009. A 220-nucleotide deletion of the intronic enhancer reveals an epigenetic hierarchy in immunoglobulin heavy chain locus activation. *J. Exp. Med.* 206: 1019–1027.
- Inlay, M. A., T. Lin, H. H. Gao, and Y. Xu. 2006. Critical roles of the immunoglobulin intronic enhancers in maintaining the sequential rearrangement of IgH and Igk loci. *J. Exp. Med.* 203: 1721–1732.
- Li, F., and L. A. Eckhardt. 2009. A role for the IgH intronic enhancer E μ in enforcing allelic exclusion. *J. Exp. Med.* 206: 153–167.
- Li, F., Y. Yan, J. Pieretti, D. A. Feldman, and L. A. Eckhardt. 2010. Comparison of identical and functional Igh alleles reveals a nonessential role for E μ in somatic hypermutation and class-switch recombination. *J. Immunol.* 185: 6049–6057.
- Bottaro, A., F. Young, J. Chen, M. Serwe, F. Sablitzky, and F. W. Alt. 1998. Deletion of the IgH intronic enhancer and associated matrix-attachment regions decreases, but does not abolish, class switching at the μ locus. *Int. Immunol.* 10: 799–806.
- Peng, C., and L. A. Eckhardt. 2013. Role of the Igh intronic enhancer E μ in clonal selection at the pre-B to immature B cell transition. *J. Immunol.* 191: 4399–4411.
- Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, R. Fiancette, M. Cogné, E. Pinaud, and Y. Denizot. 2012. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* 287: 8356–8360.
- Tinguely, A., G. Chemin, S. Péron, C. Sirac, S. Reynaud, M. Cogné, and L. Delpy. 2012. Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol. Cell. Biol.* 32: 107–117.
- Dupé, V., M. Davenne, J. Brocard, P. Dollé, M. Mark, A. Dierich, P. Chambon, and F. M. Rijli. 1997. In vivo functional analysis of the *Hoxa-1* 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Development* 124: 399–410.
- Perlot, T., and F. W. Alt. 2008. Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. *Adv. Immunol.* 99: 1–32.
- Simpson, E. M., C. C. Linder, E. E. Sargent, M. T. Davisson, L. E. Mobraaten, and J. J. Sharp. 1997. Genetic variation among 129 substrains and its importance for targeted mutagenesis in mice. *Nat. Genet.* 16: 19–27.
- Threadgill, D. W., D. Yee, A. Matin, J. H. Nadeau, and T. Magnuson. 1997. Genealogy of the 129 inbred strains: 129/SvJ is a contaminated inbred strain. *Mamm. Genome* 8: 390–393.
- Medvedovic, J., A. Ebert, H. Tagoh, I. M. Tamir, T. A. Schwickert, M. Novatchkova, Q. Sun, P. J. Huis In 't Veld, C. Guo, H. S. Yoon, et al. 2013. Flexible long-range loops in the V $_H$ gene region of the *Igh* locus facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity* 39: 229–244.
- Herzog, S., M. Reth, and H. Jumaa. 2009. Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 195–205.
- Mårtensson, I.-L., R. A. Keenan, and S. Licence. 2007. The pre-B-cell receptor. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 137–142.
- Vettermann, C., K. Herrmann, and H.-M. Jäck. 2006. Powered by pairing: the surrogate light chain amplifies immunoglobulin heavy chain signaling and pre-selects the antibody repertoire. *Semin. Immunol.* 18: 44–55.
- Kitamura, D., A. Kudo, S. Schaal, W. Müller, F. Melchers, and K. Rajewsky. 1992. A critical role of λ 5 protein in B cell development. *Cell* 69: 823–831.
- Mundt, C., S. Licence, T. Shimizu, F. Melchers, and I. L. Mårtensson. 2001. Loss of precursor B cell expansion but not allelic exclusion in *VpreB1/VpreB2* double-deficient mice. *J. Exp. Med.* 193: 435–445.
- Shimizu, T., C. Mundt, S. Licence, F. Melchers, and I.-L. Mårtensson. 2002. *VpreB1/VpreB2* triple-deficient mice show impaired B cell development but functional allelic exclusion of the *IgH* locus. *J. Immunol.* 168: 6286–6293.
- Brenner, S., D. Drewel, T. Steinbart, F. Weisel, E. Härtel, S. Pötzsch, H. Welzel, A. Brandl, P. Yu, G. C. Mudde, et al. 2011. A hypomorphic IgH-chain allele affects development of B-cell subsets and favours receptor editing. *EMBO J.* 30: 2705–2718.
- Bentolila, L. A., S. Olson, A. Marshall, F. Rougeon, C. J. Paige, N. Doyen, and G. E. Wu. 1999. Extensive junctional diversity in Ig light chain genes from early B cell progenitors of μ MT mice. *J. Immunol.* 162: 2123–2128.
- Delpy, L., C. Sirac, E. Magnoux, S. Duchez, and M. Cogné. 2004. RNA surveillance down-regulates expression of nonfunctional κ alleles and detects premature termination within the last κ exon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 7375–7380.
- Jhunjhunwala, S., M. C. van Zelm, M. M. Peak, and C. Murre. 2009. Chromatin architecture and the generation of antigen receptor diversity. *Cell* 138: 435–448.
- Guo, C., T. Gerasimova, H. Hao, I. Ivanova, T. Chakraborty, R. Selimyan, E. M. Oltz, and R. Sen. 2011. Two forms of loops generate the chromatin conformation of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Cell* 147: 332–343.
- Yancopoulos, G. D., and F. W. Alt. 1985. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged V $_H$ gene segments. *Cell* 40: 271–281.
- Bolland, D. J., A. L. Wood, C. M. Johnston, S. F. Bunting, G. Morgan, L. Chakalova, P. J. Fraser, and A. E. Corcoran. 2004. Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination. *Nat. Immunol.* 5: 630–637.
- Su, I.-H., A. Basavaraj, A. N. Krutchinsky, O. Hobert, A. Ullrich, B. T. Chait, and A. Tarakhovskiy. 2003. Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and *Igh* rearrangement. *Nat. Immunol.* 4: 124–131.
- Xu, C.-R., L. Schaffer, S. R. Head, and A. J. Feeney. 2008. Reciprocal patterns of methylation of H3K36 and H3K27 on proximal vs. distal IgV $_H$ genes are modulated by IL-7 and Pax5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 8685–8690.
- Fuxa, M., J. Skok, A. Souabni, G. Salvagiotto, E. Roldan, and M. Busslinger. 2004. Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev.* 18: 411–422.

45. Liu, H., M. Schmidt-Suppran, Y. Shi, E. Hobeika, N. Barteneva, H. Jumaa, R. Pelanda, M. Reth, J. Skok, K. Rajewsky, and Y. Shi. 2007. Yin Yang 1 is a critical regulator of B-cell development. *Genes Dev.* 21: 1179–1189.
46. Reynaud, D., I. A. Demarco, K. L. Reddy, H. Schjerve, E. Bertolino, Z. Chen, S. T. Smale, S. Winandy, and H. Singh. 2008. Regulation of B cell fate commitment and immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements by Ikaros. *Nat. Immunol.* 9: 927–936.
47. Park, K., and M. L. Atchison. 1991. Isolation of a candidate repressor/activator, NF-E1 (YY-1, delta), that binds to the immunoglobulin kappa 3' enhancer and the immunoglobulin heavy-chain mu E1 site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9804–9808.
48. Pan, X., M. Papisani, Y. Hao, M. Calamito, F. Wei, W. J. Quinn III, A. Basu, J. Wang, S. Hodawadekar, K. Zaprzana, et al. 2013. YY1 controls Igk repertoire and B-cell development, and localizes with condensin on the Igk locus. *EMBO J.* 32: 1168–1182.
49. Verma-Gaur, J., A. Torkamani, L. Schaffer, S. R. Head, N. J. Schork, and A. J. Feeney. 2012. Noncoding transcription within the Igh distal V(H) region at PAIR elements affects the 3D structure of the Igh locus in pro-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 17004–17009.
50. Degner, S. C., J. Verma-Gaur, T. P. Wong, C. Bossen, G. M. Iverson, A. Torkamani, C. Vettermann, Y. C. Lin, Z. Ju, D. Schulz, et al. 2011. CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin influence the genomic architecture of the Igh locus and antisense transcription in pro-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 9566–9571.
51. Hess, J., A. Werner, T. Wirth, F. Melchers, H. M. Jäck, and T. H. Winkler. 2001. Induction of pre-B cell proliferation after de novo synthesis of the pre-B cell receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1745–1750.
52. Casola, S. 2007. Control of peripheral B-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 143–149.
53. Pillai, S., A. Cariappa, and S. T. Moran. 2005. Marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 161–196.
54. Pillai, S., and A. Cariappa. 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9: 767–777.
55. Keenan, R. A., A. De Riva, B. Corleis, L. Hepburn, S. Licence, T. H. Winkler, and I.-L. Mårtensson. 2008. Censoring of autoreactive B cell development by the pre-B cell receptor. *Science* 321: 696–699.
56. Pinaud, E., M. Marquet, R. Fiancette, S. Péron, C. Vincent-Fabert, Y. Denizot, and M. Cogné. 2011. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110: 27–70.
57. Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, A. Saintamand, R. Fiancette, M. Marquet, I. Robert, B. Reina-San-Martin, E. Pinaud, M. Cogné, and Y. Denizot. 2013. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 210: 1501–1507.
58. Sakai, E., A. Bottaro, and F. W. Alt. 1999. The Ig heavy chain intronic enhancer core region is necessary and sufficient to promote efficient class switch recombination. *Int. Immunol.* 11: 1709–1713.
59. Morvan, C. L., E. Pinaud, C. Decourt, A. Cuvillier, and M. Cogné. 2003. The immunoglobulin heavy-chain locus *hs3b* and *hs4* 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* 102: 1421–1427.
60. Vincent-Fabert, C., R. Fiancette, E. Pinaud, V. Truffinet, N. Cogné, M. Cogné, and Y. Denizot. 2010. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (*hs3a*, *hs1,2*, *hs3b*, and *hs4*) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 116: 1895–1898.

Supplementary Table 1 : Igκ L chain junctional diversity in wt and full length Eμ KO mice.

DNA source	<i>n</i>	% out of frame junction	%N ⁺	%P _V ⁺	%P _J ⁺	CDR3 length (nt)
wt CD25 ⁺ bone marrow	55	62	11	0	3.6	26.4
Eμ ^{ΔΔ} CD25 ⁺ bone marrow	44	54	14	3	4.5	26.9

Legend to supplementary table 1: κ junctional sequences were cloned out of bone marrow pre-B cell DNA samples from 3 animals of each genotype. Junction analysis was performed using the IMGT V-QUEST software (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/). *n* indicates the number of analyzed independent sequences, percentage of out of frame sequences was determined, N and P nucleotide insertions and CDR3 length were reported.

Article 2

Sequential activation and Distinct functions for Distal and Proximal modules within the IgH 3'RR region.

Armand Garot, Marie Marquet, Alexis Saintamand, Sébastien Bender, Sandrine Le Noir, Pauline Rouaud, Claire Carrion, Zéliha Oruc, Anne-Gaëlle Bébin, Jeanne Moreau, Yves Denizot, Frederick W Alt, Michel Cogné and Eric Pinaud.

En révision à *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

Ces résultats ont fait l'objet de communications affichées sous forme de posters.

Armand Garot, Marie Marquet, Sandrine Le Noir, Alexis Saintamand, Sébastien Bender, Pauline Rouaud, Ophélie Martin, Claire Carrion, Zéliha Oruc, Anne-Gaëlle Bébin, Yves Denizot, Michel Cogné and Eric Pinaud. Prioritization of the IgH 3' regulatory elements: a quasi-palindrome and the distal hs4 element. 6ème workshop annuel de l'Axe 2 du Canceropôle Grand Sud Ouest; 11-12 juin 2015, Toulouse.

Armand Garot, Marie Marquet, Alexis Saintamand, Yves Denizot, Michel Cogné and Eric Pinaud. Prioritization of the IgH 3' regulatory region : proximal and distal domains feature distinct functions. 4th European Congress of Immunology ; 6-9 septembre 2015, Vienne, Autriche.

Le locus IgH est constitué de nombreux éléments régulateurs influençant le développement lymphocytaire B (**Figure 44**). Parmi eux, on distingue la région régulatrice en 3' du locus ou 3'RR constituée des quatre enhanceurs (hs3a ; hs1,2 ; hs3b ; hs4). Les études conjointes menées sur ces activateurs indiquent que leur délétion individuelle n'a pas de conséquences significatives sur l'ontogénie B. En revanche les délétions conjointes des activateurs hs3b et hs4 (Pinaud et al., 2001; Le Morvan et al., 2003) ou de la 3'RR entière (*i.e* 3'RR KO (Vincent-Fabert et al., 2010a; Rouaud et al., 2013) démontrent clairement son implication (**Figure 45B**).

Cette région n'est pas impliquée dans les réarrangements VDJ (Rouaud et al., 2012b). Son activité régulatrice débute seulement après le stade pré-B jusqu'au stade terminal (Pinaud et al., 2011). Les modèles murins ayant une modification de tout ou partie de la 3'RR ont des défauts de la SHM, de la CSR ainsi qu'un défaut d'expression du BCR (*cf* Annexes [**Article 1**] (Saintamand et al., 2015)).

La présence d'une structure quasi-palindromique centrée sur l'enhancer hs1,2 rend cette région régulatrice très particulière (Chauveau and Cogné, 1996). Bien que les 3'RR

Résultats

présentes chez d'autres espèces animales ne soient pas systématiquement composées des mêmes activateurs (Pinaud et al., 2011); la structure globale formant un « quasi-palindrome » est cependant conservée. Ainsi, ces données phylogénétiques suggèrent que la structure particulière de la 3'RR joue un rôle important jusque-là inconnu.

Afin d'appréhender les fonctions du « quasi-palindrome » 3'IgH, nous avons créé un modèle murin déficient pour les trois enhancers proximaux (hs3a ; hs1,2 ; hs3b) et les séquences inversées répétées intercalées entre ces derniers (**Figure 45C**). Nous avons dénommé ce modèle 3' PAL KO et nous l'avons comparé à deux autres modèles présents au laboratoire (hs3b-hs4 KO et 3'RR KO).

Dans cette étude, j'ai réalisé l'analyse des populations lymphocytaires B tout au long du développement B par cytométrie en flux. J'ai effectué les dosages d'Ig *in vivo* et *in vitro* et mené les études de transcription. Enfin, j'ai participé à la rédaction de l'article.

Sequential activation and Distinct functions for Distal and Proximal modules within the IgH 3'RR region

Running title: Distinct features among the IgH 3'RR enhancers

Armand Garot^{a,1}, Marie Marquet^{a,1}, Alexis Saintamand^a, Sébastien Bender^{a,b}, Sandrine Le Noir^a, Pauline Rouaud^c, Claire Carrion^a, Zéliha Oruc^a, Anne-Gaëlle Bébin^d, Jeanne Moreau^a, Yves Denizot^a, Frederick W Alt^e, Michel Cogné^{a,f} and Eric Pinaud^{a,2}.

^aUMR 7276, Centre national de la Recherche Scientifique and Université de Limoges : Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations, 2, rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France

^bCentre Hospitalier Universitaire Dupuytren : Centre de Référence des Amyloses, 2 Avenue Martin Luther King, F-87042 Limoges, France

^cPresent address :...

^dPresent address :...

^eProgram in Cellular and Molecular Medicine, Howard Hughes Medical Institute, Boston Children's Hospital, and Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

^fInstitut Universitaire de France

¹ both authors contributed equally to this work.

² to whom correspondence should be addressed: E-mail address: eric.pinaud@unilim.fr

Authors contributions: A.G, M.M., F.W.A., M.C. and E.P. designed research; A.G., M.M., A.S., S.B., S.L.N., P.R., C.C., Z.O., A.B. and E.P. performed research; A.G., M.M., A.S., J.M., Y.D., F.W.A, M.C. and E.P. analysed data; .A.G. M.M., J.M, M.C. and E.P. wrote the manuscript.

Keywords: immunoglobulin heavy chain, enhancer, knock out animals, germline transcription, class switch recombination, somatic hypermutation.

Abbreviations: IgH: immunoglobulin heavy chain; IgL: immunoglobulin light chain; CSR: class switch recombination; SHM: somatic hypermutation; LSR: IgH locus suicide recombination; GC: germinal center; MAR: matrix attachment region.

Abstract

As a master regulator of functional immunoglobulin heavy chain (IgH) expression, the IgH 3' regulatory region (3'RR) controls multiple transcription events at various stages of B cell ontogeny, from newly formed B cells until the ultimate plasma cell stage. The IgH 3'RR plays a pivotal role in early BCR expression, germline transcription preceding CSR, interactions between targeted S regions, variable region transcription prior to SHM and antibody heavy chain production but the functional ranking of its different elements is still inaccurate, especially that of its evolutionarily conserved quasi-palindromic structure. By comparing relevant previous mouse models (3'RR KO and hs3b-4 KO) to a novel mutant devoid of the 3'RR quasi-palindromic region (3'PAL KO), we pinpointed common features and differences that specify two distinct regulatory entities acting sequentially during B cell ontogeny. Independently of exogenous antigens, the 3'RR distal part including hs4 tuned BCR expression in newly formed and naïve B cell subsets. At mature stages, the 3'RR part including the quasi-palindrome dictated most antigen-dependent locus remodelling (SHM and CSR to most isotypes, except IgA) in activated B cells and antibody production in plasma cells.

Introduction

Immunoglobulin heavy chain (*IgH*) expression is critical for B cell development and survival. In developing B-lineage cells, accessibility to the major remodelling events (VDJ recombination, SHM, CSR and LSR) mainly depends on epigenetic changes and germline transcription of many regions spread throughout the *IgH* locus, including V_H promoters, I/switch region promoters, *cis*-regulatory region enhancers and chromatin insulators (1–3). Among the multiple mouse models that contributed to deciphering *IgH* locus regulation, a focus on KO models for *cis*-regulatory regions (enhancers and chromatin insulators) is a means to simplify the picture. Before VDJ recombination, at the pre-proB stage, the *IgH* locus undergoes long-range looping in a “rosette-like” structure that brings into close proximity major *IgH* regulatory regions such as the V_H to D_H intergenic control regions (IGCR1 and 2), the $E\mu$ intronic enhancer, the 3' regulatory region (3'RR) and the 3'IgH CTCF-binding elements (CBEs) (4–6). Initiation of VDJ recombination is assisted by the $E\mu$ enhancer (located downstream from the J_H4 segment) which provides efficient transcription and accessibility to initiate D_H to J_H rearrangements (7–10) as well as the IGCR1 and 2 elements that ordinate the V_H to DJ_H second recombination step (5, 11–13). Even if they most likely participate in *IgH* folding prior to VDJ recombination, 3'CBE (hs5 to hs8) are devoid of enhancer activity (14, 15); deletion of hs5 to 7 CBEs in the mouse modestly impacts usage of proximal V_H regions without any other consequence on B cell development (16). In pre-B cells, once a functional H chain is expressed as a component of the pre-BCR, the $E\mu$ enhancer function switches from DJ_H region accessibility to *Ig μ* chain expression and consequently modulates pre-BCR expression and expansion of the pre-B cell compartment (17, 18). The activity of $E\mu$ even extends to the newly-formed/immature stage where it tunes BCR expression and influences B cell fate (18). The 3'RR has been proven to be dispensable for locus contraction and VDJ recombination (19, 20); its transcriptional activity starts after the pre-B stage and continues throughout B cell development, (for review see ref (21)). The large window of activity of the 3'RR implies that its regulatory function shifts sequentially in order to modulate the expression of functional H chains (in BCR-expressing cells or plasma cells) or the production of germline regulatory transcripts correlated with Ag-dependent remodelling events such as CSR, SHM (for review see ref 1) or even locus suicide recombination (3). The multiple KO and transgenic models developed in order to study 3'RR function (reviewed in (21)) have brought considerable information, although sometimes puzzling given that

models have been mostly studied individually. Transgenic models carrying modified bacterial artificial chromosomes (BAC) prohibit B cell development and chromatin studies but provided information on major effects concerning CSR and SHM (22). Taking CSR into account, BAC transgene studies point out a cumulative activity of IgH 3' enhancer elements, with special activities for some of them such as hs1-2, hs4 alone or combined with hs3b (23, 24) and on the other hand exonerate any effect of the hs3 homologues (25). Transgenic models contradict endogenous deletion studies with regards to BCR expression and antibody secretion (23). From endogenous deletion models, we learned that 3'RR enhancers share redundant functions since individual KOs had no significant consequences on B cell remodelling events (26–28) while combined deletion of hs3b and hs4 decreased CSR to all isotypes except for IgG1 (29). The entire 3'RR deletion model clearly demonstrates the potency of the region at all steps: deficient mice cumulate BCR-expression defects (30), global SHM defects (31), abrogated CSR and failure to secrete Igs (32). Another singularity of the IgH 3'RR is its quasi-palindromic structure centered around hs1,2, composed of inverted repeats for about 25 kilobases and terminating by virtually identical hs3a and hs3b enhancers in the mouse (33, 34). A similar quasi-palindromic organization is conserved in the 3'RR of other species including humans and apes (3, 35, 36). Strikingly, evolution did not conserve virtual homology of 3'RR inverted regions but preserved its global structure. Such a selection implies a dedicated function for the 3'RR quasi-palindrome that has not yet been elucidated. Our current study describes and compares a new mouse model carrying the endogenous deletion of the quasi-palindromic 3'RR proximal module (*3'PAL* KO) to relevant models devoid of either the distal (*hs3b-4* KO) or the entire *IgH 3'RR* (*3'RR* KO). Common features and differences raised by this side by side comparison reveal the IgH 3'RR is a locus control region composed of two functional entities that activate sequentially during B cell development.

Results

Replacement and deletion of the proximal IgH 3'RR module in the mouse: 3'PAL KO model

To determine the role of the “proximal 3'RR structural module” made up of a quasi-palindromic region (called “3'PAL” for IgH 3' quasi-palindromic region), we introduced, a *pTK neoR* gene flanked by two *loxP* sites, in place of the 26.4 kb region that includes *hs3a*, *hs1,2* and *hs3b* enhancers by homologous recombination into 129/Ola ES cells (Supplementary Fig1 A and B). This mutation was introduced into the mouse germline and the *neoR* cassette was thereafter deleted by breeding with the CMV-*cre* transgenic mouse strain (37). The IgH allele carrying the deletion was named 3'PAL^Δ (Supplementary Fig1C). In this model, the *hs4* enhancer, considered as the “distal 3'RR structural module” (38), remains intact. Depending on the experiments, our study used either homozygous mutant mice (of mixed background, in majority 129) or F1 heterozygous mice obtained after breeding to *wt* C57BL/6 mice. For the needs of the study, we compared our 3'PAL deletion to previous models harbouring deletions of either the two distal 3'IgH enhancers (*hs3b-4*^Δ) (29) or the entire 3'RR (3'RR^Δ) (32).

The distal IgH 3'RR module (*hs4*) is *per se* sufficient for antigen-independent B cell ontogeny (from pre-proB to naive B cells)

Since the 3'RR *hs4* enhancer remains upon our “3'PAL” deletion, this mouse KO strain is a model of choice to evaluate the function of the 3'RR distal module in developing B cells. To avoid any disparity linked to mouse genetic background (30, 39), the antigen independent phase of B cell development was assessed in mouse models carrying IgH alleles of distinct allotypes. In such heterozygous models, IgM-allotype expression in developing B-lineage cells reflects competition between the “b” allotype IgH *wt* allele (from C57BL/6 mice) and the “a” allotype IgH mutant allele (from 129 mice). We compared bone marrow and spleen B-lineage cell subsets of *wt* F1 mice (IgH^{wt^a/wt^b}) to three different models carrying heterozygous deletions of the IgH 3'RR modules: proximal module (this study, 3'PAL^{Δ^a}/wt^b), distal *hs3b* and *hs4* elements (*hs3b-4*^{Δ^a}/wt^b) and the complete 3'RR (3'RR^{Δ^a}/wt^b). We combined surface staining with intracellular IgM-allotype staining to precisely determine, in each relevant B-lineage cell subset, both the proportion (and the resulting ratio) of IgM^a or IgM^b-expressing cells and the mean fluorescence of each IgM-allotype (and its ratio).

We noted that disruption of part or the entire 3'RR did not compromise early B cell development since all four models displayed similar numbers and proportions of IgM^a or IgM^b-expressing cells in the bone marrow newly formed/immature (NF) B cell subset (**Table 1 and Fig. 1A and 1B upper panel**). Even if a slight decrease in expression of the mutated allele (IgM^a) had already been seen in NF/immature B cells from 3'RR^{Δa}/wtb and hs3b-4^{Δa}/wtb animals (**Fig. 1B lower panel**), this had no consequence on the inflow of NF B cells.

Deletion of the proximal 3'RR module had no effect on developing B-lineage cells: 3'PAL^{Δa}/wtb animals displayed normal numbers and proportions of all bone marrow and spleen B cell subsets, most likely the consequence of normal IgM^a heavy chain expression in these cells (**Fig. 1B, Fig.2**). This was confirmed in homozygous 3'PAL^{Δ/Δ} mice harbouring B cell compartments comparable to wt mice (**Supplementary Table 1**).

The distal IgH 3'RR module (hs4) is required for efficient BCR expression in newly formed/transitional B cells

Deletion of the proximal 3' regulatory region strongly contrasted with 3'IgH-deletions that encompass the distal hs4 element: in the spleen of 3'RR^{Δa}/wtb and hs3b-4^{Δa}/wtb animals, numbers and proportions of splenic transitional B cells expressing the mutated IgM^a allele was decreased (**Table 1, Fig. 2A and 2B**). This disadvantage in the generation of transitional B cells was correlated with decreased expression (about two fold when compared to wt cells, as evaluated by mean fluorescence intensity) of the IgM^a mutated allele (**Fig. 2B, lower right panel**). This was associated with a significant decrease, in numbers and proportions of IgM^a-expressing mature B lineage cells: marginal zone and follicular B cells from the spleen (**Table 1, Fig. 2C, 2D and 2E**); mature recirculating B cells in the bone marrow (**Table 1, Fig. 1C**) and B1 cell subsets in the peritoneal cavity in 3'RR^{Δa}/wtb and hs3b-4^{Δa}/wtb animals (**Supplementary Fig.2**). Deletion of either proximal, distal or the entire 3'IgH RR showed marked differences on Ig heavy chain expression in developing B cells. A locus devoid of the 3'RR distal module (3'RR^Δ and hs3b-4^Δ) failed to express a normal amount of surface Igμ heavy chain (already observed in NF B cells) with drastic consequences on the capacity to generate mature naïve B cell subsets. On the other hand, our 3'PAL KO model proved that the hs4 3' enhancer was *per-se* sufficient to drive efficient expression of μ heavy chain in developing B cells.

The proximal IgH 3'RR module controls CSR and SHM in a transcription dependent manner

To evaluate the direct effect of the proximal 3'RR deletion on CSR, purified splenic B cells from *wt* and homozygous 3'PAL KO mice were stimulated *in vitro* with LPS (or anti CD40 antibody) plus cytokines. Three days post-stimulation, activated B cells were tested respectively for germline transcription (GLT) of targeted switch regions and post-CSR transcripts. B cells deficient for the 3'RR proximal module displayed a strong CSR defect in most conditions: quantitative detection of most switched transcripts ($I\mu$ -C γ 3, $I\mu$ -C γ 1, $I\mu$ -C γ 2b, $I\mu$ -C γ 2a, $I\mu$ -C ϵ) showed a drastic decrease when RNA from 4d-stimulated mutant B cells was compared to *wt* B cells (**Fig. 3A**). This decreased mRNA amount correlated with decreased numbers of the corresponding switched cells by FACs analysis of the same *in vitro* stimulated cultures, showing a consistent reduction of the cells expressing IgG3, IgG1, IgG2b and IgG2a (reduced by 3 to 10 fold, depending on the isotype) (**Fig. 3C**).

The decrease in CSR efficiency was correlated with a consistent defect in germline transcription of both donor and acceptor switch regions (**Fig. 3B**): when comparing 3'PAL $\Delta\Delta$ to *wt* activated B cells. $I\gamma$ 3-C γ 3 GLT was reduced by 5 fold; $I\mu$ -C μ , $I\gamma$ 1-C γ 1 and $I\gamma$ 2a-C γ 2a GLT were reduced by 3 fold and $I\gamma$ 2b-C γ 2b GLT was reduced by 2 fold. Surprisingly, *in vitro* CSR to IgA was not affected by the deletion of the proximal 3'RR region (**Fig. 3C**); both germline and switched hybrid transcripts were detected in normal proportions in stimulated 3'PAL $\Delta\Delta$ B cells (**Fig. 3A and 3B**). Moreover, Ig secretion was decreased for all isotypes in supernatants of *in vitro*-stimulated cells (**Fig3. D**). This could be linked to the CSR defect and/or to a global Ig secretion defect in plasma cells (see discussion).

SHM was assayed in GC B cells (B220⁺/PNA^{High}/FAS⁺) sorted from Peyer's patches of *wt* and homozygous 3'PAL $\Delta\Delta$ animals. At the IgH locus, we quantified mutations in the ~500bp intronic regions downstream from rearranged-J_H3 or J_H4 segments and found SHM frequency reduced by ~3 fold in 3'PAL $\Delta\Delta$ GC B cells (0.0046 mutations per bp) when compared to *wt* controls (0.0139 mutations per bp) (**Fig. 4A**). When comparing the distribution of mutated sequences, we found that 3'PAL $\Delta\Delta$ GC B cells were largely unmutated (72%) whereas *wt* control had only a small proportion (7%) of unmutated cells (**Fig. 4B**). Mutated IgH alleles from GC B cells devoid of the proximal module contained only few mutations (27% of sequences with less than 6 substitutions). Similarly to the whole 3'RR deletion (31), highly mutated *IgH* alleles (>6 mutations) were almost absent in our 3'PAL

mutants (**Fig. 4B**). As a control experiment, SHM was also quantified in the intron downstream from the J κ 5 segment and found both the mutation frequency and the percentage of mutated sequences to be comparable with that in *wt* controls (**Fig. 4A and 4B**). We finally quantified IgH primary transcription by quantitative RT-PCR with a probe downstream from the J μ 4 intron and found a 2 to 3 fold reduction in CG B cells lacking the 3'RR proximal module (**Fig. 4C**). In naïve B cells (B220⁺/PNA^{Low}/FAS⁻) sorted from Peyer's patches, *IgH* primary transcription levels were similar in *wt* and 3'PAL^{Δ/Δ} mice. This was correlated with normal IgM-expression of the 3'PAL-deficient allele in splenic B cell populations (**Fig. 2**) and confirmed that the 3'RR proximal module did not modulate H chain expression in resting B cells.

Plasma cell antibody production and the antigen-specific immune responses rely on the IgH 3'RR proximal module

The first evidence of Ig secretion defects in animals lacking the 3'RR distal module was detected by the drastic reduction of all circulating Ig, including IgM, in the serum of 8-week-old 3'PAL^{Δ/Δ} mice (**Fig. 5A**). When compared to *wt*, homozygous mutants displayed a 10 fold reduction in IgM and IgG2a levels, IgE was barely detectable and concentrations of all other isotypes were reduced more than 5 fold. This decrease was similar to that previously observed in 3'RR KO mice (32). When challenged with ovalbumin, cohorts of *wt*^{a/b} and 3'PAL^{Δa/wtb} animals confirmed that an IgH allele devoid of its proximal module was unable to support efficient antibody response to this T-dependent antigen (**Fig. 5B**). The IgM^a specific response was consistently decreased (**Fig.5B, top left panel, grey lines**) while IgG1^a and IgG2a^a responses were completely abrogated (**Fig.5B, top middle and right panels, grey lines**), probably the consequence of combined CSR and Ig secretion defects. Altogether, severe hypogammaglobulinemia combined with inefficient antibody responses implied a defect at the plasma cell stage: either a differentiation or an Ig production defect.

Plasma cell differentiation and ability to produce Ig was then evaluated in mice carrying a heterozygous deletion (3'PAL^{Δa/wtb}, *hs3b-4*^{Δa/wtb}, and 3'RR^{Δa/wtb}) and compared to *wt*^{a/b} counterparts after SRBC intraperitoneal challenge (**Fig.5C**). All models allowed efficient generation of plasma cells expressing both IgM^a and IgM^b allotypes in the spleen six days after challenge (**Fig.5C**). Remarkably, plasma cells carrying IgH alleles devoid of the proximal 3'RR module (3'PAL^Δ and 3'RR^Δ alleles) exhibited a strong defect in intracellular IgM

expression (**Fig.5C, right panels and 5D**). To verify that reduced heavy chain transcription was the origin of the defect in *3'PAL* KO animals, IgH transcription was assayed in resting and *in vitro*-activated B cells from homozygous KO mice (**Fig.5E, left panel**). Indeed, in this plasmablast-enriched population, *IgH* primary transcription was drastically reduced in the absence of the proximal *3'RR* module (**Fig.5E, left panel**); this was correlated with decreased transcription of the μ chain secreted form (**Fig. 5E right panel**). The common feature shared by *3'RR* and *3'PAL*-deficient plasma cells highlighted the critical role of the proximal *3'RR* module in IgH chain transcription and production at this terminal stage of B cell development.

Discussion

There is no doubt that the 3'RR plays a key role in IgH locus regulation, contributing to GLT and CSR, LSR, SHM, and the production of large amounts of H chain in plasma cells (3, 21, 38). However, the role of the conserved quasi-palindrome and the hierarchy between the 3'RR modules were still poorly understood. Based on the comparison of previous models to a new KO mouse model lacking the 3'RR quasi palindromic region, our present study demonstrated that the 3'RR includes at least two functional modules: i/ the distal module which includes the *hs4* enhancer element and ii/ the proximal module defined as the 3'RR quasi-palindrome. Based on heterozygous models carrying IgH alleles of a and b allotypes, our comparative study highlights a sequential activation of the 3'RR in developing B cells, once VDJ recombination has occurred. First, independently of antigen stimuli, our study confirmed that VDJ recombination does not require any element of the 3'RR enhancer. In all models carrying an IgH allele lacking either the 3' quasi-palindrome, *hs3b-hs4* elements or even the entire 3'RR, early B cell development was preserved, with normal pro- and pre-B cell compartments. This correlates with previous studies carried out in homozygous KO mice showing that VDJ rearrangement efficiency or V_H usage was not affected in such models (19, 40). Second, our study identifies the critical role of the distal 3'RR module for Ig heavy chain expression in a defined window starting as soon as a complete BCR is expressed (newly formed B cells) and extending until the naïve B cell stage.

The first contribution of the 3' IgH region to B-lineage remodelling events could be assigned to chromatin insulators binding CTCF named CBEs (*hs5* to *hs7* and the newly described *hs8*), which have been proposed to facilitate long-distance interactions within the IgH locus (14, 20, 41, 42). So far, deletion of *hs5-7* CBEs downstream from the mouse 3'RR resulted in only a slight modification of D and V_H usage (16) suggesting a modest contribution of 3' CBEs in VDJ joining, although it is not excluded that full deletion of all 3' CBEs (including *hs8*) might have a more drastic effect (38). Once VDJ recombination completed, the 3'RR and VDJ-rearranged segment promoter are still interacting and then starts the actual 3'RR stepwise transcriptional activation by its distal module.

Indeed, when developing B cells were driven by IgH alleles lacking the *hs4* distal enhancer (*hs3b-4^Δ* or *3'RR^Δ*), a progressive decrease in μ H chain expression was already observed in newly formed B cells (about 30% decrease at this stage when compared to *WT*, based on IgM^a/IgM^b mean fluorescence ratio) and rose to a 50% decrease in transitional B cells. Such

“low BCR-expressing” NF and transitional B cells displayed a differentiation disadvantage (observed in both models devoid of the distal *hs4* enhancer) toward mature MZ and FO B cell subsets. In the *3'PAL* KO model, normal *Igμ* expression in bone marrow NF B cells and spleen mature B subsets clearly shows the proximal *3'RR* module as dispensable at these stages. These findings pinpoint the window of activity for the distal *hs4* enhancer and supports a stepwise activation of the *IgH 3'RR*: *hs4* is required to maintain optimal μ heavy chain transcription from the bone marrow NF to the spleen mature MZ and FO B cells. This window of activity clearly overlaps with that of $E\mu$, recently described as active on μ H chain transcription from pre-B to transitional B cell stages (18).

When mature B cells encounter antigen and engage in an immune response, the *3'RR* proximal module takes over most of *IgH* locus regulatory mechanisms: SHM, CSR and antibody production.

First, SHM seems strongly dependent on the *3'RR* proximal module. The drastic reduction in SHM frequency in GC B cells from *3'PAL*^{ΔΔ} mice (0.0046 mutations per bp downstream from the J_H introns, excluding unmutated sequences) was similar to that observed in *3'RR*-deficient animals (31), a model described as deficient for recruiting AID in *IgH* variable regions (43). In our *3'PAL*^Δ mice, the SHM defect was also correlated with a decrease (at least 2 fold) in *IgH* primary transcription, a defect comparable to that seen in *3'RR*-deficient mice (31). The *IgH* transcription defect in *3'PAL*-deficient GC B cells also provides further evidence that *hs4* does not shape H chain expression once B cells are activated. Even if such a 2 fold transcription decrease appears modest, it is certainly significant. Indeed, it is admitted that the level of BCR expression modulates B-cell fate and that a basal level of H chain transcription is necessary for B cell survival (44). Besides a similar transcription defect in both models, the proportion of unmutated sequences (72%) in *3'PAL* deficient GC B cells was, however, lower than in *3'RR*-KO mice (95%) (31). Even if *hs4* does not impact transcription at this stage, its partnership with the *3'PAL* module for AID recruitment or targeting can be suspected in light of the higher proportion of unmutated *IgH* alleles in *3'RR* KO than in *3'PAL*-deficient mice.

Second, germline transcription of most *Ig* switch regions is regulated by the proximal *3'RR* module. Similarly to complete *3'RR* deletion, transcription of the donor $S\mu$ region is decreased by at least 4 fold in B cells induced for CSR *in vitro* (32, 45). The strong decrease in germline transcripts for most acceptor switch regions ($S\gamma3$, $S\gamma1$, $S\gamma2b$ and $S\gamma2a$) is also a

feature shared by *3'PAL*- and *3'RR*-KO models (32), arguing that this regulatory process is essentially assigned to the *3'RR* proximal module. The failure of a *3'PAL*-deficient allele to support IgG1 or IgG2a specific responses is also consistent with a strong CSR defect. Interestingly the *3'PAL*^{ΔΔ} phenotype preserved normal germline transcription and CSR to IgA whereas these processes were affected in animals lacking both *hs4* and all or part of the *3'PAL* (29, 32). Actually, CSR to IgA was also decreased in transgenic models carrying a truncated BAC missing a 15kb segment encompassing *hs4* and the *hs5-7* insulators (24). Although deletion of endogenous *hs4* alone did not obviously affect CSR to IgA (27), our *3'PAL* KO model specifies that *hs4* alone is sufficient for normal germline transcription and CSR to Sα (**Fig. 3B**). A recently described enhancer-RNA expressing element, called Inc-RNA-CSR, also indicates a role of *hs4* for IgA CSR. In the CH12 cell line undergoing CSR to IgA, authors showed that Inc-RNA-CSR promotes the CSR-stimulating activity of the *3'RR* via a long-distance interaction with the *hs4* region (46).

Third, in plasma cells, Ig heavy chain transcription and consequently antibody production, is directly under the control of the *3'RR* proximal module. Various phenotypic defects, shared by both *3'RR*- and *PAL*-KO mice, argue in favour of limited antibody production in such models. Similar to *3'RR* KO mice (32), our study highlights a global serum Ig defect, including IgM, in homozygous *3'PAL*^{ΔΔ} animals (**Fig. 5A**), associated with deficient Ig secretion by *in vitro*-stimulated cells (**Fig3. D**). Both *3'RR* and *3'PAL*-deficient alleles thus displayed a similar IgH transcription and IgH chain synthesis defect in activated B-cells and plasma cells that can logically be attributed to deletion of the proximal *3'RR* module (**Fig. 5**).

We like to hypothesize that *IgH 3'RR* modules respond sequentially maybe independently to external stimuli: i/ the distal (*hs4*) module being responsible for efficient heavy chain and consequently BCR expression in newly formed and naïve B cell subsets and ii/ the proximal quasi-palindromic module being later activated by exogenous antigen stimulation for supporting both SHM, CSR (with some help from *hs4* in the unique situation of Sα CSR) and prolonged IgH over-expression in antibody secreting cells. By simultaneously preserving normal early B cell development and normal BCR expression at all B-cell differentiation stages, the *3'PAL* deletion model thus stands as an ideal model for specifically truncating antigen-driven remodelling of the IgH locus (CSR, SHM and IgH over-expression in plasma cells for antibody secretion).

Materials and Methods

Mice models

Heterozygous mice ($3'PAL^{\Delta a}/wtb$, $3'RR^{\Delta a}/wtb$ and $hs3b-4^{\Delta a}/wtb$) were generated by crossing homozygous mice with C57BL/6 mice. Mixed Sv/129 x C57BL/6 mice were used as controls.

Animal facilities and ethics

Mice were bred and housed in specific pathogen free conditions at 21-23°C with a 12-h light/dark cycle. All experiments were performed according to the guidelines of the Comité Régional d'Éthique de l'Expérimentation Animale du Limousin and were approved as part of the protocol registered under no. CREAAL 7-07-2012.

Southern blots

Genomic Southern blots were performed as follows: 20 µg genomic DNA was digested by *XhoI* or *SacI* and submitted to electrophoresis on a 0.7% agarose gel. DNA was transferred to nylon membranes (MP Biomedicals, Santa Ana, CA) by capillarity. Blots were hybridized with [³²P]-labeled probes generated by random priming. "X" probe located upstream from the 5' homology arm was a 0.8-kpb *HindIII-EcoRI* fragment; "Y" probe located downstream from the 3' homology arm was a 0.6-kpb *XhoI-HindIII* fragment as indicated in Supp. Fig 1.

Flow cytometry

Freshly isolated cells were washed with 2% FCS-PBS. Single cell suspensions of bone marrow, spleen, peritoneal cavity and Peyer's patches were labeled with various antibodies. For bone marrow staining, cells were labelled with B220-BV510, CD117-PE, CD43-PE-Cy7, IgM-FITC, CD19-APC-H7 and CD93-APC (clone AA4.1, eBioscience), IgM^a-FITC (clone DS-1, BD Pharmingen), IgM^b-PE (clone AF6-78, BD Pharmingen). Splenocytes were stained with B220-BV510, CD21-BV605, CD23-PE-Cy7, CD19-APC-H7, CD93-APC, IgD-FITC. For the peritoneal cavity, Abs used were B220-BV510, CD5-BV605, IgM^a-FITC, IgM^b-PE. For Peyer's patches, cells were labelled with B220-BV510 or B220-V450, IgA-FITC, IgM-PE, peanut agglutinin (PNA)-FITC, FAS-PE (SouthernBiotech [Birmingham, AL], BD Biosciences). Flow cytometry analysis was performed on a BD LSR Fortessa cell analyzer (BD Biosciences). FACS data were analyzed by FACSDIVA software (BD Biosciences). For intracellular staining, cells were first stained for surface markers. After washing, cells were treated with a Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) and intracellular staining was performed with IgM^a-FITC, IgM^b-PE Abs.

Plasma cell analysis

For plasma cell analysis, mice were injected i.p with 200 μ l of sheep red blood cells (SRBC). At day 6, mice were sacrificed and plasma cells analyzed by flow cytometry. Single cells from spleens were washed with 2% FCS-PBS. Cell surface staining was performed with the following Abs : B220-BV510, CD138-allophycocyanin (BioLegend, BD Biosciences). For intracellular staining, 5×10^6 cells were first stained for surface proteins. After washing, cells were treated with a Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences) and intracellular staining was performed with IgM^a-FITC, IgM^b-PE Abs.

RNA isolation and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from 10^7 cells using TRI Reagent (Ambion). Residual DNA was removed with DNase I (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was synthesized from total RNA (2 μ g for each experiment) with Superscript III reverse transcriptase and random hexamers (Invitrogen). Real-time PCR using TaqMan Universal or SYBR Green Master mix (Applied Biosystems) was performed on cDNA samples (25 ng per reaction). The change in cycling threshold ($\Delta\Delta C_T$) method was used for data analysis. TaqMan probes and primers used for *IgH* primary transcripts, *Ig κ* mature transcripts, pre-CSR germline transcripts (*I_H-C_H*), post-CSR (*I μ -C_H*) hybrid transcripts are listed in **Supplementary Table 2**. Relative mRNA levels were normalized to *Gapdh* or *Cd79a* transcripts. The quantitative RT-PCR reactions were performed on a StepOnePlus Real-Time PCR cycler (Applied Biosystems).

Secreted Ig and *in vitro* CSR

Supernatants from *in vitro* stimulated B cells, harvested after 4-d culture, and sera from *wt* or homozygous mutant mice were tested for the presence and concentration of different Ig isotypes by ELISA, as previously described (29). Absorbance was measured at 405 nm on a Varioskan Flash system (Thermo Scientific).

Specific Ig isotype response upon Ag stimulation

Animal cohorts including *wt^a/wt^b* and 3'PAL ^{Δ ^a}/*wt^b* were analyzed for the presence of OVA-specific Ig isotypes in sera by ELISA. Allotype-specific IgM, IgG1 and IgG2a responses to OVA were determined as previously described (30).

SHM

Peyer's patch cells from 8-week-old *wt* and 3'PAL^{Δ/Δ} mice were stained with anti-B220-APC, PNA-FITC and anti-FAS-PE (described above). Germinal center (GC) B cells (B220⁺/PNA^{high}/FAS^{high}) were sorted and collected on a FACSVantage (BD Biosciences). Genomic DNA, extracted from sorted B cells, was used for amplification and cloning both IgH- and Igκ-rearranged variable regions targeted by somatic mutations. Amplification of VD_{JH}-or VJ_K-rearranged DNA fragments was performed with the appropriate primers (**Supplementary Table 2**). Genomic DNA was submitted to amplification using Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) according to the following program: 1 cycle [98°C/30s]; 33 cycles [98°C/10 s, 66°C/30 s, 72°C/90 s]; 1 cycle [72°C/10 min]. PCR products were cloned into the Zero Blunt[®] Topo[®] PCR cloning vector system (Invitrogen). Plasmids were isolated using NucleoSpin kit (Macherey-Nagel) and sequenced using an automated laser fluorescent ANA ABI-PRISM sequencer (Perkin-Elmer). Mutational analysis was performed in either the 500 bp intronic region just downstream from J_{H3} and J_{H4} segments (for IgH locus) or in the 554 bp intronic region located downstream from the J_{K5} segment (for Igκ locus).

Acknowledgements

We are very grateful to all members of the Service Commun d'Animalerie and Plateforme de Transgenose of Limoges University for mouse work. We are grateful to Catherine Ouk-Martin and the FACS sorting facility of Limoges University. We are also very grateful to Drs. Laurent Delpy, Christophe Sirac and Brice Laffleur for discussions and helpful comments.

Footnotes

Sources of support: M.M. was supported by a PhD joint scholarship from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Région Limousin. A.G. and P.R. were supported by a PhD scholarship from the Région Limousin. A.S. was supported by a PhD scholarship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. S.L.N. was supported by a post-doc fellowship from ANR- 11- BSV302701 grant. This work was supported by grants from ARC #SL220100601332 ; Conseil Régional du Limousin ; Ligue contre le Cancer, comités de la région Limousin ; ANR- 11- BSV30270 ; Comité d'Orientation Recherche Cancer en Limousin (CORC).

References

1. Perlot T, Alt FW (2008) Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. *Adv Immunol* 99:1–32.
2. Sleckman BP, Oltz EM (2012) Preparing targets for V(D)J recombinase: transcription paves the way. *J Immunol Baltim Md 1950* 188(1):7–9.
3. Péron S, et al. (2012) AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 336(6083):931–934.
4. Jhunjhunwala S, et al. (2008) The 3D structure of the immunoglobulin heavy-chain locus: implications for long-range genomic interactions. *Cell* 133(2):265–279.
5. Guo C, et al. (2011) CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* 477(7365):424–430.
6. Choi NM, Feeney AJ (2014) CTCF and ncRNA Regulate the Three-Dimensional Structure of Antigen Receptor Loci to Facilitate V(D)J Recombination. *Front Immunol* 5:49.
7. Afshar R, Pierce S, Bolland DJ, Corcoran A, Oltz EM (2006) Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J Immunol Baltim Md 1950* 176(4):2439–2447.
8. Bolland DJ, et al. (2007) Antisense intergenic transcription precedes Igh D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer Emu. *Mol Cell Biol* 27(15):5523–5533.
9. Perlot T, Alt FW, Bassing CH, Suh H, Pinaud E (2005) Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(40):14362–14367.
10. Sakai E, Bottaro A, Davidson L, Sleckman BP, Alt FW (1999) Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4):1526–1531.
11. Featherstone K, Wood AL, Bowen AJ, Corcoran AE (2010) The mouse immunoglobulin heavy chain V-D intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V(D)J recombination. *J Biol Chem* 285(13):9327–9338.

12. Giallourakis CC, et al. (2010) Elements between the IgH variable (V) and diversity (D) clusters influence antisense transcription and lineage-specific V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(51):22207–22212.
13. Lin SG, Guo C, Su A, Zhang Y, Alt FW (2015) CTCF-binding elements 1 and 2 in the Igh intergenic control region cooperatively regulate V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(6):1815–1820.
14. Nicolás L, Chaudhuri J (2013) 4C-ing the Igh Landscape. *Immunity* 39(2):199–201.
15. Garrett FE, et al. (2005) Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol Cell Biol* 25(4):1511–1525.
16. Volpi SA, et al. (2012) Germline deletion of Igh 3' regulatory region elements hs 5, 6, 7 (hs5-7) affects B cell-specific regulation, rearrangement, and insulation of the Igh locus. *J Immunol Baltim Md 1950* 188(6):2556–2566.
17. Li F, Eckhardt LA (2009) A role for the IgH intronic enhancer E mu in enforcing allelic exclusion. *J Exp Med* 206(1):153–167.
18. Marquet M, et al. (2014) The E μ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950* 193(3):1171–1183.
19. Rouaud P, et al. (2012) Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J Biol Chem* 287(11):8356–8360.
20. Medvedovic J, et al. (2013) Flexible long-range loops in the VH gene region of the Igh locus facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity* 39(2):229–244.
21. Pinaud E, et al. (2011) The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol* 110:27–70.
22. Dunnick WA, et al. (2009) Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *J Exp Med* 206(12):2613–2623.
23. Dunnick WA, Shi J, Zerbato JM, Fontaine CA, Collins JT (2011) Enhancement of antibody class-switch recombination by the cumulative activity of four separate elements.

J Immunol Baltim Md 1950 187(9):4733–4743.

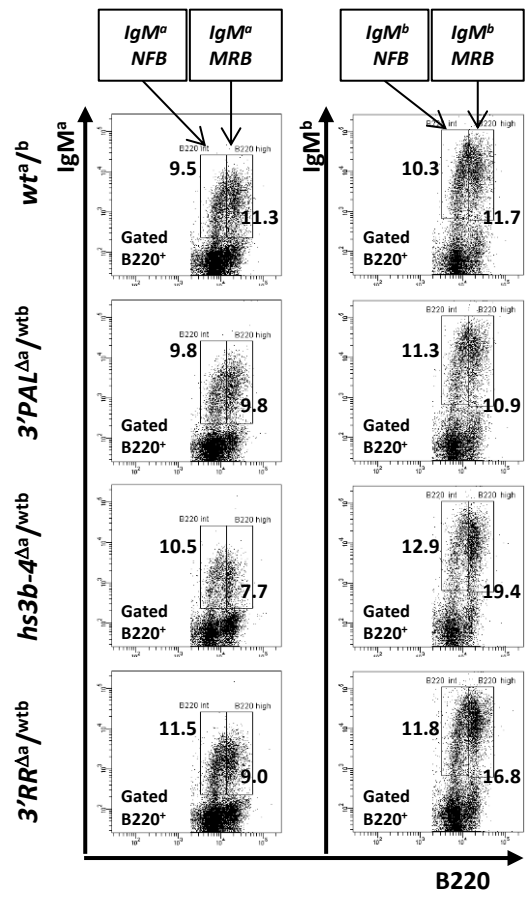
24. Dunnick WA, Shi J, Fontaine C, Collins JT (2013) Transgenes of the mouse immunoglobulin heavy chain locus, lacking distal elements in the 3' regulatory region, are impaired for class switch recombination. *PLoS One* 8(2):e55842.
25. Yan Y, et al. (2011) Homologous elements hs3a and hs3b in the 3' regulatory region of the murine immunoglobulin heavy chain (Igh) locus are both dispensable for class-switch recombination. *J Biol Chem* 286(31):27123–27131.
26. Manis JP, et al. (1998) Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J Exp Med* 188(8):1421–1431.
27. Vincent-Fabert C, et al. (2009) Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J Immunol Baltim Md 1950* 182(11):6926–6932.
28. Bébin A-G, et al. (2010) In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J Immunol Baltim Md 1950* 184(7):3710–3717.
29. Pinaud E, et al. (2001) Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* 15(2):187–199.
30. Saintamand A, et al. (2015) The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget*.
31. Rouaud P, et al. (2013) The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J Exp Med* 210(8):1501–1507.
32. Vincent-Fabert C, et al. (2010) Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 116(11):1895–1898.
33. Chauveau C, Cogné M (1996) Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat Genet* 14(1):15–16.
34. Saleque S, et al. (1997) Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3'E and hs3). *J Immunol Baltim Md 1950* 158(10):4780–4787.

35. Sepulveda MA, Garrett FE, Price-Whelan A, Birshstein BK (2005) Comparative analysis of human and mouse 3' Igh regulatory regions identifies distinctive structural features. *Mol Immunol* 42(5):605–615.
36. Addabbo P D', Scascitelli M, Giambra V, Rocchi M, Frezza D (2011) Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1.2 within the palindrome of IgH 3' Regulatory Region. *BMC Evol Biol* 11:71.
37. Dupé V, et al. (1997) In vivo functional analysis of the Hoxa-1 3' retinoic acid response element (3'RARE). *Dev Camb Engl* 124(2):399–410.
38. Birshstein BK (2014) Epigenetic Regulation of Individual Modules of the immunoglobulin heavy chain locus 3' Regulatory Region. *Front Immunol* 5:163.
39. Kaminski DA, Stavnezer J (2007) Antibody class switching differs among SJL, C57BL/6 and 129 mice. *Int Immunol* 19(4):545–556.
40. Morvan CL, Pinaud E, Decourt C, Cuvillier A, Cogné M (2003) The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* 102(4):1421–1427.
41. Degner SC, et al. (2011) CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin influence the genomic architecture of the Igh locus and antisense transcription in pro-B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(23):9566–9571.
42. Degner SC, Wong TP, Jankevicius G, Feeney AJ (2009) Cutting edge: developmental stage-specific recruitment of cohesin to CTCF sites throughout immunoglobulin loci during B lymphocyte development. *J Immunol Baltim Md 1950* 182(1):44–48.
43. Maul RW, et al. (2014) Spt5 accumulation at variable genes distinguishes somatic hypermutation in germinal center B cells from ex vivo-activated cells. *J Exp Med* 211(11):2297–2306.
44. Lam KP, Kühn R, Rajewsky K (1997) In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90(6):1073–1083.
45. Saintamand A, et al. (2015) Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat Commun* 6:7084.

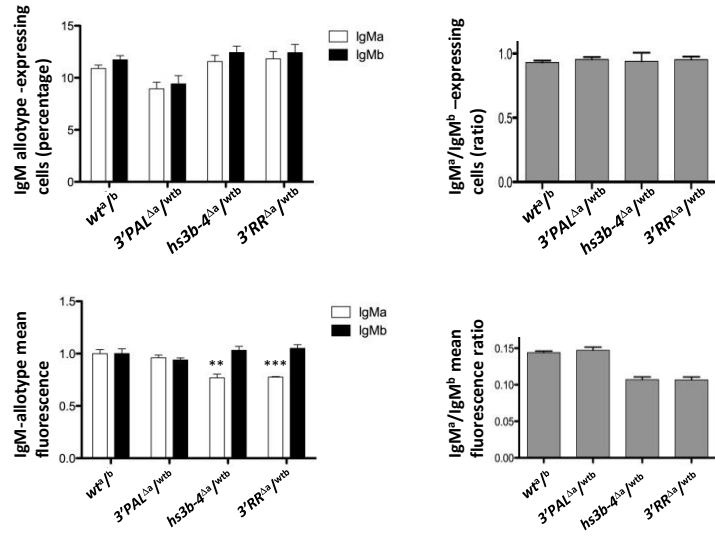
46. Pefanis E, et al. (2015) RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell* 161(4):774–789.
47. Sellars M, Reina-San-Martin B, Kastner P, Chan S (2009) Ikaros controls isotype selection during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 206(5):1073–1087.
48. Tinguely A, et al. (2012) Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol Cell Biol* 32(1):107–117.
49. Xiang Y, Garrard WT (2008) The Downstream Transcriptional Enhancer, Ed, positively regulates mouse Ig kappa gene expression and somatic hypermutation. *J Immunol Baltim Md 1950* 180(10):6725–6732.
50. Park S-R, Seo G-Y, Choi A-J, Stavnezer J, Kim P-H (2005) Analysis of transforming growth factor-beta1-induced Ig germ-line gamma2b transcription and its implication for IgA isotype switching. *Eur J Immunol* 35(3):946–956.
51. Park S-R, et al. (2009) HoxC4 binds to the promoter of the cytidine deaminase AID gene to induce AID expression, class-switch DNA recombination and somatic hypermutation. *Nat Immunol* 10(5):540–550.

Figure 1. Normal IgM-expressing bone marrow B cell subsets require the 3'RR distal module. Bone marrow cells from 8 to 10-week old F1 mice (expressing IgH alleles of *a* and *b* allotypes) of each genotype ($wt^{a/b}$, $3'PAL^{\Delta a}/wt^b$, $hs3b-4^{\Delta a}/wt^b$, and $3'RR^{\Delta a}/wt^b$) were stained with fluorescent antibodies and analyzed by FACS. (A) B220⁺-gated bone marrow B-lineage cells, IgM^a- (left column) and IgM^b- (right column) expressing cells were separated; for each allotype. Percentage of B220^{int}/IgM⁺ newly formed/immature B cells (NFB) and B220^{high}/IgM⁺ mature recirculating B cells (MRB) are indicated. (B) Top left histograms display percentage of IgM^a or IgM^b expressing newly formed/immature bone marrow B cells collected from 5 animals of each genotype. Significant differences are indicated by *p* values: ***p*<0.01, ****p*<0.001 according to the Mann-Whitney *U*-test. Top right histograms report same data represented as a ratio. Bottom left histograms represent cells give intracellular IgM^a or IgM^b allotype expression (estimated by flow cytometry as described above) in newly formed/immature from same animals. Bottom right histograms report same data represented as a ratio. (C) Top left histograms show percentage of IgM^a or IgM^b expressing mature/recirculating bone marrow B cells collected from 5 animals of each genotype. Significant differences are indicated by *p* values: ***p*<0.01, ****p*<0.001 according to the Mann-Whitney *U*-test. Top right histograms report same data represented as a ratio. Bottom left histogram stands for intracellular IgM^a or IgM^b allotype expression (estimated by flow cytometry as described above) in mature/recirculating B cells from same animals. Bottom right histograms reported same data represented as a ratio.

A. Bone marrow IgM-expressing B cell populations



B. IgM-allotype balance in NF/immature B cells



C. IgM-allotype balance in MR B cells

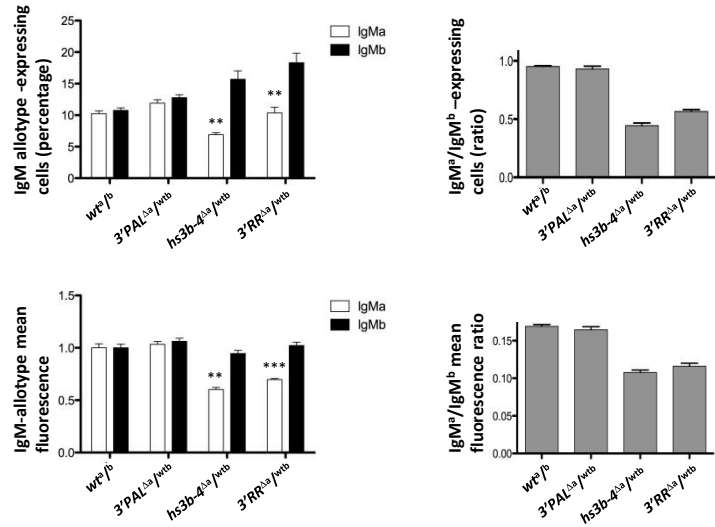
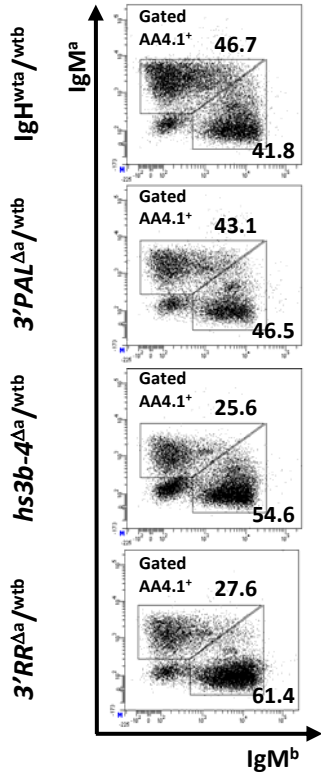


Figure 1.

Figure 2. Normal IgM-expressing splenic B cell subsets require the 3'RR distal module.

Spleen cells from 8 to 10-week old F1 mice (expressing IgH alleles of *a* and *b* allotypes) of each genotype (*wt*^{*a*/*b*}, *3'PAL* ^{Δ *a*/*wtb*}, *hs3b-4* ^{Δ *a*/*wtb*}, and *3'RR* ^{Δ *a*/*wtb*}) were stained with fluorescent antibodies and analyzed by FACS. (A) Dot plots showed percentage of transitional (TR) B cells (gated AA4.1⁺ cells) expressing intracellular IgM^{*a*} or IgM^{*b*} allotypes. (B) Top left histograms display percentage of IgM^{*a*} or IgM^{*b*} expressing transitional B cells collected from 5 animals of each genotype. Significant differences are indicated by *p* values: ***p*<0.01, ****p*<0.001 according to the Mann-Whitney *U*-test. Top right histograms report same data represented as a ratio. Bottom left histograms give for intracellular IgM^{*a*} or IgM^{*b*} allotype expression (estimated by flow cytometry as described above) in transitional B cells from same animals. Bottom right histograms report same data represented as a ratio. (C) Dot plots show percentage of cells expressing intracellular IgM^{*a*} or IgM^{*b*} allotypes in marginal zone B cells (MZB, gated on CD19⁺ B220⁺ CD21^{high} CD23^{low}, left column) and follicular B cells (FOB, gated on CD19⁺ B220⁺ CD21^{low} CD23^{high}, right column). (D) Top left histograms display percentage of IgM^{*a*} or IgM^{*b*} expressing marginal zone spleen B cells collected from 5 animals of each genotype. Significant differences are indicated by *p* values: ***p*<0.01, ****p*<0.001 according to the Mann-Whitney *U*-test. Top right histograms report same data represented as a ratio. Bottom left histograms represent intracellular IgM^{*a*} or IgM^{*b*} allotype expression (estimated by flow cytometry as described above) in MZ cells from same animals. Bottom right histograms report same data presented as a ratio. (E) Top left histograms display percentage of IgM^{*a*} or IgM^{*b*} expressing follicular B cells collected from 5 animals of each genotype. Significant differences are indicated by *p* values: ***p*<0.01, ****p*<0.001 according to the Mann-Whitney *U*-test. Top right histograms report same data represented as a ratio. Bottom left histograms show intracellular IgM^{*a*} or IgM^{*b*} allotype expression (estimated by flow cytometry as described above) in FO B cells from same animals. Bottom right histograms report same data represented as a ratio.

A. Splenic TR B cell populations



B. IgM-allotype balance in TR B cells

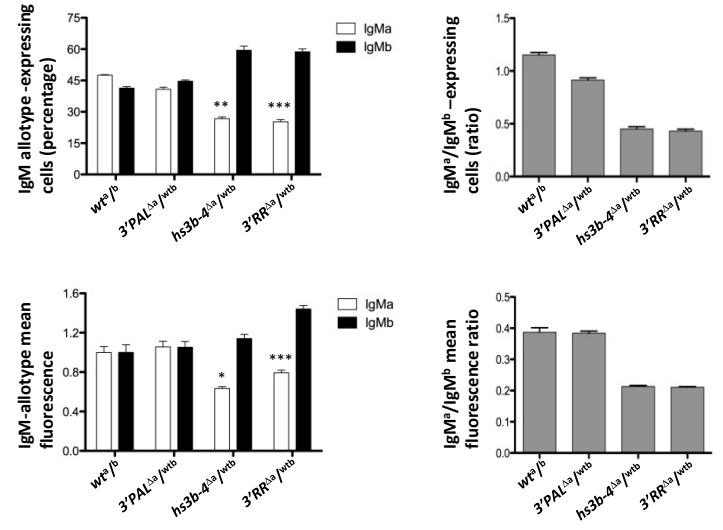
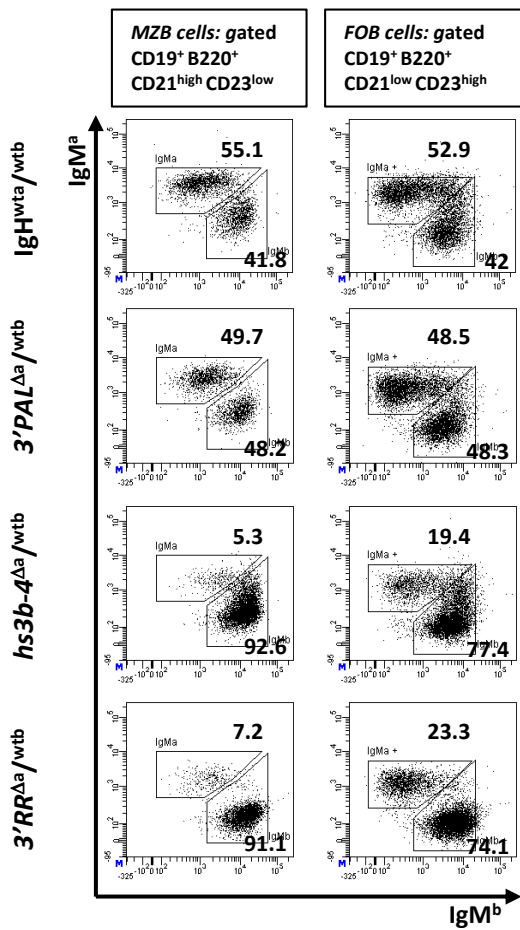
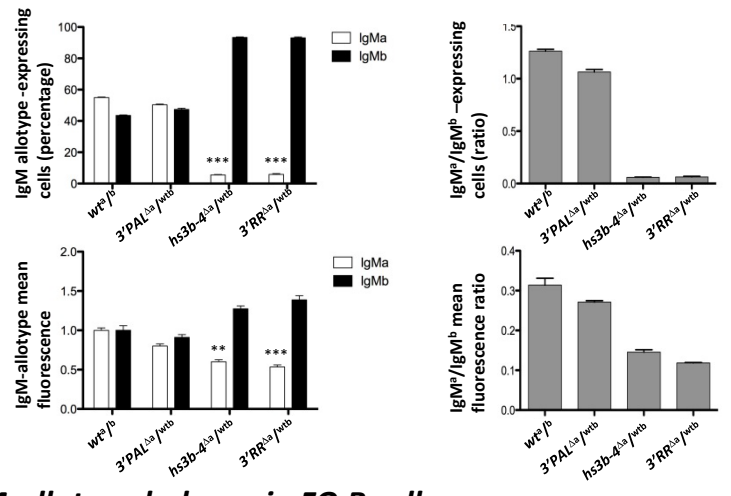


Figure 2.

C. Splenic mature B cell populations



D. IgM-allotype balance in MZ B cells



E. IgM-allotype balance in FO B cells

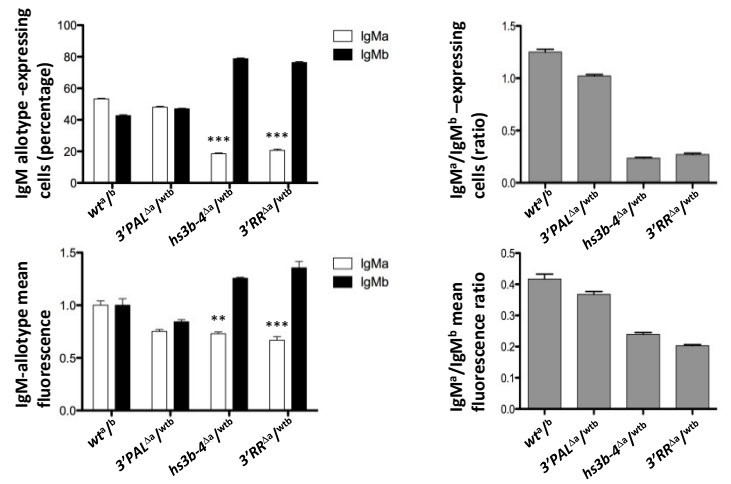
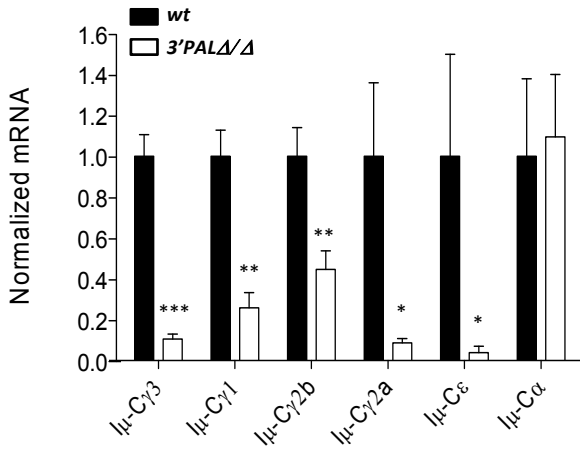
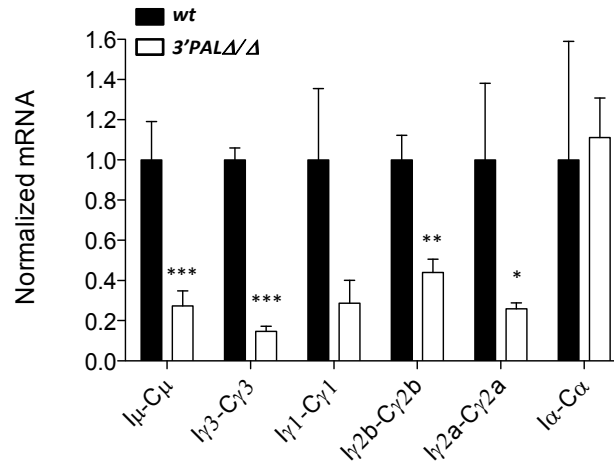


Figure 3. Impaired CSR in the absence of the 3'RR proximal module. Resting splenic B cells (from *wt* and *3'PAL^{Δ/Δ}* mice) were stimulated with LPS (IgG2b and IgG3), LPS + TGF- β (for IgA), LPS + IFN- γ (for IgG2a) or anti-CD40 + IL4 (for IgG1 and IgE). Total RNA was isolated on day 3. This was used as template for real-time qRT-PCR to measure the levels of post-recombination I μ -C_H transcripts (A) or germline I_H-C_H transcripts (B), normalized to *Gapdh* expression. Significant differences are indicated by *p* values: **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 according to the Mann-Whitney *U*-test. After 4 days, cells were collected and analyzed by flow cytometry for surface Ig isotype expression (C); the same day, supernatant was harvested and antibody isotype was quantified by ELISA (D). Data are from one representative of 4 independent experiments, mean and SEM are indicated.

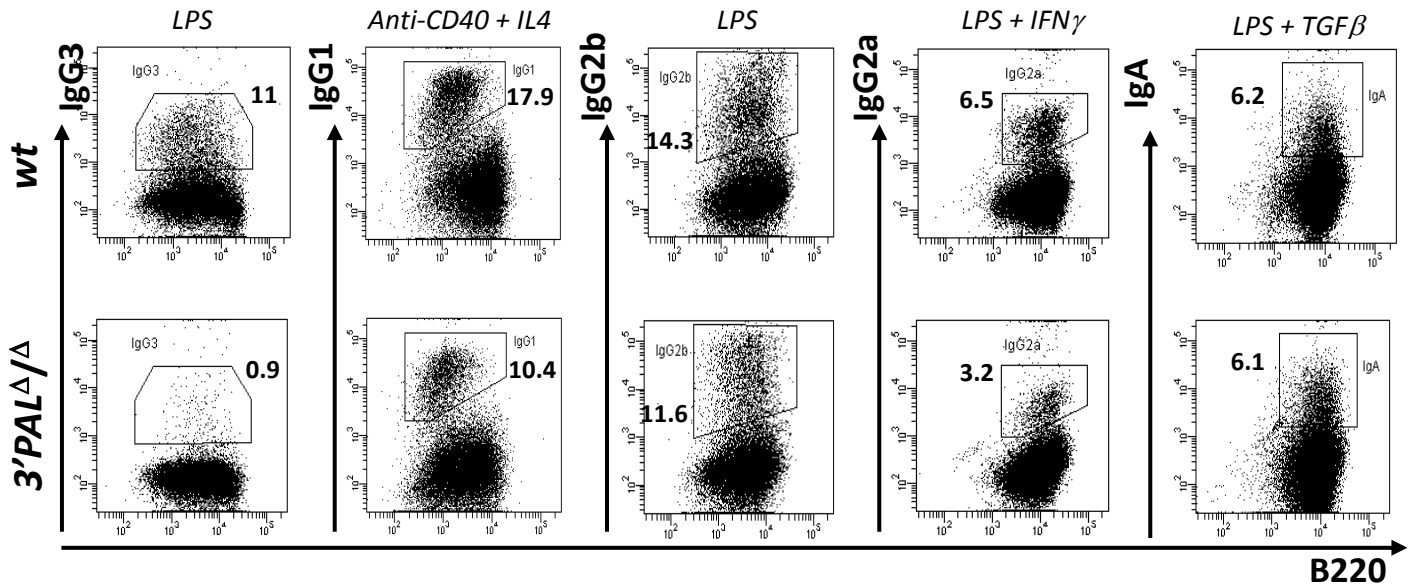
A. Post-recombination I_{μ} - C_H transcripts



B. Germline I_H - C_H transcripts



C. Surface Ig expression



D. Ig secretion in supernatant (ng/mL)

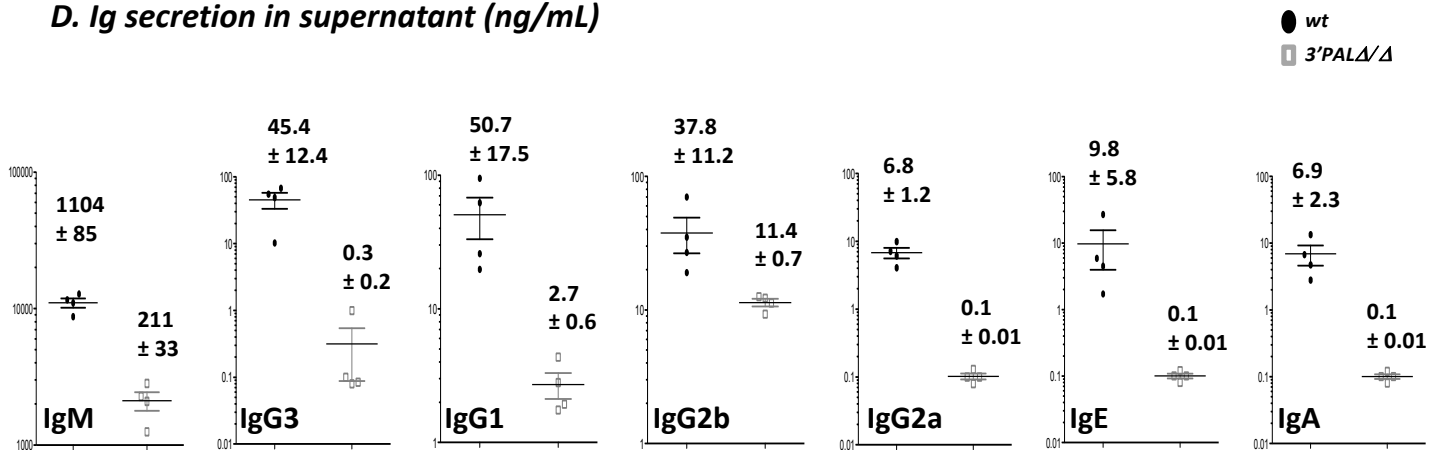


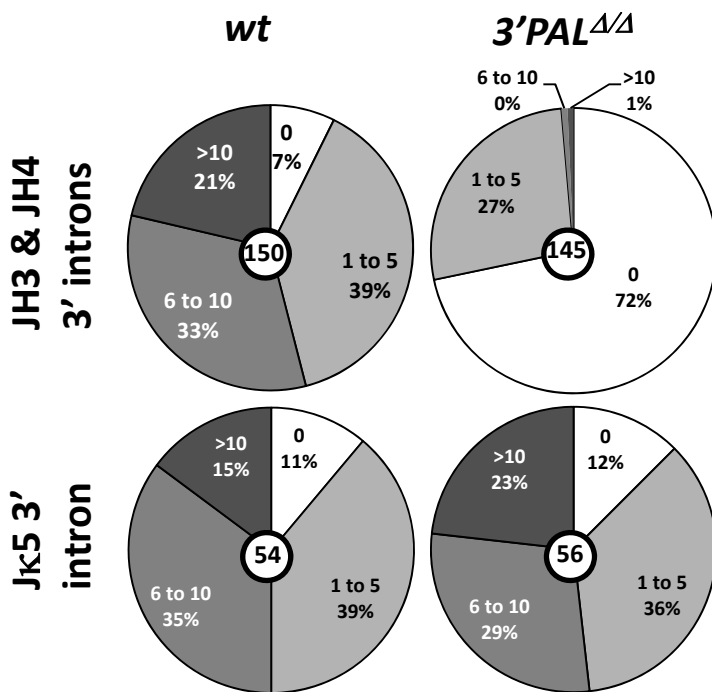
Figure 3.

Figure 4. **Impaired SHM in the absence of the 3'RR proximal module.** Germinal center B cell DNA was isolated from B220⁺ PNA^{high}/FAS^{high} Peyer's patch cells from unimmunized 8-wk-old *wt* and *3'PAL* KO mice. **(A)** Number of mutations versus total length of DNA sequence analyzed, and mutation frequency. Only sequences that contained at least one mutation were included, and clonally related sequences were excluded. **(B)** Pie plots showing the percentage of total number of clones for each percentage group (proportional to the area in each slice). Total number of clones analyzed for each genotype is noted in the center. **(C)** Relative IgH primary transcripts: RT-qPCR was performed using IgH^{wt} probe and normalized to *Cd79a* transcripts.

A. Ig genes mutation frequency

		Number of sequences	Percentage of mutated sequences	Total length analysed (bp)	Number of mutations	Mutation Frequency (mutation per bp)
JH3 & JH4 3' introns	wt	150	92,7%	79698	1025	0.0139
	3'PAL $\Delta\Delta$	145	28.3%	77559	100	0.0046
J κ 5 3' intron	wt	54	88,9%	29916	312	0.0117
	3'PAL $\Delta\Delta$	56	87.5%	31024	346	0.0127

B. Distribution of mutated sequences



C. IgH transcription

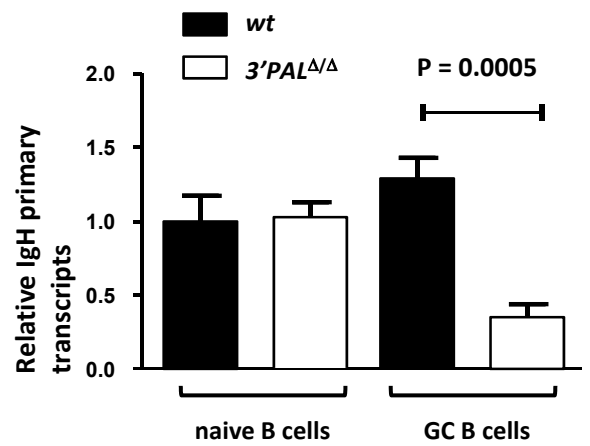
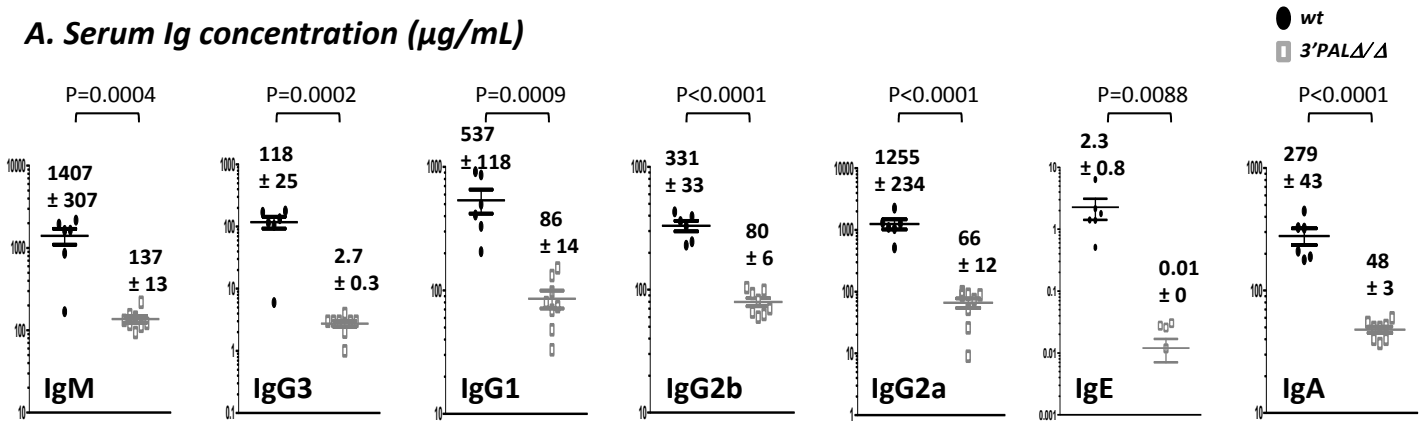


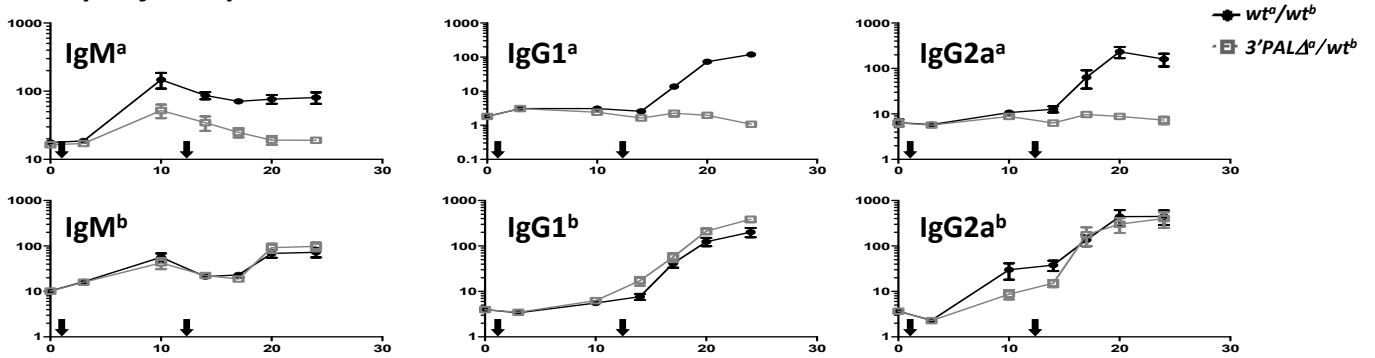
Figure 4.

Figure 5. **Proximal 3'RR module drives Ig production in plasma cells.** (A) Serum Ig isotype levels quantified by ELISA in 8 week old *wt* and *3'PAL^{Δ/Δ}* mice. Mean +/- SEM are shown and significant differences indicated with a *p* value, according to the Student T-test. (B) ELISA quantification of OVA-specific Ig isotype in serum from immunized 8 week old *wt^{a/b}* and *3'PAL^{Δa/wtb}* mice. Ab levels are indicated on the y-axis in arbitrary units by comparison with a control serum. Days post immunization are indicated on the x-axis; arrows indicate first and second antigen injections. Each point is the mean of serum quantification for five animals. Top panel: "a" allotype responses for IgM, IgG1 and IgG2a isotypes; bottom panel : "b" allotype responses for the same Ig classes. One significant experiment is shown. (C) Intracellular IgM-allotype expression in plasma cells from F1 heterozygous mouse models (*wt^{a/b}*; *3'PAL^{Δa/wtb}*, *hs3b-4^{Δa/wtb}*, and *3'RR^{Δa/wtb}*) measured by FACS analysis. After SRBC challenge, plasma cells from the spleen were gated based on surface expression of B220^{low} and CD138⁺. This specific population was assayed for intracellular expression of IgM^a or IgM^b allotypes. One representative experiment is shown. (D) Left panel: mean fluorescence of intracellular IgM^a or IgM^b allotype expression (estimated by flow cytometry as described above) in plasma cells collected from 5 animals of each genotype. Significant differences are indicated by *p* values: ***p*<0.01 according to the Mann Whitney *U*-test. Right panel: histograms report mean fluorescence IgM^a/IgM^b ratio calculated for each sample of each different genotype. (E) IgH primary and secreted-Igμ transcripts in *wt* and *3'PAL^{Δ/Δ}* B cells. Left panel: primary transcription of rearranged IgV_H regions (normalized to *Gapdh* transcripts) was quantified by RT-qPCR in CD43-negative resting B cells from *wt* and *3'PAL^{Δ/Δ}* animals. TaqMan probe used for quantification was located in the intronic region downstream from the J_H4 segment. Right panel: transcription of the secreted form of Ig μ heavy chain was quantified by RT-qPCR using a forward primer located within the C_H4 exon and a reverse primer specific for the secreted μ exon. Significant differences are indicated by *p* values: ***p*<0.01, ****p*<0.001 according to the Mann Whitney *U*-test.

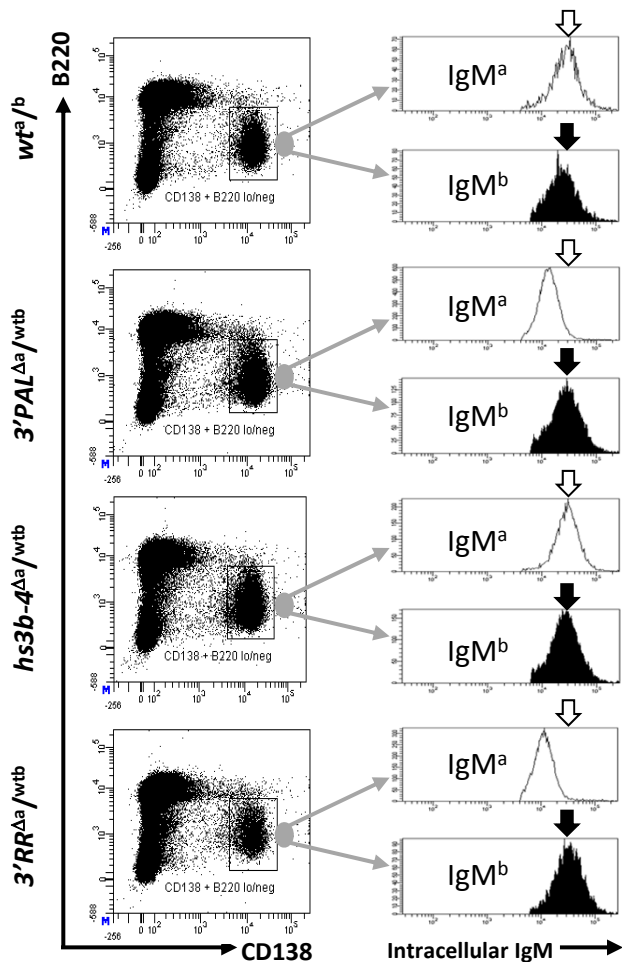
A. Serum Ig concentration ($\mu\text{g/mL}$)



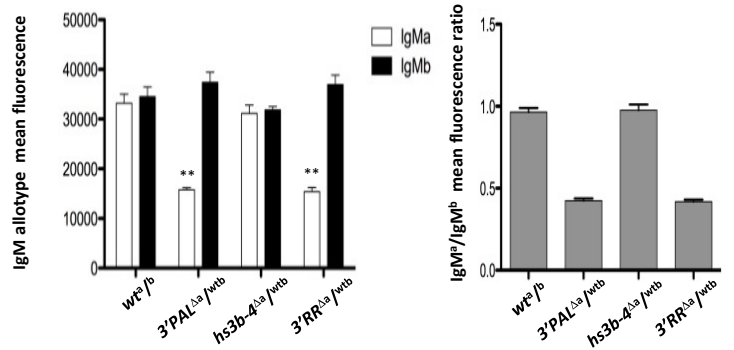
B. OVA-specific response



C. IgM allotype production in plasma cells



D. IgM-allotype balance in plasma cells



E. Ig μ chain transcription

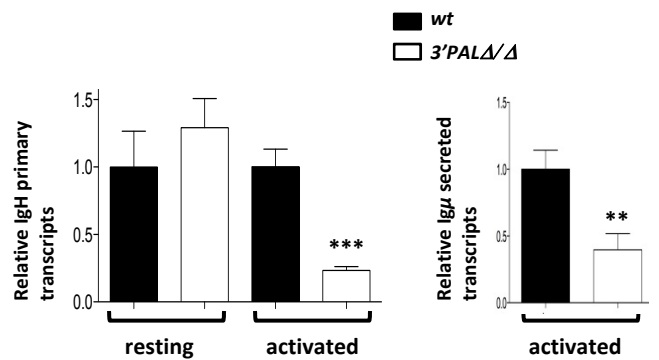


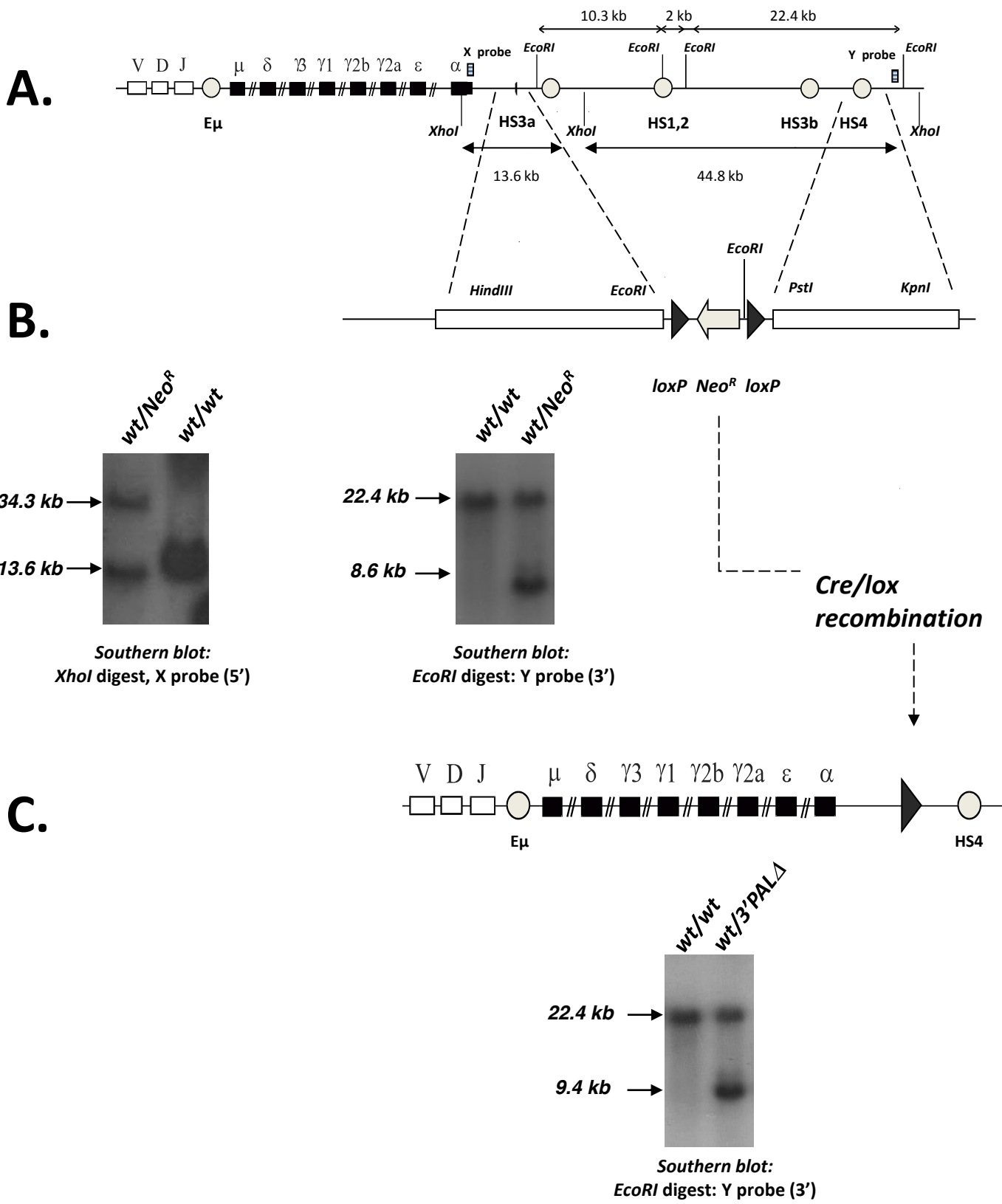
Figure 5.

Table 1. **Absolute numbers of leukocytes and B-lineage cells in bone marrow, spleen and Peyer's patches of 8 to 12-weeks old mice carrying IgH alleles of different haplotypes: wt^a/wt^b (129-C57BL/6 F1 mice), 3'PAL^{Δa}/wt^b, Hs3b-4^{Δa}/wt^b and 3'RR^{Δa}/wt^b.** Means +/- SEM are reported; number of animals is reported; within a given B cell subset expressing a- or b-allele, significance (*p* Value) is assessed by a Student t test.

Table 1

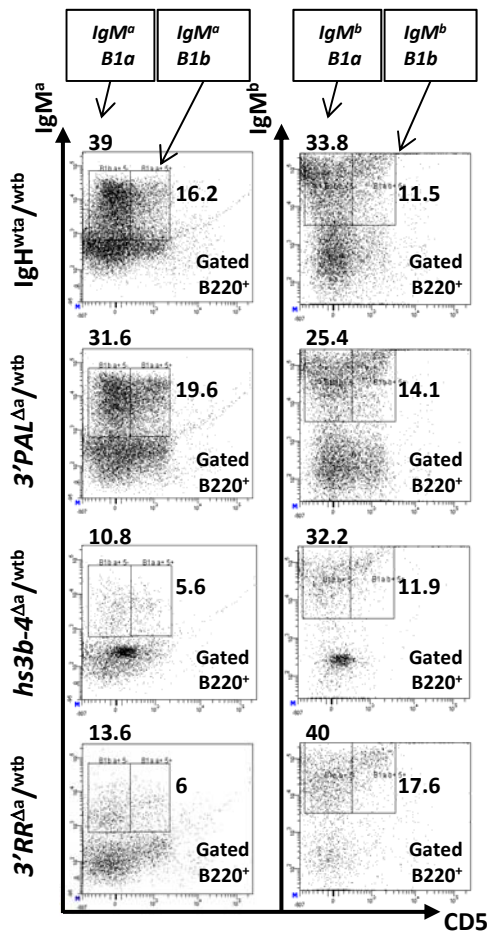
	wt^a / wt^b	IgM ^a /IgM ^b ratio	3'PAL ^{Δa} /wt ^b	IgM ^a /IgM ^b ratio	Hs3b-4 ^{Δa} /wt ^b	IgM ^a /IgM ^b ratio	3'RR ^{Δa} /wt ^b	IgM ^a /IgM ^b ratio
Bone Marrow								
Leucocytes	83.7 ± 2.5 N=11	-	79.8 ± 9.7 N=9	-	66.4 ± 6.4 N=4	-	71.1 ± 3.0 N=11	-
Total B cells (B220+)	25.7 ± 1.7 N=11	-	24.2 ± 3.7 N=9	-	17.8 ± 1.8 N=4	-	22.3 ± 0.9 N=11	-
Immature B cells IgMa (B220int IgMa+)	8.8 ± 0.2 N=7	0.93	6.2 ± 0.7 N=5	0.95	7.6 ± 0.4 N=4	0.93	9.1 ± 0.5 N=11	0.96
Immature B cells IgMb (B220int IgMb+)	9.5 ± 0.3 N=7		6.5 ± 0.8 N=5		8.2 ± 0.8 N=4		9.5 ± 0.6 N=11	
Mature B cells IgMa (B220high IgMa+)	8.3 ± 0.4 N=7	0.94	8.1 ± 0.5 N=5	0.93	4.6 ± 0.6 N=4	0.43	7.9 ± 0.5 N=11	0.57
Mature B cells IgMb (B220high IgMb+)	8.8 ± 0.4 N=7		8.7 ± 0.5 N=5		10.6 ± 1.8 N=4		13.9 ± 0.9 N=11	
Spleen								
Leucocytes	149.2 ± 13.6 N=19	-	172.3 ± 10.4 N=14	-	179.7 ± 12.6 N=9	-	156.6 ± 6.6 N=16	-
Total B cells (B220+ CD19+)	44.9 ± 4.7 N=11	-	51.3 ± 3.3 N=9	-	50.7 ± 5.2 N=4	-	54.8 ± 2.4 N=11	-
Follicular B cells IgMa (CD23high CD21low IgMa+)	18.0 ± 2.3 N=7	1.09	16.1 ± 0.8 N=5	0.89	6.1 ± 0.8 N=4	0.21	8.5 ± 0.6 N=7	0.25
Follicular B cells IgMb (CD23high CD21low IgMb+)	16.5 ± 2.2 N=7		18.1 ± 1.0 N=5		29.1 ± 2.2 N=4		34.1 ± 2.0 N=7	
Marginal zone B cells IgMa (CD23low CD21high IgMa+)	2.2 ± 0.2 N=7	1.16	1.6 ± 0.2 N=5	0.94	0.3 ± 0.04 N=4	0.05	0.3 ± 0.03 N=7	0.06
Marginal zone B cells IgMb (CD23low CD21high IgMb+)	1.9 ± 0.1 N=7		1.7 ± 0.2 N=5		5.7 ± 0.4 N=4		4.6 ± 0.3 N=7	
Transitional B cells IgMa (AA4.1+ IgMa+)	8.0 ± 0.6 N=7	1.13	5.2 ± 0.8 N=5	0.93	4.2 ± 0.5 N=4	0.44	3.4 ± 0.5 N=7	0.44
Transitional B cells IgMb (AA4.1+ IgMb+)	7.1 ± 0.6 N=7		5.6 ± 0.8 N=5		9.5 ± 1.0 N=4		7.7 ± 1.1 N=7	
Peyer's Patches								
Leucocytes	15.0 ± 1.3 N=11	-	20.6 ± 3.7 N=9	-	14.2 ± 3.3 N=4	-	11.0 ± 2.4 N=7	-
Total B cells (B220+)	9.8 ± 0.9 N=11	-	14.6 ± 2.8 N=9	-	10.9 ± 2.4 N=4	-	8.3 ± 1.9 N=7	-
B cells IgMa+	3.9 ± 0.3 N=11	1.11	5.2 ± 0.7 N=9	1.21	2.2 ± 0.5 N=4	0.30	2.0 ± 0.5 N=7	0.37
B cells IgMb+	3.5 ± 0.3 N=11		4.3 ± 0.6 N=9		7.2 ± 1.6 N=4		5.4 ± 1.3 N=7	

Supplementary figure 1. **Targeting the 3'RR proximal module in the mouse germline.** To generate the 3'PAL KO mouse model, the hs3a to hs3b region (so called 3'RR proximal module) was disrupted by insertion of a *loxP* site. (A) Map of the mouse *wt* IgH 3' regulatory region. Closed circles stand for transcriptional enhancers. B) Targeting construct and Southern blot of knockout ES cells or animals with *Neo^R* insertion. The 5' probe (X, 0.8 kb *EcoRI-HindIII* fragment) detects genomic 14.7 kb and 31 kb *XhoI* bands after homozygous recombination. The 3' probe (Y, 0.6 kb *XhoI-HindIII* fragment) detects genomic 22 kb and 8.6 kb *EcoRI* bands in the targeted locus. (C) Map of the cre-deleted targeted locus. PCR on *wt* and knock out animals DNA. On the *wt* allele, PCR amplified a 209 bp band; on the 3'PAL Δ allele, PCR amplified a 1100 bp band.

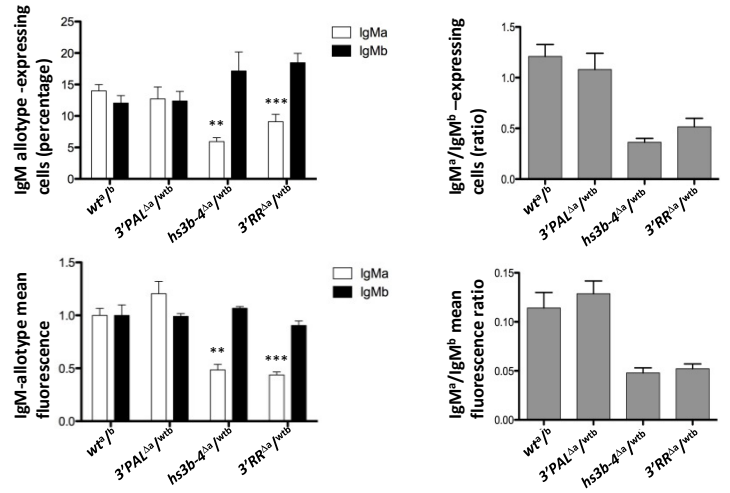


Supplementary figure 2. **Normal IgM-expressing peritoneal B cell subsets require the 3'RR distal module.** Peritoneal cavity cells from 8 to 10-week old F1 mice (expressing *a* and *b* IgH alleles of) of each genotype (wt^a/b , $3'PAL^{\Delta a}/wt^b$, $hs3b-4^{\Delta a}/wt^b$, and $3'RR^{\Delta a}/wt^b$) were stained with fluorescent antibodies and analyzed by FACS. (A) B220⁺-gated peritoneal cavity B-lineage cells, IgM^a- (left column) and IgM^b- (right column) expressing cells were separated; for each allotype, percentage of CD5⁻/IgM⁺ B1a B cells and CD5⁺/IgM⁺ B1b B cells are indicated. (B) Top left histograms represent percentage of IgM^a or IgM^b B1a B cells collected from 5 animals of each genotype, significant differences are indicated by *p* values: ***p*<0.01, ****p*<0.001 according to the Mann-Whitney *U*-test. Top right histograms report same data represented as a ratio. Bottom left histograms stand for intracellular IgM^a or IgM^b allotype expression (estimated by flow cytometry as described above) in B1a cells from same animals. Bottom right histograms report same data represented as a ratio. (C) Top left histograms display percentage of IgM^a or IgM^b expressing B1b B cells collected from 5 animals of each genotype, significant differences are indicated by *p* values: ***p*<0.01, ****p*<0.001 according to the Mann-Whitney *U*-test. Top right histograms report same data represented as a ratio. Bottom left histograms stand for intracellular IgM^a or IgM^b allotype expression (estimated by flow cytometry as described above) in B1b cells from same animals. Bottom right histograms report same data represented as a ratio.

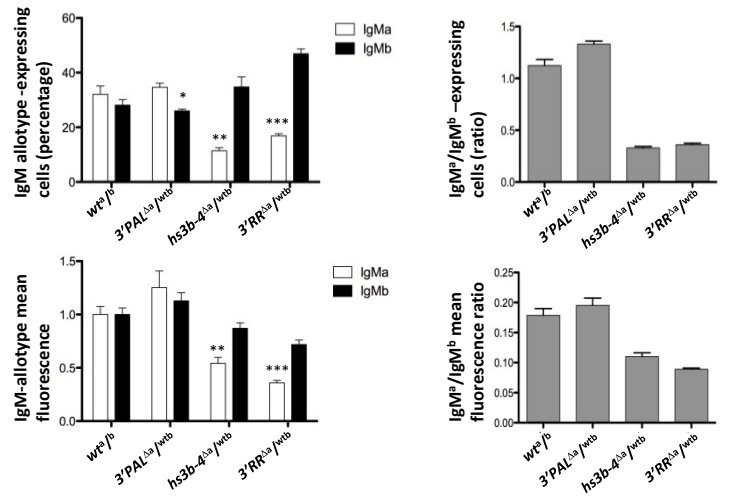
A. Peritoneal B cell subsets



B. IgM-allotype balance in B1a cells



C. IgM-allotype balance in B1b cells



Supplementary table 1. **Absolute numbers of leukocytes and B-lineage cells in bone marrow, spleen, peritoneal cavity and Peyer's patches of 8-weeks old wt and 3'PAL^{Δ/Δ} mice.** Means +/- SEM are reported; number of animals is reported; significance (*p* Value) between the two genotypes is assessed by a Student t test.

Supplementary Table 1

	<i>WT</i>	<i>3'PAL</i> ^{Δ/Δ}	pValue
Bone marrow			
Leucocytes (x10 ⁶)	71.89 ± 3.96 N=9	61.93 ± 2.96 N=11	ns
B220+ cells (x10 ⁶)	25.75 ± 1.89 N=9	21.03 ± 1.37 N=11	P = 0.0227
IgM-/B220+/CD43low cells (x10 ⁶)	11.39 ± 0.89 N=9	9.07 ± 0.26 N=11	P = 0.0111
IgM-/B220+/CD43high cells (x10 ⁶)	4.52 ± 0.72 N=9	3.48 ± 0.30 N=11	ns
B220+/CD117+ cells (x10 ⁶)	1.69 ± 0.10 N=9	1.68 ± 0.13 N=11	ns
B220+/CD117- cells (x10 ⁶)	23.45 ± 1.68 N=9	19.25 ± 1.25 N=11	P = 0.04
Spleen			
Leucocytes (x10 ⁶)	174.82 ± 16.34 N=9	138.6 ± 10.23 N=11	ns
B220+ cells (x10 ⁶)	72.22 ± 8.40 N=9	56.50 ± 4.42 N=11	ns
B220+/IgM+/IgD+ cells (x10 ⁶)	61.80 ± 8.62 N=9	45.47 ± 4.18 N=11	ns
Marginal zone B cells (x10 ⁶)	7.21 ± 0.72 N=9	9.64 ± 1.06 N=11	ns
Follicular B cells (x10 ⁶)	45.44 ± 4.72 N=16	34.935 ± 3.66 N=9	ns
Transitional B cells (x10 ⁶)	12.31 ± 0.87 N=15	11.54 ± 1.22 N=15	ns
Peritoneal Cavity			
Leucocytes (x10 ⁶)	2.85 ± 0.42 N= 9	1.91 ± 0.42 N=11	ns
B220+ cells (x10 ⁶)	1.38 ± 0.25 N=9	0.83 ± 0.24 N=11	P = 0.0448
CD5+/IgM+ cells (x10 ⁶)	0.39 ± 0.09 N=9	0.24 ± 0.07 N=11	ns
CD5-/IgM+ cells (x10 ⁶)	0.75 ± 0.18 N=9	0.48 ± 0.15 N=11	P = 0.0378
Peyer's Patches			
Leucocytes (x10 ⁶)	7.53 ± 1.10 N=6	10.67 ± 1.57 N=6	ns
B220+ cells (x10 ⁶)	4.76 ± 0.91 N=6	5.84 ± 0.96 N=6	ns
B220+ /IgA+ cells (x10 ⁶)	0.56 ± 0.11 N=6	0.88 ± 0.18 N=6	ns
B220+/IgM+ cells (x10 ⁶)	2.83 ± 0.43 N=6	3.78 ± 0.68 N=6	ns
B220+/PNA ^{low} /FAS ^{low} cells (x10 ⁶)	3.97 ± 0.30 N=8	3.56 ± 0.45 N=5	ns
B220+/PNA ^{High} /FAS ^{High} cells (x10 ⁶)	2.51 ± 0.32 N=8	1.61 ± 0.25 N=5	ns

Supplementary table 2. **Oligonucleotides and TaqMan probes used in this study**

Some oligonucleotides have been previously described in the following references: (9, 47–51)

Supplementary Table 2. Primers for real-time qRT-PCR and SHM used in this study.

	Primer/probe	Reference
Real-time qRT-PCR		
<i>Cd79a</i>	Mm00432423_m1	Applied Biosystem
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1	Applied Biosystem
<u>IgH primary transcripts</u>		
IgH ^{WT} for	5'TTCTGAGCATTGCAGACTAATCTTG3'	Tinguely et al., 2012
IgH ^{WT} rev	5'CCTAGACAGTTTATTTCCCAACTTCTC3'	Tinguely et al., 2012
IgH ^{WT} probe	5'CCCTGAGGGAGCCG3'	Tinguely et al., 2012
<u>Germline transcripts</u>		
I μ -C μ for	5'ACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTT3'	Park et al., 2009
I μ -C μ rev	5'TCTGAACCTTCAAGGATGCTCTTG3'	Park et al., 2009
I γ 3 -C γ 3 for	5'AACTACTGCTACCACCACCACCAG3'	Park et al., 2009
I γ 3 -C γ 3 rev	5'ACCAAGGGATAGACAGATGGGG3'	Park et al., 2009
I γ 1 -C γ 1 for	5'GGCCCTTCCAGATCTTTGAG3'	Park et al., 2009
I γ 1 -C γ 1 rev	5'ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCA3'	Park et al., 2009
I γ 2b -C γ 2b for	5'CCAACCAGGAAGAGTCCAGAG3'	Sellars et al., 2009
I γ 2b -C γ 2b rev	5'ACAGGGATCCAGAGTTCCAAGT3'	Sellars et al., 2009
I γ 2a -C γ 2a for	5'GCTGATGTACCTACCGAGAGA3'	Park et al., 2009
I γ 2a -C γ 2a rev	5'GCTGGGCCAGGTGCTCGAGGTT3'	Park et al., 2009
I α -C α for	5'CTACCATAGGGAAGATAGCCT3'	Park et al., 2005
I α -C α rev	5'TAATCGTGAATCAGGCAG3'	Park et al., 2005
<u>Post-recombination transcripts</u>		
I μ -C γ 3 for	5'CTCGGTGGCTTTGAAGGAAC3'	Park et al., 2009
I μ -C γ 3 rev	5'ACCAAGGGATAGACAGATGGGG3'	Park et al., 2009
I μ -C γ 1 for	5'ACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTT3'	Park et al., 2009
I μ -C γ 1 rev	5'ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCA3'	Park et al., 2009
I μ -C γ 2b for	5'ACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTT3'	Park et al., 2009
I μ -C γ 2b rev	5'CGGAGGAACCAGTTGTATC3'	Park et al., 2009
I μ -C γ 2a for	5'ACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTT3'	Park et al., 2009
I μ -C γ 2a rev	5'GCTGGGCCAGGTGCTCGAGGTT3'	Park et al., 2009
I μ -C ϵ for	5'CTCGGTGGCTTTGAAGGAAC3'	Park et al., 2009
I μ -C ϵ rev	5'AGCGATGAATGGAGTAGC3'	Park et al., 2009
I μ -C α for	5'ACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTT3'	Park et al., 2005
I μ -C α rev	5'TAATCGTGAATCAGGCAG3'	Park et al., 2005
SHM		
<u>IgH locus</u>		
V _H J558 family for	5'GCGAAGCTTARGCCTGGGRCTTCAGTGAAG3'	Perlot et al., 2005
5'MAR _{Eμ} rev	5'CAGCAACTACCCTTTTGAGACCGA3'	
<u>Igk locus</u>		
Igk for	5'GGCTGCAGSTTCAGTGGCAGTGGRTCWGGGRAC3'	Xiang et al., 2008
Igk rev	5'AGCGAATTCAACTTAGGAGACAAAAGAGAGAAC3'	Xiang et al., 2008

Résultats préliminaires

Caractérisation des éléments régulateurs des mutations somatiques

Au début de ces travaux de thèse, aucun activateur transcriptionnel IgH n'était connu pour contrôler l'hypermutation somatique. A l'aide d'animaux modèles KO de notre laboratoire, le groupe thématique « Eléments régulateurs de la transcription et des recombinaisons des gènes d'Ig » (animé par Yves Denizot et Eric Pinaud) a récemment découvert *in vivo* l'implication de deux régions régulatrices IgH dans le phénomène d'hypermutation des cellules B du centre germinatif:

1- d'une part la région 3'RR qui module l'hypermutation somatique par l'action conjointe de transcription active de la région cible (segment VDJ réarrangé) et du recrutement de la déaminase AID : cette étude a fait l'objet d'une publication en 2013 (Rouaud et al., 2013). Nous avons poursuivi ces travaux sur un modèle KO complémentaire (nommé 3'PAL KO, supprimant les 3 premiers éléments de la 3'RR : hs3a ; hs1-2 ; hs3b) qui indique que l'essentiel de cette activité est porté par le module proximal « quasi-palindromique » de la région 3'RR, cette étude a été soumise pour publication (partie Résultats [**Article 2**] « *Sequential activation and Distinct functions for Distal and Proximal modules within the IgH 3'RR region* »).

2- d'autre part la région intronique E μ et en particulier les régions d'attachement à la matrice nucléaire MAR_{S μ} influencent les mutations somatiques par un mécanisme indépendant de la transcription. Ces travaux sont présentés ci-dessous sous la forme de deux études (la première quasi-aboutie et la seconde plus préliminaire), auxquelles j'ai significativement contribué:

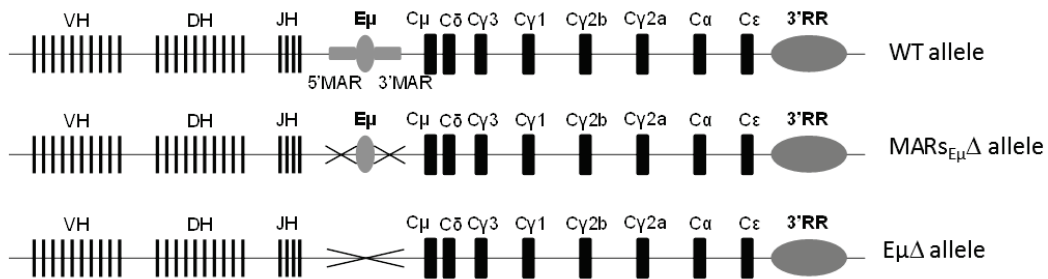
Etude 1 : Contrôle des mutations somatiques des gènes d'Ig par les régions MAR_{S μ}

Notre laboratoire a précédemment réalisé deux modèles de souris KO complémentaires de la totalité de la région E μ (E μ full length KO, Marquet et al., 2014) (partie Résultats [**Article 1**]) et de seulement les régions MARs flanquant le cE μ (MAR_{S μ} KO) (**Figure 1 A**). Contrairement aux délétions incluant le cE μ , la suppression des seules MARs flanquantes ne compromet pas le développement B : chez les mutants, les sous-populations B médullaires et périphériques sont normales, la CSR et les réponses anticorps ne sont pas affectées. L'étude de la SHM chez ces animaux a cependant révélé des résultats très intéressants (non publiés à ce jour).

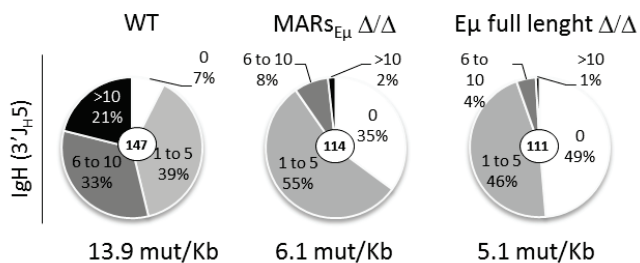
Résultats

En effet, dans les cellules B du GC issues d'animaux $E\mu$ full length KO et $MAR_{S_{E\mu}}$ KO, la fréquence des mutations somatiques au locus IgH (évaluée dans des régions non codantes du locus, situées dans les introns en aval de segments J_H réarrangés, qui ne sont pas soumises à une sélection par l'antigène) est diminuée d'environ deux fois : respectivement 6,1 et 5,1 mutations pour 1000pb pour les modèles $E\mu$ full length KO et $MAR_{S_{E\mu}}$ KO contre 13,9% chez les animaux contrôles (**Figure 1 B**). En outre, et contrairement à la suppression de la région 3'RR (Rouaud et al. JEM 2012), la transcription primaire du locus n'est pas affectée par la suppression des $MAR_{S_{E\mu}}$ (**Figure 1 C**). Ces observations indiquent, pour la première fois que des régions régulatrices du locus IgH modulent l'hypermutation somatique par un mécanisme indépendant de la transcription. En découplant la SHM de la transcription, le modèle $MAR_{S_{E\mu}}$ KO constitue un excellent modèle pour l'étude du recrutement de la machinerie de SHM et de AID.

A. IgH alleles in the study



B. SHM at IgH locus



C. IgH transcription and expression

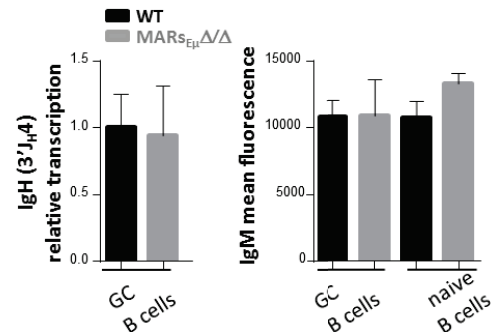


Figure 1.

(A) IgH alleles used in this study: IgH locus maps describing wt allele and endogenous deletions in the mouse germline of either full-length $E\mu$ region ($E\mu\Delta$ allele, Marquet et al. Jimmunol 2012) or $MAR_{S_{E\mu}}$ regions ($MAR_{S_{E\mu}}\Delta$ allele, this study)

(B) Decreased somatic hypermutation at the IgH locus of both $E\mu$ and $MAR_{S_{E\mu}}$ -deficient GC B cells: pie plots showed percentage (proportional to the area in each slice) of clones displaying 0 ; 1 to 5 ; 6 to 10 and more than 10 mutations within introns downstream from JH3- or JH4-rearranged segments; total number of independent analyzed clones is marked in the center. For each case, mutation frequency is shown below the pie plot (unmutated clones excluded).

(C) Normal IgH transcription and expression in naive and GC B cells of WT and $MAR_{S_{E\mu}}\Delta/\Delta$ mice. Left panel: for both genotypes, RT-qPCR was performed on total RNA extracted from GC B cell using IgH^{wt} TaqMan probe detecting igH primary transcripts and normalized to CD79a transcripts. Right Panel: intracellular IgM mean fluorescence, estimated by flow cytometry, in naive and GC B cells of each genotype.

La recherche des mutations au locus des chaînes légères (Kappa, majoritairement exprimé chez la souris) dans les modèles dépourvus des régions $MAR_{S_{E\mu}}$ ont révélé une action

Résultats

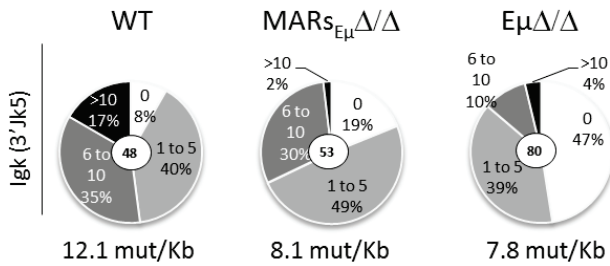
insoupçonnée de ces régions régulatrices. En effet, la fréquence de SHM se trouve également significativement diminuée par la suppression des MARs_{E μ} : 8,1 et 7,8‰ chez les mutants contre 12,1‰ chez les animaux contrôles (**Figure 2 A**). Comme pour le locus IgH, le mécanisme semble indépendant de la transcription (**Figure 2 B**). Ces observations surprenantes suggèrent que les MARs_{E μ} , localisées au locus IgH, sont capables de moduler « en *trans* » (sur les loci des chaînes légères Kappa) le mécanisme de SHM.

Dans le but de confirmer cette hypothèse, nous avons poursuivi notre étude dans un modèle de souris hétérozygotes porteuses d'allèles IgH d'haplotypes différents « a » et « b » (l'allèle IgH wt « b » provient du fond génétique C57Bl/6 et l'allèle IgH déficient pour la région MARs_{E μ} « a » provient du fond génétique 129 correspondant à la lignée ES d'origine « E14 »). Ce modèle permet, par des polymorphismes génétiques connus (variations de bases en fonction des allèles « a » ou « b ») d'identifier l'allèle IgH impliqué et d'y quantifier les mutations somatiques. Dans ce modèle, la délétion d'une seule région MARs_{E μ} suffit à diminuer la SHM aux deux loci IgH : 8,6 et 7,8‰ pour chaque allèle IgH chez animaux mutants hétérozygotes contre 11,9 et 10,6‰ chez les animaux contrôles (**Figure 2 C**). L'effet prédominant aux loci IgH, dans les mutants hétérozygotes, est la diminution (d'environ deux fois) du nombre de séquences fortement mutées (présentant plus de 6 mutations, portions grises et noires (**Figure 2 C**). Dans ce contexte hétérozygote, la suppression d'une seule région MARs_{E μ} réduit également les mutations aux loci des chaînes légères kappa : 6,2‰ contre 12,4‰ chez les animaux contrôles (**Figure 2 D**).

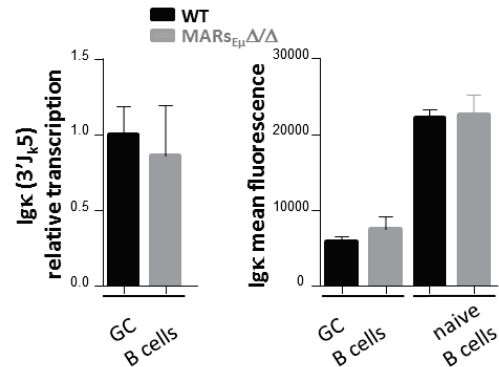
L'étude des modèles hétérozygotes valide l'hypothèse des effets *cis et trans* activateurs des régions (**Figure 2 C**) sur l'hypermutation somatique.

Résultats

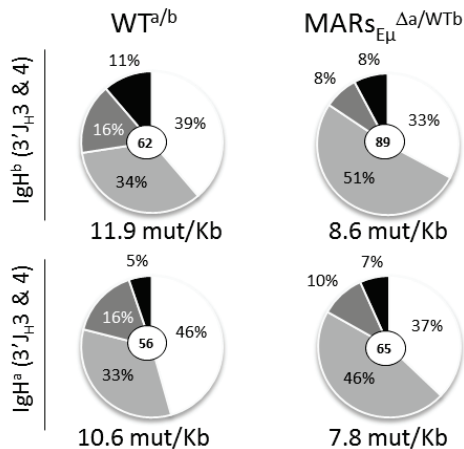
A. SHM at Igκ locus



B. Igκ transcription and expression



C. SHM at IgH MAR_{Eμ}Δ^a and WT^b alleles



D. SHM at Igκ in MAR_{Eμ}Δ^a/WT^b model

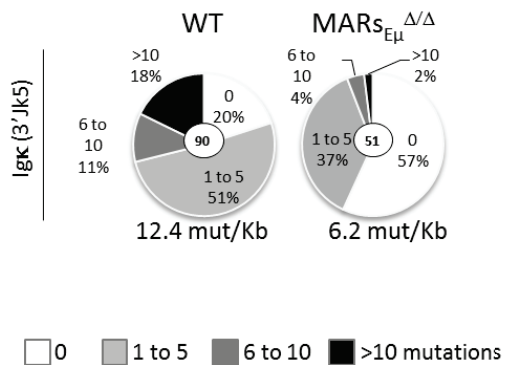


Figure 2.

(A) Decreased somatic hypermutation at the Ig kappa locus of MAR_{Eμ}-deficient GC B cells: pie plots showed percentage (proportional to the area in each slice) of clones displaying 0 ; 1 to 5 ; 6 to 10 and more than 10 mutations within introns downstream from Jk5-rearranged segments; number of independent analyzed clones is marked in the center. For each case, mutation frequency is shown below the pie plot (unmutated clones excluded).

(B) Normal Igκ transcription and expression in naive and GC B cells of WT and MARs_{Eμ}Δ/Δ mice. Left panel: for both genotypes, RT-qPCR was performed on total RNA extracted from GC B cell using a TaqMan probe detecting Igκ primary transcripts and normalized to CD79a transcripts. Right Panel: intracellular Igκ mean fluorescence, estimated by flow cytometry, in naive and GC B cells of each genotype.

(C) Decreased somatic hypermutation at IgH loci in heterozygous MAR_{Eμ}-deficient GC B cells: pie plots showing distribution of mutated independent clones from IgH alleles carrying a (MAR_{Eμ}Δ) and b (WT) haplotypes, number of independent clones is marked in the center. For each case, mutation frequency is shown below the pie plot (unmutated clones excluded).

(D) Decreased somatic hypermutation at Igκ loci in heterozygous MAR_{Eμ}-deficient GC B cells: pie plots showing distribution of mutated independent clones from Igκ alleles; number of independent clones is marked in the center. For each case, mutation frequency is shown below the pie plot (unmutated clones excluded).

Nos hypothèses sur le mode d'action des régions MARs_{Eμ} sont les suivantes :

1- les régions MARs_{Eμ} pourraient «recruter» AID et la machinerie de mutation aux régions cibles des gènes d'Ig (VDJ des chaînes lourdes et VJ des chaînes légères). Dans ce cas AID est recruté sur les gènes d'Ig par le biais des régions MARs.

Résultats

2- et/ou les régions **MAR_{E μ}** pourraient « adresser » les régions cibles des gènes d'Ig vers une région du noyau où se trouve la forme active de l'enzyme AID, cette région étant proche des oncogènes ciblés par AID (comme le suggère l'équipe de Jane Skok à New York). Dans ce second cas la forme active de AID est « ancrée » dans un domaine défini du noyau, les MAR_{E μ} permettraient la relocalisation des gènes d'Ig à cette région active.

La vérification de ces hypothèses passe par l'étude du positionnement des allèles IgH et Ig κ à l'aide de marquages FISH dans des noyaux d'architecture conservée (FISH-3D). Cette étude est réalisée hors du cadre de ma thèse. Dans son ensemble, cette étude fait l'objet d'un manuscrit en préparation auquel je contribue comme co-auteur intitulé : « *IgH E μ -Scaffold/Matrix Attachment Regions Spatially Control Ig genes Somatic mutations in a transcription-independent manner* » (Auteurs : Sandrine Le Noir*, Marie Marquet*, Armand Garot et al.,)

Grâce à nos modèles animaux, nous observons pour la première fois un effet « *trans-régulateur* » pour le mécanisme de SHM. Cette découverte amène au postulat suivant : les régions régulatrices MAR_{E μ} sont des candidats « recruteurs inter-chromosomiques de AID » qui pourraient induire des « dommages collatéraux » tels que des mutations sur les cibles « AID off-target » ou des cassures dans des partenaires de translocations.

Cette hypothèse a conduit à débiter l'étude « Implication des éléments régulateurs IgH (E μ et 3'RR) sur les « dommages collatéraux » infligés aux oncogènes du lignage B » développée dans la partie suivante.

Etude 2 : Implication des éléments régulateurs IgH (E μ et 3'RR) sur les « dommages collatéraux » infligés aux oncogènes du lignage B

Nous avons récemment mis en évidence que les mutations des régions MAR_{S μ} affectent la SHM par un mécanisme indépendant de la transcription (*Le Noir, Marquet, Garot et al. en préparation*). De façon surprenante, nous observons dans notre modèle « MAR_{S μ} KO » une forte diminution des mutations somatiques « en *cis* » (au locus IgH) et également « en *trans* » au locus des chaînes légères Ig κ . Nous proposons que le processus d'hypermutation somatique des loci des gènes d'Ig soit régulé « spatialement » par les MARs, ce mode de régulation a déjà été proposé dans le lignage B lors des réarrangements V(D)J (Hewitt et al., 2008, 2009) ou après activation de la CSR (Rocha et al., 2012). Selon notre hypothèse, les MAR_{S μ} participeraient à « l'adressage » (*-trans*) des loci d'Ig à des régions du noyau où s'opèrent les mutations somatiques. Cette hypothèse est compatible avec une fonction de « recrutement » (*-cis*), par les régions MAR_{S μ} , des acteurs de l'hypermutation somatique; selon cette hypothèse, le complexe de SHM une fois recruté est potentialisé par une forte augmentation de la transcription causée par la région régulatrice 3'.

L'investigation du rôle « mutagène » des régions MARs des loci d'Ig passe également par la validation de nos hypothèses « adressage » et « recrutement », avec des cibles autres que les loci des gènes d'Ig. L'hypothèse « adressage » est en cours d'étude par une méthode de FISH-3D. Dans l'étude à laquelle j'ai contribué dans le cadre de ma thèse, nous proposons de vérifier, au moins en partie, l'hypothèse « recrutement » en quantifiant les mutations somatiques des gènes « AID off-targets ».

En effet, les mutations somatiques induites par AID dans les cellules B du centre germinatif affectent, en marge des gènes d'Ig qui sont leurs cibles physiologiques, un nombre important de gènes transcrits à ce stade donné. Ces gènes « AID off-targets » sont fréquemment mutés dans les cellules B tumorales, les plus ciblés par ce processus sont *Bcl6*, *Cd83*, *Pim1*, *Btg1*, *Blk*, *Cd79b*, *Syk*, *Pax5*, *OcaB*, *Ung*, *Myc*, etc. (Liu et al., 2008; Pasqualucci et al., 2001). L'équipe de Schatz a décrit trois groupes parmi ces gènes cibles : les gènes déaminés par AID puis réparés de façon infidèle (groupe 1, il comprend les gènes *d'Ig*, *Bcl6* et *Cd83*), les gènes déaminés et réparés de façon fidèle (groupe 2, il comprend entre autres *Pax5*, *OcaB*, *c-Myc*...), les gènes très rarement ciblés par AID (groupe 3).

Nous avons analysé et comparé la fréquence de mutation (en *trans*) des cibles « off targets » du groupe 1 que sont les gènes *Bcl6* et *Cd83* dans les cellules B du centre germinatif isolés de plaques de Peyer de souris « MAR_{S μ} KO ». Lorsqu'ils sont déaminés par AID, la réparation de ces gènes fait intervenir des polymérases infidèles qui conduit à des mutations somatiques survenant avec une fréquence 10 fois inférieure à celle des gènes d'Ig (de l'ordre de 1%). Ces mutations s'accumulent et peuvent être observées dans un contexte wt, dans des cellules B du GC (ce qui n'est pas le cas pour les gènes du groupe 2 qui nécessitent, pour être

Résultats

accumulées, un fond génétique déficient pour les voies de réparation BER et MMR, obtenu par croisement avec des modèles animaux KO pour les gènes *Msh2* et *Ung* (Liu et al., 2008).

1- Nous avons, dans un premier temps, réalisé une étude préliminaire par clonage et séquençage, par la méthode de Sanger, des régions cibles (environ 1000 pb en aval des promoteurs des gènes *Bcl6* et *Cd83*), le mode opératoire nous a été communiqué par le Dr. David Schatz (Liu et al., 2008). En parallèle, la transcription primaire de *Bcl6* et *Cd83* a été évaluée par RT-QPCR.

Après tri cellulaire des cellules B des GC issus d'animaux wt et homozygotes $MAR_{SE\mu} \Delta/\Delta$ et extraction d'ADN génomique, nous avons amplifié, cloné et séquençé, par la méthode classique de Sanger, les gènes *Bcl6* and *Cd83*. La fréquence des mutations de chacun de ces gènes montre une nette diminution en l'absence des régions $MAR_{SE\mu}$. Les mutations cumulées dans *Bcl6* sont diminuées de 2 fois chez les animaux $MAR_{SE\mu}$ -KO : 21,7 contre 36 mutations pour 10^5 bp pour le contrôle (Figure 3). Pour le gène *CD83*, le cumul de mutations est diminué de 3,5 fois chez le mutant: 6,4 contre 16,9 mutations pour 10^5 bp chez le contrôle (Figure 3).

Genes	Genotype	Total length (pb)	Number of mutations	Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)
<i>Bcl6</i>	WT	133188	48	36.0
	$MAR_{SE\mu}$	64575	14	21.7
	WT (Liu et al. 2008)	235290	204	86.0
<i>Cd83</i>	WT	272412	46	16.9
	$MAR_{SE\mu}$	156745	10	6.4
	WT (Liu et al. 2008)	257431	113	41.0

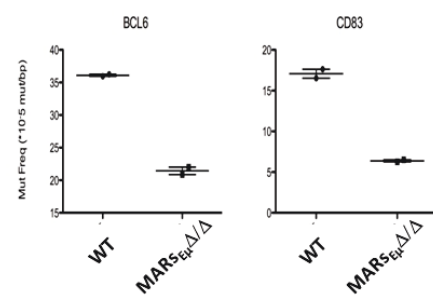


Figure 3. Decreased SHM in *Bcl6* and *Cd83* off target genes: data obtained from cloning and sequencing by Sanger method

Table specified, for both genes and genotypes, length, mutations and frequency in two pools of GC B cells sorted from Peyer's patches of 3 to 6 month-old mice. Data from the littérature (Liu et al. 2008) are reported for each gene.

Frequencies for each gene are reported in plots on the right side.

Bien que la longueur totale analysée soit d'ordre comparable, nous constatons que, pour chacun des deux gènes étudiés, les fréquences de mutations que nous avons obtenues chez les animaux WT sont systématiquement inférieures à celles précédemment publiées par l'équipe de Schatz. Il se peut que cette étude préliminaire sous-estime la fréquence réelle des mutations de ces gènes. Une telle variation pourrait être interprétée par la nature de l'échantillon (2 pools de cellules B triées dans le cas de notre étude contre 3 à 5 pour l'étude de Schatz) et par l'âge des animaux utilisés pour l'étude (de 3 à 6 mois dans notre étude préliminaire contre 4 à 6 pour l'étude de Schatz).

La fréquence de mutation de ces gènes se trouvant réduite chez les animaux $MAR_{SE\mu} \Delta/\Delta$, il s'avérait indispensable d'entreprendre une étude à plus grande échelle afin de confirmer ces résultats.

Résultats

2- Dans un second temps, nous avons donc procédé au séquençage de ces mêmes cibles par une méthode haut débit, dans le but de vérifier nos données préliminaires sur un échantillon représentatif d'un nombre d'allèles de chacun de ces deux gènes constitué de 5 pools de cellules B du GC triées à partir de plaques de Peyer d'animaux d'âge croissant.

Afin de discriminer les substitutions induites par AID (considérées comme de « vraies mutations ») des éventuelles mutations indépendantes de la déaminase (causées par des « erreurs de lecture » liées à la méthode haut débit), nous avons également séquençé les gènes *Bcl6* et *Cd83* dans un échantillon obtenu à partir d'animaux déficients pour AID.

Nous constatons, chez les animaux des deux génotypes, une accumulation progressive des mutations somatiques dans chacun des deux gènes *Bcl6* et *Cd83*. Les fréquences de mutation obtenues chez les animaux wt âgés de 6 mois sont comparables à celles obtenues par l'équipe de Schatz (Liu et al., 2008).

Chez les animaux âgés de 6 mois, la fréquence de mutation de chacune des deux cibles « off-targets » est diminuée : dans le cas de *Bcl6* la fréquence des mutations ne dépasse pas $42 \cdot 10^{-5}$ mutations par pb contre plus de $75 \cdot 10^{-5}$ chez le contrôle wt ; dans le cas *Cd83* la fréquence des mutations se situe aux environs de $20 \cdot 10^{-5}$ mutations par pb contre près de $35 \cdot 10^{-5}$ chez le contrôle wt (Figure 4).

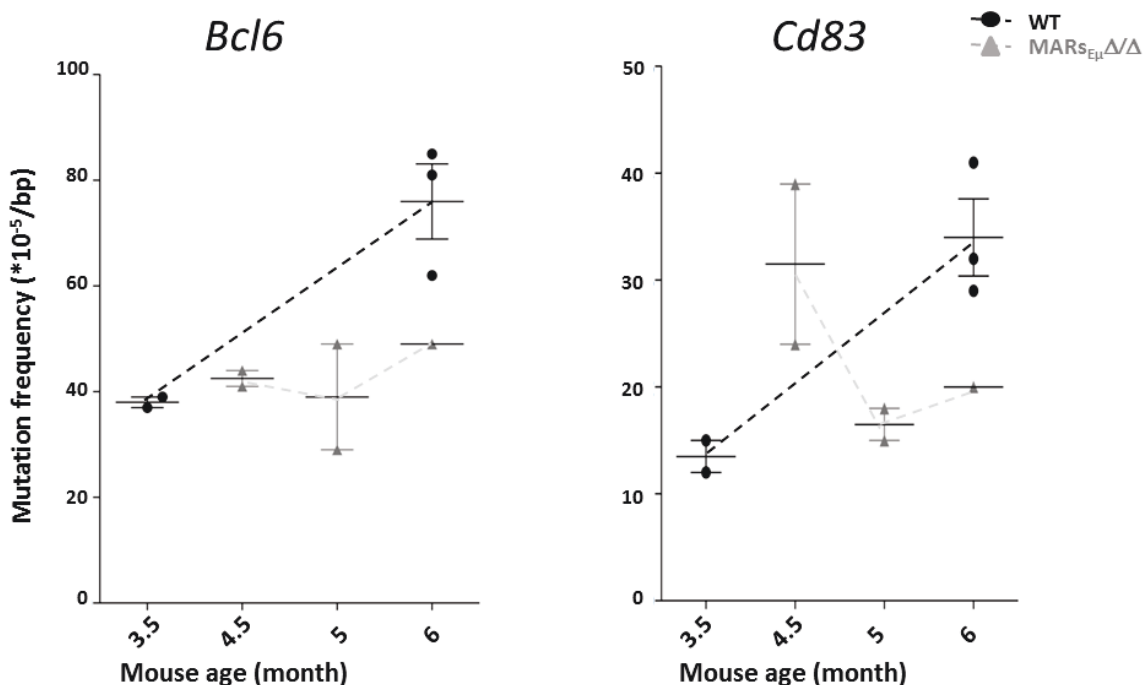


Figure 4. Decreased SHM in *Bcl6* and *Cd83* off target genes obtained by high throughput sequencing (IonTorrent®)

Mutation frequency (median) in five pools of GC B cells sorted from Peyer's patches of 3.5 to 6 month-old mice.

Résultats

Bien que les mécanismes impliqués dans l'adressage de AID vers ses cibles (légitimes ou illégitimes) ne soit à l'heure actuelle pas connus, nos résultats suggèrent que les régions régulatrices du locus IgH MAR_{SEμ} participent à la régulation du processus de SHM initié par AID. De façon concordante aux résultats obtenus pour la SHM des gènes d'Ig, nous montrons que l'absence des régions MAR_{SEμ} diminue la mutation des gènes off target *Bcl6* et *Cd83*. Ces études confirment le rôle *trans*-activateur des régions MAR_{SEμ} sur le processus de SHM. Simultanément aux études des mutations, notre équipe a mis en évidence, par méthode de FISH-3D, une perte de l'organisation nucléaire concernant les gènes cibles de AID (Le Noir, Martin et al. *données non publiées*). Pour l'instant aucune des deux hypothèses « recrutement » et « adressage » des gènes cibles de AID par les régions MAR_{SEμ} n'est exclue. L'étude de l'hypothèse « adressage » se poursuit à l'aide de méthodes d'imageries du noyau (FISH-3D, distances et localisation dans l'espace nucléaire). Il apparaît également indispensable d'évaluer par une autre méthode l'hypothèse « recrutement », par exemple par immunoprécipitation de la chromatine à l'aide d'un anticorps dirigé contre AID. Nous envisageons également de poursuivre les études de séquençage sur les mêmes cibles dans de nouveaux échantillons issus de souris âgées d'au moins 6 mois. Il serait également possible de rechercher l'influence des régions MAR_{SEμ} sur d'autres gènes «AID off-targets» (du groupe 2, pour exemple *c-Myc*, *Pim1*, *Pax5*, etc.) ; cependant une telle étude nécessite de placer la mutation MAR_{SEμ} Δ/Δ dans un fond génétique déficient pour les UNG et MSH2.

Discussion & Perspectives

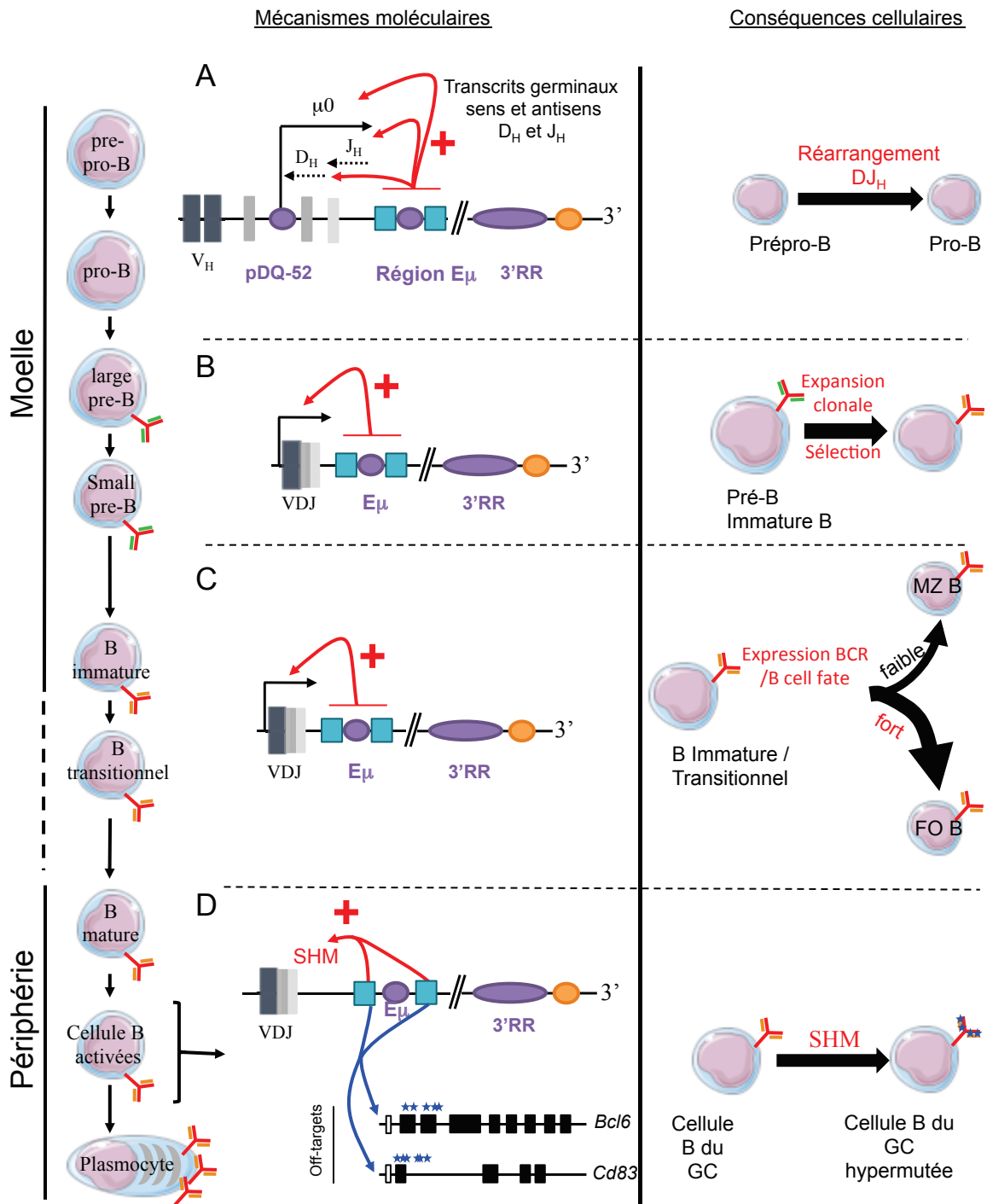


Figure 46. Implication de la région E_μ lors du développement B

Discussion & Perspectives

La compréhension du système immunitaire nécessite que l'on s'intéresse aux régulations moléculaires mises en place tout au long du développement B et aux interactions cellulaires qui coordonnent son action. Pris dans sa globalité, le système immunitaire peut être considéré comme un organe à part entière. Sa dispersion au sein de l'organisme, sa dynamique et sa stricte régulation rendent son étude complexe. Le locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines, de par les remaniements géniques qu'il subit au cours du développement B (recombinaisons et mutations), constitue un modèle pour de la régulation des gènes complexes.

Notre laboratoire a contribué, par la réalisation de nombreux modèles murins, à l'étude des fonctions des éléments régulateurs du locus de chaîne lourde. Mes travaux de thèse ont contribué à l'étude de plusieurs nouveaux modèles : (1) Le modèle de délétion de la totalité de la région $E\mu$ « $E\mu$ KO » nous a permis de décrire une nouvelle fonction de l'activateur $E\mu$ comme modulateur du Pré-BCR et du BCR ; (2) Le modèle $MARs_{E\mu}$ KO qui a dévoilé des fonctions surprenantes de ces régions comme régulant le processus de SHM aux gènes d'Ig mais également aux gènes « off-targets » ; (3) Le modèle « 3'PAL KO », supprimant la région quasi-palindromique 3'IgH, précise des fonctions distinctes pour deux modules de la 3'RR.

1- Implication de la région $E\mu$ lors du développement B

Depuis de nombreuses années la région $E\mu$ fait l'objet de très nombreuses études. Très rapidement les données sur l'activateur intronique ont mis en évidence son rôle lors de l'ontogénie B précoce notamment lors des réarrangements VDJ. Les expériences de gènes rapporteurs ont également démontré que parmi l'ensemble des éléments régulateurs connus et étudiés au locus IgH, $E\mu$ est celui dont l'activité est la plus forte (Chauveau et al., 1998). Initialement, il a été proposé que l'enhancer contrôlait les réarrangements de V_H vers DJ_H (Serwe and Sablitzky, 1993; Sakai et al., 1999). Des modèles d'étude plus récentes montrent que $E\mu$ régule essentiellement l'étape de réarrangement de D_H vers J_H (Perlot et al., 2005; Afshar et al., 2006) en modulant l'accessibilité de ces régions par le biais de la transcription germinale. En effet, $E\mu$ (plus précisément $cE\mu$) favorise la transcription germinale « sens » ($\mu 0$) initiée au promoteur pDQ52 (Lennon and Perry, 1985; Alessandrini and Desiderio, 1991) et « antisens » traversant la région incluant les segments J_H (Bolland et al., 2007; Perlot et al., 2008) puis D_H (Bolland et al., 2007; Chakraborty et al., 2007) situées en amont de l'enhancer. Ces modèles pour l'étude de $E\mu$ ont récemment montré que cette région ne modulait pas l'accessibilité des régions V_H et la transcription germinale qui l'accompagne (Bolland et al., 2007; Perlot et al., 2008; Medvedovic et al., 2013) (**Figure 46A**)

Les études des modèles animaux de délétion des activateurs potentiels en amont et en aval des segments V_H (sites hs en 5' du locus et région intergénique V_H - D_H) n'ont pour

l'instant révélé aucun élément régulateur de l'accessibilité des régions V_H (Perlot et al., 2010; Giallourakis et al., 2010).

Les modèles KO de E_μ établissant une souche d'animaux modèles ont permis, malgré un blocage important des recombinaisons VDJ, l'étude de cet élément régulateur aux divers stades du développement B (Perlot et al., 2005; Marquet et al., 2014), ce dernier n'étant pas aboli. En effet, chez nos animaux E_μ KO, le nombre de cellules pro-B est très augmenté aux dépens du nombre de cellule pré-B. Le même constat peut être observé dans deux modèles voisins (Perlot et al., 2005; Peng and Eckhardt, 2013). L'accumulation du nombre de cellules au stade pro-B peut facilement s'expliquer par le retard lors des recombinaisons D_H vers J_H engendré par l'absence de E_μ . Cependant, cette accumulation de cellules pro-B ne peut à elle seule justifier la diminution drastique du nombre de cellules pré-B. En effet, la transition du stade pro-B à pré-B, conditionnée par un réarrangement VDJ_H productif qui autorise l'expression d'une chaîne lourde μ fonctionnelle à la surface de la cellule sous la forme d'un pré-BCR, n'est pour autant pas abrogée dans notre modèle E_μ KO. Le passage de pro-B à pré-B est un point de contrôle crucial lors de l'ontogénie B sous la dépendance des signaux du pré-BCR. Ces signaux du pré-BCR sont nécessaires au passage du stade large pré-B à small-B caractérisé par une expansion clonale (augmentant considérablement la taille de ce compartiment) suivie d'une différenciation. L'analyse de l'expression du pré-BCR dans notre modèle E_μ KO indique clairement une diminution de l'expression de la chaîne μ à la membrane des cellules pré-B et B transitionnels. En revanche, aux stades plus matures, le niveau d'expression de la chaîne lourde, et par conséquent d'IgM membranaire, n'est pas affecté par l'absence de E_μ . Au-delà de son rôle maintes fois démontré au cours des réarrangements VDJ, nos résultats confirment donc un rôle important pour E_μ aux stades précoces pour l'expression de la chaîne lourde et par conséquent de l'expression du récepteur de surface qui en découle : le pré-BCR (**Figure 46B**). La conséquence logique d'une telle diminution d'expression du pré-BCR à la surface des cellules est une diminution des signaux intracellulaires (pré-BCR signalling) qui en découlent. A ce stade, une diminution de ce signal explique un défaut d'expansion qui limite considérablement la taille du compartiment pré-B (**Figure 46B**). La diminution du nombre de cellules pré-B peut être lié à deux phénomènes conjoints : (1) un retard lors des réarrangements VDJ et (2) une incapacité à remplir le compartiment pré-B par un défaut d'expansion.

Bien que fortement ralenti, le compartiment B médullaire autorise la génération d'un nombre suffisant de cellules B capables de coloniser les compartiments périphériques pour permettre leur étude. Nous avons observé un déséquilibre très important dans la colonisation des compartiments B de la rate lié à une forte diminution du nombre de cellules B folliculaires (alors que le compartiment des cellules B de la zone marginale est normal). Ce déséquilibre, à l'avantage du compartiment B MZ peut être expliqué par la diminution de l'expression du BCR au stade transitionnel. En effet, le « choix » de différenciation vers les sous population FO ou MZ est conditionné par la « force » du signal du BCR au stade B transitionnel (Pillai and Cariappa, 2009). Ainsi, un signal BCR faible engage la cellule B vers le compartiment MZ alors qu'un signal fort favorise le phénotype FO. Dans notre modèle E_μ KO, la diminution de l'expression de la chaîne lourde μ , effective au stade transitionnel,

limite le niveau d'expression du BCR et par conséquent son signal, limitant la différenciation vers le compartiment FO (**Figure 46C**).

Les études précédentes proposaient l'implication de $E\mu$ lors des réarrangements de V_H vers DJ_H (Sakai 1999), nous avons étudié le répertoire des pré-immun de chaîne lourde (évaluant, par PCR sur l'ADN des cellules pré-B, la proportion respective d'utilisation des diverses familles de segments V_H) dans notre modèle mutant. Les données ne montrent pas de défaut d'utilisation des segments V_H par comparaison aux animaux wt ; indiquant clairement que $E\mu$ n'est pas impliqué dans la diversification du répertoire de la chaîne lourde et ne participe donc pas au « choix » des familles de segments V_H lors de l'étape ultime de recombinaison de V_H vers DJ_H .

Compte tenu du déséquilibre des populations FO/MZ provoqué par la suppression de la région $E\mu$, nous avons recherché une éventuelle conséquence) dans une réponse immune « T-indépendante » ou « T-dépendante ». Dans notre modèle, les réponses anticorps IgM, IgG1 et IgG2a après immunisation sont comparables à celles des animaux wt. Ces résultats montrent que les cellules B périphériques dépourvues de $E\mu$ restent compétentes pour mettre en place une réaction immunitaire efficace : cet enhancer est dispensable aux événements de CSR (du moins vers les isotypes concernés) et à la production d'immunoglobulines sécrétées par les plasmocytes.

Les modèles précédents, KO ou transgéniques, ont successivement validé et invalidé des fonctions de la région $E\mu$ comme régulateur des modifications des cellules B activées (cellules B du GC). En effet la délétion de $cE\mu$ n'a pas d'effet sur les processus de SHM et CSR (Perlot et al., 2005) mais des travaux plus récents contredisent ce constat et proposent que cette région pourrait contribuer au recrutement de la machinerie SHM/CSR au locus IgH (Li et al., 2010). Nous avons donc étudié le processus de SHM dans notre modèle $E\mu$ KO (**Figure 25**) et simultanément dans le « modèle compagnon » $MAR_{SE\mu}$ KO. Contrairement à la délétion de $cE\mu$ (Perlot et al., 2005), l'absence totale de la région induit une forte diminution de la fréquence de mutation. Nous observons une baisse (5.1‰ contre 13.9‰ chez le wt) dans la région en aval du segment J_H4 (Le Noir, Marquet, Garot et al., *unpublished*). Des résultats similaires obtenus chez le modèle $MAR_{SE\mu}$ KO confirment un effet activateur de la de SHM pour la région $E\mu$ et plus précisément des régions flanquantes MARs dont la suppression diminue la fréquence de SHM à 6.1‰ (**Figure 45A**). (Le Noir, Marquet, Garot et al., *unpublished*). L'étude des SHM aux locus des chaînes légères $Ig\kappa$, dans ces mêmes modèles $E\mu$ et $MAR_{SE\mu}$ KO, montre contre toute attente une nette diminution des SHM (environ 8‰ contre 12‰ chez le wt). Ce constat surprenant indique que ces régions pourraient moduler le processus de SHM à distance, du chromosome 12 (IgH) vers un chromosome différent (le chromosome 6 où se trouve le locus $Ig\kappa$) (Le Noir, Marquet, Garot et al., *unpublished*). Le mode d'action sur la SHM, à la fois « en *cis* » et « en *trans* », de la région $E\mu$ et de ces MARs reste à définir mais nous avons montré qu'il est indépendant de la transcription des gènes cibles IgH et $Ig\kappa$. Il est raisonnable de considérer ces régions comme interagissant (directement ou indirectement) avec AID, dans les cellules prédisposées à la SHM.

Ces données suggérant un effet « en *trans* » des régions MARs_{Eμ} nous ont conduits à rechercher l'implication de ces régions régulatrices sur les mutations survenant aux cibles illégitimes de AID que sont les oncogènes « off-targets ». Dans une étude par séquençage des gènes « off-targets » chez *Bcl6* et *Cd83*, dans un premier temps préliminaire (clonage et séquençage « classique ») suivie d'une étude plus large (séquençage par méthode « haut débit »), nous montrons qu'elles participeraient activement au ciblage des gènes off-targets par AID (**Figure 46D**). En effet, de la même manière que pour les gènes d'Ig, nous observons une diminution significative de la fréquence de mutation chez *Bcl6* KO (baisse d'un facteur 2) et *Cd83* (baisse d'un facteur 3) dans les animaux MARs_{Eμ}. Ces études récentes confirment l'implication « en *trans* » des régions MARs_{Eμ} lors de la SHM. En effet, les MARs_{Eμ} sont impliquées dans le ciblage à distance de gènes placés sur d'autres chromosomes que ceux portant les loci des gènes d'Ig, ici des cibles illégitimes de AID sur les chromosomes 16 (*Bcl6*) et 13 (*Cd83*). Le mécanisme d'action des MARs lors de la SHM n'est pas encore identifié mais nous émettons deux hypothèses sur le fonctionnement des MARs lors de la SHM : (1) l'hypothèse d'adressage : il est possible (en cohérence avec leur fonction de « régions d'attachement à la matrice ») que les MARs adressent les loci d'Ig (cibles légitimes) et les gènes off-targets dans une région du noyau où AID est active. (2) L'hypothèse de recrutement : Les MARs pourraient recruter AID aux loci d'Ig et à proximité des gènes off-targets.

Afin d'élucider le ou les mécanismes (les hypothèses ne sont pas exclusives) nous avons entrepris l'étude, par méthode de FISH-3D, du positionnement nucléaire des allèles de gènes d'Ig IgH et Igk dans les cellules de GC. Une étude similaire de position des allèles des « off targets » *Bcl6* et *Cd83* a également débuté.

2- Dynamique de la 3'RR: quels rôles pour les éléments proximaux et distaux au cours du développement B ?

Les nombreuses études, descriptives et fonctionnelles, de la 3'RR auxquelles s'ajoutent les données comparatives attestant de la conservation de sa structure chez de nombreuses espèces ne laissent planer aucun doute sur l'importance de cette région au cours de l'ontogénie B. Depuis la découverte du premier enhancer 3' IgH (Pettersson et al., 1990) jusqu'à aujourd'hui, les travaux, parmi lesquels de nombreux modèles KO, menés sur cette région régulatrice, ont peu à peu précisé sa fonction qui s'avère particulièrement complexe. Cette grande région (plus de 25kb) est désormais considérée comme un « super-enhancer », possiblement de par sa structure si particulière. En effet, les trois premiers activateurs (hs3a ; hs1,2 ; hs3b) sont inclus dans une région quasi-palindromique (structure conservée au cours de l'évolution) et sont suivis d'un activateur (hs4) situé plus en aval. Pris individuellement, ces enhanceurs ont une activité « régulatrice » modérée; en revanche lorsqu'ils sont associés, leur fonction activatrice se trouve considérablement renforcée. Malgré les différents modèles cellulaires et *in vivo* (chez la souris) établis pour l'étude pour cette région, certaines fonctions

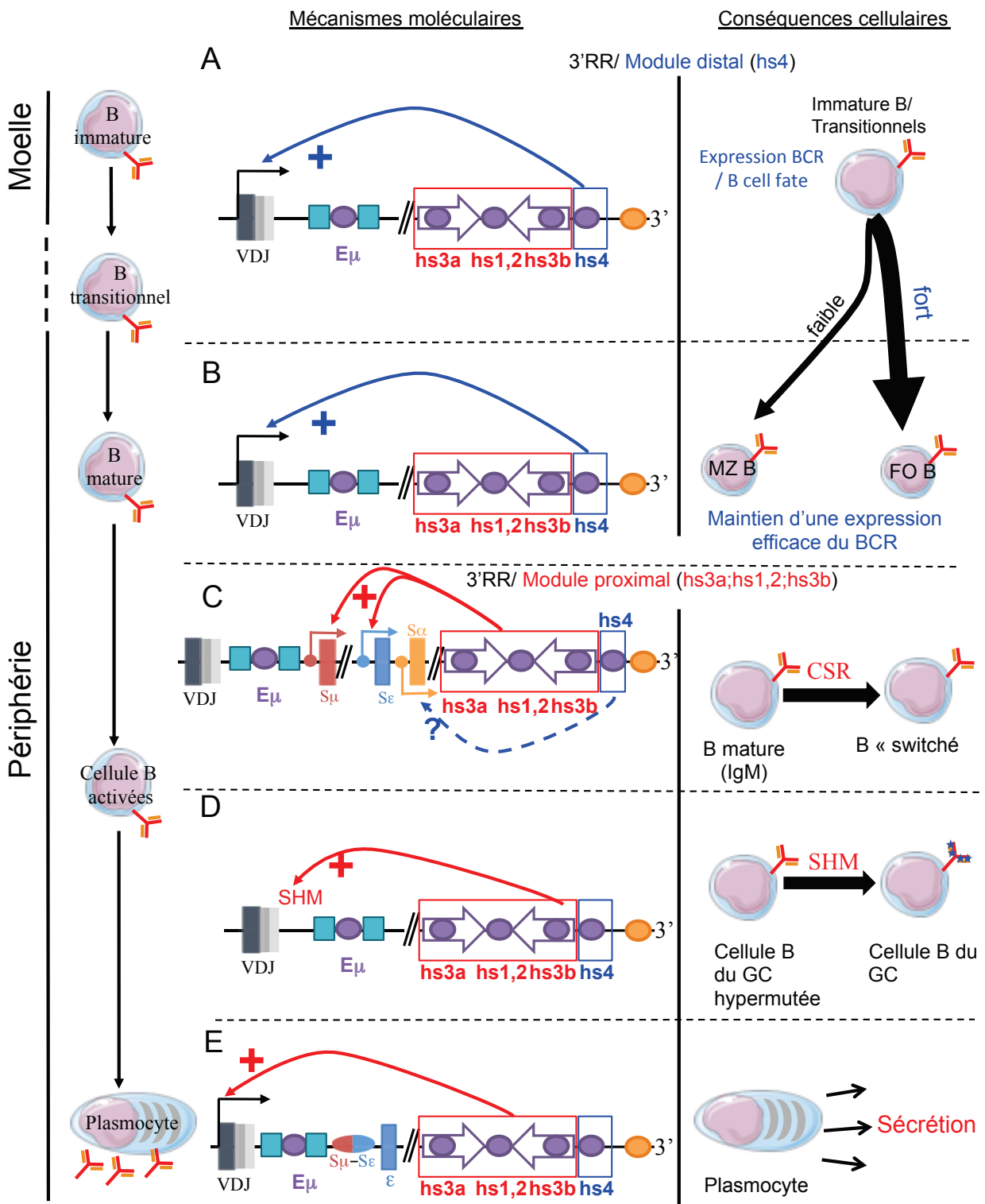


Figure 47. Dynamique de la 3'RR: quels rôles pour les éléments proximaux et distaux au cours du développement B

Discussion-Perspectives

de la 3'RR restent à élucider. Jusqu'à présent, seules les délétions combinées incluant au moins deux enhanceurs (ou de la totalité de la région) montrent un effet régulateur lors de la CSR (et parfois la SHM). Bien que suspectés, le rôle et la fonction de la structure quasi-palindromique au cours de l'ontogénie B restaient cependant mal connus.

En effet, les délétions individuelles des enhanceurs hs3a ; hs1, 2 et hs3b montrent que ces éléments ne sont pas indispensables aux processus de SHM et CSR (Manis et al., 1998; Bébin et al., 2010). Seuls les modèles d'animaux déficients pour l'activateur hs4 présentent un phénotype commun et marqué à savoir une diminution de l'expression du BCR des cellules B matures au repos (Vincent-Fabert et al., 2009). Ces données indiquent que l'élément hs4, situé en dehors de la structure quasi-palindromique, occupe des fonctions spécifiques.

Les études précédentes laissaient donc présager « deux entités » distinctes au sein de la 3'RR : un module proximal incluant le « quasi-palindrome » et un module distal formé de l'enhancer hs4 (et ses régions flanquantes non-inclues dans le palindrome). Mes travaux de thèse ont largement contribué à la vérification de l'hypothèse des « deux entités fonctionnelles » au sein de la 3'RR par l'étude du modèle de souris portant la délétion des 25 kb englobant le quasi-palindrome 3'IgH (3' PAL KO).

Afin de mieux définir la fenêtre d'action des enhanceurs de la région 3'IgH, nous avons comparé notre modèle 3'PAL KO (chez lequel la région 3'RR est simplifiée à la présence du seul enhancer hs4) à deux autres modèles précédemment réalisés au laboratoire présentant soit une délétion minimale dans le module distal (hs3b-hs4 KO) soit la délétion de la totalité de la région de contrôle du locus (3'RR KO) (**Figure 45B et C**). Notre étude comparative montre que le développement B précoce et l'expression du BCR ne sont pas affectés dans notre modèle 3' PAL KO, contrairement aux deux autres modèles dans lesquels hs4 est absent. De plus, ce défaut d'expression du BCR se poursuit jusqu'au stade mature. Le modèle 3' PAL KO permet d'une part d'indiquer que le module proximal et sa structure palindromique ne sont pas indispensables au développement B précoce et d'autre part d'apporter des précisions sur la fenêtre d'activité de hs4 (**Figure 47A**). Cet enhancer distal module l'expression de la chaîne lourde et par conséquent du BCR à partir du stade B immature jusqu'au stade mature naïf. La comparaison de ces données à celles obtenues dans le modèle $E\mu$ KO indique un chevauchement des fenêtres d'activité de ces deux enhanceurs, $E\mu$ modulant également l'expression de la chaîne lourde du stade pré-B au stade transitionnel. Il semble donc qu'il s'établisse une hiérarchie permettant le contrôle et le maintien de l'expression du BCR au cours de l'ontogénie B. (1) Du stade pré-B au stade immature, l'enhancer $E\mu$ est nécessaire à l'expression de la chaîne lourde μ . (2) Au stade transitionnel, l'expression du BCR est sous la dépendance conjointe des éléments $E\mu$ et hs4 ; il est à ce titre difficile de conclure sur la redondance ou la synergie de ces éléments (3) Seul hs4 semble requis pour le maintien de l'expression du BCR aux stades B matures naïfs (**Figure 47A et B 49C**). Notre modèle apporte donc un éclaircissement sur la fonction des deux modules de la 3'RR au cours du développement B précoce. Le module 3' distal est indispensable à une expression optimale du BCR, lorsque ce dernier est exprimé à la surface

Discussion-Perspectives

des cellules de la lignée B précoce alors que le module proximal ne semble occuper aucune fonction évidente à ces stades.

Les résultats apportées par les modèles de délétions multiples (3'RR KO et hs3b-hs4 KO) suggéraient que la région quasi-palindromique puisse exercer des fonctions modulant les processus de CSR et éventuellement de SHM. L'analyse de la fréquence de mutation au locus IgH dans les animaux 3'PAL KO montre une baisse drastique de la SHM associée à une forte diminution de la transcription du locus, comparable à celle observée chez les animaux dépourvus de la totalité de la 3'RR (Rouaud et al., 2013). Dans les cellules B du GC, le module proximal semble donc à lui seul contrôler la transcription de la chaîne lourde indispensable lors de la SHM (**Figure 47D**). Ces conclusions sont confortées par une diminution de la SHM également observée dans deux nouveaux modèles murins de « déstructuration » du quasi-palindrome, nommés Δ leftPAL ou Δ IRIS, supprimant respectivement la moitié de ce dernier ou les seules régions répétées (**Figure 45**) (Saintamand, Vincent-Fabert, Garot et al., unpublished) Annexe [**Manuscrit 2**]. La déstructuration du quasi-palindrome 3' IgH présente donc un effet significatif sur la SHM. En effet dans le modèle Δ IRIS où seule une région inversée-répétée est délétée, l'altération de la SHM est conséquente. Ce phénomène est accentué dans le modèle Δ leftPAL où toute la région hs3a-hs1,2 est supprimée. Il est imaginable que le repliement et l'association des régions inversées-répétées servent de « guide » ou de « plateforme » à la machinerie de SHM (incluant entre autres AID) ou du moins facilite son recrutement dans les régions devant hypermuter. En revanche, les délétions individuelles des enhanceurs de la structure quasi-palindromique, ou la délétion conjointe de hs3b et hs4, ne semblent pas impacter le processus de SHM (Manis et al., 1998; Le Morvan et al., 2003; Bébin et al., 2010). Il est raisonnable d'envisager qu'une fois la « plateforme » stabilisée, la combinaison d'enhanceurs procure un niveau suffisant de transcription pour assurer un grand nombre de mutations. Ainsi, la redondance des activateurs serait telle qu'une suppression individuelle est insuffisante pour modifier l'équilibre. En revanche, les délétions déstructurantes (telles que rencontrées dans les modèles Δ leftPAL ou Δ IRIS) n'assureraient plus une stabilité suffisante pour le recrutement de AID.

Notre modèle 3'PAL KO apporte également son lot d'informations concernant la régulation de la transcription germinale associée à la CSR. La transcription de la région donneuse S_{μ} est fortement diminuée, de manière similaire au modèle 3'RR KO. Nous observons également une diminution de la transcription de plusieurs régions S acceptrices ($S_{\gamma 3}$, $S_{\gamma 1}$, $S_{\gamma 2a}$, $S_{\gamma 2b}$ et S_{ϵ}). Ces données indiquent clairement que le module proximal est l'élément régulateur essentiel des événements de CSR. Parallèlement à ces résultats de transcription, nous observons également dans nos animaux une baisse de l'efficacité de la CSR vers tous les isotypes excepté IgA. En revanche, les transcrits initiés au promoteur $I\alpha$ semblent régulés indépendamment du quasi-palindrome. Ces observations sont à confronter à celles obtenues dans les modèles de souris incluant une délétion de hs4 (hs3b-hs4 KO et 3'RR KO) qui présentent tous une diminution de la CSR vers IgA (Pinaud et al., 2001; Vincent-Fabert et al., 2010; Dunnick et al., 2013). Ces résultats plaident en faveur d'un

contrôle de la transcription germinale et de la CSR vers IgA par la région distale de la 3'RR et son activateur hs4.

Récemment, l'équipe de Basu a décrit, 2,6Mb en aval de la 3'RR, un élément régulateur des « longs ARN non codant » ou lnc-RNA (pour long non-coding RNA) (Pefanis et al., 2015). La suppression de cet élément appelé « lncRNA-CSR » au sein de la lignée cellulaire CH12 (lignée chez laquelle la CSR vers IgA est inductible *in vitro*) montre une diminution de la transcription germinale à partir de $I\alpha$ s'accompagnant d'une baisse de la CSR vers IgA. Dans cette étude, par une méthode de 3C, les auteurs montrent que cet élément interagit avec le module distal de la 3'RR (hs4). Ces résultats sont en accord avec notre hypothèse proposant un rôle de hs4 comme élément facilitateur (quasi-exclusif) de la CSR vers IgA (**Figure 47C**).

Le dernier point majeur, issu de l'analyse du modèle 3'PAL KO, est la mise en évidence de la fonction essentielle du module proximal de la 3'RR dans la production d'anticorps. La diminution drastique du taux sérique d'Ig concernant tous les isotypes y compris IgM, du même ordre dans les deux modèles complémentaires 3'RR et 3'PAL KO (Vincent-Fabert et al., 2010), indique, qu'au stade plasmocyte, l'essentiel de la fonction activatrice de la 3'RR est porté par le module quasi-palindromique. Notre modèle 3'PAL KO permet une différenciation efficace des plasmocytes dont chacun présente des capacités limitées pour l'expression leurs chaînes lourdes. Ce défaut, pouvant être aisément corrélé à un défaut majeur de transcription, indique une fonction essentielle d'activation, portée par le module proximal. Nos données montrent qu'à ce stade du développement, l'expression de la chaîne lourde et sa régulation par le module proximal, sont une étape limitante qui conditionne l'efficacité de la réponse anticorps (avec pour preuve une réponse vaccinale réduite dans notre modèle 3'PAL KO) (**Figure 47E**).

3- Topologie du locus IgH et interactions entre les éléments régulateurs

Dans ce manuscrit, j'ai évoqué la contraction du locus IgH au cours de l'ontogénie B (*cf.* Chapitre 2.d). Initialement, des études d'imagerie réalisées par la méthode de FISH-3D ont posé les bases de l'architecture du locus ; cependant, la résolution apportée par cette méthode (distinguant, dans le meilleur des cas, une distance de 50 nm entre deux « spots ») ne permet pas de différencier avec précision un rapprochement ou un contact entre des segments de gènes. Les études de FISH-3D et de trilatération ont démontré que lors de l'assemblage VDJ, au stades précoces, le locus IgH peut se contracter en formant des boucles. Ces travaux de l'équipe de Murre suggèrent que la compaction du locus évolue au cours du développement B. Par exemple, afin de favoriser les recombinaisons, les segments V_H sont inclus dans des boucles de chromatine permettant de les rapprocher physiquement du DJ_H réarrangé. Il est tout à fait possible que des éléments régulateurs utilisent cette stratégie pour créer des interactions à longue distance (Jhunjhunwala et al., 2008).

Discussion-Perspectives

Des techniques plus résolutive utilisées récemment mais n'utilisant pas l'imagerie, notamment les méthodes 3C (Chromosome Capture Conformation) et 4C-seq (Circularized 3C) permettent d'apprécier des interactions physiques entre diverses régions du génome (liaisons intra ou inter-chromosomiques). La méthode 3C permet d'analyser l'interaction existante entre une ancre (bait) et une zone précise du génome (en général située à distance sur le même chromosome). Cette région ciblée doit être connue (ou suspectée) comme partenaire de l'ancre. Concernant la méthode « 4C-seq », l'objectif est semblable et consiste à identifier les éléments du génome, connus ou non, interagissant avec l'ancre (**Figure 21**). Les données obtenues (sous forme de séquences) identifient les partenaires de l'ancre. Simple sur le principe, cette technique reste complexe à mettre en place. L'interprétation des résultats nécessite une analyse bioinformatique. Le crible d'analyse est encore sujet à controverse notamment par les équipes de Skok et de Casellas (Hakim et al., 2012; Rocha et al., 2012).

L'équipe de Busslinger a utilisé la méthode 4C-seq pour analyser les interactions physiques entre diverses régions du locus IgH, aux stades précoces du développement B (**Figure 21**). Cette étude montre, au stade pro-B, des contacts à longues distances (boucles d'interaction) au sein du locus IgH : les éléments régulateurs $E\mu$, IGCR1 et 3'RR sont présents dans ces boucles (Medvedovic et al., 2013; Nicolás and Chaudhuri, 2013). De manière surprenante, la suppression individuelle de ces éléments (le $cE\mu$ ou la totalité de la 3'RR) n'impacte pas les interactions à longue distance. A ce jour, les facteurs impliqués dans la formation et la régulation des boucles sont CTCF et son complexe partenaire Cohésine (Degner et al., 2011; Guo et al., 2011; Thomas-Claudepierre et al., 2013), YY1 et PAX5 (Stubington and Corcoran, 2013).

Aux stades ultérieurs du développement B, des contacts à distance entre régions du locus ont également été mis en évidence par l'équipe de Kenter. Dans ces cellules B au repos, $E\mu$ et la 3'RR (plus exactement $hs1,2$) sont connectés et pourraient former une « plateforme d'enhancers ». Ces interactions semblent bien spécifiques du lignage B car elles ne sont pas détectées dans les cellules T. Les auteurs détectent des interactions entre les enhancers et les promoteurs I dans les cellules B au repos, ce qui suppose que, à ce stade, le locus IgH se trouve « pré-configuré » pour l'activation. Ces interactions sont par la suite fortement augmentées lors de l'activation, en accord avec le type de stimulation employé. En effet, les interactions enhancers-promoteurs $I\gamma1$ et $I\epsilon$ sont favorisées par l'ajout d'IL4 alors qu'une simple activation des cellules avec du LPS (favorisant la CSR vers IgG2b et IgG3) augmentent les interactions enhancers-promoteurs $I\gamma2b$ et $I\gamma3$ au dépend de $I\gamma1$ et $I\epsilon$ (Wuerffel et al., 2007). Le rapprochement des régions acceptrices de la CSR de la « plateforme enhancers » est une hypothèse séduisante pour expliquer l'augmentation de la transcription germinale de ces régions cibles contrôlée par la 3'RR.

Il est raisonnable de considérer que les bases topologiques de la configuration du locus IgH sont posées ; cependant il est vraisemblable que toutes les interactions prenant place n'ont pas encore été décrites. La présence d'isolateurs de la chromatine pourrait, par exemple, confiner au sein d'une même boucle certaines régions amenées à recombiner afin de favoriser cet assemblage. A l'inverse, il n'est pas exclu que l'interaction médiée par ces

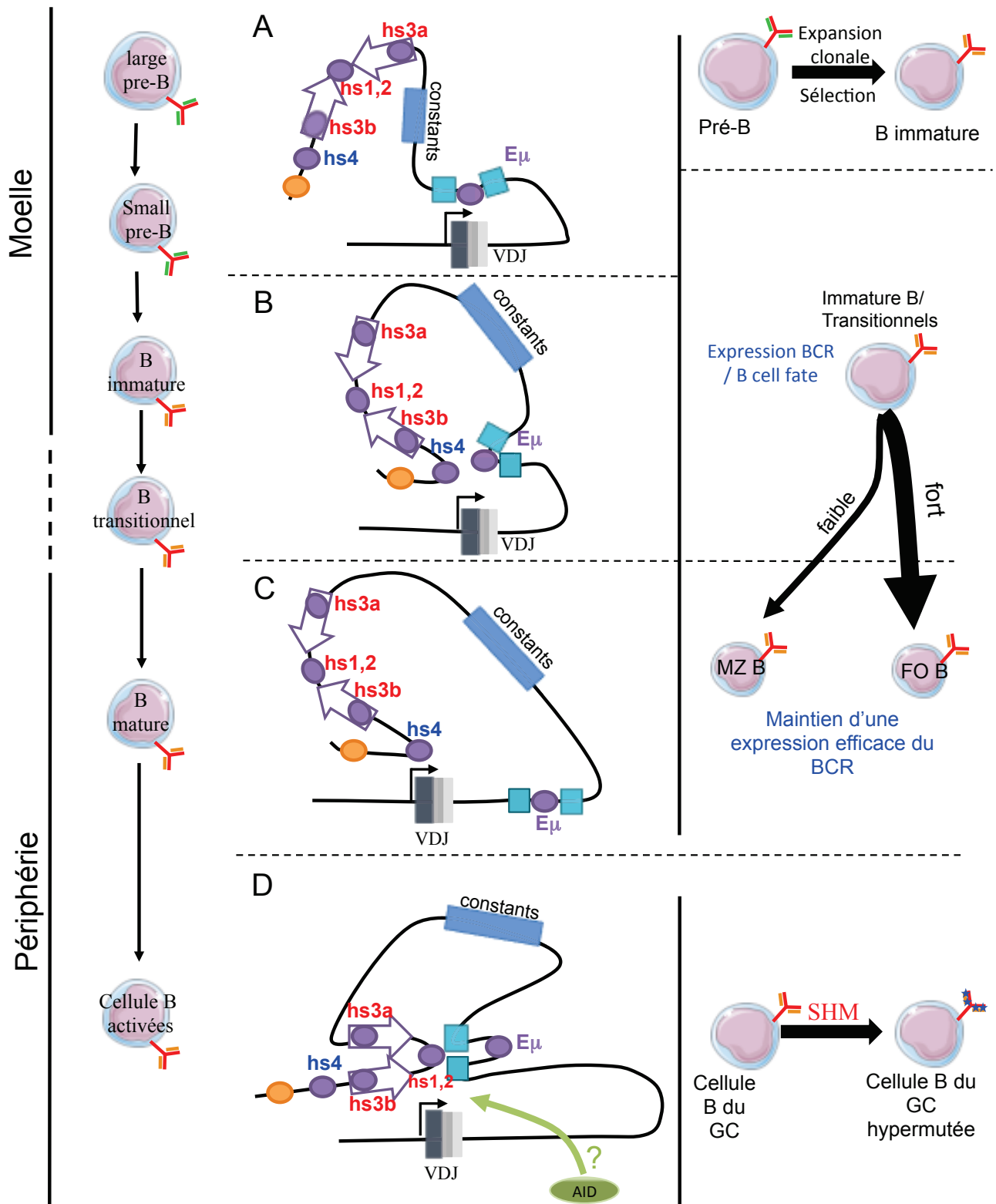


Figure 48. Topologie du locus IgH et interactions entre les éléments régulateurs

éléments conduise à un effet contraire en évitant la propagation de transcrits activateurs, conférant donc un effet négatif sur l'accessibilité de régions en dehors de la boucle. C'est vraisemblablement le cas de la région intergénique V_H-D_H contenant deux CBE (CTCF Binding Element) : l'absence de ces isolateurs se traduit par des réarrangements ectopiques de V_H vers D_H dans les lymphocytes T (Giallourakis et al., 2010). Pour autre exemple, au locus IgH, les isolateurs 3' du locus pourraient prévenir de l'expression des gènes voisins (e.g *Hole*). Au-delà des interactions prenant place sur un locus (en *cis*, situé sur le même chromosome) il faut envisager des interactions survenant entre les loci (en *trans*). Ces *trans*-interactions ont en effet été observées, entre les loci IgH, lors de la CSR (Dougier et al., 2006). Nos modèles E_μ et MAR_{SE_μ} KO indiquent également des *trans*-interactions entre loci IgH mais également entre avec les loci Igk et loci off-targets.

4- Les animaux KO dans la région E_μ ou 3'RR sont-ils de bons modèles pour l'analyse des interactions au locus IgH ?

Aujourd'hui, la notion d'interaction entre loci ou la capacité des chromosomes à « dialoguer » est admise. Cependant le rôle de ces contacts n'est pas clairement élucidé. On sait qu'il existe de nombreuses interactions au locus IgH entre des éléments éloigné de plusieurs centaines de paires de bases. Nos animaux déficients pour certaines parties du locus IgH seraient de bons modèles pour l'étude de ces interactions.

Il est tentant de s'essayer à représenter une image dynamique, en 3 dimensions, du locus IgH au cours du développement B. Nous avons tenté des représentations minimalistes de ces interactions, en fonction du stade de développement B, en s'inspirant des études menées à l'aide des modèles animaux précédemment générés au laboratoire (**Figure 48**).

Les travaux présentés dans ce manuscrit, basés sur l'étude des modèles E_μ full length KO et 3' PAL KO, précisent les fenêtres d'activité de ces régions éloignées de plus de 200 kb l'une de l'autre. Nos travaux (sur le modèle E_μ full length KO) mettent en évidence une fonction activatrice de l'enhancer E_μ pour l'expression de la chaîne lourde jusqu'au stade transitionnel ; notre modèle 3' PAL KO montre que l'enhancer hs4 est requis pour l'expression de cette même chaîne du stade transitionnel jusqu'au stade mature naïf. La distance séparant le promoteur de la chaîne lourde (pV_H) de ces deux éléments régulateurs varie de quelques centaines de bases en aval (pour E_μ) à plus de 200 kb pour hs4. De telles distances impliquent la formation de boucles d'interaction entre enhancers et promoteur. Ainsi nous pouvons envisager, aux stades précoces, une boucle d'interaction reliant le promoteur à E_μ ; ce dernier serait seul responsable de l'expression de la chaîne lourde au stade pré-B (**Figure 48A**). Par la suite, aux stades immatures et transitionnels, nous proposons une boucle d'interaction reliant le promoteur à E_μ et hs4 pour moduler l'expression de la chaîne μ (**Figure 48B**). Enfin, aux stades B matures périphériques (mais avant activation) ; nous envisageons qu'une boucle simplifiée, reliant le promoteur à hs4, serait nécessaire et suffisante au maintien d'une expression efficace du BCR (**Figure 48C**).

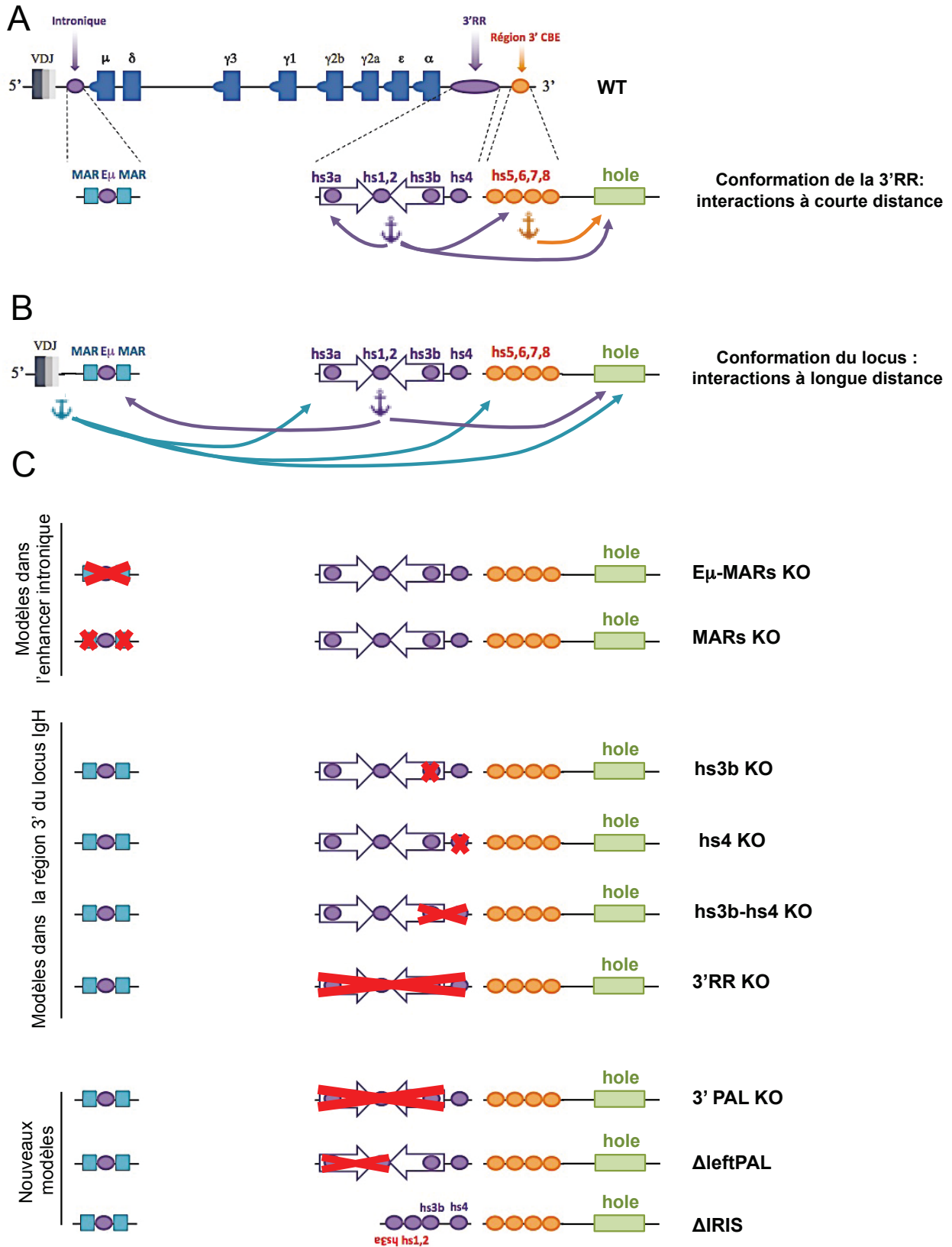


Figure 49. Etudes des interactions à courtes et longues distances au sein du locus IgH

Discussion-Perspectives

L'étude des SHM dans plusieurs de nos modèles nous amène à proposer une hypothèse quant à la conformation du locus IgH au cours de ce processus (**Figure 48D**). La région E μ et la région 3'RR sont connues pour interagir dans les cellules B matures et activées (Wuerffel et al., 2007) ainsi que dans les lignées plasmocytaires (Ju et al., 2007). Il est envisageable que des interactions du même type soient rencontrées lors de la SHM. La comparaison des modèles cE μ KO (Perlot et al., 2005), E μ full length KO (Marquet et al., 2014) Résultats [**Article 2**] et MARs KO (Le noir, Marquet, Garot et al., unpublished) nous permet de préciser le rôle de toute la grande région E μ lors de la SHM. En effet, seules les MARs seraient essentielles lors de ce processus. Nos études précisent également l'implication de la 3'RR lors de la SHM. En effet, notre modèle 3' PAL KO montre en particulier que la transcription initiée au pV_H est essentiellement sous la dépendance du module proximal. La formation de boucles d'interaction n'est à ce jour pas connue lors de la SHM mais il est possible que les éléments E μ et hs4 soient exclus de ces boucles (leur délétion respective ne conférant aucun défaut de SHM) (Le Morvan et al., 2003; Perlot et al., 2005). En revanche, dans les cellules B du GC prédisposées à la SHM, le pV_H pourrait être connecté à la fois aux régions MARs et au module proximal de la 3'RR. Si le mécanisme d'action du module 3'RR proximal semble être l'activation de la transcription, le rôle des régions MARs semble être totalement différent.

Nos modèles murins sont en effet particulièrement utiles et adaptés pour valider ou invalider nos hypothèses de repliements du locus. Nous avons à ce titre initié une étude d'interaction à longue ou à courte distance par méthode 4C. Selon notre plan méthodologique (déterminé en fonction du couple d'enzyme de restriction utilisé), nous avons positionné des ancres à proximité des régions E μ et 3'RR (**Figure 49A et B**).

Nous comptons sur ces études d'interaction pour répondre à deux questions :

(1) dans un contexte wt d'une part, nous souhaitons analyser les interactions au sein de la 3'RR (à courte distance) (**Figure 49A**), en espérant que les résultats obtenus nous informent sur la structure de la région (repliements, groupements d'enhancers, etc.) Dans ce cas des ancres multiples seront placées dans les fragments incluant hs1,2 ; hs4 ; hs567 (**Figure 49A**).

(2) D'autre part, en utilisant les différents modèles KO en notre possession, nous espérons définir la conformation du locus en analysant les interactions à longue distance (**Figure 49B**). Cette étude est envisageable en plaçant les ancres dans la région E μ ou dans la région 3'RR. L'analyse des interactions avec le gène *Hole* (premier gène non B spécifique en aval de la 3'RR) sera utilisée comme contrôle négatif. Dans un premier temps, les interactions seront comparées, pour les différents modèles, dans les cellules B au repos et activées *in vitro* pour la CSR (**Figure 49C**).

Conclusion Générale

En conclusion, nos travaux de recherche apportent des précisions sur le fonctionnement des régions régulatrices $E\mu$ et 3'RR au locus IgH.

La délétion de la région entière $E\mu$ révèle des fonctions multiples de l'enhancer intronique aux stades précoces du développement B. Nous confirmons son rôle direct au cours des réarrangements de D_H vers J_H et montrons également que $E\mu$ n'est pas impliqué dans le choix des segments V_H . Une fois les recombinaisons VDJ effectuées, nos données dévoilent un rôle très important de $E\mu$ sur l'expansion du compartiment pré-B et la différenciation en cellule folliculaire *via* le contrôle de l'expression de la chaîne lourde μ .

Notre modèle 3' PAL KO, éclaire la fonction de la structure quasi palindromique de la région régulatrice 3'RR. Nos études montrent que la région 3'RR peut être divisée en deux entités fonctionnelles. Le module 3'RR distal maintient l'expression de la chaîne lourde et du BCR indépendamment de l'antigène. Le module 3'RR proximal, d'organisation quasi-palindromique, contrôle les étapes de transcription survenant après l'activation par l'antigène : transcription germinale nécessaire à la CSR et à la SHM et hyper-transcription nécessaire à la production d'anticorps.

Annexes

Annexes

Article 1. The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate.

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

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

Manuscrit 2. Deciphering the functional importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' rregulatory region.

Alexis Saintamand, Christelle Vincent-Fabert, Armand Garot, Pauline Rouaud, Zeliha Oruc, Michel Cogné and Yves Denizot.

Soumis pour publication à *Nature Communications*.

Manuscrit 3. Pre-germinal center origin for mature mouse B cell lymphomas: a major discrepancy with human mature lymphomas.

Alexis Saintamand, Armand Garot, Faten Saad and Yves Denizot.

Soumis pour publication à *Cell cycle*

Article 4. Immunoglobulin genes undergo legitimate repair in human B cells not only after cis- but also frequent trans-class switch recombination.

Laffleur Brice, Bardet Sylvia, Garot Armand, Brousse Mylène, Baylet Audrey and Cogné Michel.

Genes and Immunity, 2014, volume 15, numéro 5, pages 341-346.

Annexes

Manuscrit 5. Allelic transvection in mammalian B lymphocytes mediated by the IgH locus 3' *cis*-regulatory region.

Sandrine Le Noir, Brice Laffleur, Claire Carrion, Armand Garot, Eric Pinaud, Yves Denizot and Michel Cogné.

Soumis pour publication à *Blood*

Article 1

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

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

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

Ces résultats ont fait l'objet de communications affichées sous forme de posters.

Alexis Saintamand, Pauline Rouaud, Armand Garot, Michel Cogné and Yves Denizot. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during B cell development via germline deletion. 4th European Congress of Immunology ; 6-9 septembre 2015, Vienne, Autriche.

De nombreux facteurs *cis*- ou *trans*- régulateurs interviennent au cours du développement B. Les régions E μ et IGCR1 sont impliquées majoritairement dans le contrôle de l'assemblage VDJ au stade précoce (Perlot et al., 2005; Giallourakis et al., 2010; Guo et al., 2011a; Marquet et al., 2014). Les évènements géniques au stade tardif (SHM et CSR) nécessitent la 3'RR (Vincent-Fabert et al., 2010a; Pinaud et al., 2011; Rouaud et al., 2013). Au cours de l'ontogénie, les cellules du lignage B sont sous le contrôle des signaux transmis par le pré-BCR au stade précoce et par le BCR au stade tardif (Niirio and Clark, 2002; Pillai and Cariappa, 2009).

Au stade B transitionnel, un signal « faible » transmis par le BCR est en faveur d'une différenciation en cellule B de la zone marginale, alors qu'un signal « fort » induit le lymphocyte B immature à devenir une cellule B folliculaire. Afin d'étudier le rôle de la 3'RR sur le destin de la cellule B, nous avons analysé des souris hétérozygotes IgH $a^{3'RR}/b^{WT}$. Ces animaux portent un allèle sauvage d'allotype b et un allèle dépourvu de la 3'RR d'allotype a.

Les souris IgH $a^{3'RR}/b^{WT}$ peuvent alors exprimer un pré-BCR ou un BCR produit à partir de l'allèle a (KO) ou l'allèle b (wt). Ces deux types de BCR sont identifiables par cytométrie en flux en utilisant des anticorps anti-IgM spécifiques d'allotype.

Nous avons dans un premier temps analysé par cytométrie en flux l'expression de l'IgM membranaire de chaque allotype dans les lymphocytes B la moelle osseuse puis en périphérie. Ensuite nous avons étudié la capacité des cellules à répondre (co-localisation BCR-radeaux lipidiques et phosphorylation des effecteurs intracellulaires) suite à une stimulation.

Annexes

Au cours de cette étude j'ai participé à la mise en place, la réalisation et l'analyse des données de cytométrie. J'ai participé à la rédaction de l'article.

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

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

¹CNRS, CRIBL, UMR 7276, 87000 Limoges, France

²Université de Limoges, CRIBL, UMR 7276, 87000 Limoges, France

³Institut Universitaire de France, Paris, France

Correspondence to:

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

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

Received: December 17, 2014

Accepted: December 21, 2014

Published: January 14, 2015

ABSTRACT

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

INTRODUCTION

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

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

RESULTS AND DISCUSSION

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

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

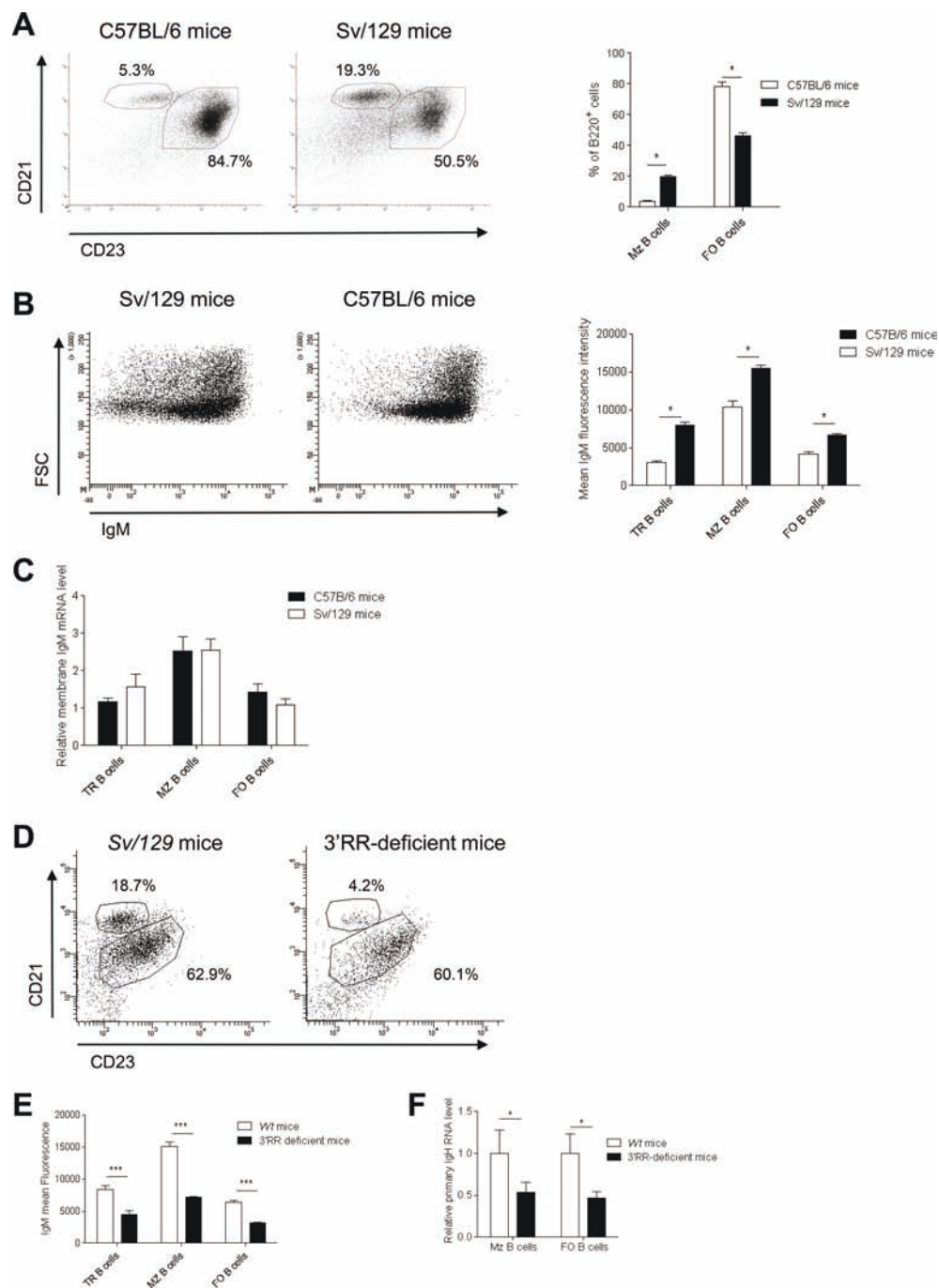


Figure 1: B cell fate and IgM expression in C57BL/6 and Sv/129 mice. (A) Left part - flow cytometry analysis of follicular (FO) B cells ($B220^+CD21^{low}CD23^{high}$) and marginal zone (MZ) B cells ($B220^+CD21^{high}CD23^{low}$) in spleen of C57BL/6 (IgH b^{wt}/b^{wt}) and Sv/129 (IgH a^{wt}/a^{wt})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

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

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

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

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

CONCLUSION

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

MATERIAL AND METHODS

Mice

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

Cell cytometry analysis

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

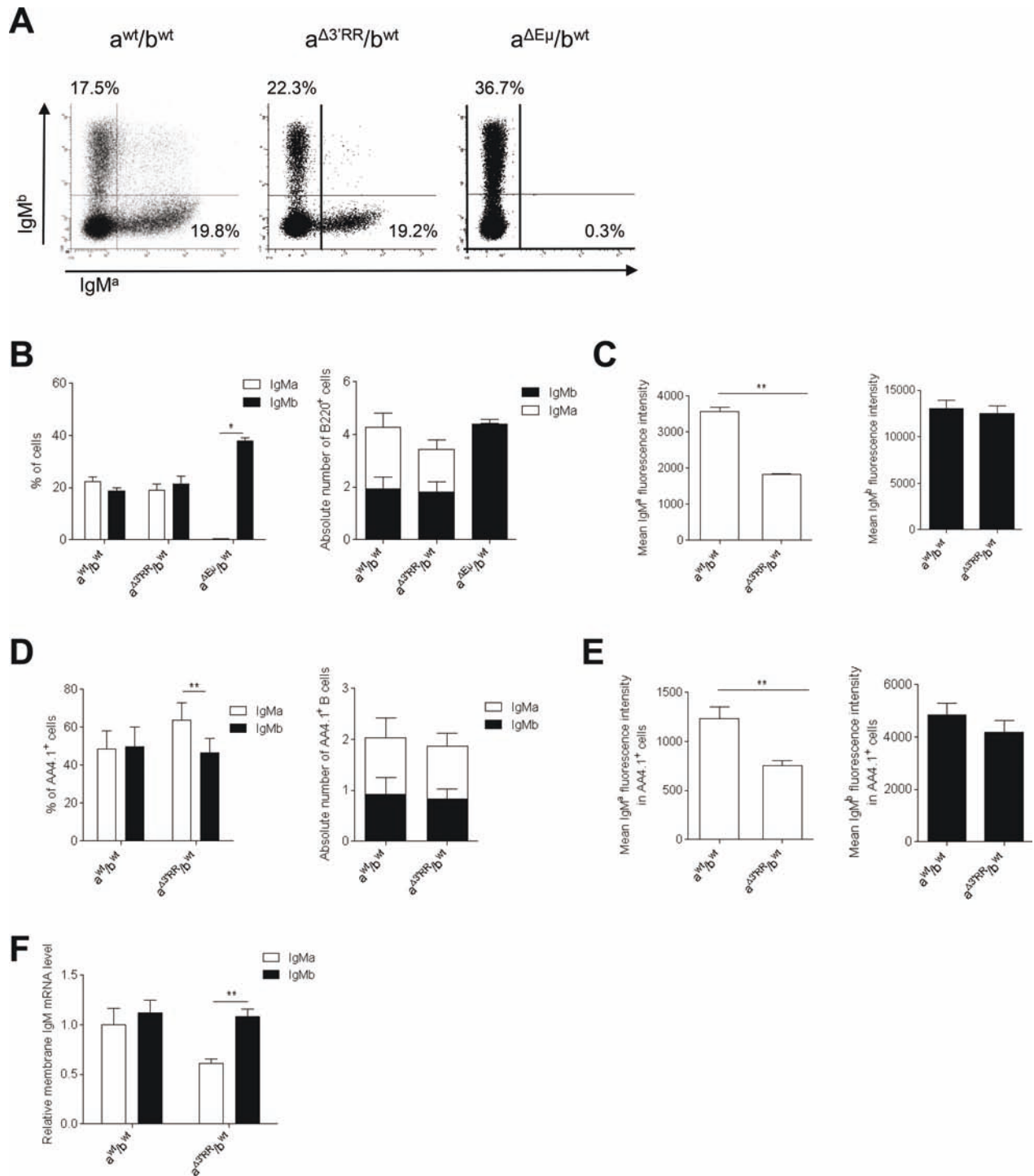


Figure 2: Expression of a 3'RR-deleted allele in bone marrow B cells. (A) Flow cytometry analysis of IgM^a and IgM^b on B220⁺ bone marrow cells of heterozygous *a^{Δ3'RR}/b^{wt}*, *a^{wt}/b^{wt}* and *a^{ΔEμ}/b^{wt}* mice. One representative experiment out of ten is shown for *a^{Δ3'RR}/b^{wt}* and *a^{wt}/b^{wt}* mice. One representative experiment out of four is shown for *a^{ΔEμ}/b^{wt}* mice. Cells were gated on B220⁺ cells. (B) Percentages (left part) and numbers (right part) of B220⁺ bone marrow B cells expressing the *a* or *b* allele in *a^{Δ3'RR}/b^{wt}*, *a^{wt}/b^{wt}* and *a^{ΔEμ}/b^{wt}* mice. Mean ± SEM of ten *a^{Δ3'RR}/b^{wt}* mice, ten *a^{wt}/b^{wt}* and four *a^{ΔEμ}/b^{wt}* mice. Millions of bone marrow B cells are reported. **p* < 0.05 (Mann-Whitney *U*-test). (C) IgM^a and IgM^b fluorescence intensity on B220⁺ B cells of *a^{Δ3'RR}/b^{wt}* and *a^{wt}/b^{wt}* mice. Mean ± SEM of ten mice. ***p* < 0.01 (Mann-Whitney *U*-test). (D) Percentages (left part) and numbers (right part) of B220⁺AA4.1⁺ bone marrow B cells in *a^{Δ3'RR}/b^{wt}* and *a^{wt}/b^{wt}* mice. Mean ± SEM of ten mice. ***p* < 0.01 (Mann-Whitney *U*-test). (E) IgM^a and IgM^b fluorescence intensity on B220⁺AA4.1⁺ bone marrow B cells in *a^{Δ3'RR}/b^{wt}* and *a^{wt}/b^{wt}* mice. Mean ± SEM of ten mice. ***p* < 0.01 (Mann-Whitney *U*-test). (F) Real time PCR analysis of μ membrane transcripts in sorted B220⁺AA4.1⁺ bone marrow B cells of *a^{Δ3'RR}/b^{wt}* and *a^{wt}/b^{wt}* mice. Values were normalized to GAPDH transcripts. Mean ± SEM of six mice. **p* < 0.05 (Mann-Whitney *U*-test).

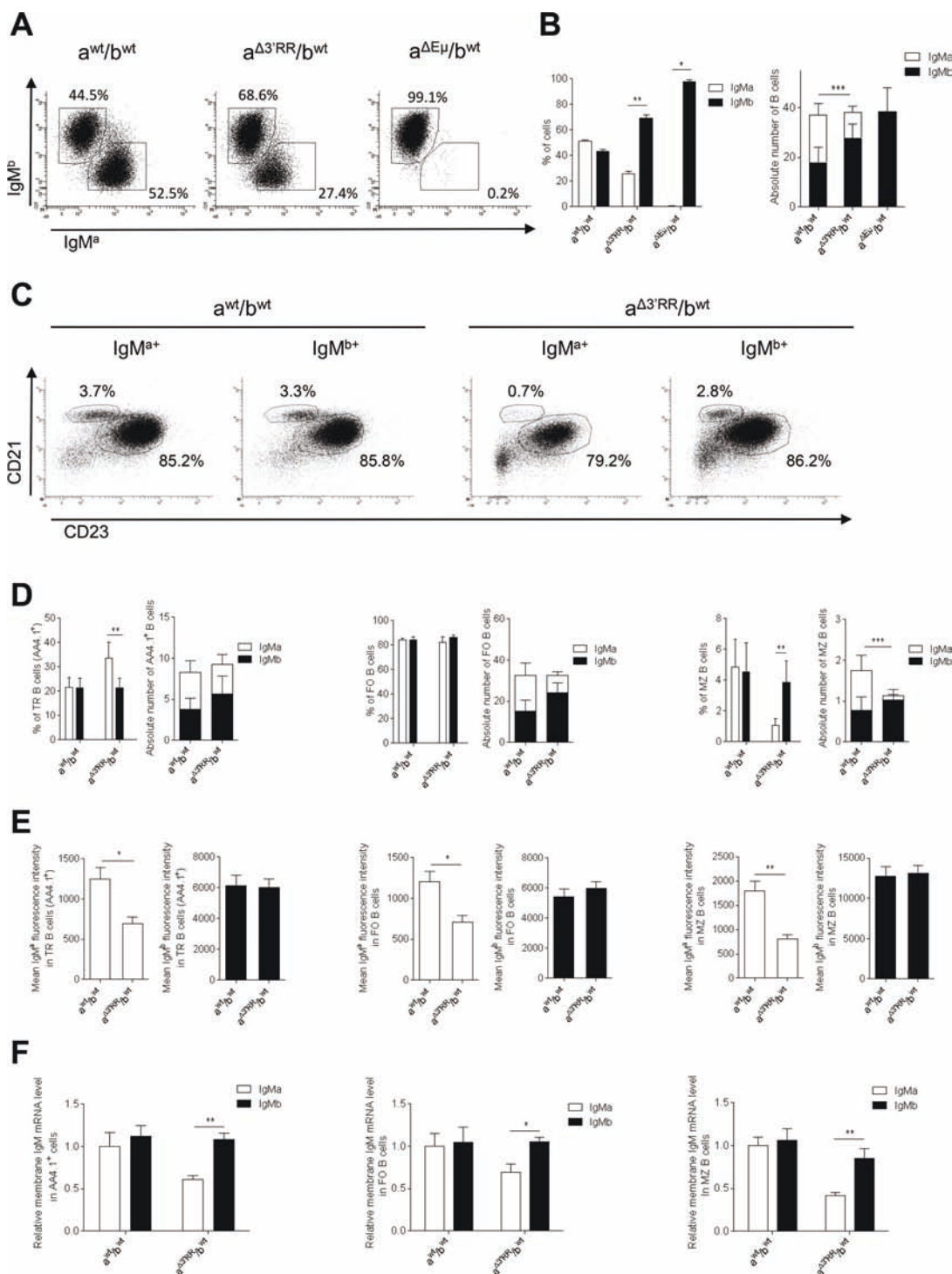


Figure 3: Expression of a 3'RR-deleted allele in splenic B cells. (A) Flow cytometry analysis of IgM^a and IgM^b in spleen of heterozygous *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt}, *a*^{wt}/*b*^{wt} and *a*^{ΔEμ}MARs/*b*^{wt} mice. One representative experiment out of ten is shown for *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. One representative experiment out of four is shown for *a*^{ΔEμ}MARs/*b*^{wt} mice. Cells were gated on B220⁺ cells. (B) Percentages (left part) and numbers (right part) of B220⁺ splenic B cells expressing the *a* or *b* allele in *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt}, *a*^{wt}/*b*^{wt} and *a*^{ΔEμ}MARs/*b*^{wt} mice. Mean ± SEM of ten *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} mice, ten *a*^{wt}/*b*^{wt} and four *a*^{ΔEμ}MARs/*b*^{wt} mice. Millions of splenic B cells are reported. The significance is for IgM^a cells in the right part. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 (Mann-Whitney *U*-test). (C) Flow cytometry analysis of follicular (FO) B cells (B220⁺CD21^{low}CD23^{high}) and marginal zone (MZ) B cells (B220⁺CD21^{high}CD23^{low}) in *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. One representative experiment out of ten is shown. Cells were gated on B220⁺ cells. (D) Percentages and numbers (in millions) of TR (AA4.1⁺), FO and MZ B cells in *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. Mean ± SEM of ten mice. Million numbers of cells are reported. The significance is for MZ IgM^a cells in the right part. ***p* < 0.01 (Mann-Whitney *U*-test). (E) IgM^a and IgM^b densities on TR, FO and MZ B cells in *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. Mean ± SEM of ten mice. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 (Mann-Whitney *U*-test). (F) μ transcription in sorted TR, FO and MZ B cells of *a*^{Δ3'RR}/*b*^{wt} and *a*^{wt}/*b*^{wt} mice. Mean ± SEM of 6 mice. Values were normalized to GAPDH transcripts. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 (Mann-Whitney *U*-test).

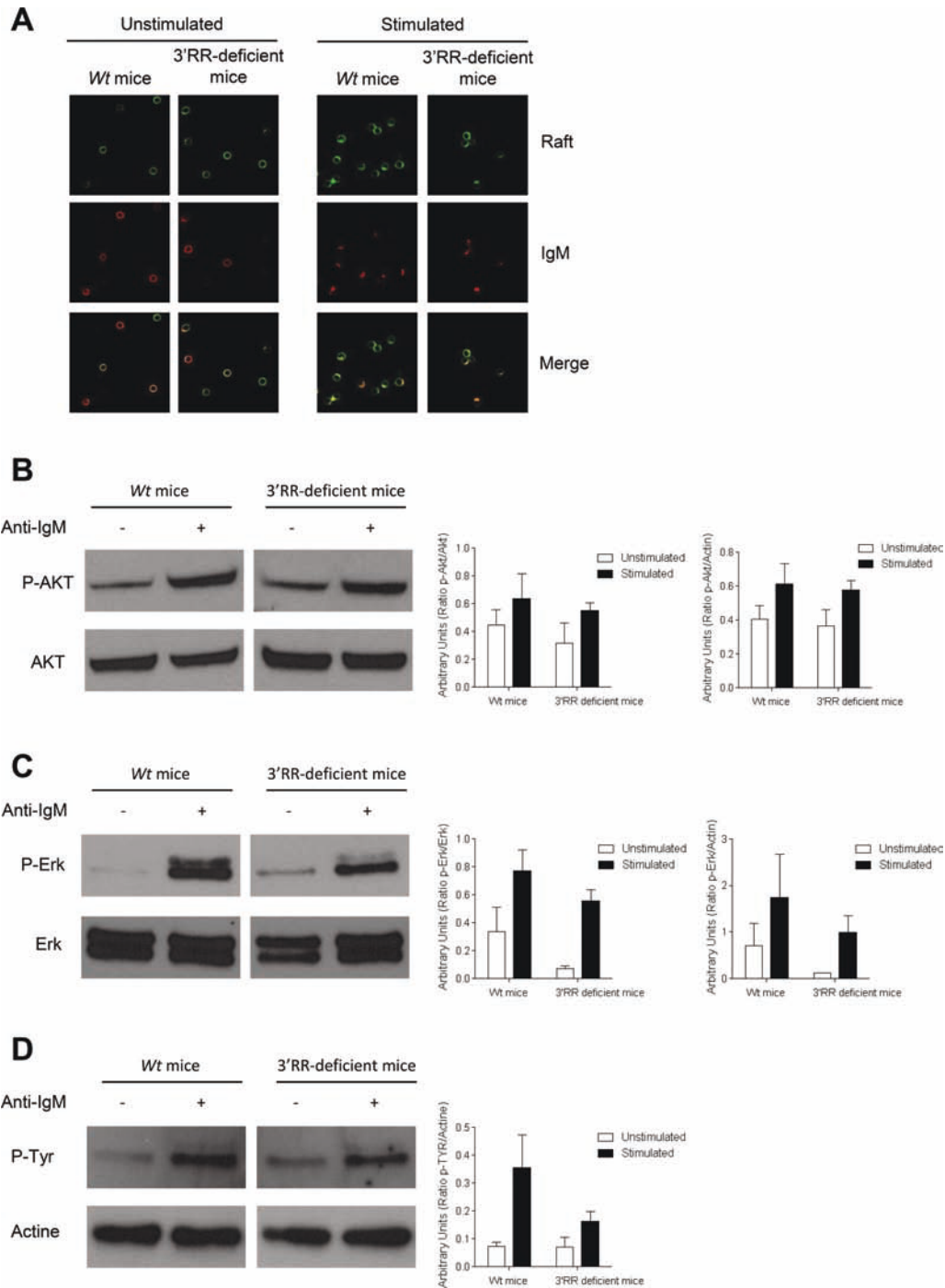


Figure 4: BCR signalling response in 3'RR-deficient B splenocytes. (A) BCR and lipid rafts colocalization experiments. 3'RR deficient mice ($a^{\Delta 3'RR}/a^{\Delta 3'RR}$) and Sv/129 wt mice (a^{wt}/a^{wt}) were investigated. CD43⁻ B cells were stained with cholera toxin Alexa 488 followed by stimulation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

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

Transcript analysis

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

Western blot analysis

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

Lipid raft aggregation

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Editorial note

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

REFERENCES

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

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

Manuscrit 2

Deciphering the functional importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region.

Alexis Saintamand, Christelle Vincent-Fabert, Armand Garot, Pauline Rouaud, Zeliha Oruc, Michel Cogné and Yves Denizot.

Soumis pour publication à *Nature Communications*

La région régulatrice de souris en 3' du locus IgH (3'RR) est constituée de 4 éléments activateurs (hs3a ; hs1,2 ; hs3b ; hs4). La 3'RR se distingue en deux modules comme le présentent nos travaux en cours de soumission (Partie Résultats [**Article 2**]). Le module distal est constitué de l'activateur hs4 et le module proximal comprend les 3 premiers enhanceurs et formant une structure quasi-palindromique. Cette structure particulière, conservée au cours de l'évolution, contient au centre l'enhancer hs1,2 encadré par deux régions inversées répétées et aux extrémités les deux enhanceurs hs3a d'un côté, hs3b de l'autre. Ces deux derniers enhanceurs sont en réalité des copies inversées inclus dans la région quasi-palindromique. Afin de préciser le rôle de cette structure, nous avons créé au laboratoire deux lignées murines dans lesquelles la structure palindromique est déstructurée. Dans le premier modèle appelé Δ leftPAL, nous avons éliminé toute la partie « 5' » du palindrome (les enhanceurs hs3a et hs1,2 ainsi que la région inversée-répétée située entre les deux) (**Figure 45**). Dans le second appelé Δ IRIS (IRIS pour inverted repeat intervening sequences), nous avons éliminé les deux régions inversées-répétées ; les 3 enhanceurs de la région palindromique sont présents, seul hs3a est modifié, dans notre modèle, il est orienté dans le même que hs3b.

Afin d'explorer le rôle de cette structure quasi-palindromique, nous avons analysé et comparé ces deux modèles murins en analysant l'impact de ces délétions sur les processus de SHM et CSR et sur le destin de la cellule B lié au niveau d'expression de son BCR.

Dans cette étude, j'ai participé à la réalisation et à l'analyse des données obtenues par cytométrie en flux.

Deciphering the functional importance of the palindromic architecture of the immunoglobulin heavy chain 3' regulatory region.

Running title: Role of the IgH 3'RR palindromic structure

Alexis Saintamand,¹ Christelle Vincent-Fabert,¹ Armand Garot,¹ Pauline Rouaud,¹ Zeliha Oruc,¹ Michel Cogné,^{1,2,3,4} Yves Denizot^{1,3,4}

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

³Institut Universitaire de France, Paris, France

³Address correspondence to Dr. Yves Denizot and Pr. M. Cogné, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7276, Laboratoire d'Immunologie, 2, rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France. E-mail address: yves.denizot@unilim.fr and cogne@unilim.fr

⁴Co-senior-authors

Keywords: B cells, IgH 3' regulatory region, palindrome, transcriptional enhancers, knock-out mice, class switch recombination, somatic hypermutation

ABSTRACT

The IgH 3' regulatory region (3'RR) controls class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM) in B cells. The mouse 3'RR contains four enhancer elements (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) with hs1,2 flanked by inverted repeated sequences and the center of a 25-kb palindrome bounded by two hs3 enhancer inverted copies (hs3a and hs3b). hs4 lies downstream of the palindrome. Evolution maintained in mammal this unique palindromic arrangement suggesting that it is functionally significant. To explore its role in the context of the endogenous locus, we compared two variant complete disruptions of the 3'RR palindromic architecture. Δ leftPAL mice lacking the entire left half of the palindrome (including the hs3a and hs1,2 enhancers and inverted repeat intervening sequences (IRIS)) were compared to IRIS-deficient mice (only lacking IRIS but with all core enhancers unaltered except for hs3 enhancers now present in a direct repeat orientation). We report that deconstructing the palindromic IgH 3'RR strongly impacts its function even when core enhancers are preserved. The "architectural effect" mostly manifested with lowered V_H germline transcription, AID recruitment and SHM. CSR and the high-rate IgH transcription typical of plasma cells appeared less dependent from the 3'RR architecture and were more or less preserved provided 3'RR core enhancers were present. In conclusion, this work indicates that the IgH 3'RR does not simply pile up enhancer units but also optimally expose them into a functional 2D/3D architecture of crucial importance.

Introduction

Lymphopoiesis is coupled with programmed accessibility of Ig genes to transcription and to several major transcription-dependent DNA remodelling events.^{1,2} Multiple *cis*-regulatory elements located 5' and 3' of constant (C) genes control B cell ontogeny. Among 5' elements, the intronic E μ enhancer is reported as a master control element of V(D)J recombination.^{3,4} The IgH 3' regulatory region (3'RR), that encompasses the four transcriptional enhancers hs3a, hs1,2, hs3b and hs4, controls μ transcription in mature B cells,⁵ and is the master element controlling conventional class switch recombination (CSR),^{6,7} locus suicide recombination,⁸ and somatic hypermutation (SHM)⁹ but with little role on V(D)J recombination except for silencing early transcription in pro-B cells.¹⁰⁻¹² The mouse 3'RR contains four enhancer elements (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) with hs1,2 flanked by inverted repeated intervening sequences (IRIS) and the center of a more than 25-kb palindrome bounded by two inverted copies of the hs3 enhancers (hs3a and hs3b).^{2,13} hs4 lies downstream of the palindrome. The modest activity of each of the 3'RR elements *in vitro*, however, contributes to a synergic and potent global effect of the 3'RR in transgenes, especially when its "palindromic" architecture is maintained.¹⁴ In human, each of the two 3'RR located downstream of C α 1 and C α 2 contains three enhancer elements similar to mouse hs3, hs1,2 and hs4 with hs1,2 being also flanked by IRIS. Beyond divergence of hs1,2 flanking sequences, evolution maintained a "quasi-palindromic" organisation in all mammals for which sequence is available, making it tempting to speculate that this unique arrangement is of significant importance for the regulatory region function.¹⁵ To explore the role of the 3'RR palindromic architecture in the context of the endogenous locus, we analysed two newly generated transgenic mice: hs3a+IRIS+hs1,2-deficient mice (called Δ leftPAL mice in this study) lacking the 11.5-kb left half of the 3'RR palindrome (deconstructing palindrome and deleting two enhancer elements) and Δ IRIS mice with the same left-half deletion of the

palindrome but with reintroduction of an inverted hs3a and of hs1,2 core enhancers (deconstructing the palindrome by fully eliminating left-side IRIS while maintaining all four core enhancer elements). We report that the deconstruction of the IgH 3' palindrome widely impacts SHM (but only marginally CSR) showing that the unique architecture of the IgH locus 3' boundary crucially determines the full functional expression of the IgH 3'RR transcriptional enhancers.

Results

Generation of deficient mice - The gene-targeting vectors replaced the 11.5 kb-genomic fragment encompassing the palindrome and hs3a/hs1,2 enhancers of the IgH 3'RR with a *floxed* neo^R cassette (Δ leftPAL mutation) or a cassette including an inverted copy of the core hs3a enhancer plus the hs1,2 core enhancer plus a *floxed* neo^R cassette (Δ IRIS mutation). After germline transmission, breeding with cre expressing mice allowed the derivation of Δ leftPAL and Δ IRIS mice after cre-deletion of *neo* (Fig. 1).

The palindromic arrangement of 3'RR enhancers influences SHM - Interactions with cognate antigens recruit activated B cells into germinal centers where they undergo SHM in V(D)J exons for the generation of high-affinity antibodies. SHM is strongly altered in the IgH locus of 3'RR-deficient mice, whereas SHM in light chain loci remains unaltered.⁹ We explored Δ leftPAL and Δ IRIS mice for potential SHM defects. Mice were daily immunized orally with sheep red blood cells for 2 weeks and intraperitoneally with 10 μ g LPS for 3 days. This immunisation protocol was found the most efficient to regularly obtain *in vivo* activated B cells in Peyer's patches.⁸ B220⁺GL7⁺Fas⁺ cells were sorted from immunized *wt*, Δ leftPAL and Δ IRIS mice. Extracted DNA was amplified by PCR and submitted to high throughput sequencing to evaluate SHM. Since SHM in light chains is not under the 3'RR control,⁹ IgH

SHM values along rearranged J_{H4} sequences were normalised to J κ 5 SHM values. Mutation frequencies of 1.45% and 0.07% were found in *wt* and AID-deficient mice, respectively. SHM frequency was dramatically reduced (by more than 4-fold, at 0.33%) in Δ leftPAL mice (Fig. 2A and 2B). The presence of hs3a and hs1,2 core enhancers in Δ IRIS mice maintained SHM frequency at 0.75%, *i.e.* at an intermediate level higher than Δ leftPAL mice (Fig. 2A and 2B) but markedly lower (by about 2-fold) than in *wt* mice (Fig. 2A and 2B). Mutations were found all along the analysed 3' J_{H4} DNA segment but hotspots of mutations were evidenced in both genotypes. The proportion of transitions and transversions did not significantly differ between *wt*, Δ leftPAL and Δ IRIS mice (Fig. 2C). SHM requires AID recruitment on single stranded DNA (ssDNA) transiently generated during transcription. Real-time PCR (Fig. 2D) indicated lowered V_H transcription and lowered AID load on J_H in ChIP experiments (Fig. 2E), altogether suggesting lowered AID recruitment in V_H genes in Δ leftPAL mice compared with *wt* mice and explaining the dramatic fall in J_{H4} SHM. As positive controls, no alteration was found for Ig κ and AID transcripts in Δ leftPAL mice (Fig. 2D). The presence of hs3a and hs1,2 core enhancer elements in Δ IRIS mice only partly avoided the fall in transcription (Fig. 2D) and AID recruitment (Fig. 2E) in V_H genes. Taken together these results indicate that even when all core enhancer elements were present, breaking the palindrome symmetry by deleting the left half of inter-enhancer intervening sequences plus flipping hs3a in a direct repeat orientation, resulted in a SHM alteration almost as important as in Δ leftPAL mice also lacking hs3a and hs1,2. Absence of any inter-species sequence identity between 3'RR IRIS suggests that they do not include major functional motif, while the strong conservation of their dyad symmetry architecture around hs1,2 by contrast suggests an evolutionary pressure on the palindromic structure itself.¹⁴ Our data fully support the idea that the evolutionary pressure on the 3'RR architecture connects with its functional importance for germinal center

B cell response and thus for optimal humoral immunity. This might also somehow split the IgH 3'RR into functional modules with the 25kb-long palindrome playing a strong role in SHM, while hs4 deletion alone only affected membrane IgM expression in resting B cells,¹⁶ and even the hs3b+hs4 deletion previously documented in mice affected IgM expression and CSR but not SHM.¹⁷

C_H germline transcription is poorly dependent from the palindromic arrangement of 3'RR enhancers - Germline transcription (GLT) of C_H gene is a known prerequisite of CSR. We evaluated GLT using real-time PCR on LPS only (*I_{γ3}-C_{γ3}*, *I_{γ2b}-C_{γ2b}*), LPS plus IL4 (*I_{γ1}-C_{γ1}*), LPS plus TGFβ (*I_α-C_α*) and LPS plus INFγ (*I_{γ2b}-C_{γ2a}*) activated splenic B cells from *wt*, ΔleftPAL and ΔIRIS mice. As shown in Fig. 3A, GLT was heterogeneously affected in ΔleftPAL mice, more or less for *I_{γ3}-C_{γ3}*, *I_{γ2a}-C_{γ2a}* and *I_{γ2b}-C_{γ2b}* while *I_α-C_α* and *I_{γ1}-C_{γ1}*, was preserved. Alterations were milder and restricted to *I_{γ2a}-C_{γ2a}* GLT in ΔIRIS mice (Fig. 3A). These data identify GLT as a basic activity of 3'RR transcriptional enhancers that can arise almost independently from their inclusion into the 3'RR palindrome. Accordingly, combined deletion of hs3b+hs4 elements, although minimally truncating the 3'RR palindrome had a dramatic role on GLT.¹⁸ It also has to be acknowledged that the various C genes are not equally affected by 3'RR defects and that C_{γ1} GLT was only affected by the whole 3'RR deletion,^{6,19} while C_α GLT is sensitive to deletions encompassing the hs4 enhancer element.^{6,20}

CSR poorly depends from the palindromic arrangement of 3'RR enhancers - To determine whether results on GLT translated to a decreased CSR we appreciated by flow cytometry the number of cells switching to a particular isotype after *in vitro* stimulation. Flow cytometric analysis allowed the counting of cells and the study of surface expression of class-switched isotype on LPS only, LPS plus IL4, LPS plus TGFβ and LPS plus INFγ activated splenic B

cells from *wt* and Δ leftPAL mice. A pattern mirroring results of GLT was found (Fig. 3B and 3C). Lowered CSR was found for IgG₃, IgG_{2a}, IgG_{2b} but not IgA. CSR toward IgG₁ was slightly reduced despite unchanged GLT. Fitting well with results of GLT, maintaining the presence of all core enhancer elements in Δ IRIS mice preserved CSR toward IgG₃, IgG_{2b} but not IgG_{2a}. IgG₁ and IgA CSR were in parallel normal, similar to Δ leftPAL mice. Downstream of GLT, we observed efficient preservation of the *in vitro* IgG₃ and IgG_{2b} CSR when core enhancers were maintained. Our data confirm the particular status of γ_1 and α isotypes with respect to the 3'RR-induced CSR control. IgA CSR is only sensitive to deletion encompassing the hs4 enhancer element,^{6,18} and recently an enhancer-RNA expressing element called Inc-RNA-CSR was reported to promote CSR toward α by stimulating activity of the 3'RR *via* a long-distance interaction with the hs4 region.²⁰ The residual IgG₁ CSR that persists even in 3'RR-deficient mice is most probably linked to the length of the switch (S)₁ region, by far the largest among all S regions. Molecular analysis of the 3'RR-induced CSR mechanism has reported that the 3'RR promotes CSR by acting on the initial steps of the CSR process (GLT and histone modifications).¹⁹ The present study suggests that most of these effects can be provided simply by the presence of all four 3'RR enhancers, more or less independently from their rigorous palindromic arrangement.

Palindromic arrangement of 3'RR enhancers does not influence μ chain synthesis, BCR expression and B cell fate - The full deletion of the 3'RR was reported to impact membrane IgM density and to modulate the B cell fate toward less marginal zone B cells.⁵ We generated heterozygous IgH $a^{\text{leftPAL}}/b^{wt}$ mice and IgH a^{IRIS}/b^{wt} mice by crossing homozygous Δ leftPAL mice (IgH $a^{\text{leftPAL}}/a^{\text{leftPAL}}$) and Δ IRIS mice (IgH $a^{\text{IRIS}}/a^{\text{IRIS}}$) with C57BL/6 mice (IgH b^{wt}/b^{wt}). Analysis of splenic B cells with IgM-allotype specific antibodies indicated similar

percentages of transitional B cells (B220⁺AA4.1⁺), follicular B cells (B220⁺CD21^{low}CD23^{high}) and marginal zone B cells (B220⁺CD21^{high}CD23^{low}) expressing either the *a* or *b* allotype in *a*^{leftPAL}/*b*^{wt} and IgH *a*^{IRIS}/*b*^{wt} mice (Fig. 4A and 4B) and no defect of membrane IgM density (Fig. 4C). If percentages of B220⁺CD138⁺ plasmablasts were not different in Δ leftPAL, Δ IRIS and *wt* mice (Fig. 4D), CD138⁺ plasmablasts had lowered membrane IgM density only in Δ leftPAL but not in Δ IRIS mice (Fig. 4E). This again suggests that most of the effects of 3'RR enhancers on IgM expression and relevant B cell fate are simply provided by the presence of all four 3'RR enhancers, without requiring their rigorous palindromic arrangement.

The palindromic arrangement of 3'RR enhancers influences Ig synthesis - Ig production was assessed *in vitro* through stimulation of splenocytes with LPS and/or cytokines. It was significantly affected in both mutant strains of mice, although this phenotype was aggravated in Δ leftPAL mice lacking two core enhancers. IgG_{2b} (LPS stimulation), IgG₁ (LPS+IL4 stimulation), IgG_{2a} (LPS+INF γ stimulation) and IgA (LPS+TGF β stimulation) synthesis were markedly reduced in Δ leftPAL compared to *wt* mice (Fig. 5A). Similar alterations were observed in Δ IRIS mice except that they were eventually less pronounced and spared IgG₃ and IgA secretion (Fig. 5A). We next investigated Ig production and plasmatic accumulation *in vivo* and again found similar alterations in both mutant strains, which mostly showed defects for IgM, IgG₃ and IgG_{2a} plasma levels while IgG₁, IgG_{2b} and IgA were preserved (Fig. 5B). Although statistically significant in both cases, the plasma IgG₃ and IgG_{2a} levels were less dramatically decreased in Δ IRIS mice than in mice with the dual deletion of *hs3b* and *hs4* enhancers.¹⁸ While these total Ig level defects were clear, evaluation of specific circulating antibody levels after ovalbumin immunization did not show major alteration, neither in

Δ leftPAL nor in Δ IRIS mice, suggesting that the intrinsic B cell defect was compensated upon specific antigenic challenge (with potentially a trend of lower levels of IgG1 and IgG2a antibodies in mutant animals) (Fig. 5C).

Discussion

The IgH 3'RR is a large and complex *cis*-regulatory region with a unique and striking palindromic architecture for which a potential functional role has been long questioned. Because the previously reported focal genomic alterations of the 3'RR could not address the issue of a role for the 3'RR architecture,^{6,16,18,21-23} we generated two different mice with complete disruption of the palindromic architecture, either by globally deleting the first half part of the 3'RR (including hs3a and hs1,2 core enhancers) or by removing all inverted repeats while preserving all core enhancers (but with hs3 core enhancer disposed as direct repeats) and compared them. SHM in V_H genes was markedly affected by the palindromic deconstruction. Combined effect of the four 3'RR core enhancers was not sufficient alone for a normal V_H transcription, an efficient AID recruitment and thus for a normal SHM rate. Interestingly, a previously reported 3'RR deletion sparing most of its palindromic part but removing its two last enhancers (hs3b+hs4) had no effect on SHM but major effects on CSR,¹⁸ while complete deletion of the 3'RR was shown to simultaneously affect CSR and SHM.^{6,9} In the present study, analysis of Δ leftPAL and Δ IRIS mice with a deconstruction of the 3'RR palindrome only had a minor effect on CSR with reduced CSR toward γ_3 and γ_{2b} connected with decreased γ_3 and γ_{2b} GL transcriptions. The 3'RR-induced CSR control is complex since CSR toward α is mostly dependent upon the hs4 enhancer,²⁰ and since CSR to γ_1 appears as at least partially 3'RR-independent.⁶ These differences likely relate to the specific structures of germline promoters and of S regions since the number of G-clusters to initiate R loops, the number of WGCW sites for AID deamination and distance to promoter

are of key importance for CSR efficiency.²⁴ Thereby, S_u has been demonstrated to be able to form R-loops more readily than other isotypes, thus allowing AID to induce the double strand breaks (DSBs) required to initiate CSR, due to the short distance between I_u and C_u.²⁵ Transcription is suggested to play a key role both in SHM and CSR. However the kinetics of these two processes is different. SHM requires accumulation of AID-initiated lesions and might thus be the most sensitive to a decrease in the AID load. By contrast, CSR is a “yes” or “no” process which might still be able to occur even when the frequency of AID lesions within downstream S region is decreased (specially in conditions with a 3'RR deletion, where DSBs still occur at high rate in the upstream S_u region.¹⁹ In addition, CSR and SHM require the activity of different parts of the AID molecule and different partners of AID, such as 14-3-3 and KAP1/HP1 in the case of CSR.²⁶ Finally, it has been demonstrated that V and S regions use different mechanisms to expose ssDNA to AID. While S regions form long R-loops due to the high level of transcription and their repetitive sequence, V regions display short patches of ssDNA that require the assembly of protein-DNA complex.²⁷ AID is, evolutionarily, the first enzyme known to improve immune diversity by SHM, and is present as early as the primordial jawed vertebrates; AID-induced CSR begins later, with the first amphibians.²⁶ Understanding differences of the pathways that contribute to CSR and SHM will help us to understand mechanisms for antibody regulation and diversity. Our present results indicate that the 3'RR regulates AID-induced SHM and CSR by different mechanisms, underline the complexity of action of this major *cis*-regulatory element and demonstrate that not only core enhancers included in the 3'RR but also the global palindromic architecture of this region are critical determinants of its function.

Material and methods

Vector construction, transfection and embryonic stem cell screening - The studies have been reviewed and approved by CNRS and University review committee. A neomycin resistance gene (*neo*^R) flanked by *loxP* sites was stuck in between 5' and 3' arms. At the 5' end, a phosphoglucokinase promoter-Herpes Simplex Virus thymidine kinase gene (Tk) was included to permit negative selection against random integration. Cells of the embryonic stem (ES) cell line E14 were transfected with linearized vector by electroporation and selected using 300 µg/ml of geneticin and 2 µg/ml of gancyclovir. The ES cell line E14 was derived from the inbred mouse strain 129. PCR analysis with primers 5' and 3' of the construct identified recombinants. ES clones showing homologous recombination were injected into C57Bl/6 blastocysts, and the resulting chimeras were mated with C57Bl/6 animals. Germline transmission in heterozygous mutant mice was checked by specific PCR. Mutant mice were mated with cre transgenic mice. The progeny was checked by PCR for the occurrence of a cre-mediated deletion of the *neo*^R gene. ΔleftPAL and ΔIRIS homozygous mice were checked by PCR. The various PCR primers used for screening the ΔleftPAL and ΔIRIS mice are reported in the supplemental Table 1.

Blood sampling - Blood samples were recovered from transgenic mice and *wt* controls with heparinised needles. Ten week-old animals were used. Plasma samples were recovered by centrifugation and stored at -20°C until used.

Spleen cell cultures for CSR and Ig determinations - Single-cell suspensions of CD43⁺ spleen cells of *wt*, ΔleftPAL and ΔIRIS mice were cultured 3 days at 1x10⁶ cells/ml in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum, 5µg/ml LPS with or without 20ng/ml IL-4, 2ng/ml TGFβ and 2 ng/ml INFγ (PeproTech, Rocky Hill, NJ).^{6,29} At day 3, 1x10⁶ cells were cultured for 24 hours in growth medium without LPS + cytokine. Supernatants were recovered and stored at -20°C until used. At day 3 cultured splenic B cells were incubated with anti-B220-SpectralRed (PC5)-labelled antibodies (Biolegend) and anti-IgG₁-, anti-IgG_{2a}-, anti-IgG_{2b}-, anti-IgG₃-,

anti-IgA- and anti-IgE-fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labelled antibodies (Southern Biotech) and analysed on a Fortessa LSR2 (Beckton-Dickinson).⁶

Real time quantitative PCR of I_x-C_x GL transcription - Three days-*in vitro* stimulated splenocytes (LPS + appropriated cytokines) were harvested and RNA was extracted for investigation of I_x-C_x transcripts. RNA and cDNA were prepared using standard techniques. Quantitative PCR was performed using power SYBR[®] green (Applied Biosystems). PCR primers used for determinations of I_x-C_x transcripts are reported in the supplemental Table 1.

Immunization - For immunization experiments, batches of 8-week-old mice were used (6 mice per genotype). The first immunization was performed with 50 µg chicken ovalbumin per animal in 50% complete Freund adjuvant and a second immunization was realized 13 days later with the same amount of antigen in 50% incomplete Freund adjuvant. Immunized mice were eye-bled at various intervals during the immunization protocol and plasma was analyzed for the presence of ovalbumin-specific IgM, IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} by ELISA.¹⁷

Antibody determinations - Specific ELISA assay were performed as previously described.^{6,17,18} ELISA assays for specific IgM, IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} were performed in polycarbonate 96 multiwell plates coated overnight at 4°C with 100 µl of 10 mg/ml ovalbumin solution in 0.05 M Na₂-CO₃ buffer. After washing, a blocking step was performed with gelatine (2 mg/ml) in PBS buffer. After washing, 50 µl assayed plasma or control plasma was diluted into successive wells in gelatine (2 mg/ml) in PBS buffer and incubated 2 hours at 37°C. The positive control consisted in a pool of plasma from ovalbumin-immunized *wt* mice (the same control plasma was used in all ELISA assay). After washing, 100 µl/well of appropriated conjugated antibodies were added and adsorbed during 2 hours at 37°C. Alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat antisera specific for mouse IgM, IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} (Southern Biotechnologies) were used at 1 µg/ml. After washing, AP activity was assayed using AP substrate and enzymatic reactions were stopped with of 3 M NaOH. The optical

density was measured at 400 nm. Diluted plasma were compared with the titration curve obtained on the same multiwell plate and allowed the quantification of ovalbumin-specific antibodies in arbitrary units. Culture supernatants and plasma from Δ leftPAL, Δ IRIS and *wt* mice were analysed for the presence of the various Ig classes (IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ and IgA) by ELISA as previously described.^{6,17,18} ELISA assays were performed in polycarbonate 96 multiwell plates, coated overnight at 4°C (100 μ l/well) with suitable capture antibodies diluted in 0.05 M Na₂CO₃ buffer (2 μ g/ml for IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}; 3 μ g/ml for IgG₃; and 4 μ g/ml for IgA). After washing, a blocking step was performed. After washing, 50 μ l of plasma (first diluted to 1:50), supernatants or isotypic standard Ig were diluted into successive wells in 1% BSA/PBS buffer and incubated for 2 hr at 37°C. The mouse standard panel included antisera specific for IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ and IgA (Southern Biotechnologies). After washing, appropriate conjugated antibodies were added and adsorbed during 2 hr at 37°C. AP-conjugated goat antisera specific for mouse Ig classes (Southern Biotechnologies) were used at 1 μ g/ml for IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, and IgG₃, or at 2 μ g/ml for IgA. After washing, AP activity was assayed on AP substrate, and blocked with addition of 3 M NaOH. Optic density was then measured at 400 nm.

ChIP experiments – Mice immunizations were performed orally with sheep red blood cells for 2 weeks and intraperitoneally with 10 μ g LPS for 1 week. ChIP experiments were done on freshly isolated Peyer's patches cells as previously described.⁸ In brief, 4x10⁶ B cells were cross-linked at room temperature for 15 min in 15ml PBS with 1% formaldehyde. The reaction was quenched with 0.125M glycine. After lysis, chromatin was sonicated to 0.5-1 kb using a Vibracell 75043 (Thermo Fisher Scientific). After dilution in ChIP buffer (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl, pH 8.1, and 167mM NaCl), chromatin was precleared by rotating for 2 h at 4°C with 50 ml of 50% protein A/G slurry (0.2 mg.ml⁻¹ sheared salmon sperm DNA, 0.5 mg.ml⁻¹ BSA, and 50% protein A/G; Sigma).

0.1x10⁶ cell equivalents were saved as input, and 2x10⁶ cell equivalents were incubated overnight with anti-AID or control antibodies. Immune complexes were precipitated by the addition of protein A/G. Cross-linking was reversed by overnight incubation (70°C) in TE buffer with 0.02% SDS and chromatin was phenol/chloroform extracted. Anti-AID antibodies were kindly provided by Dr. P. Gearhart. PCR primers are detailed in the supplementary Table 1.

IgH primary transcription analysis - Total RNA was phenol chloroform-extracted from 5x10⁵ B cells from freshly isolated peyers patches, in mice previously stimulated as described above for SHM analysis. Real-time PCR was performed in duplicate by using TaqMan assay reagents and analyzed on a StepOnePlus™ RT PCR system (Applied Biosystems). IgH primary transcripts (probe located in the intron between the last JH and the intronic E_μ enhancer) were studied as previously reported.³⁰ Forward primer, 5'-TTCTGAGCATTGCAGACTAATCTTG-3'; reverse primer, 5'CCTAGACAGTTTATTTCCCAACTTCTC-3'; and probe, 5'-CCCTGAGGGAGCCG-3'. κ primary transcripts (probe located in the intron between the last Jκ and the intronic enhancer E_{i κ}): κ forward primer, 5'-ACCCCGCGGTAGCA-3'; κ reverse primer, 5'-TCCTATCACTGTGCCTCAGGAA-3'; and probe, 5'-CCCTTGCTCCGCGTGGACCA-3'. Aicda transcripts were also analyzed (reference Mm01184115-m1) and GAPDH was used for normalization of gene expression levels (reference Mm99999915-g1).

Sequencage - Mice were immunized orally with sheep red blood cells for 2 week and intraperitoneally with 10 μg LPS for 3 day. Single-cell suspensions from Peyer's patches were labeled with B220-APC-, GL7-FITC-, and Fas-PE-conjugated antibodies. Purification of B220⁺GL7⁺Fas⁺ cells was realized on a FACS ARIA III (BD). Genomic DNA was extracted, and a region corresponding to a sequence of 517 bp downstream of the J_{H4} segment was amplified by PCR. As a control, Igκ light chain VJ-rearranged fragments were also amplified.

Primers (detailed in sup. Table 1) were coupled to 454 Sequencing adaptor sequences and PCR was done using the program previously reported.⁸ According to the manufacturer, the resulting purified amplicons were prepared for sequencing with a GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-A) (Roche), and the library of DNA fragments was sequenced on a 454 GS Junior instrument (Roche). Obtained sequences were aligned to the reference sequence using BWA aligner,³¹ and SAMtools software was used to obtain BAM files.³² Redundant sequences were excluded, and wig files were generated using IGV Tools,³³ and manually analyzed to determine mutation frequencies for each nucleotide in the sequence.

Online supplemental material - Table S1

Acknowledgments - This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (PJA 20141201649), Ligue Contre le Cancer (comité de la Corrèze), and “Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud”. This work was not supported by ANR grants. We acknowledge the technological expertise Rémi Moulinas and Emilie Guerin from the GENOLIM platform of the Limoges University (France). We thank S. Desforges and B. Remerand for help with animal care. We thank Dr. P. Gearhart for sending us anti-AID antibodies.

Contribution section - A. Saintamand, A. Garot, P. Rouaud, C. Vincent-Fabert, M. Cogné and Y. Denizot actively participated to the experimental design of the study. Z Oruc generated transgenic mice. M. Cogné and Y. Denizot participated to the scientific discussion for manuscript writing, obtained financial grants and agreement of the ethic committee of our institution to perform the study.

Conflict of interest – None

References

1. Henderson, A, and K Calame. 1998. Transcription regulation during B cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 16:163-200.
2. Pinaud, E., M. Marquet, R. Fiancette, S. Péron, C. Vincent-Fabert, Y. Denizot, and M. Cogné. 2011. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110:27-70.
3. Perlot, T., F.W. Alt, C.H. Bassing, H. Suh, and E. Pinaud. 2005. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 42:14362-14367.
4. Marquet, M., A. Garot, S. Bender, C. Carrion, P. Rouaud, S. Lecardeur, Y. Denizot, M. Cogné, and E. Pinaud. 2014. The E μ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response in vivo. *J. Immunol.* 193:1171-1183.
5. Saintamand, A., P. Rouaud, A. Garot, F. Saad, C. Carrion, C. Oblet, M. Cogné, E. Pinaud, and Y. Denizot. 2015. The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget* 6:4845-4852.
6. Vincent-Fabert, C., R. Fiancette, E. Pinaud, V. Truffinet, N. Cogné, M. Cogné, and Y. Denizot. 2010. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 116:1895-1898.
7. Rouaud, P., A. Saintamand, F. Saad, C. Carrion, S. Lecardeur, M. Cogné, and Y. Denizot. 2014. Elucidation of the enigmatic IgD class switch recombination via germ-line deletion of the IgH 3' regulatory region. *J. Exp. Med.* 211:975-985.

8. Péron, S., B. Laffleur, N. Denis-Lagache, J. Cook-Moreau, A. Tinguely, L. Delpy, Y. Denizot, E. Pinaud, M. Cogné. 2012. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain “locus suicide recombination” in B cells. *Science* 336:931-934.
9. Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, A. Saintamand, R. Fiancette, M. Marquet, I. Robert, B. Reina-San-Martin, E. Pinaud, M. Cogné, and Y. Denizot. 2013. The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J. Exp. Med.* 210:1501-1507.
10. Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, R. Fiancette, M. Cogné, E. Pinaud, and Y. Denizot. 2012. Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* 287:8356-8360.
11. Medvedovic, J., A. Ebert, H. Tagoh, I.M. Tamir, T.A. Schwickert, M. Novatchkova, Q. Sun, P.J. Huis In 't Veld, C. Guo, H.S. Yoon, Y. Denizot, S.J.B. Holwerda, M. Cogné, Y. Shi, F.W. Alt, and M. Busslinger. 2013. Flexible long-range loops in the VH gene region of the Igh locus that likely facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity* 39:229-244.
12. Braikia, F.Z., C. Conte, M. Moutahir, Y. Denizot, M. Cogné, and A.A. Khamlichi. 2015. A developmental switch in the transcriptional activity of a long-range regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* [Epub ahead of print].
13. Chauveau, C., and M. Cogné. 1996. Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nature Genet.* 14:15-16.
14. Chauveau, C., C. Decourt, and M. Cogné. 1998. Insertion of the IgH locus 3' regulatory palindrome in expression vectors warrants sure and efficient expression in stable B cell transfectants. *Gene* 222:279-285.

15. D'addabbo, P., M. Scascitelli, V. Giambra, M. Rocchi, and D. Frezza. 2011. Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1,2 within the palindrome of IgH 3' regulatory region. *BMC Evol. Biol.* 11:71.
16. Vincent-Fabert, C., V. Truffinet, R. Fiancette, N. Cogné, M. Cogné, and Y. Denizot. 2009. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J. Immunol.* 182:6926-6932.
17. Le Morvan, C., E. Pinaud, C. Decourt, A. Cuvillier, and M. Cogné. 2003. The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* 102:1421-1427.
18. Pinaud, E., A.A. Khamlichi, C. Le Morvan, M. Drouet, V. Nalesso, M. Le Bert, and M. Cogné. 2001. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* 15:187-199.
19. Saintamand, A., P. Rouaud, F. Saad, G. Rios, M. Cogné, and Y. Denizot. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. 2015. *Nature Commun.* 6:7084.
20. Pefanis, E, J. Wang, G. Rothschild, J. Lim, D. Kazadi, J. Sun, A. Federation, J. Chao, O. Elliott, Z.P. Liu, A.N. Economides, J.E. Bradner, R. Rabadan, and U. Basu. 2015. RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell* 161:774–789.
21. Cogné, M., R. Lansford, A. Bottaro, J. Zhang, J. Gorman, F. Young, H.L. Cheng, and F.W. Alt. 1994. A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* 77:737-747
22. Manis, J.P., N. van der Stoep, M. Tian, R. Ferrini, L. Davidson, A. Bottaro, and F.W. Alt. 1998. Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J. Exp. Med.* 188:1421-1431.

23. Bébin, A.G., C. Carrion, M. Marquet, N. Cogné, S. Lecardeur, M. Cogné, and E. Pinaud. 2010. In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol.* 184:3710-3717.
24. Zhang, Z.Z., N.R. Pannunzio, L. Han, C.L. Hsieh, K. Yu, and M.R. Lieber. 2014. The strength of an Ig switch region is determined by its ability to drive R loop formation and its number of WGCW sites. *Cell Report* 8:557-569.
25. Kato, Y.P., W.C. Hsieh, S.T. Hung, C.W. Huang, M.R. Lieber, and F.T. Huang. 2013. Detection and characterization of R-loops at the murine immunoglobulin S α region. *Mol. Immunol.* 54:208-216.
26. Cogné, M. 2013. Activation-induced deaminase in B lymphocyte maturation and beyond. *Biomed J* 36:259-268.
27. Ronai, D., M.D. Iglesias-Ussel, M. Fan, Z. Li, A. Martin, and M.D. Scharff. 2007. Detection of chromatin-associated single-stranded DNA in regions targeted for somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* 204:181-190.
28. Kato, L., A. Stanlie, N.A. Begum, M. Kobayashi, M. Aida, and T. Honjo. 2012. An evolutionary view of the mechanism for immune and genome diversity. *J. Immunol.* 188:3559-3566.
29. Truffinet, V., E. Pinaud, N. Cogné, B. Petit, L. Guglielmi, M. Cogné, and Y. Denizot. 2007. The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol.* 179:6033-6042.
30. Tinguely, A., G. Chemin, S. Péron, C. Sirac, S. Reynaud, M. Cogné, and L. Delpy. 2012. Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol. Cell. Biol.* 32:107-117.

31. Li, H. 2013. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. arXiv:1303.3997v1 [q-bio.GN].
32. Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin, and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078-2079
33. Thorvaldsdóttir, H., J.T. Robinson, and J.P. Mesirov. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* 14:178-192.

Legends to Figures

Figure 1: Generation of Δ leftPAL and Δ IRIS mice

Upper part (A+B): generation of Δ leftPAL mice. A: Gene-targeting vector was constructed in order to replace the genomic fragment encompassing the hs3a+hs1,2 part of the 3'RR with a *loxP/neo^R* gene cassette in ES cells. Mutant ES clones allowed the derivation of Neo mutant mice. Neo mutant mice allowed the derivation of Δ leftPAL animals after cre-deletion of the *neo* gene. B: A specific PCR was performed to ensure correct 5' recombination (P1+P2) (amplicon of 3.7 kb) in ES cells. A specific PCR was performed to ensure correct 3' recombination (P3+P4) (amplicon of 10 kb) in ES cells. A specific PCR was performed to ensure correct Cre recombination (P5+P6) (amplicon of 2 kb vs 0.5 kb after Cre deletion) in Neo mutant mice. A specific PCR was performed to ensure homozygous Δ leftPAL mice (P9+P10) (lack of a 0.2 kb amplicon). Lower part (C+D): Generation of Δ IRIS mice. C: Same protocol that in the upper part except that the *loxP/neo^R* gene cassette reintroduced inverted hs3a and hs1,2 enhancers. D: A specific PCR was performed to ensure correct 5' recombination (P1+P2) (amplicon of 3.7 kb) in ES cells. A specific PCR was performed to ensure correct 3' recombination (P3+P4) (amplicon of 10 kb) in ES cells. A specific PCR was performed to ensure correct Cre recombination (P5+P6) (amplicon of 3 kb vs 1.4 kb after Cre deletion) in Neo mutant mice. A specific PCR was performed to ensure homozygous Δ IRIS mice (P7+P8) (lack of a 0.15 kb amplicon).

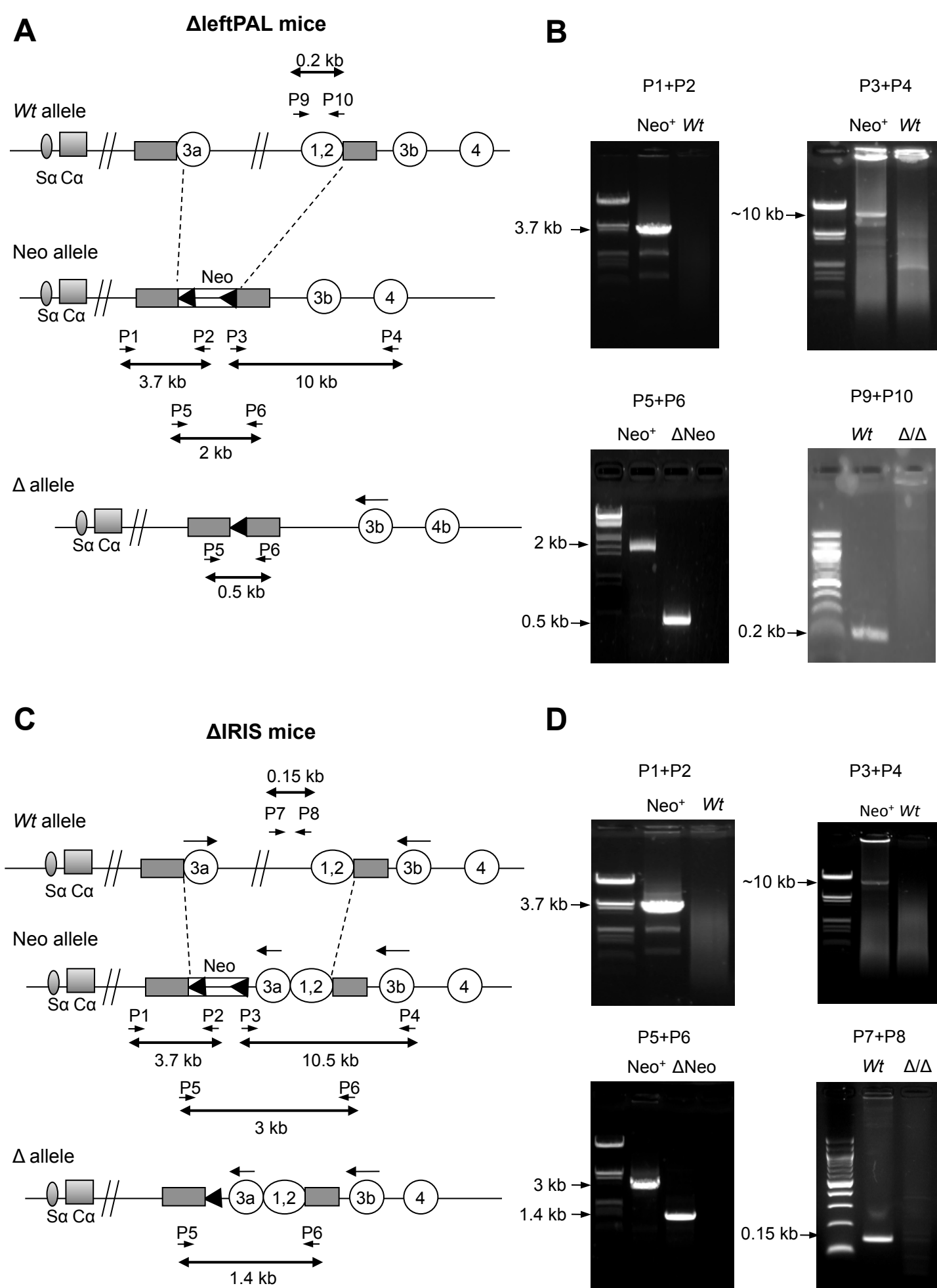


Figure 1

Figure 2: Influence of the 3'RR palindrome on SHM.

A: SHM in V_H regions of Δ leftPAL, Δ IRIS and *wt* mice. Mice were immunized orally with sheep red blood cells for 2 week and intraperitoneally with 10 μ g LPS for 3 days. B220⁺GL7⁺Fas⁺ cells from Peyer's patches were sorted, pooled and extracted DNA was amplified by PCR and submitted to high throughput sequencing to evaluate SHM. V_H SHM values were normalised to Jk5 SHM values. Mean values from 6 mice for all genotypes were reported. B: SHM were found all along the analysed 3'J_{H4} DNA segment and hot spot of mutations were evidenced in both genotypes. Same mice as in Fig. 1A. C: The proportion of transitions and transversions did not significantly differ between *wt*, Δ leftPAL and Δ IRIS mice. Same mice as in Fig. 1A. D: IgH, Ig κ and AICDA transcription in Δ leftPAL, Δ IRIS and *wt* mice. Mice were immunized orally with sheep red blood cells for 2 week and intraperitoneally with 10 μ g LPS for 3 days. Peyer's patche cell RNA was extracted and transcripts were amplified by real-time PCR. Data are the mean \pm SEM of 6 independent experiments with 1 mouse per genotype. * p <0.05 and ** p <0.001 (Mann-Whitney *U*-test for significance). Values were normalized to GAPDH transcripts. E: Left part - ChIP analysis of AID recruitment in V_H regions in Δ leftPAL, Δ IRIS and *wt* mice. Same mice as in Fig. 1D. Background ChIP signals from mock samples with irrelevant antibody were subtracted. ChIP AID values were normalized to the total input DNA. Data are the mean \pm SEM of 3 independent experiments with DNA pooled from 2 mice. * p <0.05 (Mann-Whitney *U*-test). ChIP experiments were done in A and B locations.

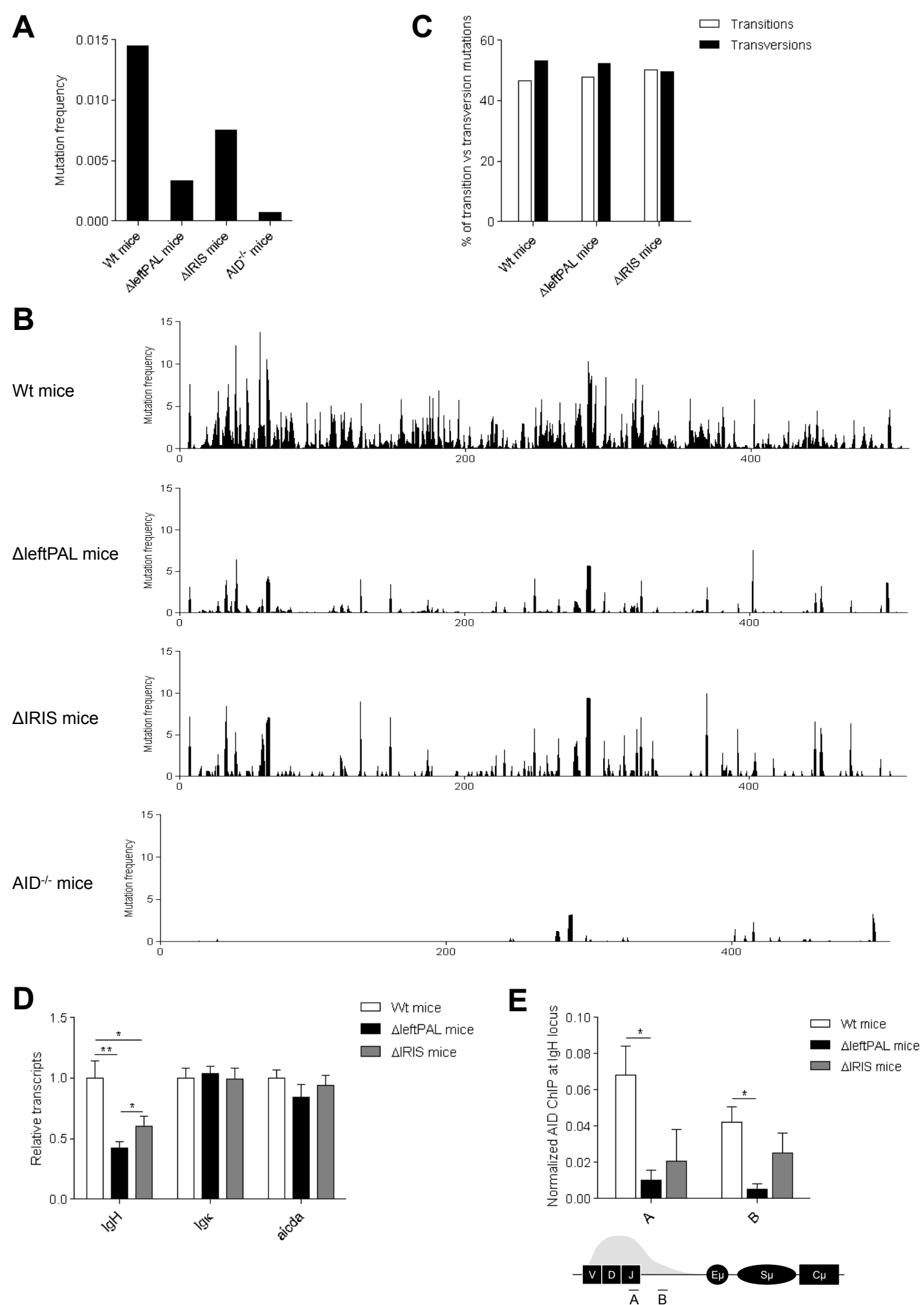


Figure 3: Influence of the 3'RR palindrome on GLT and CSR.

A: GLT in B splenocytes of Δ leftPAL, Δ IRIS and *wt* mice. Cells were stimulated with LPS \pm IL-4, INF γ and TGF β for 2 days. I γ ₁-C γ ₁, I γ _{2a}-C γ _{2a}, I γ _{2b}-C γ _{2b}, I γ ₃-C γ ₃ and I α -C α GL transcription was investigated by real-time PCR. Mean \pm SEM of 6 independent experiments with 1 mouse. **p*<0.05 and ****p*<0.0001 (Mann-Whitney *U*-test for significance). Values were normalized to GAPDH transcripts

B: CSR in B splenocytes of Δ leftPAL, Δ IRIS and *wt* mice. Cells were stimulated with LPS \pm IL-4, INF γ and TGF β for 3 days. Cells were then labelled with anti-B220-APC antibodies and anti-IgG₁-, anti-IgG_{2a}-, anti-IgG_{2b}-, anti-IgG₃- and anti-IgA-FITC antibodies. One representative experiment out of six (one mouse per experiment) is shown.

C: Mean \pm SEM of 6 independent experiments of CSR with 1 mouse. **p*<0.05 and ***p*<0.001 (Mann-Whitney *U*-test for significance).

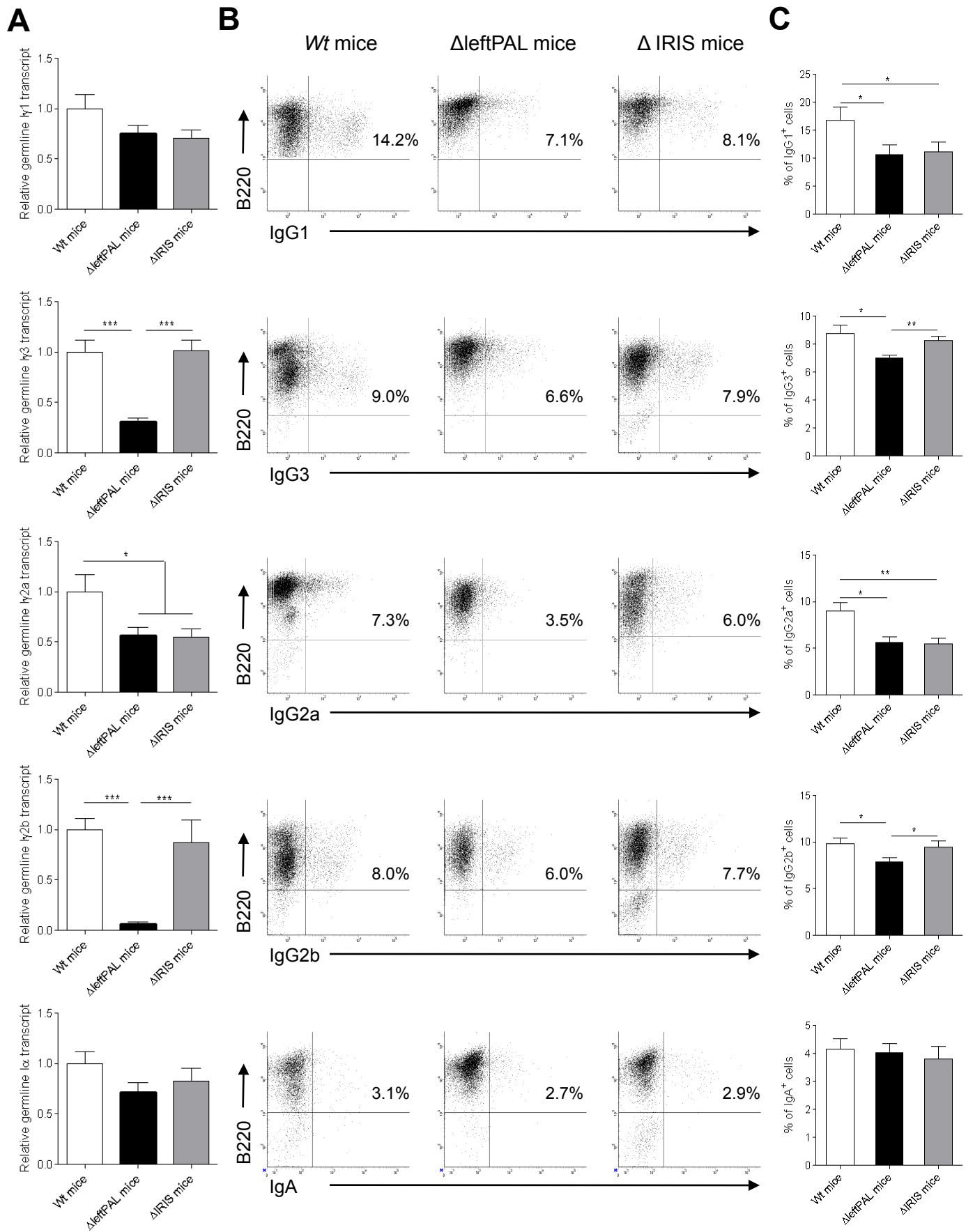


Figure 3

Figure 4: Influence of the 3'RR palindrome on BCR expression and B cell fate.

A: Flow cytometry analysis of transitional (TR) B cells (AA4.1⁺), follicular (FO) B cells (CD21^{low}CD23^{high}) and marginal zone (MZ) B cells (CD21^{high}CD23^{low}). One representative experiment out of 5 is shown. B: TR, FO and MZ B cells expressing the *a* or *b* allele in $a^{\Delta\text{leftPAL}}/b^{wt}$, $a^{\Delta\text{IRIS}}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment out of 5 is shown (left part). Mean \pm SEM of 5 mice for all genotypes (right part). C: Mean \pm SEM of membrane IgM densities on TR, FO and MZ B cells expressing the *a* or *b* allele in $a^{\Delta\text{leftPAL}}/b^{wt}$, $a^{\Delta\text{IRIS}}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. D: Flow cytometry analysis of plasmablasts (B220⁺CD138⁺) in spleen of homozygous $a^{\Delta\text{leftPAL}}/b^{wt}$, $a^{\Delta\text{IRIS}}/b^{wt}$ and a^{wt}/b^{wt} mice. One representative experiment out of 3 is shown. E: Expression of IgM on plasmablasts of homozygous $\Delta\text{leftPAL}$, ΔIRIS and *wt* mice. One representative experiment out of 3 mice is shown.

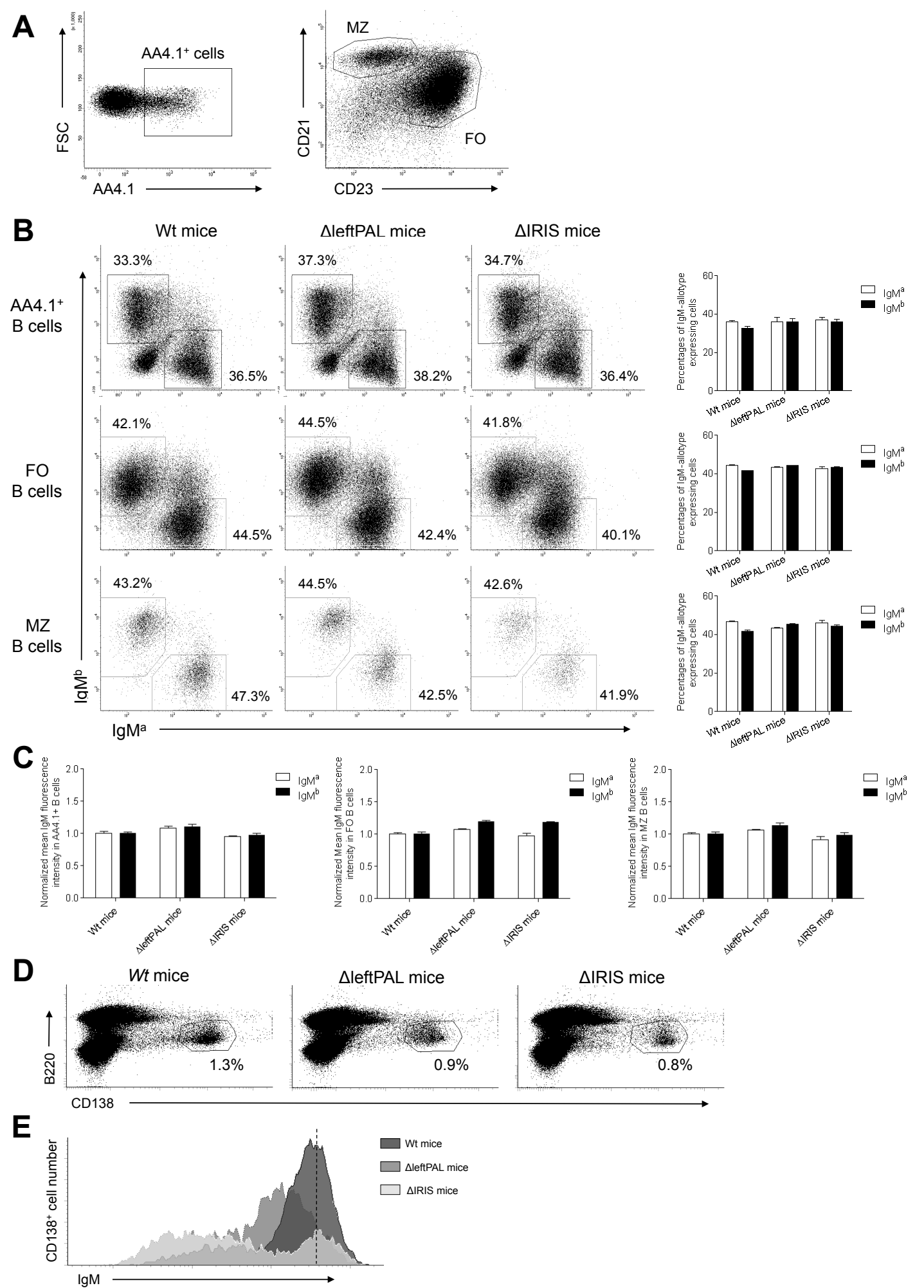


Figure 4

Figure 5: Influence of the 3'RR palindrome on Ig synthesis.

A: ELISA analysis of IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ and IgA in supernatants of LPS ± IL-4, INF γ and TGF β stimulated splenocytes of Δ leftPAL, Δ IRIS and *wt* mice. Data are the mean \pm SEM of 8 experiments with 1 mouse. * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 (Mann-Whitney *U*-test for significance). B: ELISA analysis of IgM, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃ and IgA in plasma of 10 Δ leftPAL, 9 Δ IRIS mice and 18 *wt* mice (8-weeks-old). Mean \pm SEM. * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 (Mann-Whitney *U*-test for significance). C: Ovalbumin-specific IgM, IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b}. Antibody levels, detected by ELISA, are expressed in arbitrary units by comparison with control plasma values. Time after immunization is indicated in days. Each point is the mean \pm SEM of plasma determinations from 6 mice for each genotype. One representative experiment out of two is shown.

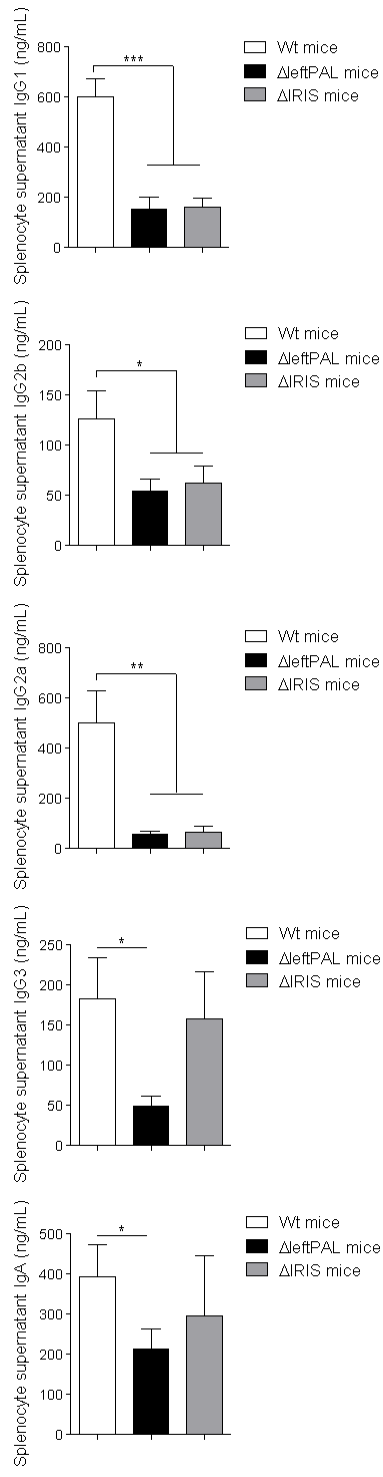
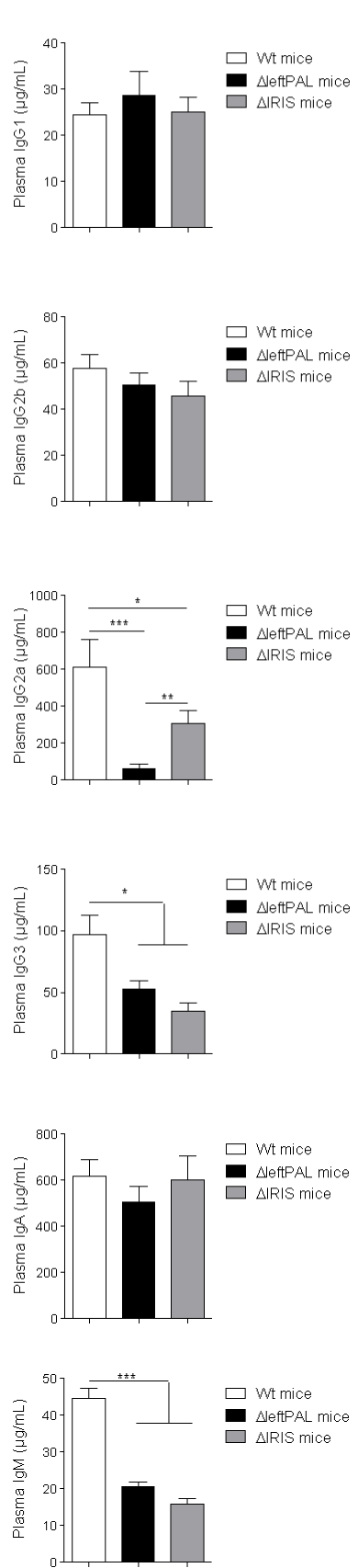
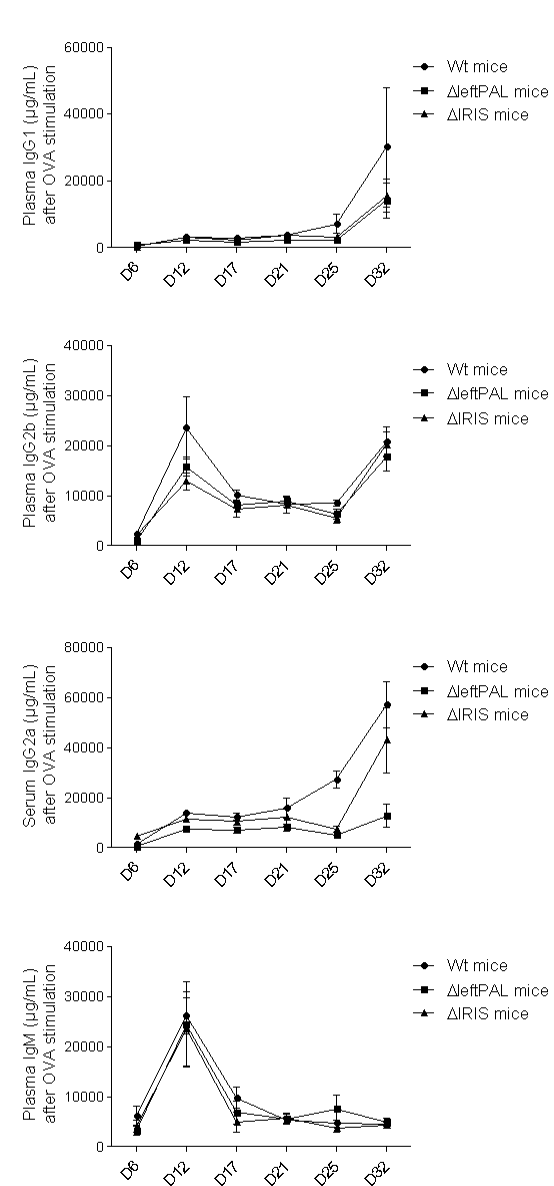
A**B****C****Figure 5**

Table S1 shows the PCR primers for the screening of DleftPAL and DIRIS mice, for real-time PCR analysis and sequencing.

Screening

P1	5' GGA GGG AGA AAT ACC ACC 3'	
P2	5' AGC ACG TAC TCG GAT GGA AG 3'	
P3	5'GTG CAA TCC ATC TTG TTC AAT GGC CGA TCC 3'	
P4	5' CGG CTC TAA CAA CTG GGT CCT GTA C 3'	
P5	5' GGT TAA TCA GTT GGG GCT GA 3'	
P6	5' AGG TGC ATG ACA GGG TAA GG 3'	
P7	5' GGT GAC ATT AAG CTT GGG GAT A 3'	
P8	5' CCC TGA GAG GTT TCA CAT TTT C 3'	
P9	5' ACC ACT GCT GGA ATC TGA CC 3'	
P10	5' CAG GCC AAG ACT TTT CCA GT 3'	

SHM analysis

VHJ558 SHM	5' CAG CCT GAC ATC TGA GGA CTC TGC 3'	
SHM H4 3'	5' CAG CAA CTA CCC TTT TGA GAC CGA 3'	

ChIP analysis

ChIP A Fw	5' CAG TCT CCT CAG GTG AGT CCT 3'	Maul et al, 2014
ChIP A Rev	5' CCC AAT GAC CCT TTC TGA CT 3'	
ChIP B Fw	5' GGA GAG CTG TCT TAG TGA TTG AGT CAA GGG 3'	
ChIP B Rev	5' GTG TTC CTT TGA AAG CTG GAC 3'	

GLT Analysis

I μ -C μ -Fwd	5-ACCTGGGAATGTATGGTTGTGGCTT-3	Park et al, 2009
I μ -C μ -Rev	5 -TCTGAACCTTCAAGGATGCTCTTG-3	
I γ 3-C γ 3-Fwd	5 -AACTACTGCTACCACCACCAG-3	
I γ 3-C γ 3-Rev	5 -ACCAAGGGATAGACAGATGGGG-3	
I γ 1-C γ 1-Fwd	5 -GGCCCTTCCAGATCTTTGAG-3	
I γ 1-C γ 1-Rev	5 -ATGGAGTTAGTTTGGGCAGCA-3	
I γ 2b-C γ 2b-Fwd	5 -CCAACCAGGAAGAGTCCAGAG-3	
I γ 2b-C γ 2b-Rev	5 -ACAGGGATCCAGAGTTCCAAGT-3	
IG γ a-C γ 2a-Fwd	5 -GCTGATGTACCTACCGAGAGA-3	
I γ 2a-C γ 2a-Rev	5 -GCTGGGCCAGGTGCTCGAGGTT-3	
I α -C α Fw	5-CTACCATAGGGAAGATAGCCT-3	Park et al, 2005
I α -C α -Rev	5-TAATCGTGAATCAGGCAG-3	

Manuscrit 3

Pre-germinal center origin for mature mouse B cell lymphomas: a major discrepancy with human mature lymphomas.

Alexis Saintamand, Armand Garot, Faten Saad and Yves Denizot.

Soumis pour publication à *Cell cycle*

De nombreux lymphomes humains ont pour origine une dérégulation des mécanismes mis en jeu au cours du développement B. Ainsi, des recombinaisons peuvent se produire dans les régions où des cassures doubles brins sont nécessaires lors de processus physiologiques : les régions VDJ et les régions switch. Ces régions se retrouvent impliquées lors des translocations d'oncogènes.

Nous savons maintenant que les éléments régulateurs des loci d'Ig sont indispensables lors de l'ontogénie B. Ces activateurs sont mis en jeu lors des translocations d'oncogènes et participent à leur dérégulation conduisant à la formation de lymphomes. Les études confirment l'implication des éléments régulateurs aux loci d'Ig dans la lymphomagenèse (Kovalchuk et al., 2000; Langdon et al., 1986; Truffinet et al., 2007).

Dans un modèle murin où le gène *c-myc* humain est mis sous le contrôle des éléments régulateurs du locus lambda ($Ig\lambda$ -myc), on observe un développement spontané de lymphomes matures de types Burkitt. De plus, nous savons que dans les lymphomes B humains de type B mature les gènes actifs dans les centres germinatifs (tels que *Bcl6*) ou les oncogènes « transloqués » sont ciblés par AID.

Lorsque les souris $Ig\lambda$ -myc sont croisées avec des animaux déficients pour la 3'RR (Saad et al., 2015) les auteurs remarquent que la proportion de lymphomes B matures diminue au profit de lymphomes B de type immature. Connaissant l'implication de la région régulatrice en 3' du locus IgH dans les processus de SHM et CSR (Vincent-Fabert et al., 2010a; Rouaud et al., 2013), nous avons vérifié si les mutations induites par AID dans les lymphomes étaient influencées par la 3'RR.

Nous avons étudié les fréquences de mutations des gènes *c-myc* endogène (murin) et transloqué (humain) ainsi que celle du gène *Bcl6*. Ces deux gènes sont des cibles de AID dans les lymphomes B humains. Ces analyses sont menées à partir de cellules issues de lymphomes B immatures ($B220^+ C-kit^+$) ou matures ($B220^+ IgM^+ IgD^+$) dans un contexte sauvage ou déficient pour la 3'RR ; les mutations sont comparés à celles obtenues dans des cellules non tumorales matures ($B220^+ IgM^+$).

Cette étude a été réalisée par séquençage haut-débit, nous avons également vérifié la transcription de *Aicda* (gène codant AID). Dans cette étude, j'ai participé à la mise au point

Annexes

du séquençage haut-débit, à l'étude de la transcription et à l'analyse des données. J'ai participé à la rédaction de l'article.

Pre-germinal center origin for mature mouse B cell lymphomas: a major discrepancy with human mature lymphomas.

Alexis Saintamand^{*1}, Armand Garot^{*1}, Faten Saad¹, Yves Denizot¹

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

*These authors contributed equally

Address correspondence : Dr. Yves Denizot, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7276, Laboratoire d'Immunologie, 2, rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France. E-mail address: yves.denizot@unilim.fr

During the different stages of their development, B lymphocytes undergo several genetic events such as V(D)J recombination, somatic hypermutation (SHM) and class switch recombination (CSR) in their immunoglobulin light (IgL) and heavy (IgH) chain loci.¹ Ongoing recombination and mutations make the Ig loci hotspots for oncogene translocation. Indeed, many lymphomas are induced by oncogenes (bcl2, cyclin D1, cyclin D3, c-maf, c-myc...) translocations to the Ig loci.² These loci are controlled by *cis*-regulatory elements that regulate both transcription of the Ig genes and induction of the genetic events, making them critical elements in the context of lymphomagenesis.¹ Among them, the most important oncogen-driven *cis*-regulatory elements are the IgH 5'E μ enhancer, the four enhancers of the IgH 3' regulatory regions (3'RR), and the E κ enhancer of the Ig κ locus. Although less studied, transcriptional enhancers are also present in the Ig λ locus.³

Animal models demonstrated that translocation of an oncogene under the transcriptional control of one of these enhancers promotes B cell malignancies.³⁻⁸ However, these translocations are not sufficient to induce transformation since tumors require additional "hits" to develop. The role of the activation-induced cytidine deaminase (AID) that target thousand loci on the B cell genome is suspected.^{2,9} In human mature B cell lymphomas both germinal center-associated genes such as bcl6 and the translocated oncogene bear stigmata of AID targeting.² By using a mouse model (λ -MYC mice)³ mimicking the translocation of a human c-myc under the transcriptional control of mouse Ig λ enhancers we have suggested that these additional hits would be influenced by the 3'RR,^{10,11} through its AID-driven action during SHM,¹² and CSR.¹³ Indeed, λ -MYC-derived lymphomas exhibited a marked reduction of their degree of maturity in a 3'RR-deficient background.¹⁰ To asses this hypothesis we have investigated in our collection of mouse lymphomas the occurrence of SHM in c-myc (both endogenous and translocated) and bcl6 genes, two well known AID-targeted genes in human B cell lymphomas.²

We first looked for mutations that could explain the transcriptional burst of the translocated *c-myc* in λ -MYC mice.¹⁰ Immature (B220⁺CD117⁺) and mature (B220⁺IgM⁺IgD⁺) B cell lymphomas were investigated and compared with pre-malignant mature splenic B cells (B220⁺IgM⁺). Using high throughput sequencing (primers are located in Fig. 1A), we could not find a significant amount of mutation neither in the translocated human *c-myc* or in the endogenous mouse *c-myc* both in immature and mature lymphomas; irrespectively of the presence of a functional 3'RR (Fig. 1B). We next searched for mutations in *bcl6*, a germinal center associated protein frequently AID-mutated in human B cell lymphomas.² Surprisingly, we found that *bcl6* was unmutated in mouse B cell lymphomas (even with a mature phenotype) (Fig. 1B) and that *bcl6* transcript levels were dramatically lowered compared to *wt* mature splenic B cell levels (Fig. 1C). The lack of a functional 3'RR did not affect B cell lymphoma *bcl6* transcript levels. Taken altogether these results evidenced no AID-induced stigmata in mouse B cell lymphomas. Strengthening this hypothesis, lowered AID transcript levels were found in both immature and mature mouse B cell lymphomas (with or without a 3'RR) as compared to *wt* splenic B cells (Fig. 1D).

The present data indicate that the marked reduction of the degree of maturity in B cell lymphomas of 3'RR-deficient λ -MYC mice is not linked to reduced AID-induced *myc* and AID-induced *bcl6* mutations. The molecular mechanisms controlling this maturity shift remain unclear. Recently, the 3'RR was reported to control μ chain transcription and the B cell fate.¹⁴ Differences in BCR signaling (strength, timing and/or cooperation with accessory molecules) might be suggested to explain the change in lymphoma maturity in 3'RR-deficient mice. Strengthening this hypothesis the class-specific BCR tonic signal was reported to modulate lymphomagenesis in a *c-myc* deregulation transgenic model.¹⁵ The presence of low AID and *bcl6* transcript levels associated with the previously reported unmutated IgH V gene status of these lymphomas,^{3,9} clearly indicated their pre-germinal center cell origin. Of

interest, such a pre-germinal center cell origin has been already postulated for B lymphomas from iMyc^{Eμ} mice,⁷ and c-myc-3'RR mice.⁴ It is interesting to note that the vast majority of human mature B cell lymphomas arise from a cell with a post-germinal center origin (high bcl6 and high AID expressions associated with myc, bcl6 and V_H gene mutations).² SHM is suggested to contribute to pathogenesis in human by introducing additional mutations (hits) in key cell cycle regulatory genes. Clearly this tumoral route is difficult to model in mice even with mice bearing mini-locus construction mimicking oncogene translocation to IgH and IgL locus highlighting that the mechanisms of mature lymphoma progression in mice and human should be compared cautiously.

Conflict of interest: Authors have no conflict of interest to disclose.

Acknowledgments - This work was supported by grants from Conseil Régional du Limousin, Association pour la Recherche sur le Cancer (PJA 20141201649), Ligue Contre le Cancer (comité de la Corrèze) and “Lions Club de la Corrèze, Zone 33 district 103 Sud”. We acknowledge the technological expertise of Emilie Guerin and Rémi Moulinas (GENOLIM platform, Limoges University) for high throughput sequencing.

References

1. Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y, *et al.* The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol* 2011; **110**: 27-70.
2. Robbiani DF, Nussenzweig MC. Chromosome translocation, B cell lymphoma, and activation-induced cytidine deaminase. *Ann Rev Pathol Mech Dis* 2013; **8**: 79-103.

3. Kovalchuk AL, Qi CF, Torrey TA, Taddesse-Heath L, Feigenbaum L, Park SS, *et al.* Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med* 2000; **192**: 1183-1190.
4. Truffinet V, Pinaud E, Cogné N, Petit B, Guglielmi L, Cogné M, *et al.* The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J Immunol* 2007; **179**: 6033-6042.
5. Rouaud P, Fiancette R, Vincent-Fabert C, Magnone V, Cogné M, Dubus P, *et al.* Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53+/- mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget* 2012; **3**: 586-593.
6. Wang J, Boxer LM. Regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain gene 3'-enhancers induce c-myc deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 12766-12773.
7. Zhu D, Qi CF, Morse III HC, Janz S, Stevenson FK. Deregulated expression of the *Myc* cellular oncogene drives development of mouse "Burkitt-like" lymphomas from naïve B cells. *Blood* 2005; **105**: 2135-2137.
8. Park SS, Kim JS, Tessarollo L, Owens JD, Peng L, Han SS, *et al.* Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res* 2005; **65**: 1306-1315.
9. Laffleur B, Denis-Lagache N, Péron S, Sirac C, Moreau J, Cogné M. AID-induced remodelling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* 2014; **15**: 1118-1131.
10. Saad F, Saintamand A, Cogné M, Denizot Y. The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Igλ-Myc mice. *Oncotarget* 2015 Apr 29 [Epub ahead of print].

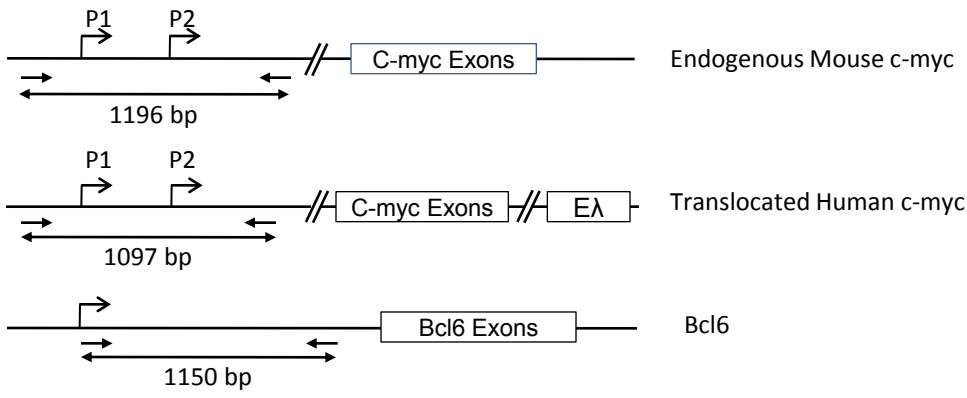
11. Saintamand A, Saad F, Denizot Y. A new 3'RR regulatory role during lymphomagenesis. *Cell Cycle* 2015; **14**: 1-2.
12. Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I, *et al.* The IgH 3' regulatory region controls AID-induced somatic hypermutation in germinal centre B-cells in mice. *J Exp Med* 2013; **210**: 1501-1507.
13. Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M, *et al.* Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 2010; **116**: 1895-1898.
14. Saintamand A, Rouaud P, Garot A, Saad F, Carrion C, Oblet C, *et al.* The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget* 2015; **6**: 4845-4852.
15. Amin R, Marfak A, Pangault C, Oblet C, Chanut A, Tarte K, *et al.* The class-specific BCR tonic signal modulates lymphomagenesis in a *c-myc* deregulation transgenic model. *Oncotarget* 2014; **15**: 8995-9006.

Legend to Figure 1

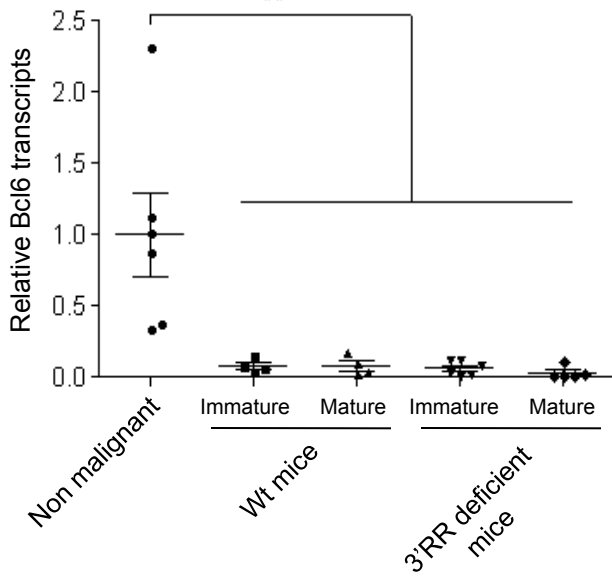
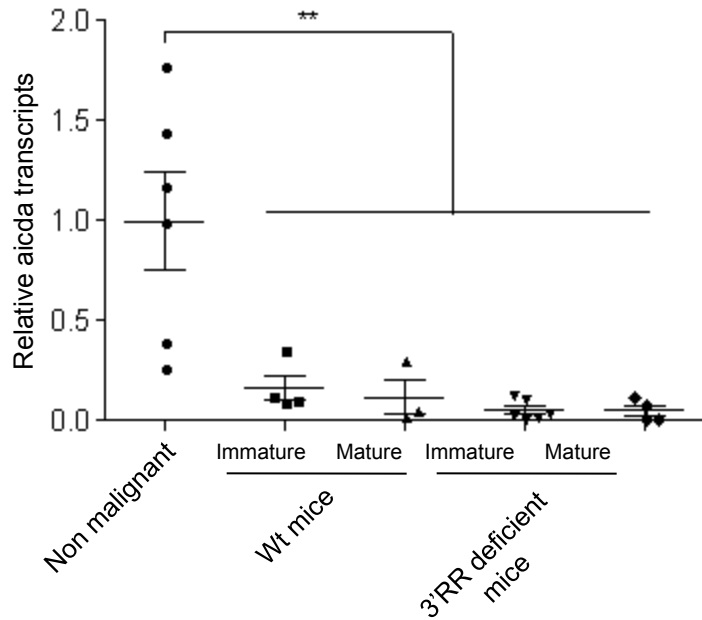
A: Location of primers for B cell lymphoma sequencing. Mouse Bcl6-for 5'-GGCCGGACACCAGGTGATTAT-3'; Mouse Bcl6-rev 5'-AGGGAGGGAACTACCGCTGAG-3'; Mouse myc-for 5'-CGGGGGCTCCTAGATAACTC-3'; mouse-myc-rev 5'-GACCACCAGATCTGTGCTTA-3'; human myc-for 5'-TAGGCGCGCGTAGTTAATTC-3'; human myc-rev 5'-GATATGCGGTCCCTACTCCA-3'. Sizes of amplicons are indicated.

B: Mutations in mouse Bcl6, mouse myc and human myc in mouse B cell lymphomas. 12 λ -MYC B cell lymphomas (6 mature and 6 immature lymphomas) and 12 λ -MYC 3'RR-

deficient mice B cell lymphomas (6 matures and 6 immature lymphomas) were investigated. After specific amplification (PrimeSTAR Max DNA Polymerase, Takara) and library constructions (Ion Xpress Plus and Ion Plus Fragment Library Kits, life technologies), libraries were sequenced on an Ion Torrent system. n: number of samples. C: Real-time PCR analysis of *bcl6* and *AID* transcripts in mouse B cell lymphomas. Transcripts were analysed with *AID* (Mm01184115_m1, Applied Biosystems) and *bcl6* (Mm00477633_m1) TaqMan probes on a StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Relative mRNA levels were normalized to *GAPDH* transcripts (Mm99999915_g1). For *wt* λ -MYC mice: 6 immature and 6 mature B cell lymphomas. For λ -MYC 3'RR-deficient mice: 6 immature and 6 mature B cell lymphomas. Non malignant: splenic B cells from 3 pre-malignant λ -MYC mice and 3 pre-malignant λ -MYC mice 3'RR deficient mice. ** $p < 0.005$ (Mann-Whitney *U*-test).

A**B**

	Mouse c-Myc			Human c-Myc			Bcl6			
	Reads (x10 ⁶)	bp (x10 ⁶)	Mutation frequency	Reads (x10 ⁶)	bp (x10 ⁶)	Mutation frequency	Reads (x10 ⁶)	bp (x10 ⁶)	Mutation frequency	
WT	Non malignant n=3	1.65	223.36	0.00304	0.92	121.75	0.00208	0.5	66.23	0.00214
	Immature n=6	3.18	428.24	0.00318	1.97	263.24	0.00198	0.88	114.95	0.00252
	Mature n=6	5.33	713.05	0.00319	3.5	461.04	0.00197	1.55	202.57	0.00228
3'RR deficient	Non malignant n=3	2.18	278.44	0.00302	1.07	139.59	0.00187	0.75	91.74	0.00217
	Immature n=6	7.27	889.26	0.00302	5.57	670.35	0.00181	2.4	285.5	0.00217
	Mature n=6	9.12	1242.73	0.00312	7.1	952.77	0.00188	3.23	429.43	0.00217

C**D**

Article 4

Immunoglobulin genes undergo legitimate repair in human B cells not only after cis- but also frequent trans-class switch recombination.

Laffleur Brice, Bardet Sylvia, Garot Armand, Brousse Mylène, Baylet Audrey and Cogné Michel.

Genes and Immunity, 2014, volume 15, numéro 5, pages 341-346.

Le phénomène de commutation de classe permet aux cellules exprimant à la surface des IgM/IgD de changer d'isotype et d'exprimer des IgG, IgE ou IgA. Ce processus au sein des cellules B activées nécessite à la fois des facteurs *cis*- et *trans*- régulateurs. En effet, la CSR est régulée par la région régulatrice 3' du locus IgH (3'RR), elle nécessite l'action d'AID et met en jeu des mécanismes de réparation de l'ADN (Perlot and Alt, 2008; Pinaud et al., 2011).

La recombinaison de classe se produit au sein du même chromosome par une recombinaison intra-chromosomique mais peut également se produire par réarrangement inter-chromosomique. L'assemblage sur un autre chromosome a déjà été documenté chez le lapin et la souris (Kingzette et al., 1998; Reynaud et al., 2005) mais jamais chez l'homme.

Dans cette étude nous avons cherché à démontrer que ce phénomène existe chez l'homme. Afin de répondre à la problématique, nous avons utilisé des SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) éloignés sur le locus IgH humain. Ces SNP localisés dans l'intron J_{H6} et dans le gène C α 1, nous permet d'identifier deux régions distinctes sur les allèles IgH. Nous avons recherché un individu hétérozygote pour ces deux SNP et nous avons séquencé les transcrits matures IgA.

Pour ces travaux, j'ai participé aux expérimentations permettant l'identification du donneur sain double hétérozygote.

SHORT COMMUNICATION

Immunoglobulin genes undergo legitimate repair in human B cells not only after *cis*- but also frequent *trans*-class switch recombination

B Laffleur^{1,2}, SM Bardet^{1,2,4}, A Garot^{1,2}, M Brousse^{1,3}, A Baylet¹ and M Cogné^{1,2,3}

Immunoglobulin (Ig) genes specifically recruit activation-induced deaminase (AID) for 'on-target' DNA deamination, initiating either variable (V) region somatic hypermutation, or double-strand break intermediates of class switch recombination (CSR). Such breaks overwhelmingly undergo legitimate intra-Ig repair rather than rare illegitimate and potentially oncogenic junctions outside of Ig loci. We show that in human B cells, legitimate synapsis and repair efficiently join Ig genes whether physically linked on one chromosome or located apart on both alleles. This indicates mechanisms faithfully recognizing and/or pairing loci with homology in structure and accessibility, thus licensing interchromosomal *trans*-CSR junctions while usually preventing illegitimate interchromosomal recombination with AID off-target genes. Physical linkage of IgH genes in *cis* on the same allele just increases the likelihood of legitimate repair by another fourfold. The strongest force driving CSR might thus be recognition of legitimate target genes. Formation of IgH intra-allelic loops along this process would then constitute a consequence rather than a pre-requisite of this gene-pairing process.

Genes and Immunity advance online publication, 22 May 2014; doi:10.1038/gene.2014.25

INTRODUCTION

During their early development, pro-B and pre-B cells undergo V(D)J rearrangements of immunoglobulin (Ig) heavy- (H) and light (L)-chain loci. Later on, antigen-stimulated mature B cells can further diversify their variable (V) regions through somatic hypermutation initiated by activation-induced deaminase (AID).¹ constant (C) genes of the heavy-chain (IgH) locus can also undergo class switch recombination (CSR) or locus suicide recombination.^{2–4} CSR is mostly considered as a deletion process whereby a downstream constant region (C) gene is brought to proximity of a rearranged VDJ gene and then expressed in replacement of C μ and C δ . CSR targets highly repetitive switch (S) regions located upstream of all the C genes except C δ and is controlled by multiple signals including B-cell antigen receptor ligation, toll-like receptors ligation, cytokines and B-cell/T-cell interactions.

Regulation of CSR is under the strict dependence of the *cis*-regulatory elements that control germline transcription (GT) from I promoters. GT precedes CSR to a given constant (C) gene, and the induction or suppression of GT by specific stimuli correlates directly with further CSR to the corresponding C gene.^{5–8} When transcribed as introns between I and C exons, repetitive switch (S) regions form R loops structures exquisitely targeted by AID.⁹ Additional enzymes including uracil-DNA-glycosylase and exonuclease-1 can then process S regions and generate double-strand DNA breaks (DSBs) and recombination substrates. Repair of S junctions is later dependent on the activation of the DNA damage repair and of classical or alternate non-homologous end-joining.^{10–12} DNA repair during CSR is often summarized as if

systematically leading to *cis*-recombination between paired S regions (transcribed at the same time on the same chromosome). Beside this paradigm, an alternate pathway of inter-allelic CSR was in fact shown by Kingzette *et al.*¹³ to concur to rabbit IgA production, where allotypes of Ig V and C regions were shown at the protein level to undergo inter-allelic associations. Studying inter-allelic associations in mouse IgH transcripts also showed that a substantial proportion of CSR could occur inter-allelically and account for 7–17% of CSR events towards C α or C γ 3 in mouse B cells, with S regions demonstrated to be joined at the DNA level and with non-homologous end-joining patterns similar in *cis*- and *trans*-CSR junctions.^{14–16}

The IgH '3' regulatory region' (3'RR) located downstream IgH constant (C) genes is mandatory for recruiting AID at the IgH locus, both for CSR and SHM.^{17–19} Before CSR, I promoter elements undergo long-range interactions with the 3'RR, which controls their physical linking and was suggested after 3C experiments to promote looping of the intervening DNA.²⁰ The 3'RR then likely stimulates transcription and accessibility of the S regions, while in addition, I promoters are targeted by various cytokine-modulated transcription factors. Altogether in activated B cells, S regions transcription occurs at similar levels on both the 'productive' and the 'non-productive' allele of the IgH locus.²¹ Changes in chromatin structure of S regions then simultaneously allow CSR to take place on both Ig alleles, so that in up to 75% of switched cells, CSR on the productive allele is concomitant with intra-chromosomal CSR to the same C gene on the non-productive allele.^{22–24} Since transcription and promoter–enhancer interactions are *cis*-controlled processes, and since DNA circles made up

¹Immunology CNRS UMR7276, Limoges, France; ²Université de Limoges, UMR7276, Institut Universitaire de France, Limoges, France and ³Hôpital Universitaire Dupuytren, Laboratoire d'Immunologie, Limoges, France. Correspondence: Professor M Cogné, Immunology CNRS UMR7276, 2, rue Marcland Université de Limoges, Limoges 87170, France. E-mail: cogné@unilim.fr

⁴Current address: CNRS, Université de Limoges, XLIM, F-87060 LIMOGES, France.

Received 9 December 2013; revised 26 March 2014; accepted 14 April 2014

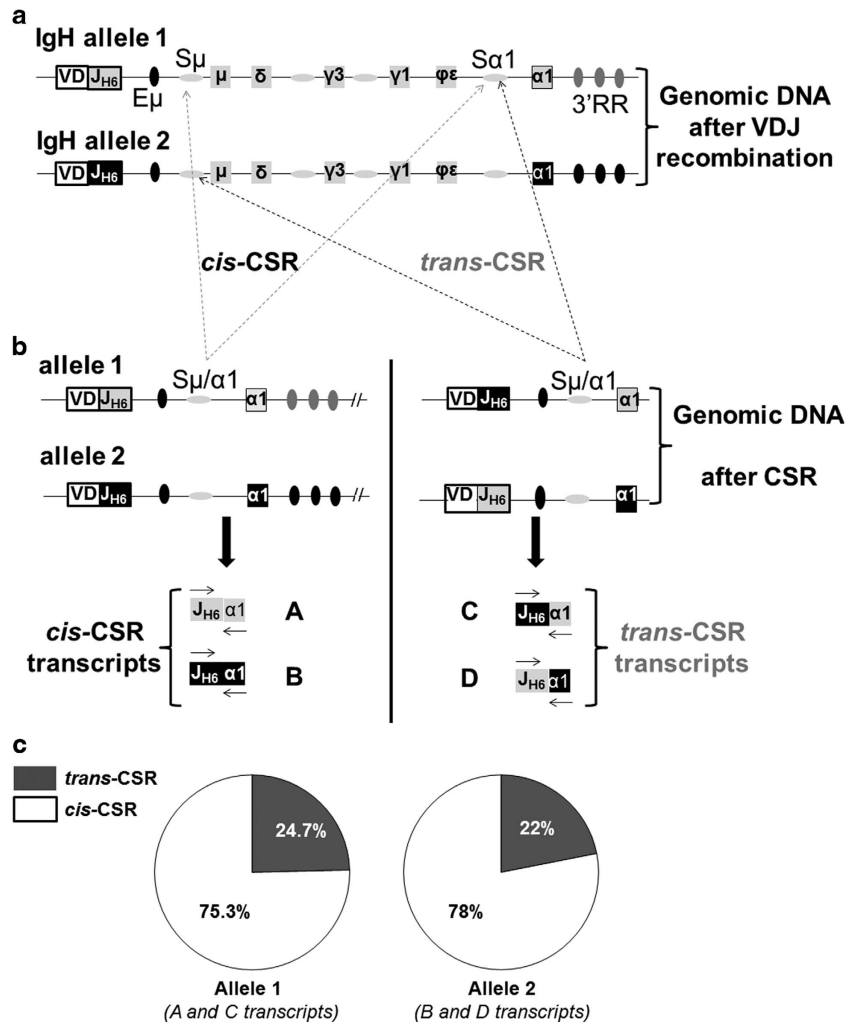


Figure 2. Strategy to quantify *cis*-CSR and *trans*-CSR in human B cells. **(a)** IgH loci are represented after VDJ assembly with: a specific JH6 allele containing either SNP (gray or black box), the intronic enhancer E_μ, the switch μ region (S_μ), constant genes (μ, δ, γ3, γ1 and α1), the switch α region (Sα) and the 3' regulatory region (3'RR) (not to scale). Cα1 alleles correspond to specific SNPs (gray or black box). **(b)** After CSR, *cis*-CSR joins a JH6 SNP with a Cα SNP from the same chromosome (left part), resulting in the expression of *cis*-CSR transcripts maintaining these SNP associations (A or B). *Trans*-CSR joins a JH6 SNP with the Cα SNP from the other chromosome (right part) and *trans*-CSR transcripts contain the shuffled associations C and D. **(c)** The various *cis* and *trans*-associations observed among those cDNA sequences carrying unique clonal mutations of JH6 were counted after cloning and sequencing. The relative amounts of *trans*- vs *cis*-CSR involving IgH allele 1 (Cα1 SNP 'G', that is, associations A or C, and IgH allele 2 (Cα1 SNP 'C', that is, associations B or D, are indicated (bottom).

Globally, 739 sequences were analyzed, among which 159 (that is, 21.5%) showed *trans*-CSR. Since multiple sequences were unmutated and could then be biased by the overrepresentation of a few B-cell clones carrying a germline JH6 segment, we decided to also focus the analysis on a subset of unique sequences, restricted to those 276 marked by somatic hypermutation of JH6. This focused analysis confirmed a high rate of *trans*-CSR and allowed to precisely assign 194 sequences to the IgH allele carrying the Ig Cα1 SNP 'G' (distributed into 146 sequences showing *cis*-CSR and 48, that is, 24.7%, with *trans*-CSR). Another 82 unique sequences corresponded to the other IgH allele (carrying the Ig Cα1 SNP 'C') and also fell into either *cis*-CSR (64 sequences) or *trans*-CSR (18 sequences, that is, 22%) (Figure 2).

To ensure that the observed *trans*-associations of alleles within α1 heavy-chain transcripts were not PCR artefacts (through re-annealing of imperfectly matched PCR products), we controlled that the PCR-cloning strategy did not create artificial *trans*-associations when carried on a 50/50 mixture of cDNAs from the

two forms of allelic IgH *cis*-CSR transcripts: above 99% of clones from this control experiment unambiguously maintained the *cis*-association of the JH6 and Cα1 SNPs.

CONCLUDING REMARKS

The majority of class-switched IgH chains are derived from VH and CH genes joined through a *cis*-acting 'looping-out and deletion' pathway, that is, through intra-chromosomal recombination between switch regions located on the same chromosome.^{21,25} Reciprocal exchange between sister chromatids has also been proposed as a rare CSR pathway, yielding one daughter cell with a class-switched-expressed IgH locus and another daughter cell with an unswitched C_μ followed with a partial C region duplication.²⁷ By analogy with protozoans and lower invertebrates, potential *trans*-splicing in mammalian B cells has also been invoked for the expression of non-IgM isotypes, but failed to be experimentally evidenced.^{28,29} Finally, beside the paradigm of *cis*-CSR, inter-allelic *trans*-CSR was observed for rabbit IgA and mouse IgG3- or

IgA-producing B cells.^{13,14,30} Using B cells from a 'double heterozygous' healthy donor, carrying two different JH6 allelic sequences and two different C α 1 alleles, we explored the frequency of *trans*-CSR in human by sequencing IgH α 1 chain transcripts and evaluating how alleles located apart from the switch junction stayed associated or were shuffled by the CSR process.

Interchromosomal exchanges are considered rare in somatic cells, but are likely promoted by DSBs. Interestingly, although such DSBs also occur on both alleles during V(D)J recombination, inter-allelic recombination was not found at this stage where synapsis between RAG target sequences precedes the occurrence of DSBs.^{31,32} It is also likely that in the case of VDJ recombination, DNA breaks are mostly repaired on each allele independently, at the pro-B/pre-B stage after the repositioning of IgH alleles at unequivalent nuclear locations immediately after occurrence of the first DSBs on one allele,^{33,34} whereas in the case of CSR, a single nuclear location could attract from either allele those S regions with parallel transcriptional and accessibility status. Such a 'CSR factory' might thus both check legitimacy of repair and concentrate the synapsis and/or of repair enzymes. This would thereby promote the legitimate resolution of DSBs through either *cis*-CSR or *trans*-CSR, while avoiding junctions with non-Ig genes erroneously targeted in parallel by AID. In that sense, it is noteworthy that nuclear localization studies showed an asymmetric location of both IgH alleles in B-cell precursors (at the time of VDJ recombination), comparing with a symmetric location of alleles in euchromatin domains of resting mature B cells³⁵ (and in activated B cells until days 1.5 after activation). 'CSR factories' might be 'AID factories', reminiscent of SHM equally targeting both IgH alleles.³⁶ Such observations fit with the idea that switch regions transcribed and undergoing chromatin remodeling in a paired fashion and at close locations may interact and eventually recombine either in *cis* (major pathway) or in *trans* (alternate pathway) during a specific window of time where they are physically associated within transient CSR factories. This would also occur before one IgH locus migrates to the peripheral nuclear compartment of heterochromatin to further stay there as an excluded allele.³⁵ It is also interesting to point out that a recent study evaluating chromosome territories and gene proximity within haplotypes showed that there is in general no colocalization and *trans*-interactions of alleles in the mouse or human genome;³⁷ our data thus indicate a specific feature of IgH genes during CSR. Regarding the issue of legitimate vs illegitimate repair, our data are also worth comparing with a recent study by Bottaro *et al.*,⁶ in which the I-SceI endonuclease generated DSBs on chromosome 15 of activated B cells, concurrently to DSBs induced by AID on chromosome 12.³⁸ This study documented frequent Ig junctions on one side and frequent chromosome 15 *cis*-junctions on the other side, while illegitimate 12–15 translocations were only detected in about 4% of cases.³⁸ By contrast, we show *trans*-CSR as frequent, just four times below *cis*-CSR. Altogether, this gives a clear indication that while *cis*-CSR

mechanistically predominates in B cells, other mechanisms favor legitimate rather than illegitimate DNA repair, whether in *cis* or *trans*, and thus allows interchromosomal recombination to frequently occur, with *trans*-CSR significantly contributing to physiological class switching.

The present study of human B cells further shows *trans*-CSR as a general process and argues for the ability of the CSR machinery to recruit, pair and repair in a single nuclear-specialized compartment legitimate CSR targets whether or not they are *cis*-linked within the productive IgH locus. In that sense, it is certainly worth recalling that a number of B-cell malignancies involve aberrant CSR events, joining an oncogene with an S region from the excluded IgH allele and thus promoting B-cell transformation while Ig expression from the productive allele is unaffected. Further studies will clearly be useful in order to understand how B cells CSR factories can specifically promote synapsis between Ig genes, whether linked on the same chromatin fiber or not, rather than between Ig genes and off-targets of AID.

MATERIALS AND METHODS

Determination of informative SNPs

We searched for human SNPs located on both sides of IgH breakpoints/junctions after CSR, that is, in both JH and the C α 1 constant gene. The reference genome sequences selected, featuring an acceptable allele frequency in human were *rs74454466* (C/A, C frequency = 0.69) for JH6 and *rs1407* (C/G, C frequency = 0.33) for C α 1, whose combination allows the detection of both SNP on the same transcripts from class-switched C α 1 genes. SNP data were downloaded in VCF format from the NCBI 1000 Genomes browser³⁹ and sequence analysis was achieved with Serial Cloner 2.6.1. (<http://serialbasics.free.fr/Home/Home.html>).

Screening for a double heterozygous healthy donor and typing of allelic associations

Blood from 22 healthy volunteers was collected on heparin tubes. peripheral blood mononuclear cells were washed and processed for DNA and RNA extraction.

PCR conditions for DNA typing were with 200 ng of input DNA, with the Taq Core kit (Cat EPTQK101, Qiogen, Irvine, CA, USA) and following this program: 94 °C 5 min, 33 cycles at 94 °C 30 s, 55 °C 35 s, 72 °C 1 min and 72 °C 5 min. PCR products were purified using the kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

Primers for cloning and sequencing the C α 1 CH2 region in order to determine C α 1 alleles were 'C α 1 for' and 'C α 1 rev' (Table 1). These primers flank the C α 1 gene SNP *rs1407*, within CH2 (C/G).

Three different JH6 forward primers were used (Table 1). For genotyping donors on genomic DNA, the forward primer 'JH6 for DNA' was used with the 'JH6 rev primer'. These primers flank a polymorphic region of JH6 including a 1-codon insertion (SNP *rs1950943*, ---/GGT) and one base change (SNP *rs74454466* C/A).

Once identified a donor heterozygous for JH6 (in fact simultaneously heterozygous for both JH6 SNPs *rs74454466* and *rs1950943*), two different and specific JH6 forward primers could be used, each mostly specific for one JH6 allele, primer 'JH6 for Allele1' (including *rs1950943* ---, and allowing

Table 1. Primers used for DNA genotyping and for determination of allelic associations within α 1 heavy-chain mature transcripts

	Target	Primer	Sequence
DNA genotyping	JH6	JH6 for DNA	5'-CAGAGGGTTCATGAGAAGG-3'
		JH6 rev	5'-TGGCCATTCTTACCTGAGGA-3'
	C α 1	C α 1 for	5'-ACTCCACCTACCCCATCTCC-3'
		C α 1 rev	5'-GAGAGGGTGGCGGTAGC-3'
Alleles in switched transcripts	JH6 SNP1	JH6 for Allele1	5'-ACTACTACATGGACGCTCTGG-3'
		C α 1 rev	5'-GAGAGGGTGGCGGTAGC-3'
	JH6 SNP2	JH6 for Allele2	5'-ACTACGGTATGGACGCTCTGG-3'
		C α 1 rev	5'-GAGAGGGTGGCGGTAGC-3'

to read *rs74454466 A*) and primer 'JH6 for Allele2' (including *rs1950943 GGT* and allowing to read *rs74454466 C*).

RNA studies

Twelve blood samples were independently collected from the donor at three different times. Total RNA was prepared from peripheral blood mononuclear cells or magnetically sorted memory B cells (MACS Miltenyi Biotec kits 130-091-151 and 130-051-601, Bergisch Gladbach, Germany), using TRI Reagent (Ambion, Austin, TX, USA). RNA was treated with DNaseI (Invitrogen, San Diego, CA, USA) and 1 µg was used for cDNA synthesis with Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Thirty independent reverse transcriptase-PCRs and cloning reactions were performed with the different samples in order to ensure independence and diversity of cloned sequences.

Each reverse transcriptase-PCR analysis of $C\alpha 1$ transcription was carried on 1 µg of total RNA in the following conditions: PCR was on 100 ng of cDNA with the Taq Core kit (Qbiogen) and the following program: 95 °C 2 min, 30 cycles at 95 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 30 s and 72 °C 5 min. PCR products were purified using the kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) and cloned into Topo TA Cloning (Invitrogen) and TOP10 bacteria. Positive colonies were amplified and plasmids were purified with Nucleospin Plasmid (Macherey-Nagel). Primer 'JH6 for Allele1' (*rs1950943 ---*) and the variant primer 'JH6 for Allele2' (*rs1950943 GGT*) were used for reverse transcriptase-PCR/cloning experiments and allowed to preferentially amplify each JH6 allele, in order to accumulate cDNA sequences from both JH6 alleles. These sequences were assigned to each allele not simply according to their preferential amplification with one of the JH primer but by reading the *rs74454466* SNP downstream of the primers, thus independently of primer hybridization. Both JH primers allowed amplify VDJ- $C\alpha 1$ transcripts by reverse transcriptase-PCR when used in conjunction with the reverse primer ' $C\alpha 1$ rev' chosen within the $C\alpha 1$ CH2 exon, thus simultaneously allowing to read allelic SNPs for JH6 (*rs74454466*) and $C\alpha 1$ (*rs1407*).

Sequencing

Sequencing was done in both orientations using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Cat 4337455, Applied Biosystems), and analyzed with an Applied Biosystems 3130 XL apparatus. Sequences were compared with Multalin software (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC SL 220100601332), ANR (IghAccess 2011 BSV302701). Ligue Nationale contre le Cancer and Conseil Régional du Limousin. BL and SMB were supported by Association pour la Recherche sur le Cancer.

REFERENCES

- Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol* 2012; **12**: 517–531.
- Stavnezer J. Antibody class switching. *Adv Immunol* 1996; **61**: 79–146.
- Stavnezer J. Molecular processes that regulate class switching. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; **245**: 127–168.
- Péron S, Laffleur B, Denis-Lagache N, Cook-Moreau J, Tinguely A, Delpy L *et al*. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 2012; **336**: 931–934.
- Jung S, Siebenkotten G, Radbruch A. Frequency of immunoglobulin E class switching is autonomously determined and independent of prior switching to other classes. *J Exp Med* 1994; **179**: 2023–2026.
- Bottaro A, Lansford R, Xu L, Zhang J, Rothman P, Alt FW. S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J* 1994; **13**: 665–674.
- Zhang J, Bottaro A, Li S, Stewart V, Alt FW. A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *EMBO J* 1993; **12**: 3529–3537.
- Harriman GR, Bradley A, Das S, Rogers-Fani P, Davis AC. IgA class switch in I alpha exon-deficient mice. Role of germline transcription in class switch recombination. *J Clin Invest* 1996; **97**: 477–485.

- Chaudhuri J, Tian M, Khuong C, Chua K, Pinaud E, Alt FW. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 2003; **422**: 726–730.
- Bassing CH, Alt FW. The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair* 2004; **3**: 781–796.
- Imai K, Slupphaug G, Lee W-I, Revy P, Nonoyama S, Catalan N *et al*. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* 2003; **4**: 1023–1028.
- Bardwell PD, Woo CJ, Wei K, Li Z, Martin A, Sack SZ *et al*. Altered somatic hypermutation and reduced class-switch recombination in exonuclease 1-mutant mice. *Nat Immunol* 2004; **5**: 224–229.
- Kingzette M, Spieker-Polet H, Yam PC, Zhai SK, Knight KL. Trans-chromosomal recombination within the Ig heavy chain switch region in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 11840–11845.
- Reynaud S, Delpy L, Fleury L, Dougier H-L, Sirac C, Cogné M. Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J Immunol* 2005; **174**: 6176–6183.
- Dougier H-L, Reynaud S, Pinaud E, Carrion C, Delpy L, Cogné M. Interallelic class switch recombination can reverse allelic exclusion and allow trans-complementation of an IgH locus switching defect. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 2181–2191.
- Guikema JEJ, Schrader CE, Leus NGJ, Ucher A, Linehan EK, Werling U *et al*. Reassessment of the role of Mut S homolog 5 in Ig class switch recombination shows lack of involvement in cis- and trans-switching. *J Immunol* 2008; **181**: 8450–8459.
- Vincent-Fabert C, Fiancette R, Pinaud E, Truffinet V, Cogné N, Cogné M *et al*. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1.2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 2010; **116**: 1895–1898.
- Rouaud P, Vincent-Fabert C, Saintamand A, Fiancette R, Marquet M, Robert I *et al*. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J Exp Med* 2013; **210**: 1501–1507.
- Pinaud E, Marquet M, Fiancette R, Péron S, Vincent-Fabert C, Denizot Y *et al*. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv Immunol* 2011; **110**: 27–70.
- Wuerffel R, Wang L, Grigera F, Manis J, Selsing E, Perlot T *et al*. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* 2007; **27**: 711–722.
- Delpy L, Le Bert M, Cogné M, Khamlichi AA. Germ-line transcription occurs on both the functional and the non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes. *Eur J Immunol* 2003; **33**: 2108–2113.
- Borzillo GV, Cooper MD, Kubagawa H, Landay A, Burrows PD. Isotype switching in human B lymphocyte malignancies occurs by DNA deletion: evidence for non-specific switch recombination. *J Immunol* 1987; **139**: 1326–1335.
- Rothman P, Chen YY, Lutzker S, Li SC, Stewart V, Coffman R *et al*. Structure and expression of germ line immunoglobulin heavy-chain epsilon transcripts: interleukin-4 plus lipopolysaccharide-directed switching to C epsilon. *Mol Cell Biol* 1990; **10**: 1672–1679.
- Jeevan-Raj BP, Robert I, Heyer V, Page A, Wang JH, Cammas F *et al*. Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med* 2011; **208**: 1649–1660.
- Iwasato T, Shimizu A, Honjo T, Yamagishi H. Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell* 1990; **62**: 143–149.
- Matsuoka M, Yoshida K, Maeda T, Usuda S, Sakano H. Switch circular DNA formed in cytokine-treated mouse splenocytes: evidence for intramolecular DNA deletion in immunoglobulin class switching. *Cell* 1990; **62**: 135–142.
- Harriman W, Völk H, Defranoux N, Wabl M. Immunoglobulin class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 361–384.
- Bruzik JP, Maniatis T. Spliced leader RNAs from lower eukaryotes are trans-spliced in mammalian cells. *Nature* 1992; **360**: 692–695.
- Bonen L. Trans-splicing of pre-mRNA in plants, animals, and protists. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 1993; **7**: 40–46.
- Knight KL, Kingzette M, Crane MA, Zhai SK. Transchromosomally derived Ig heavy chains. *J Immunol* 1995; **155**: 684–691.
- Casellas R, Nussenzweig A, Wuerffel R, Pelanda R, Reichlin A, Suh H *et al*. Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J* 1998; **17**: 2404–2411.
- Delpy L, Decourt C, Le Bert M, Cogné M. B cell development arrest upon insertion of a neo gene between JH and Emu: promoter competition results in transcriptional silencing of germline JH and complete VDJ rearrangements. *J Immunol* 2002; **169**: 6875–6882.
- West RB, Lieber MR. The RAG-HMG1 complex enforces the 12/23 rule of V (D) J recombination specifically at the double-hairpin formation step. *Mol Cell Biol* 1998; **18**: 6408–6415.

- 34 Hewitt SL, Yin B, Ji Y, Chaumeil J, Marszalek K, Tenthorey J *et al*. RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat Immunol* 2009; **10**: 655–664.
- 35 Skok JA, Brown KE, Azuara V, Caparros ML, Baxter J, Takacs K *et al*. Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat Immunol* 2001; **2**: 848–854.
- 36 Delpy L, Sirac C, Le Morvan C, Cogné M. Transcription-dependent somatic hypermutation occurs at similar levels on functional and nonfunctional rearranged IgH alleles. *J Immunol* 2004; **173**: 1842–1848.
- 37 Selvaraj S, R Dixon J, Bansal V, Ren B. Whole-genome haplotype reconstruction using proximity-ligation and shotgun sequencing. *Nat Biotechnol* 2013; **31**: 1111–1118.
- 38 Gostissa M, Schwer B, Chang A, Dong J, Meyers RM, Marecki GT *et al*. IgH class switching exploits a general property of two DNA breaks to be joined in cis over long chromosomal distances. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**: 2644–2649.
- 39 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM *et al*. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010; **467**: 1061–1073.

Manuscrit 5

Allelic transvection in mammalian B lymphocytes mediated by the IgH locus 3' cis-regulatory region.

Sandrine Le Noir, Brice Laffleur, Claire Carrion, Armand Garot, Eric Pinaud, Yves Denizot and Michel Cogné.

Soumis pour publication à *Blood*.

La commutation de classe en *trans*- a été mise en évidence chez le lapin la souris et l'homme (Kingzette et al., 1998; Reynaud et al., 2005; Laffleur et al., 2014b). Nous savons que ce processus est sous le contrôle de la 3'RR (Vincent-Fabert et al., 2010a). Ce phénomène de *trans*-CSR laisse supposer que les deux allèles IgH sont à proximité lors de l'assemblage et que cette co-localisation nécessite que la 3'RR soit présente.

Nous avons analysé la co-localisation des allèles IgH dans un contexte sauvage ou déficient pour la 3'RR par FISH-3D. Nous avons également analysé les interactions entre E μ et la 3'RR dans des conditions particulières. Pour ce faire, nous avons utilisé des cellules doubles déficientes : un des allèle IgH est dépourvu de 3'RR, l'autre est privé de l'enhancer intronique E μ . Dans cette situation, nous avons pu détecter des interactions E μ -3'RR par utilisation de la technique de 3C attestant d'un contact entre éléments régulateurs différents des deux allèles.

Dans cette étude nous avons utilisé la méthode de 3C pour mettre en évidence les interactions inter-alléliques. Ma participation à ce travail est liée à la mise au point de la technique 3C au laboratoire, une technique pour laquelle j'ai été formé dans le laboratoire de Bernardo Reina San Martin (IGBMC) à Strasbourg.

Allelic transvection mediated by the IgH locus 3' *cis*-regulatory region in mammalian B lymphocytes

Sandrine Le Noir^{1,2}, Brice Laffleur^{1,2}, Claire Carrion¹, Armand Garot¹, Eric Pinaud¹, Yves Denizot¹, Michel Cogné^{1,3*}

¹UMR 7276 CNRS and Université de Limoges : Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoprolifération, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France

² These authors contributed equally to this work

³ Institut Universitaire de France

* To whom correspondence should be addressed at cogne@unilim.fr

Running title: The IgH 3'RR goes into a *trans* effect

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

ABSTRACT

Transvection, *i.e.* inter-allelic positive interaction demonstrated in drosophila, was never observed in mammals. Immunoglobulin heavy chain (IgH) alleles have ambivalent relationships featuring both allelic exclusion and frequent inter-allelic class-switch recombination (CSR). We show that the IgH 3' regulatory region (3'RR) promoting activation-induced cytidine deaminase (AID)-dependent somatic hypermutation (SHM) and CSR, has both *cis*- and *trans*-effects, bringing alleles closer and enabling a monoallelic 3'RR to stimulate biallelic SHM and CSR.

INTRODUCTION

Functional interactions and co-localization of non-homologous genes occur in various instances (Chen et al., 2002; Noordermeer et al., 2011; Park et al., 2014). Specific to homologous genes, transvection was defined in drosophila as corresponding to stimulatory interactions between somatically paired alleles (Lewis, 1954). By contrast in mammals, so far reported inter-allelic interactions feature negative effects concurring to allelic exclusion (Levin-Klein and Bergman, 2014).

In lymphocytes, *trans*-regulation supporting allelic exclusion affect some cytokine and antigen receptor genes. Ordered V(D)J recombination of immunoglobulin (Ig) loci initiates allelic exclusion: completion of a functional rearrangement shuts off accessibility of the second allele. This correlates with modified epigenetic marks, interactions of IgH/Igk loci, and (with

controversy) nuclear positions of IgH alleles (Hewitt et al., 2009; Holwerda et al., 2013). IgH loci are later remodeled along selection within germinal centers (GCs). The 3'RR then promotes IgH accessibility to AID for SHM of Ig variable (V) genes, CSR of IgH constant (C) genes and eventually locus suicide recombination (LSR) deleting all C genes (Peron et al., 2012). The 3'RR behaves as a locus control region with polymorphisms influencing susceptibility to immune disorders and able to deregulate oncogenes (Vincent-Fabert et al., 2010; Pinaud et al., 2011; Rouaud et al., 2013). Biallelic AID/3'RR-dependent IgH changes usually affect both productive and non-productive alleles, in line with their similar chromatin context, transcription and SHM levels (Delpy et al., 2004; Holwerda et al., 2013). Illegitimate off-target CSR-like junctions are exceptional, while IgH-specific legitimate CSR junctions predominate and occur in both *cis* and *trans* (Dougier et al., 2006; Reynaud et al., 2005; Laffleur et al., 2014). Promiscuous *trans*-CSR suggests that CSR coincides with bi-allelic co-localization, at a stage where the 3'RR interacts in *cis*- with AID-targeted IgH regions (Wuerffel et al., 2007). Synapsis between concomitantly generated biallelic DNA breaks might be secured along *trans*-CSR by preexisting inter-allelic proximity. Upstream of *trans*-CSR recombination, we thus explored whether IgH loci undergo inter-allelic stimulatory interactions reminiscent to transvection and witnessing contacts between legitimate AID targets from different alleles.

RESULTS AND DISCUSSION

We wished to check whether the 3'RR, as the strongest IgH *cis*-regulatory element, also supports inter-allelic *trans*-interactions. We compared homozygous $\Delta 3'$ RR mice (with a 3'RR deletion and altered CSR/SHM) with heterozygous mice carrying *wt* and $\Delta 3'$ RR alleles (Vincent-Fabert et al., 2010; Pinaud et al., 2011; Rouaud et al., 2013). Allotypes “a” and “b” discriminated alleles from $\Delta 3'$ RR^a/*wt*^b mice (**Fig. 1a**).

Inter-allelic IgH distance by 3D-FISH (with a probe encompassing an AID-targeted region from the DH cluster to C γ 2a) was compared in individual *wt*, heterozygous and homozygous $\Delta 3'$ RR B-cells activated *in vitro* (**Fig. 1a,b**), in conditions where the 3'RR activates transcription and AID recruitment (Rouaud et al., 2013). Distance proved shorter in *wt* than in homozygous $\Delta 3'$ RR B-cells (mean 0.35 vs 0.41, p=0.008), indicating 3'RR-mediated inter-allelic contacts. Interestingly, distance in heterozygous cells with a single 3'RR was similar to *wt* but differed from homozygous $\Delta 3'$ RR cells (0.36 vs 0.41, p=0.035) (**Fig. 1c**), a single allelic 3'RR thus being sufficient to attract both alleles in a more proximal location.

To further analyse inter-allelic interactions, we generated heterozygous $\Delta 3'$ RR/ $\Delta E\mu$ mice with a single 3'RR on one allele and a single E μ enhancer on the other (**Fig. 1d**), hereby suppressing covalent links between these elements (known with *cis*-interactions) (Wuerffel et al., 2007; Marquet et al., 2014). 3C experiments (in both resting and activated B-cells) showed E μ -3'RR contacts persisting in such conditions where they could only witness inter-allelic interactions. E μ simultaneously lacked interaction with the control non-Ig gene hole (flanking the 3'RR) (Wuerffel et al., 2007) (**Fig. 1e**).

We then wondered if IgH proximity could support inter-allelic *trans*-activation by a single 3'RR onto the other allele for AID recruitment and CSR. 3'RR deletions suppress CSR-accessibility of downstream switch (S) regions, but not S μ , and homozygous deletions thus strongly affect

CSR (Vincent-Fabert et al., 2010). This is rescued by heterozygosity, where remaining *trans*-CSR joins the accessible S μ from the 3'RR-less allele to downstream S regions from the *wt* allele (Dougier et al., 2006). Despite availability of either *cis*- or *trans*-CSR, heterozygous $\Delta 3'RR^a/wt^b$ mice should thus only express the single accessible C α^b and secrete IgA^b but not IgA^a, in line with the complete IgA defect in $\Delta 3'RR/\Delta 3'RR$ mice (Vincent-Fabert et al., 2010). We analyzed whether in this heterozygous condition, the 3'RR^b could in fact rescue the “CSR-dead” C α^a gene lacking a flanking 3'RR. Allotype-specific IgA^a secretion measured CSR to C α^a on the $\Delta 3'RR^a$ allele and increased in heterozygous compared to homozygous $\Delta 3'RR$ mice ($p=0.0007$, **Fig. 1f**), indicating that 3'RR^b confers CSR-accessibility to the otherwise silent C α^a gene. Whether this involves predominant S μ^a -S α^a *cis*-CSR or some S μ^b -S α^a *trans*-CSR, IgA^a production demonstrates in any case rescued CSR-accessibility for the 3'RR-less C α^a and efficient inter-allelic *trans*-activation by the *wt*^b functional 3'RR.

We next examined potential *trans*-complementation of a SHM defect in Peyer's patches *in vivo* activated GC B-cells. As described (Rouaud et al., 2013), IgH SHM was deficient in $\Delta 3'RR$ homozygous mice (0.31% bp in IgH vs 16.9% for control Igk SHM) (**Table 1, Fig. 2a, left**). In $\Delta 3'RR^a/wt^b$ mice, SHM on the control *wt*^b allele reached 11.58% bp (**Table 1, Fig. 2a, right**). Interestingly, the $\Delta 3'RR^a$ allele from heterozygous cells reached an intermediate (1.25%) SHM level, below *wt*^b but about 4-fold higher than with a biallelic 3'RR defect (**Table 1, Fig. 2a, middle**). Accordingly, this $\Delta 3'RR^a$ allele harboured less unmutated sequences, more with 1-3 mutations and a few with high (>3) SHM compared to homozygous $\Delta 3'RR$ cells (**Fig. 2a**). *Trans*-complementation by 3'RR^b thus partially rescues SHM on the $\Delta 3'RR^a$ allele.

Although SHM usually precedes CSR in GCs, some of our unsorted VDJ^a sequences might have first be joined with 3'RR^b through *trans*-CSR, then conventionally promoting SHM in *cis*. To exclude such hazards, we re-played the analysis on sorted unswitched (IgM⁺/B220⁺/GL7⁺)

GC B-cells and found parallel variations (although SHM was as expected globally lower in unswitched than total GC B-cells). $\Delta 3'RR$ homozygous cells showed strongly altered SHM (0.16‰ bp for IgH vs 5.87‰ for Igk) (**Table 1, Fig. 2b, left**), while in $\Delta 3'RR^a/wt^b$ cells SHM was 3-fold higher (0.54‰) on $\Delta 3'RR^a$ alleles exposed in *trans* to a functional 3'RR (**Table 1, Fig. 2b, middle**), and reached 3.48‰ on control wt^b alleles from the same cells (**Table 1, Fig. 2b, right**). As in total B-cells, the heterozygous 3'RR-deficient allele showed less unmutated sequences and more with 1-3 mutations than in homozygous $\Delta 3'RR$ cells (lack of highly mutated sequences is expected in such IgM⁺ cells) (**Fig. 2b**).

Altogether, the 3'RR thus promotes inter-allelic rapprochement and supports AID recruitment on S and VH regions not only in *cis* but also in *trans*.

Gene *trans*-activation occurs in yeast, drosophila and mammals and *cis*-regulatory elements can interact at long-distance in cell-specific manners (Kieffer-Kwon et al., 2013). The IgH locus physiology suggests intra-chromosomal loops (Wuerffel et al., 2007), but also likely require frequent inter-chromosomal contacts accounting for *trans*-CSR. It is unclear whether these *cis*- and *trans*-interactions simply witness nuclear proximity or mediate functional effects in physiology. Deleterious off-target interactions, eventually leading to chromosomal translocation, are also observed at Ig loci and the most frequent translocated oncogene c-myc often co-localize with the IgH locus transcription factory in B-cells, dependent on nucleolar organizer regions (Strongin et al., 2014). AID is normally recruited at switch regions by 3'RR-dependent chromatin marks (Saintamand et al., 2015) but oncogene proximity could promote off-target breaks and eventually translocation. In that sense, it is especially interesting to see that B-cells have developed unique features of allelic transvection between rearranging Ig loci, which promote their legitimate interactions. This may help legitimate junctions between nearby homologous IgH alleles out-compete illegitimate events and contribute to a protection against off-target lesions and deleterious recombination.

Acknowledgements: SLN and BL were supported by Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). We thank M. Brousse, M. Faïsse and S. Lecardeur for technical help. This work was supported by grants from ARC (SL 220100601332), Agence Nationale de la Recherche (ANR grant BSV302701), Ligue Nationale contre le Cancer and Conseil Régional du Limousin.

REFERENCES

- Chen, J.-L., K.L. Huisinga, M.M. Viering, S.A. Ou, C. -tin. Wu, and P.K. Geyer. 2002. Enhancer action in trans is permitted throughout the *Drosophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:3723–3728. doi:10.1073/pnas.062447999.
- Delpy, L., C. Sirac, C. Le Morvan, and M. Cogné. 2004. Transcription-dependent somatic hypermutation occurs at similar levels on functional and nonfunctional rearranged IgH alleles. *J. Immunol.* 173:1842–1848.
- Dougier, H.-L., S. Reynaud, E. Pinaud, C. Carrion, L. Delpy, and M. Cogné. 2006. Interallelic class switch recombination can reverse allelic exclusion and allow trans-complementation of an IgH locus switching defect. *Eur. J. Immunol.* 36:2181–2191. doi:10.1002/eji.200535529.
- Hewitt, S.L., B. Yin, Y. Ji, J. Chaumeil, K. Marszalek, J. Tenthorey, G. Salvagiotto, N. Steinel, L.B. Ramsey, J. Ghysdael, M.A. Farrar, B.P. Sleckman, D.G. Schatz, M. Busslinger, C.H. Bassing, and J.A. Skok. 2009. RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat. Immunol.* 10:655–664. doi:10.1038/ni.1735.
- Holwerda, S.J.B., H.J.G. van de Werken, C. Ribeiro de Almeida, I.M. Bergen, M.J.W. de Bruijn, M.J.A.M. Verstegen, M. Simonis, E. Splinter, P.J. Wijchers, R.W. Hendriks, and W. de Laat. 2013. Allelic exclusion of the immunoglobulin heavy chain locus is independent of its nuclear localization in mature B cells. *Nucleic Acids Res.* 41:6905–6916. doi:10.1093/nar/gkt491.
- Kieffer-Kwon, K.-R., Z. Tang, E. Mathe, J. Qian, M.-H. Sung, G. Li, W. Resch, S. Baek, N. Pruett, L. Grøntved, L. Vian, S. Nelson, H. Zare, O. Hakim, D. Reyon, A. Yamane, H. Nakahashi, A.L. Kovalchuk, J. Zou, J.K. Joung, V. Sartorelli, C.-L. Wei, X. Ruan, G.L. Hager, Y. Ruan, and R. Casellas. 2013. Interactome maps of mouse gene regulatory domains reveal basic principles of transcriptional regulation. *Cell.* 155:1507–1520. doi:10.1016/j.cell.2013.11.039.
- Laffleur, B., S.M. Bardet, A. Garot, M. Brousse, A. Baylet, and M. Cogné. 2014. Immunoglobulin genes undergo legitimate repair in human B cells not only after cis- but also frequent trans-class switch recombination. *Genes Immun.* 15:341–346. doi:10.1038/gene.2014.25.
- Levin-Klein, R., and Y. Bergman. 2014. Epigenetic regulation of monoallelic rearrangement (allelic exclusion) of antigen receptor genes. *Front Immunol.* 5:625. doi:10.3389/fimmu.2014.00625.
- Lewis, E.B. 1954. The theory and application of a new method of detecting chromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*. *American Naturalist.* 88:225–239.
- Marquet, M., A. Garot, S. Bender, C. Carrion, P. Rouaud, S. Lecardeur, Y. Denizot, M. Cogné, and E. Pinaud. 2014. The E μ enhancer region influences H chain expression

- and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response in vivo. *J. Immunol.* 193:1171–1183. doi:10.4049/jimmunol.1302868.
- Noordermeer, D., E. de Wit, P. Klous, H. van de Werken, M. Simonis, M. Lopez-Jones, B. Eussen, A. de Klein, R.H. Singer, and W. de Laat. 2011. Variegated gene expression caused by cell-specific long-range DNA interactions. *Nat. Cell Biol.* 13:944–951. doi:10.1038/ncb2278.
- Park, S.-K., Y. Xiang, X. Feng, and W.T. Garrard. 2014. Pronounced cohabitation of active immunoglobulin genes from three different chromosomes in transcription factories during maximal antibody synthesis. *Genes Dev.* 28:1159–1164. doi:10.1101/gad.237479.114.
- Peron, S., B. Laffleur, N. Denis-Lagache, J. Cook-Moreau, A. Tinguely, L. Delpy, Y. Denizot, E. Pinaud, and M. Cogne. 2012. AID-Driven Deletion Causes Immunoglobulin Heavy Chain Locus Suicide Recombination in B Cells. *Science.* 336:931–934. doi:10.1126/science.1218692.
- Pinaud, E., M. Marquet, R. Fiancette, S. Péron, C. Vincent-Fabert, Y. Denizot, and M. Cogné. 2011. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110:27–70. doi:10.1016/B978-0-12-387663-8.00002-8.
- Reynaud, S., L. Delpy, L. Fleury, H.-L. Dougier, C. Sirac, and M. Cogné. 2005. Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol.* 174:6176–6183.
- Rouaud, P., C. Vincent-Fabert, A. Saintamand, R. Fiancette, M. Marquet, I. Robert, B. Reina-San-Martin, E. Pinaud, M. Cogné, and Y. Denizot. 2013. The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 210:1501–1507. doi:10.1084/jem.20130072.
- Saintamand, A., P. Rouaud, F. Saad, G. Rios, M. Cogné, and Y. Denizot. 2015. Elucidation of IgH 3' region regulatory role during class switch recombination via germline deletion. *Nat Commun.* 6:7084. doi:10.1038/ncomms8084.
- Strongin, D.E., M. Groudine, and J.C.R. Politz. 2014. Nucleolar tethering mediates pairing between the IgH and Myc loci. *Nucleus.* 5:474–481. doi:10.4161/nucl.36233.
- Vincent-Fabert, C., R. Fiancette, E. Pinaud, V. Truffinet, N. Cogné, M. Cogné, and Y. Denizot. 2010. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood.* 116:1895–1898. doi:10.1182/blood-2010-01-264689.
- Wuerffel, R., L. Wang, F. Grigera, J. Manis, E. Selsing, T. Perlot, F.W. Alt, M. Cogne, E. Pinaud, and A.L. Kenter. 2007. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity.* 27:711–722. doi:10.1016/j.immuni.2007.09.007.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Inter-allelic rapprochement and *trans*-CSR.

(a). IgH loci are wt^b and $\Delta 3'RR^a$. 3D-FISH probes (RP23-109B20) in red.

(b). Representative nuclei from activated B-cells from wt , $\Delta 3'RR/\Delta 3'RR$ and $\Delta 3'RR^a/wt^b$ mice (DAPI in blue / IgH loci in red / Scale bars: 4 μ m).

(c). Normalized inter-IgH 3D-FISH distances in individual cells in wt (n=132), homozygous $\Delta 3'RR$ (n=106) and $\Delta 3'RR^a/wt^b$ (n=345) cells. Each point represents one nucleus, mean is shown (>3 experiments with >3 mice per group).

(d). $\Delta E\mu$ and $\Delta 3'RR$ alleles with XbaI (grey) and HindIII (red) restriction sites. Arrows figure primers used for 3C.

(e). $E\mu$ -hs4 or $E\mu$ -hole 3C signals for wt and heterozygous $\Delta E\mu/\Delta 3'RR$ mice, from resting or activated B cells (2 experiments, >3 mice per group).

(f). IgA^a serum levels in homozygous $\Delta 3'RR$ (n=17) and $\Delta 3'RR^a/wt^b$ mice (n=22). Each point represents one mouse, mean is shown (4 experiments, p=0.0007).

Figure 2. *Trans*-SHM in $\Delta 3'RR^a/wt^b$ mice.

(a). Mutated sequences in 3'_H4 intron from Peyer's patches (B220⁺/GL7⁺) in $\Delta 3'RR/\Delta 3'RR$ mice (left) and in $\Delta 3'RR^a$ (middle) and wt^b (right) alleles from $\Delta 3'RR^a/wt^b$ mice (>3 experiments, >3 mice per group).

(b). SHM as in (a) but in B220⁺/GL7⁺/IgM⁺ cells (>3 experiments, > 3 mice per group).

Table 1. *Trans*-SHM in $\Delta 3'RR^a/wt^b$ mice.

Mutation frequencies in 3'_H4 and 3'_K5 introns in B220⁺/GL7⁺ and B220⁺/GL7⁺/IgM⁺ cells from homozygous $\Delta 3'RR$ and $\Delta 3'RR^a/wt^b$ mice. Mice (3 experiments, >3 mice per group, with clonally related sequences counted only once).

	Genotypes	$\Delta 3'RR$		$\Delta 3'RR^a/wt^b$	
	Alleles	IgK (control)	Allele a ($\Delta 3'RR$)	Allele a ($\Delta 3'RR$)	Allele b (<i>wt</i>)
	Analyzed regions	3' _K 5	3' _H 4	3' _H 4	3' _H 4
B220⁺ GL7⁺	Total number of independent sequences	55	57	104	147
	Total number of mutations	515	9	68	880
	Total length analyzed (base pairs)	30,470	29,469	54,285	75,999
	Mutation frequencies (per 1000 base pairs)	16.90	0.31	1.25	11.58
B220⁺ GL7⁺ IgM⁺	Total number of independent sequences	44	96	86	75
	Total number of mutations	143	8	24	135
	Total length analyzed (base pairs)	24,376	49,632	44,462	38,775
	Mutation frequencies (per 1000 base pairs)	5.87	0.16	0.54	3.48

Figure 1

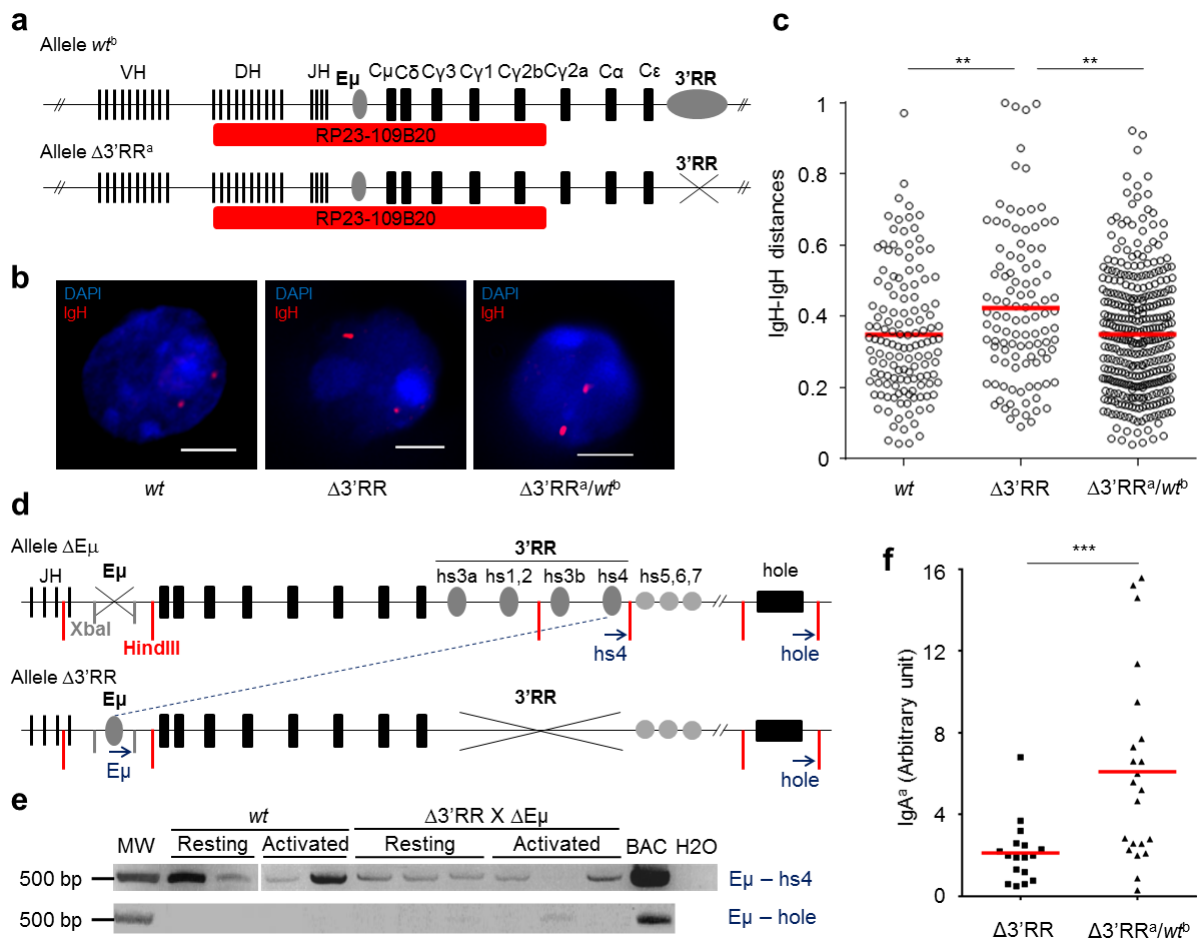
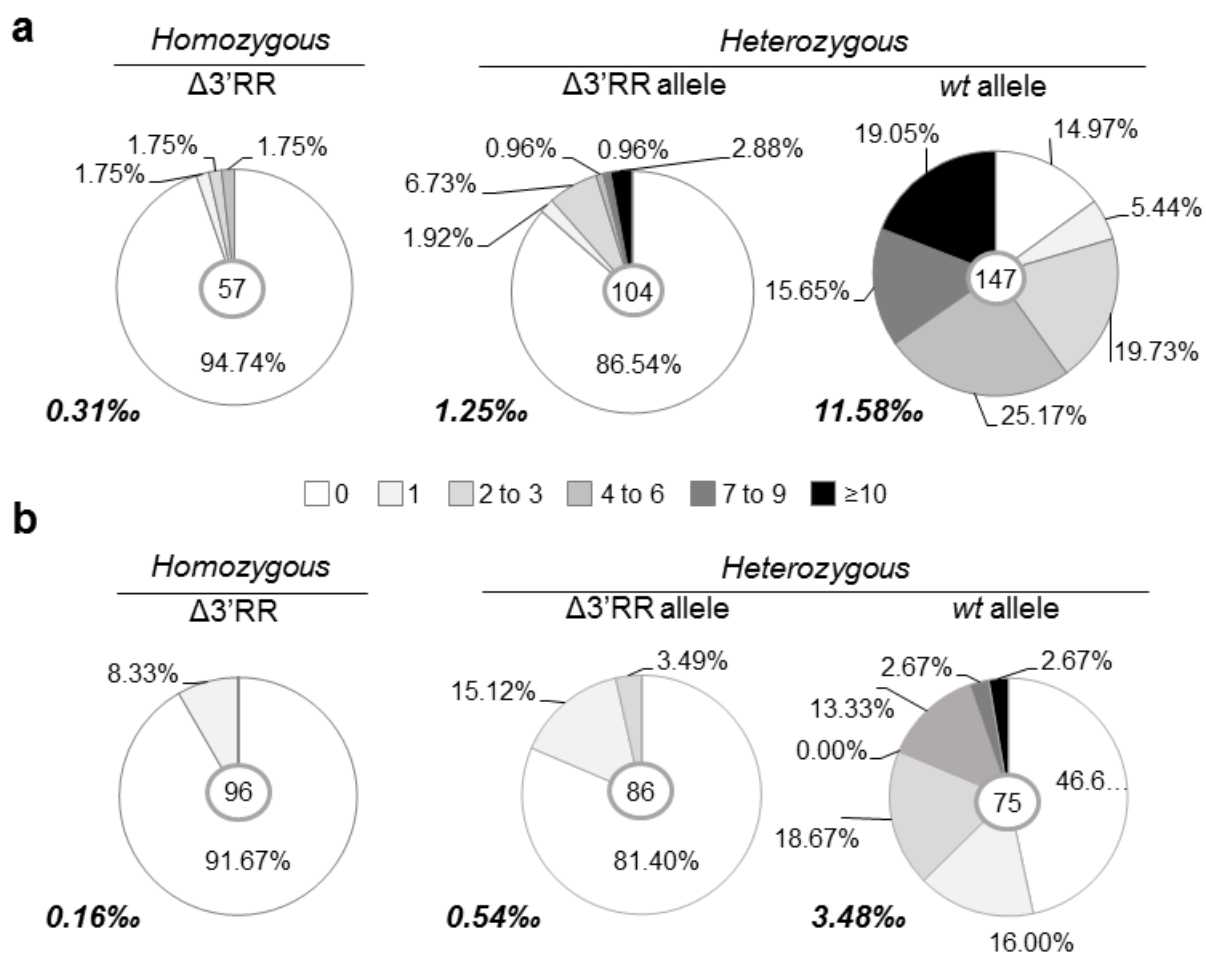


Figure 2



MATERIALS AND METHODS

Mice

Our research has been approved by the local ethics committee review board. $\Delta 3'$ RR-deficient ($\Delta 3'$ RR) IgH^{a/a} mice (Vincent-Fabert et al., 2010) were bred with *wt* IgH^{b/b} (C57BL/6) mice or enhancer E μ -deficient mice (Δ E μ) mice (Marquet et al., 2014). 8–10 weeks old littermates were used in all experiments.

Cell culture

Splenocytes were collected, red blood cells were lysed and CD43 depleted. Splenocytes were cultured 3 days in RPMI containing 10% FCS with LPS (20 μ g/mL).

3D-FISH

Spleen naive B-cells (CD43⁻) were dropped onto poly-L-lysine slides and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature (RT). After washing with PBS, cells were permeabilized with pepsine 0.02% / HCl 0.1M for 15 min at RT. After washing, cells were post-fixed with 1% paraformaldehyde for 5 min at RT. Cells were incubated for 5 min in denaturation bath (70% formamide, 2X SSC) at 72°C and hybridized overnight at 37°C with IgH (RP23-109B20) probes labeled with dCTP-biotine (Invitrogen). Cells were washed in 1X SSC at 72°C for 5 min and incubated with streptavidine-Alexa Fluor 594 (1/200, BD biosciences) 1h at RT. Finally, slides were mounted with vectashield (Vector labs). Images were acquired with an epifluorescence inverted microscope (LEICA DMI6000B). Optical sections separated by 0.2 μ m were collected and stacks were de-convoluted using Huygens software and analyzed with Volocity software.

Chromosome Conformation Capture (3C)

10 million cells were fixed with 10% FCS and 1% formaldehyde for 10 min at RT, and fixation was stopped with glycine (0.125M). Cells were lysed in lysis buffer (Tris 10mM, NaCl 10mM, NP40 2%, supplemented with protease inhibitors) with 10 strokes of a dounce homogenizer

(Pestle A). Nuclei were resuspended in restriction buffer, permeabilized with SDS (0.1%) for 10min at 37°C and triton X-100 (1%) was added. DNA was digested using HindIII restriction enzyme (900U) overnight at 37°C. After HindIII inactivation DNA was ligated with T4 DNA ligase (NEB) overnight at 16°C in 8mL. The crosslink was reversed by proteinase K (500µg) overnight at 65°C and then 300µg of RNase A was added and incubated 1h at 37°C. DNA was extracted with phenol/chloroform and quantify with Qubit (Invitrogen). PCR were performed with Herculase Taq polymerase (Agilent) on 50ng DNA using Eµ primer: TTGACATTCTGGTCAAAACGGC and hs4: CAACCTGTGTCCCTAGAGGAGT or hole: AAATATGTCACTCTCCCTGCTGA using the following program: 95°C 2min, 45 cycles 95°C 20sec, 56°C 20sec, 72°C 15sec and 72°C 3min. BAC RP23-109B20 + 199M11 were used as positive controls.

Allotype-specific ELISA

ELISA for the presence of “a” allotype IgA (IgA^a) was performed on sera from Δ3'RR homozygous and Δ3'RR^a/wt^b heterozygous mice. A pool of wt^{a/b} sera was used as standard.

Flow cytometry and cell sorting

Cell suspensions from Peyer's patches were labeled with B220-APC-, GL7-PE-, IgM-FITC-conjugated antibodies. Sorting of B220⁺/GL7⁺ or B220⁺/GL7⁺/IgM⁺ B-cells was performed on a FACS ARIA 3 (BD Biosciences). Cell sorting quality was validated when SHM frequency at the Kappa locus was superior to 5%.

Somatic hypermutation analysis

SHM analysis was performed as described (Rouaud et al., 2013) from sorted B220⁺PNA^{high}Fas⁺ cells.

Statistical analysis

Mann-Whitney tests were performed using GraphPad Prism (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

Bibliographie

Bibliographie

A

- Addabbo D', P., Scascitelli, M., Giambra, V., Rocchi, M., and Frezza, D. (2011). Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1.2 within the palindrome of IgH 3' Regulatory Region. *BMC Evol. Biol.* 11, 71.
- Adhikary, R., Yu, W., Oda, M., Walker, R.C., Chen, T., Stanfield, R.L., Wilson, I.A., Zimmermann, J., and Romesberg, F.E. (2015). Adaptive mutations alter antibody structure and dynamics during affinity maturation. *Biochemistry (Mosc.)* 54, 2085–2093.
- Afshar, R., Pierce, S., Bolland, D.J., Corcoran, A., and Oltz, E.M. (2006). Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 2439–2447.
- Alessandrini, A., and Desiderio, S.V. (1991). Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2096–2107.
- Allman, D., and Pillai, S. (2008). Peripheral B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 20, 149–157.
- Allman, D., Lindsley, R.C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., and Hardy, R.R. (2001). Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 6834–6840.
- Allman, D.M., Ferguson, S.E., and Cancro, M.P. (1992). Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 149, 2533–2540.
- Alt, F.W., Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S., and Baltimore, D. (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *EMBO J.* 3, 1209–1219.
- Alt, F.W., Oltz, E.M., Young, F., Gorman, J., Taccioli, G., and Chen, J. (1992). VDJ recombination. *Immunol. Today* 13, 306–314.
- Alt F.W, Honjo T, Radbruch A, and Reth M (2015). *Molecular biology of B cells.* (Elsevier).
- Amendola, M., and van Steensel, B. (2014). Mechanisms and dynamics of nuclear lamina-genome interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 28, 61–68.
- An, G., Miner, C.A., Nixon, J.C., Kincade, P.W., Bryant, J., Tucker, P.W., and Webb, C.F. (2010). Loss of Bright/ARID3a function promotes developmental plasticity. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 1560–1567.
- Aoufouchi, S., Faili, A., Zober, C., D'Orlando, O., Weller, S., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2008). Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J. Exp. Med.* 205, 1357–1368.

B

- Bachl, J., Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M., and Olsson, C. (2001). Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 5051–5057.
- Banerji, J., Olson, L., and Schaffner, W. (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 33, 729–740.

Bibliographie

- Bankovich, A.J., Raunser, S., Juo, Z.S., Walz, T., Davis, M.M., and Garcia, K.C. (2007). Structural insight into pre-B cell receptor function. *Science* 316, 291–294.
- 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.
- Basu, U., Franklin, A., Schwer, B., Cheng, H.-L., Chaudhuri, J., and Alt, F.W. (2009). Regulation of activation-induced cytidine deaminase DNA deamination activity in B-cells by Ser38 phosphorylation. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 561–568.
- Basu, U., Meng, F.-L., Keim, C., Grinstein, V., Pefanis, E., Eccleston, J., Zhang, T., Myers, D., Wasserman, C.R., Wesemann, D.R., et al. (2011). The RNA exosome targets the AID cytidine deaminase to both strands of transcribed duplex DNA substrates. *Cell* 144, 353–363.
- Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 34–46.
- Bébin, A.-G., Carrion, C., Marquet, M., Cogné, N., Lecardeur, S., Cogne, M., and Pinaud, E. (2010). In vivo redundant function of the 3' IgH regulatory element HS3b in the mouse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 184, 3710–3717.
- Birshtein, B.K. (2014). Epigenetic Regulation of Individual Modules of the immunoglobulin heavy chain locus 3' Regulatory Region. *Front. Immunol.* 5, 163.
- Birshtein, B.K., Chen, C., Saleque, S., Michaelson, J.S., Singh, M., and Little, R.D. (1997). Murine and human 3'IgH regulatory sequences. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 224, 73–80.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Johnston, C.M., Bunting, S.F., Morgan, G., Chakalova, L., Fraser, P.J., and Corcoran, A.E. (2004). Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination. *Nat. Immunol.* 5, 630–637.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Afshar, R., Featherstone, K., Oltz, E.M., and Corcoran, A.E. (2007). Antisense intergenic transcription precedes Igh D-to-J recombination and is controlled by the intronic enhancer Emu. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5523–5533.
- Boller, S., and Grosschedl, R. (2014). The regulatory network of B-cell differentiation: a focused view of early B-cell factor 1 function. *Immunol. Rev.* 261, 102–115.
- Bossen, C., Mansson, R., and Murre, C. (2012). Chromatin topology and the regulation of antigen receptor assembly. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 337–356.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M.D., and Goodman, M.F. (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4102–4107.

C

- Calado, D.P., Sasaki, Y., Godinho, S.A., Pellerin, A., Köchert, K., Sleckman, B.P., de Alborán, I.M., Janz, M., Rodig, S., and Rajewsky, K. (2012). The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. *Nat. Immunol.* 13, 1092–1100.
- Cantrell, D. (2015). Signaling in Lymphocyte Activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7.
- Cariappa, A., Chase, C., Liu, H., Russell, P., and Pillai, S. (2007a). Naive recirculating B cells mature simultaneously in the spleen and bone marrow. *Blood* 109, 2339–2345.
- Cariappa, A., Boboila, C., Moran, S.T., Liu, H., Shi, H.N., and Pillai, S. (2007b). The

Bibliographie

- recirculating B cell pool contains two functionally distinct, long-lived, posttransitional, follicular B cell populations. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 2270–2281.
- Cerutti, A., Cols, M., and Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 118–132.
- Cervenak, L., Magyar, A., Boja, R., and László, G. (2001). Differential expression of GL7 activation antigen on bone marrow B cell subpopulations and peripheral B cells. *Immunol. Lett.* 78, 89–96.
- Chakraborty, T., Chowdhury, D., Keyes, A., Jani, A., Subrahmanyam, R., Ivanova, I., and Sen, R. (2007). Repeat organization and epigenetic regulation of the DH-Cmu domain of the immunoglobulin heavy-chain gene locus. *Mol. Cell* 27, 842–850.
- Chakraborty, T., Perlot, T., Subrahmanyam, R., Jani, A., Goff, P.H., Zhang, Y., Ivanova, I., Alt, F.W., and Sen, R. (2009). A 220-nucleotide deletion of the intronic enhancer reveals an epigenetic hierarchy in immunoglobulin heavy chain locus activation. *J. Exp. Med.* 206, 1019–1027.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2003). Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422, 726–730.
- Chaudhuri, J., Basu, U., Zarrin, A., Yan, C., Franco, S., Perlot, T., Vuong, B., Wang, J., Phan, R.T., Datta, A., et al. (2007). Evolution of the immunoglobulin heavy chain class switch recombination mechanism. *Adv. Immunol.* 94, 157–214.
- Chauveau, C., and Cogné, M. (1996). Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat. Genet.* 14, 15–16.
- Chauveau, C., Pinaud, E., and Cogne, M. (1998). Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur. J. Immunol.* 28, 3048–3056.
- Chauveau, C., Jansson, E.A., Müller, S., Cogné, M., and Pettersson, S. (1999). Cutting edge: Ig heavy chain 3' HS1-4 directs correct spatial position-independent expression of a linked transgene to B lineage cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 4637–4641.
- Choi, N.M., and Feeney, A.J. (2014). CTCF and ncRNA Regulate the Three-Dimensional Structure of Antigen Receptor Loci to Facilitate V(D)J Recombination. *Front. Immunol.* 5, 49.
- Chowdhury, D., and Sen, R. (2001). Stepwise activation of the immunoglobulin mu heavy chain gene locus. *EMBO J.* 20, 6394–6403.
- Chowdhury, D., and Sen, R. (2004). Regulation of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements. *Immunol. Rev.* 200, 182–196.
- Chung, J.B., Silverman, M., and Monroe, J.G. (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* 24, 343–349.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., and Busslinger, M. (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* 8, 463–470.
- Cogne, M. (2013). Activation-induced deaminase in B lymphocyte maturation and beyond. *Biomed. J.* 36, 259–268.
- Cogné, M., Lansford, R., Bottaro, A., Zhang, J., Gorman, J., Young, F., Cheng, H.L., and Alt, F.W. (1994). A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* 77, 737–747.
- Cooper, M.D. (2015). The early history of B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 191–197.
- Corcoran, A.E. (2010). The epigenetic role of non-coding RNA transcription and nuclear organization in immunoglobulin repertoire generation. *Semin. Immunol.* 22, 353–361.
- Czerny, T., Schaffner, G., and Busslinger, M. (1993). DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev.* 7, 2048–2061.

D

- Daly, J., Licence, S., Nanou, A., Morgan, G., and Mårtensson, I.-L. (2007). Transcription of productive and nonproductive VDJ-recombined alleles after IgH allelic exclusion. *EMBO J.* 26, 4273–4282.
- Dariavach, P., Williams, G.T., Campbell, K., Pettersson, S., and Neuberger, M.S. (1991). The mouse IgH 3'-enhancer. *Eur. J. Immunol.* 21, 1499–1504.
- Davis, M.M., Calame, K., Early, P.W., Livant, D.L., Joho, R., Weissman, I.L., and Hood, L. (1980). An immunoglobulin heavy-chain gene is formed by at least two recombinational events. *Nature* 283, 733–739.
- Dean, A. (2006). On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends Genet. TIG* 22, 38–45.
- Degner, S.C., Verma-Gaur, J., Wong, T.P., Bossen, C., Iverson, G.M., Torkamani, A., Vettermann, C., Lin, Y.C., Ju, Z., Schulz, D., et al. (2011). CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin influence the genomic architecture of the Igh locus and antisense transcription in pro-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 9566–9571.
- DeKoter, R.P., and Singh, H. (2000). Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1. *Science* 288, 1439–1441.
- Dengler, H.S., Baracho, G.V., Omori, S.A., Bruckner, S., Arden, K.C., Castrillon, D.H., DePinho, R.A., and Rickert, R.C. (2008). Distinct functions for the transcription factor Foxo1 at various stages of B cell differentiation. *Nat. Immunol.* 9, 1388–1398.
- Deriano, L., and Roth, D.B. (2013). Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu. Rev. Genet.* 47, 433–455.
- Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E., and Papavasiliou, F.N. (2003). AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J. Exp. Med.* 197, 1291–1296.
- Dobrev, G., Dambacher, J., and Grosschedl, R. (2003). SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin mu gene expression. *Genes Dev.* 17, 3048–3061.
- 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.
- Dougier, H.-L., Reynaud, S., Pinaud, E., Carrion, C., Delpy, L., and Cogné, M. (2006). Interallelic class switch recombination can reverse allelic exclusion and allow trans-complementation of an IgH locus switching defect. *Eur. J. Immunol.* 36, 2181–2191.
- Dunnick, W.A., Shi, J., Fontaine, C., and Collins, J.T. (2013). Transgenes of the mouse immunoglobulin heavy chain locus, lacking distal elements in the 3' regulatory region, are impaired for class switch recombination. *PloS One* 8, e55842.
- Durandy, A., Peron, S., Taubenheim, N., and Fischer, A. (2006). Activation-induced cytidine deaminase: structure-function relationship as based on the study of mutants. *Hum. Mutat.* 27, 1185–1191.

E

- Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K., and Hood, L. (2004). An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. 1980. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 6503–6514.
- Ebert, A., McManus, S., Tagoh, H., Medvedovic, J., Salvagiotto, G., Novatchkova, M., Tamir, I., Sommer, A., Jaritz, M., and Busslinger, M. (2011). The distal V(H) gene cluster of the Igh locus contains distinct regulatory elements with Pax5 transcription

Bibliographie

- factor-dependent activity in pro-B cells. *Immunity* 34, 175–187.
- Edelman, G.M. (1959). DISSOCIATION OF γ -GLOBULIN. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 3155–3156.
- Ernst, P., and Smale, S.T. (1995). Combinatorial regulation of transcription II: the immunoglobulin μ heavy chain gene. *Immunity* 2, 427–438.
- 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.

F

- Fear, D.J. (2013). Mechanisms regulating the targeting and activity of activation induced cytidine deaminase. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 619–628.
- Featherstone, K., Wood, A.L., Bowen, A.J., and Corcoran, A.E. (2010). The mouse immunoglobulin heavy chain V-D intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V(D)J recombination. *J. Biol. Chem.* 285, 9327–9338.
- Filippova, G.N. (2008). Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF. *Curr. Top. Dev. Biol.* 80, 337–360.
- Flajnik, M.F., and Kasahara, M. (2010). Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat. Rev. Genet.* 11, 47–59.
- Fraser, J., Williamson, I., Bickmore, W.A., and Dostie, J. (2015). An Overview of Genome Organization and How We Got There: from FISH to Hi-C. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 79, 347–372.
- Fritz, E.L., and Papavasiliou, F.N. (2010). Cytidine deaminases: AIDing DNA demethylation? *Genes Dev.* 24, 2107–2114.
- Fritz, E.L., Rosenberg, B.R., Lay, K., Mihailović, A., Tuschl, T., and Papavasiliou, F.N. (2013). A comprehensive analysis of the effects of the deaminase AID on the transcriptome and methylome of activated B cells. *Nat. Immunol.* 14, 749–755.
- Fukita, Y., Jacobs, H., and Rajewsky, K. (1998). Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* 9, 105–114.
- Fuxa, M., and Skok, J.A. (2007). Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 129–136.
- 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.

G

- Garrett, F.E., Emelyanov, A.V., Sepulveda, M.A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L.A., Lobanenko, V.V., and Birshtein, B.K. (2005). Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1511–1525.
- Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 7, 703–713.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J.H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., and Sharpe, A. (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 79, 143–156.
- Giallourakis, C.C., Franklin, A., Guo, C., Cheng, H.-L., Yoon, H.S., Gallagher, M., Perlot, T., Andzelm, M., Murphy, A.J., Macdonald, L.E., et al. (2010). Elements between the IgH variable (V) and diversity (D) clusters influence antisense transcription and

Bibliographie

- lineage-specific V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22207–22212.
- Giannini, S.L., Singh, M., Calvo, C.F., Ding, G., and Birshstein, B.K. (1993). DNA regions flanking the mouse Ig 3' alpha enhancer are differentially methylated and DNAase I hypersensitive during B cell differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 150, 1772–1780.
- Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T., and Tonegawa, S. (1983). A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* 33, 717–728.
- Giltiay, N.V., Lu, Y., Allman, D., Jørgensen, T.N., and Li, X. (2010). The adaptor molecule Act1 regulates BAFF responsiveness and self-reactive B cell selection during transitional B cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 99–109.
- Gluch, A., Vidakovic, M., and Bode, J. (2008). Scaffold/matrix attachment regions (S/MARs): relevance for disease and therapy. *Handb. Exp. Pharmacol.* 67–103.
- Goebel, P., Janney, N., Valenzuela, J.R., Romanow, W.J., Murre, C., and Feeney, A.J. (2001). Localized gene-specific induction of accessibility to V(D)J recombination induced by E2A and early B cell factor in nonlymphoid cells. *J. Exp. Med.* 194, 645–656.
- Goebel, P., Montalbano, A., Ayers, N., Kompfner, E., Dickinson, L., Webb, C.F., and Feeney, A.J. (2002). High frequency of matrix attachment regions and cut-like protein x/CCAAT-displacement protein and B cell regulator of IgH transcription binding sites flanking Ig V region genes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 169, 2477–2487.
- Gold, M.R., Scheid, M.P., Santos, L., Dang-Lawson, M., Roth, R.A., Matsuuchi, L., Duronio, V., and Krebs, D.L. (1999). The B cell antigen receptor activates the Akt (protein kinase B)/glycogen synthase kinase-3 signaling pathway via phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 1894–1905.
- Gostissa, M., Yan, C.T., Bianco, J.M., Cogné, M., Pinaud, E., and Alt, F.W. (2009). Long-range oncogenic activation of Igh-c-myc translocations by the Igh 3' regulatory region. *Nature* 462, 803–807.
- Gramlich, H.S., Reisbig, T., and Schatz, D.G. (2012). AID-targeting and hypermutation of non-immunoglobulin genes does not correlate with proximity to immunoglobulin genes in germinal center B cells. *PLoS One* 7, e39601.
- Gregor, P.D., and Morrison, S.L. (1986). Myeloma mutant with a novel 3' flanking region: loss of normal sequence and insertion of repetitive elements leads to decreased transcription but normal processing of the alpha heavy-chain gene products. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1903–1916.
- Gregor, P.D., Kobrin, B.J., Milcarek, C., and Morrison, S.L. (1986). Sequences 3' of immunoglobulin heavy chain genes influence their expression. *Immunol. Rev.* 89, 31–48.
- Guglielmi, L., Le Bert, M., Comte, I., Dessain, M.L., Drouet, M., Ayer-Le Lievre, C., Cogné, M., and Denizot, Y. (2003a). Combination of 3' and 5' IgH regulatory elements mimics the B-specific endogenous expression pattern of IgH genes from pro-B cells to mature B cells in a transgenic mouse model. *Biochim. Biophys. Acta* 1642, 181–190.
- Guglielmi, L., Le Bert, M., Truffinet, V., Cogné, M., and Denizot, Y. (2003b). Insulators to improve expression of a 3' IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307, 466–471.
- Guo, C., Yoon, H.S., Franklin, A., Jain, S., Ebert, A., Cheng, H.-L., Hansen, E., Despo, O., Bossen, C., Vettermann, C., et al. (2011). CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* 477, 424–430.

H

- Haas, K.M. (2015). B-1 lymphocytes in mice and nonhuman primates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*
- Hackney, J.A., Misaghi, S., Senger, K., Garris, C., Sun, Y., Lorenzo, M.N., and Zarrin, A.A. (2009). DNA targets of AID evolutionary link between antibody somatic hypermutation and class switch recombination. *Adv. Immunol.* 101, 163–189.
- Haddad, D., Puget, N., Laviolette-Malirat, N., Conte, C., and Khamlichi, A.A. (2011). Seeking sense of antisense switch transcripts. *Transcription* 2, 183–188.
- Hakim, O., Resch, W., Yamane, A., Klein, I., Kieffer-Kwon, K.-R., Jankovic, M., Oliveira, T., Bothmer, A., Voss, T.C., Ansarah-Sobrinho, C., et al. (2012). DNA damage defines sites of recurrent chromosomal translocations in B lymphocytes. *Nature* 484, 69–74.
- Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 173, 1213–1225.
- Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K.A., et al. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* 39, 311–318.
- Heintzman, N.D., Hon, G.C., Hawkins, R.D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L.F., Ye, Z., Lee, L.K., Stuart, R.K., Ching, C.W., et al. (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* 459, 108–112.
- Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H., and Glass, C.K. (2010). Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell* 38, 576–589.
- Herzog, S., Reth, M., and Jumaa, H. (2009). Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 195–205.
- Hewitt, S.L., Farmer, D., Marszalek, K., Cadera, E., Liang, H.-E., Xu, Y., Schlissel, M.S., and Skok, J.A. (2008). Association between the Igk and Igh immunoglobulin loci mediated by the 3' Igk enhancer induces “decontraction” of the Igh locus in pre-B cells. *Nat. Immunol.* 9, 396–404.
- Hewitt, S.L., Yin, B., Ji, Y., Chaumeil, J., Marszalek, K., Tenthorey, J., Salvagiotto, G., Steinel, N., Ramsey, L.B., Ghysdael, J., et al. (2009a). RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat. Immunol.* 10, 655–664.
- Hewitt, S.L., Yin, B., Ji, Y., Chaumeil, J., Marszalek, K., Tenthorey, J., Salvagiotto, G., Steinel, N., Ramsey, L.B., Ghysdael, J., et al. (2009b). RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat. Immunol.* 10, 655–664.
- Hnisz, D., Abraham, B.J., Lee, T.I., Lau, A., Saint-André, V., Sigova, A.A., Hoke, H.A., and Young, R.A. (2013). Super-enhancers in the control of cell identity and disease. *Cell* 155, 934–947.
- Hoek, K.L., Carlesso, G., Clark, E.S., and Khan, W.N. (2009). Absence of mature peripheral B cell populations in mice with concomitant defects in B cell receptor and BAFF-R signaling. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 183, 5630–5643.
- Hozumi, N., and Tonegawa, S. (2004). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. 1976 [classical article]. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 4260–4264.
- Hu, Y., Ericsson, I., Torseth, K., Methot, S.P., Sundheim, O., Liabakk, N.B., Slupphaug, G., Di Noia, J.M., Krokan, H.E., and Kavli, B. (2013). A combined nuclear and nucleolar

Bibliographie

localization motif in activation-induced cytidine deaminase (AID) controls immunoglobulin class switching. *J. Mol. Biol.* 425, 424–443.

Hwang, J.K., Alt, F.W., and Yeap, L.-S. (2015). Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol. Spectr.* 3.

I

Ito, S., Nagaoka, H., Shinkura, R., Begum, N., Muramatsu, M., Nakata, M., and Honjo, T. (2004). Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1975–1980.

J

Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U. (1991). Intracloonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354, 389–392.

Jeevan-Raj, B.P., Robert, I., Heyer, V., Page, A., Wang, J.H., Cammas, F., Alt, F.W., Losson, R., and Reina-San-Martin, B. (2011). Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 208, 1649–1660.

Jeppsson, K., Kanno, T., Shirahige, K., and Sjögren, C. (2014). The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 601–614.

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

Johnson, K., Pflugh, D.L., Yu, D., Hesslein, D.G.T., Lin, K.-I., Bothwell, A.L.M., Thomas-Tikhonenko, A., Schatz, D.G., and Calame, K. (2004). B cell-specific loss of histone 3 lysine 9 methylation in the V(H) locus depends on Pax5. *Nat. Immunol.* 5, 853–861.

Ju, Z., Volpi, S.A., Hassan, R., Martinez, N., Giannini, S.L., Gold, T., and Birshtein, B.K. (2007). Evidence for physical interaction between the immunoglobulin heavy chain variable region and the 3' regulatory region. *J. Biol. Chem.* 282, 35169–35178.

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

K

Katainen, R., Dave, K., Pitkänen, E., Palin, K., Kivioja, T., Välimäki, N., Gylfe, A.E., Ristolainen, H., Hänninen, U.A., Cajuso, T., et al. (2015). CTCF/cohesin-binding sites are frequently mutated in cancer. *Nat. Genet.* 47, 818–821.

Kato, L., Begum, N.A., Burroughs, A.M., Doi, T., Kawai, J., Daub, C.O., Kawaguchi, T., Matsuda, F., Hayashizaki, Y., and Honjo, T. (2012). Nonimmunoglobulin target loci of activation-induced cytidine deaminase (AID) share unique features with immunoglobulin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2479–2484.

Keim, C., Kazadi, D., Rothschild, G., and Basu, U. (2013). Regulation of AID, the B-cell genome mutator. *Genes Dev.* 27, 1–17.

Kerfoot, S.M., Yaari, G., Patel, J.R., Johnson, K.L., Gonzalez, D.G., Kleinstein, S.H., and Haberman, A.M. (2011). Germinal center B cell and T follicular helper cell development initiates in the interfollicular zone. *Immunity* 34, 947–960.

Bibliographie

- Khamlichi, A.A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Le Bert, M., and Cogné, M. (2004). Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood* 103, 3828–3836.
- Kingzette, M., Spieker-Polet, H., Yam, P.C., Zhai, S.K., and Knight, K.L. (1998). Trans-chromosomal recombination within the Ig heavy chain switch region in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11840–11845.
- Kisseljova, N.P., Dmitriev, P., Katargin, A., Kim, E., Ezerina, D., Markozashvili, D., Malysheva, D., Planche, E., Lemmers, R.J.L.F., van der Maarel, S.M., et al. (2014). DNA polymorphism and epigenetic marks modulate the affinity of a scaffold/matrix attachment region to the nuclear matrix. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 22, 1117–1123.
- Kitamura, D., Roes, J., Kühn, R., and Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350, 423–426.
- Kitano, M., Moriyama, S., Ando, Y., Hikida, M., Mori, Y., Kurosaki, T., and Okada, T. (2011). Bcl6 protein expression shapes pre-germinal center B cell dynamics and follicular helper T cell heterogeneity. *Immunity* 34, 961–972.
- Klenova, E.M., Nicolas, R.H., Paterson, H.F., Carne, A.F., Heath, C.M., Goodwin, G.H., Neiman, P.E., and Lobanekov, V.V. (1993). CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7612–7624.
- Kocks, C., and Rajewsky, K. (1989). Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 537–559.
- Kolovos, P., Knoch, T.A., Grosveld, F.G., Cook, P.R., and Papantonis, A. (2012). Enhancers and silencers: an integrated and simple model for their function. *Epigenetics Chromatin* 5, 1.
- Kosak, S.T., Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Le Beau, M.M., Fisher, A.G., and Singh, H. (2002). Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* 296, 158–162.
- Kovalchuk, A.L., Qi, C.F., Torrey, T.A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S.S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoertnagel, K., Polack, A., et al. (2000). Burkitt lymphoma in the mouse. *J. Exp. Med.* 192, 1183–1190.
- Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 149–159.

L

- Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Péron, S., Sirac, C., Moreau, J., and Cogné, M. (2014a). AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* 5, 1118–1131.
- Laffleur, B., Bardet, S.M., Garot, A., Brousse, M., Baylet, A., and Cogné, M. (2014b). Immunoglobulin genes undergo legitimate repair in human B cells not only after cis- but also frequent trans-class switch recombination. *Genes Immun.*
- Lai, F., and Shiekhattar, R. (2014). Enhancer RNAs: the new molecules of transcription. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 25, 38–42.
- Langdon, W.Y., Harris, A.W., Cory, S., and Adams, J.M. (1986). The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E-mu-myc transgenic mice. *Cell* 47, 11–18.
- Lara-Ochoa, F., Vargas-Madrado, E., Jimenez-Montano, M.A., and Almagro, J.C. (1994). Patterns in the complementary determining regions of immunoglobulins (CDRs).

Bibliographie

- Biosystems 32, 1–9.
- Lawton, A.R., Asofsky, R., Hylton, M.B., and Cooper, M.D. (1972). Suppression of immunoglobulin class synthesis in mice. I. Effects of treatment with antibody to κ -chain. *J. Exp. Med.* 135, 277–297.
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., et al. (2009). IMGT, the international ImmunoGeneTics information system. *Nucleic Acids Res.* 37, D1006–D1012.
- Lennon, G.G., and Perry, R.P. (1985). C μ -containing transcripts initiate heterogeneously within the IgH enhancer region and contain a novel 5'-nontranslatable exon. *Nature* 318, 475–478.
- Li, F., and Eckhardt, L.A. (2009). A role for the IgH intronic enhancer E μ in enforcing allelic exclusion. *J. Exp. Med.* 206, 153–167.
- Li, F., Yan, Y., Pieretti, J., Feldman, D.A., and Eckhardt, L.A. (2010). Comparison of identical and functional Igh alleles reveals a nonessential role for E μ in somatic hypermutation and class-switch recombination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 185, 6049–6057.
- Li, G., Zan, H., Xu, Z., and Casali, P. (2013). Epigenetics of the antibody response. *Trends Immunol.* 34, 460–470.
- Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X., and Stamatoyannopoulos, G. (2002). Locus control regions. *Blood* 100, 3077–3086.
- Liang, G., Kitamura, K., Wang, Z., Liu, G., Chowdhury, S., Fu, W., Koura, M., Wakae, K., Honjo, T., and Muramatsu, M. (2013). RNA editing of hepatitis B virus transcripts by activation-induced cytidine deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2246–2251.
- Lieberson, R., Giannini, S.L., Birshtein, B.K., and Eckhardt, L.A. (1991). An enhancer at the 3' end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucleic Acids Res.* 19, 933–937.
- Lin, Y.C., Jhunjhunwala, S., Benner, C., Heinz, S., Welinder, E., Mansson, R., Sigvardsson, M., Hagman, J., Espinoza, C.A., Dutkowski, J., et al. (2010). A global network of transcription factors, involving E2A, EBF1 and Foxo1, that orchestrates B cell fate. *Nat. Immunol.* 11, 635–643.
- Lindsley, R.C., Thomas, M., Srivastava, B., and Allman, D. (2007). Generation of peripheral B cells occurs via two spatially and temporally distinct pathways. *Blood* 109, 2521–2528.
- Liu, H., Schmidt-Supprian, M., Shi, Y., Hobeika, E., Barteneva, N., Jumaa, H., Pelanda, R., Reth, M., Skok, J., Rajewsky, K., et al. (2007a). Yin Yang 1 is a critical regulator of B-cell development. *Genes Dev.* 21, 1179–1189.
- Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008a). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841–845.
- Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008b). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841–845.
- Liu, Y., Subrahmanyam, R., Chakraborty, T., Sen, R., and Desiderio, S. (2007b). A plant homeodomain in RAG-2 that binds Hypermethylated lysine 4 of histone H3 is necessary for efficient antigen-receptor-gene rearrangement. *Immunity* 27, 561–571.
- Liubchenko, G.A., Appleberry, H.C., Holers, V.M., Banda, N.K., Willis, V.C., and Lyubchenko, T. (2012). Potentially autoreactive naturally occurring transitional T3 B lymphocytes exhibit a unique signaling profile. *J. Autoimmun.* 38, 293–303.
- Lobanenkov, V.V., Nicolas, R.H., Adler, V.V., Paterson, H., Klenova, E.M., Polotskaja, A.V., and Goodwin, G.H. (1990). A novel sequence-specific DNA binding protein

Bibliographie

- which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene* 5, 1743–1753.
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., and Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* 190, 75–89.
- Lovén, J., Hoke, H.A., Lin, C.Y., Lau, A., Orlando, D.A., Vakoc, C.R., Bradner, J.E., Lee, T.I., and Young, R.A. (2013). Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell* 153, 320–334.
- Luby, T.M., Schrader, C.E., Stavnezer, J., and Selsing, E. (2001). The mu switch region tandem repeats are important, but not required, for antibody class switch recombination. *J. Exp. Med.* 193, 159–168.

M

- Madisen, L., and Groudine, M. (1994). Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy-chain locus that deregulates c-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes Dev.* 8, 2212–2226.
- Manis, J.P., van der Stoep, N., Tian, M., Ferrini, R., Davidson, L., Bottaro, A., and Alt, F.W. (1998). Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J. Exp. Med.* 188, 1421–1431.
- Mansson, R., Zandi, S., Welinder, E., Tsapogas, P., Sakaguchi, N., Bryder, D., and Sigvardsson, M. (2010). Single-cell analysis of the common lymphoid progenitor compartment reveals functional and molecular heterogeneity. *Blood* 115, 2601–2609.
- Marquet, M., Garot, A., Bender, S., Carrion, C., Rouaud, P., Lecardeur, S., Denizot, Y., Cogné, M., and Pinaud, E. (2014a). The E μ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 1171–1183.
- Marquet, M., Garot, A., Bender, S., Carrion, C., Rouaud, P., Lecardeur, S., Denizot, Y., Cogné, M., and Pinaud, E. (2014b). The E μ enhancer region influences H chain expression and B cell fate without impacting IgVH repertoire and immune response in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 193, 1171–1183.
- Martin, F., and Kearney, J.F. (2001). B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 195–201.
- Matthews, A.G.W., Kuo, A.J., Ramón-Maiques, S., Han, S., Champagne, K.S., Ivanov, D., Gallardo, M., Carney, D., Cheung, P., Ciccone, D.N., et al. (2007). RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* 450, 1106–1110.
- Matthias, P., and Baltimore, D. (1993). The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3' enhancer close to the alpha constant region. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1547–1553.
- Maul, R.W., Saribasak, H., Martomo, S.A., McClure, R.L., Yang, W., Vaisman, A., Gramlich, H.S., Schatz, D.G., Woodgate, R., Iii, D.M.W., et al. (2011). Uracil residues dependent on the deaminase AID in immunoglobulin gene variable and switch regions. *Nat. Immunol.* 12, 70–76.
- McBlane, F., and Boyes, J. (2000). Stimulation of V(D)J recombination by histone acetylation. *Curr. Biol. CB* 10, 483–486.
- McKean, D., Huppi, K., Bell, M., Staudt, L., Gerhard, W., and Weigert, M. (1984). Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 3180–3184.
- Medvedovic, J., Ebert, A., Tagoh, H., Tamir, I.M., Schwickert, T.A., Novatchkova, M., Sun,

Bibliographie

- Q., Huis In 't Veld, P.J., Guo, C., Yoon, H.S., et al. (2013). Flexible long-range loops in the VH gene region of the Igh locus facilitate the generation of a diverse antibody repertoire. *Immunity* 39, 229–244.
- Meffre, E., Casellas, R., and Nussenzweig, M.C. (2000). Antibody regulation of B cell development. *Nat. Immunol.* 1, 379–385.
- Melchers, F., Boekel, E. Ten, Seidl, T., Kong, X.C., Yamagami, T., Onishi, K., Shimizu, T., Rolink, A.G., and Andersson, J. (2000). Repertoire selection by pre-B-cell receptors and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol. Rev.* 175, 33–46.
- Michaelson, J.S., Giannini, S.L., and Birshstein, B.K. (1995). Identification of 3' alpha-hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic Acids Res.* 23, 975–981.
- Miosge, L.A., and Goodnow, C.C. (2005). Genes, pathways and checkpoints in lymphocyte development and homeostasis. *Immunol. Cell Biol.* 83, 318–335.
- Miyazaki, K., Miyazaki, M., and Murre, C. (2014). The Establishment of B versus T Cell Identity. *Trends Immunol.* 35, 205–210.
- Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2006). New perspectives in B-1 B cell development and function. *Trends Immunol.* 27, 428–433.
- Montecino-Rodriguez, E., and Dorshkind, K. (2012). B-1 B cell development in the fetus and adult. *Immunity* 36, 13–21.
- Morgado, M.G., Cam, P., Gris-Liebe, C., Cazenave, P.A., and Jouvin-Marche, E. (1989). Further evidence that BALB/c and C57BL/6 gamma 2a genes originate from two distinct isotypes. *EMBO J.* 8, 3245–3251.
- Le Morvan, C., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A., and Cogné, M. (2003). The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* 102, 1421–1427.
- Mostoslavsky, R., Singh, N., Kirillov, A., Pelanda, R., Cedar, H., Chess, A., and Bergman, Y. (1998). Kappa chain monoallelic demethylation and the establishment of allelic exclusion. *Genes Dev.* 12, 1801–1811.
- Mueller, S.N., and Germain, R.N. (2009). Stromal cell contributions to the homeostasis and functionality of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 618–629.
- 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.

N

- Nabel, C.S., Lee, J.W., Wang, L.C., and Kohli, R.M. (2013). Nucleic acid determinants for selective deamination of DNA over RNA by activation-induced deaminase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 14225–14230.
- Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 107–116.
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635–638.

Bibliographie

- Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., et al. (2007). Germinal Center Marker GL7 Probes Activation-Dependent Repression of N-Glycolylneuraminic Acid, a Sialic Acid Species Involved in the Negative Modulation of B-Cell Activation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3008–3022.
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.-G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). Transcription-Coupled Events Associating with Immunoglobulin Switch Region Chromatin. *Science* 302, 2137–2140.
- Nicolás, L., and Chaudhuri, J. (2013). 4C-ing the Igh Landscape. *Immunity* 39, 199–201.
- Nihiro, H., and Clark, E.A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 945–956.
- Nutt, S.L., Urbánek, P., Rolink, A., and Busslinger, M. (1997). Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev.* 11, 476–491.
- Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* 401, 556–562.
- 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.

O

- 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.
- Oldham, A.L., Miner, C.A., Wang, H.-C., and Webb, C.F. (2011). The transcription factor Bright plays a role in marginal zone B lymphocyte development and autoantibody production. *Mol. Immunol.* 49, 367–379.
- Ong, C.-T., and Corces, V.G. (2014). CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat. Rev. Genet.* 15, 234–246.
- Ong, J., Stevens, S., Roeder, R.G., and Eckhardt, L.A. (1998). 3' IgH enhancer elements shift synergistic interactions during B cell development. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 160, 4896–4903.
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Mitchell, J.A., Horton, A., Wood, A.L., Bolland, D.J., Corcoran, A.E., and Fraser, P. (2007). Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol.* 5, e192.
- Osmond, D.G. (1991). Proliferation kinetics and the lifespan of B cells in central and peripheral lymphoid organs. *Curr. Opin. Immunol.* 3, 179–185.
- Osmond, D.G., Rolink, A., and Melchers, F. (1998). Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol. Today* 19, 65–68.

P

- Panaroni, C., and Wu, J.Y. (2013). Interactions between B lymphocytes and the osteoblast lineage in bone marrow. *Calcif. Tissue Int.* 93, 261–268.
- Pape, K.A., Taylor, J.J., Maul, R.W., Gearhart, P.J., and Jenkins, M.K. (2011). Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. *Science* 331, 1203–1207.
- Parker, M.J., Licence, S., Erlandsson, L., Galler, G.R., Chakalova, L., Osborne, C.S., Morgan, G., Fraser, P., Jumaa, H., Winkler, T.H., et al. (2005). The pre-B-cell receptor induces silencing of VpreB and lambda5 transcription. *EMBO J.* 24, 3895–3905.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti,

Bibliographie

- R.S., Klein, U., Küppers, R., Rajewsky, K., et al. (1998). BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11816–11821.
- Pasqualucci, L., Neri, A., Baldini, L., Dalla-Favera, R., and Migliazza, A. (2000). BCL-6 mutations are associated with immunoglobulin variable heavy chain mutations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 60, 5644–5648.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R.S., Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412, 341–346.
- Patenaude, A.-M., and Di Noia, J.M. (2010). The mechanisms regulating the subcellular localization of AID. *Nucl. Acids Res.* 38, 325–331.
- Patke, A., Mecklenbräuer, I., and Tarakhovsky, A. (2004). Survival signaling in resting B cells. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 251–255.
- Pavri, R., and Nussenzweig, M.C. (2011). AID targeting in antibody diversity. *Adv. Immunol.* 110, 1–26.
- Pavri, R., Gazumyan, A., Jankovic, M., Di Virgilio, M., Klein, I., Ansarah-Sobrinho, C., Resch, W., Yamane, A., Reina San-Martin, B., Barreto, V., et al. (2010). Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell* 143, 122–133.
- Pawlitzy, I., Angeles, C.V., Siegel, A.M., Stanton, M.L., Riblet, R., and Brodeur, P.H. (2006). Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse Igh locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 6839–6851.
- Pefanis, E., and Basu, U. (2015). RNA Exosome Regulates AID DNA Mutator Activity in the B Cell Genome. *Adv. Immunol.* 127, 257–308.
- Pefanis, E., Wang, J., Rothschild, G., Lim, J., Kazadi, D., Sun, J., Federation, A., Chao, J., Elliott, O., Liu, Z.-P., et al. (2015). RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell* 161, 774–789.
- Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F., and Scharff, M.D. (2008). The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 481–511.
- Peng, C., and Eckhardt, L.A. (2013). Role of the Igh intronic enhancer E μ in clonal selection at the pre-B to immature B cell transition. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 4399–4411.
- Pennacchio, L.A., Bickmore, W., Dean, A., Nobrega, M.A., and Bejerano, G. (2013). Enhancers: five essential questions. *Nat. Rev. Genet.* 14, 288–295.
- Perlot, T., and Alt, F.W. (2008). Cis-regulatory elements and epigenetic changes control genomic rearrangements of the IgH locus. *Adv. Immunol.* 99, 1–32.
- Perlot, T., Alt, F.W., Bassing, C.H., Suh, H., and Pinaud, E. (2005). Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14362–14367.
- Perlot, T., Li, G., and Alt, F.W. (2008). Antisense transcripts from immunoglobulin heavy-chain locus V(D)J and switch regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3843–3848.
- Perlot, T., Pawlitzy, I., Manis, J.P., Zarrin, A.A., Brodeur, P.H., and Alt, F.W. (2010). Analysis of mice lacking DNaseI hypersensitive sites at the 5' end of the IgH locus. *PLoS One* 5, e13992.
- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., and Cogné, M. (2012a). AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 336, 931–934.

Bibliographie

- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Filloux, M., and Cogne, M. (2012b). [IgH locus suicide recombination, or when B cells surrender!]. *Médecine Sci. MS* 28, 551–554.
- Petro, J.B., Gerstein, R.M., Lowe, J., Carter, R.S., Shinnars, N., and Khan, W.N. (2002). Transitional Type 1 and 2 B Lymphocyte Subsets Are Differentially Responsive to Antigen Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 48009–48019.
- Pettersson, S., Cook, G.P., Brüggemann, M., Williams, G.T., and Neuberger, M.S. (1990). A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* 344, 165–168.
- Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J., and Goodman, M.F. (2003). Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* 424, 103–107.
- Pillai, S., and Cariappa, A. (2009). The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 767–777.
- Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M., and Cogné, M. (2001). Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* 15, 187–199.
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., and Cogné, M. (2011). The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110, 27–70.
- Poellinger, L., Yoza, B.K., and Roeder, R.G. (1989). Functional cooperativity between protein molecules bound at two distinct sequence elements of the immunoglobulin heavy-chain promoter. *Nature* 337, 573–576.
- Porter, R.R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* 73, 119–126.
- Pott, S., and Lieb, J.D. (2015). What are super-enhancers? *Nat. Genet.* 47, 8–12.
- Predeus, A.V., Gopalakrishnan, S., Huang, Y., Tang, J., Feeney, A.J., Oltz, E.M., and Artyomov, M.N. (2014). Targeted chromatin profiling reveals novel enhancers in Ig H and Ig L chain Loci. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 192, 1064–1070.

Q

- Qian, J., Wang, Q., Dose, M., Pruett, N., Kieffer-Kwon, K.-R., Resch, W., Liang, G., Tang, Z., Mathé, E., Benner, C., et al. (2014). B cell super-enhancers and regulatory clusters recruit AID tumorigenic activity. *Cell* 159, 1524–1537.

R

- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751–758.
- Ratliff, M.L., Templeton, T.D., Ward, J.M., and Webb, C.F. (2014). The Bright Side of Hematopoiesis: Regulatory Roles of ARID3a/Bright in Human and Mouse Hematopoiesis. *Front. Immunol.* 5, 113.
- Rebhandl, S., Huemer, M., Greil, R., and Geisberger, R. (2015). AID/APOBEC deaminases and cancer. *Oncoscience* 2, 320–333.
- Reth, M., and Nielsen, P. (2014). Signaling circuits in early B-cell development. *Adv. Immunol.* 122, 129–175.
- Reth, M., Petrac, E., Wiese, P., Lobel, L., and Alt, F.W. (1987). Activation of V kappa gene rearrangement in pre-B cells follows the expression of membrane-bound immunoglobulin heavy chains. *EMBO J.* 6, 3299–3305.
- Reth, M., Hombach, J., Wienands, J., Campbell, K.S., Chien, N., Justement, L.B., and

Bibliographie

- Cambier, J.C. (1991). The B-cell antigen receptor complex. *Immunol. Today* 12, 196–201.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeolune, R., Gennery, A., et al. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565–575.
- 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.
- Reynaud, S., Delpy, L., Fleury, L., Dougier, H.-L., Sirac, C., and Cogné, M. (2005). Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 174, 6176–6183.
- Reynolds, A.E., Kuraoka, M., and Kelsoe, G. (2015). Natural IgM is produced by CD5-plasma cells that occupy a distinct survival niche in bone marrow. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 194, 231–242.
- Robbiani, D.F., and Nussenzweig, M.C. (2013). Chromosome translocation, B cell lymphoma, and activation-induced cytidine deaminase. *Annu. Rev. Pathol.* 8, 79–103.
- Robbiani, D.F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D.J., Chen, H.T., Corcoran, A.E., Nussenzweig, A., et al. (2008). AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* 135, 1028–1038.
- Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T., and Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 981–993.
- Rocha, P.P., Micsinai, M., Kim, J.R., Hewitt, S.L., Souza, P.P., Trimarchi, T., Strino, F., Parisi, F., Kluger, Y., and Skok, J.A. (2012a). Close proximity to Igh is a contributing factor to AID-mediated translocations. *Mol. Cell* 47, 873–885.
- Rocha, P.P., Micsinai, M., Kim, J.R., Hewitt, S.L., Souza, P.P., Trimarchi, T., Strino, F., Parisi, F., Kluger, Y., and Skok, J.A. (2012b). Close proximity to Igh is a contributing factor to AID-mediated translocations. *Mol. Cell* 47, 873–885.
- Rogers, J., Early, P., Carter, C., Calame, K., Bond, M., Hood, L., and Wall, R. (1980). Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell* 20, 303–312.
- 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., and Melchers, F. (1993). Generation and regeneration of cells of the B-lymphocyte lineage. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 207–217.
- Rolink, A.G., Winkler, T., Melchers, F., and Andersson, J. (2000). Precursor B cell receptor-dependent B cell proliferation and differentiation does not require the bone marrow or fetal liver environment. *J. Exp. Med.* 191, 23–32.
- Rommel, P.C., Bosque, D., Gitlin, A.D., Croft, G.F., Heintz, N., Casellas, R., Nussenzweig, M.C., Kriaucionis, S., and Robbiani, D.F. (2013). Fate mapping for activation-induced cytidine deaminase (AID) marks non-lymphoid cells during mouse development. *PLoS One* 8, e69208.
- Rouaud, P., Fiancette, R., Vincent-Fabert, C., Magnone, V., Cogne, M., Dubus, P., and Denizot, Y. (2012a). Mantle cell lymphoma-like lymphomas in c-myc-3'RR/p53+/- mice and c-myc-3'RR/Cdk4R24C mice: differential oncogenic mechanisms but similar cellular origin. *Oncotarget* 3, 586–593.

Bibliographie

- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogne, M., Pinaud, E., and Denizot, Y. (2012b). Enhancers located in heavy chain regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) are dispensable for diversity of VDJ recombination. *J. Biol. Chem.* 287, 8356–8360.
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Saintamand, A., Fiancette, R., Marquet, M., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Pinaud, E., Cogné, M., and Denizot, Y. (2013a). The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 210, 1501–1507.
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Saintamand, A., Fiancette, R., Marquet, M., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Pinaud, E., Cogné, M., and Denizot, Y. (2013b). The IgH 3' regulatory region controls somatic hypermutation in germinal center B cells. *J. Exp. Med.* 210, 1501–1507.
- Roy, A.L., Sen, R., and Roeder, R.G. (2011). Enhancer-promoter communication and transcriptional regulation of Igh. *Trends Immunol.* 32, 532–539.
- Roy, D., Yu, K., and Lieber, M.R. (2008). Mechanism of R-loop formation at immunoglobulin class switch sequences. *Mol. Cell. Biol.* 28, 50–60.
- Ryan, A.K., and Rosenfeld, M.G. (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev.* 11, 1207–1225.

S

- Saad, F., Saintamand, A., Cogné, M., and Denizot, Y. (2015). The IgH 3' regulatory region influences lymphomagenesis in Igλ-Myc mice. *Oncotarget*.
- Saintamand, A., Rouaud, P., Garot, A., Saad, F., Carrion, C., Oblet, C., Cogné, M., Pinaud, E., and Denizot, Y. (2015). The IgH 3' regulatory region governs μ chain transcription in mature B lymphocytes and the B cell fate. *Oncotarget* 6, 4845–4852.
- Sakai, E., Bottaro, A., Davidson, L., Sleckman, B.P., and Alt, F.W. (1999). Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 1526–1531.
- Sakano, H., Maki, R., Kurosawa, Y., Roeder, W., and Tonegawa, S. (1980). Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature* 286, 676–683.
- Saleque, S., Singh, M., and Birshtein, B.K. (1999). Ig heavy chain expression and class switching in vitro from an allele lacking the 3' enhancers DNase I-hypersensitive hs3A and hs1,2. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 162, 2791–2803.
- Sayegh, C.E., Sayegh, C., Jhunjunwala, S., Riblet, R., and Murre, C. (2005). Visualization of looping involving the immunoglobulin heavy-chain locus in developing B cells. *Genes Dev.* 19, 322–327.
- Schatz, D.G., and Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 251–263.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035–1048.
- Schlissel, M.S. (2004). Regulation of activation and recombination of the murine Igkappa locus. *Immunol. Rev.* 200, 215–223.
- Schreck, S., Buettner, M., Kremmer, E., Bogdan, M., Herbst, H., and Niedobitek, G. (2006). Activation-induced cytidine deaminase (AID) is expressed in normal spermatogenesis but only infrequently in testicular germ cell tumours. *J. Pathol.* 210, 26–31.
- Schwickert, T.A., Tagoh, H., Gültekin, S., Dakic, A., Axelsson, E., Minnich, M., Ebert, A., Werner, B., Roth, M., Cimmino, L., et al. (2014). Stage-specific control of early B cell

Bibliographie

- development by the transcription factor Ikaros. *Nat. Immunol.* 15, 283–293.
- Scott, E.W., Simon, M.C., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573–1577.
- Seita, J., and Weissman, I.L. (2010). Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2, 640–653.
- Sepulveda, M.A., Garrett, F.E., Price-Whelan, A., and Birshtein, B.K. (2005). Comparative analysis of human and mouse 3' Igh regulatory regions identifies distinctive structural features. *Mol. Immunol.* 42, 605–615.
- Serwe, M., and Sablitzky, F. (1993). V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *EMBO J.* 12, 2321–2327.
- Shi, X., and Eckhardt, L.A. (2001). Deletional analyses reveal an essential role for the hs3b/hs4 IgH 3' enhancer pair in an Ig-secreting but not an earlier-stage B cell line. *Int. Immunol.* 13, 1003–1012.
- Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y., and Alt, F.W. (2003). The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat. Immunol.* 4, 435–441.
- De Silva, N.S., and Klein, U. (2015). Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 137–148.
- 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, K.G., Nossal, G.J., and Tarlinton, D.M. (1995). FAS is highly expressed in the germinal center but is not required for regulation of the B-cell response to antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11628–11632.
- Srivastava, B., Quinn, W.J., Hazard, K., Erikson, J., and Allman, D. (2005). Characterization of marginal zone B cell precursors. *J. Exp. Med.* 202, 1225–1234.
- Stadhouders, R., de Bruijn, M.J.W., Rother, M.B., Yuvaraj, S., Ribeiro de Almeida, C., Kolovos, P., Van Zelm, M.C., van Ijcken, W., Grosveld, F., Soler, E., et al. (2014). Pre-B cell receptor signaling induces immunoglobulin κ locus accessibility by functional redistribution of enhancer-mediated chromatin interactions. *PLoS Biol.* 12, e1001791.
- Stanlie, A., Aida, M., Muramatsu, M., Honjo, T., and Begum, N.A. (2010). Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22190–22195.
- Stavnezer, J., and Schrader, C.E. (2014). IgH chain class switch recombination: mechanism and regulation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 193, 5370–5378.
- Storb, U. (2014). Why does somatic hypermutation by AID require transcription of its target genes? *Adv. Immunol.* 122, 253–277.
- Storck, S., Aoufouchi, S., Weill, J.-C., and Reynaud, C.-A. (2011). AID and partners: for better and (not) for worse. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 337–344.
- Stubington, M.J.T., and Corcoran, A.E. (2013). Non-coding transcription and large-scale nuclear organisation of immunoglobulin recombination. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 23, 81–88.
- Subrahmanyam, R., Du, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Ji, Y., Zhang, Y., Alt, F.W., Schatz, D.G., and Sen, R. (2012). Localized epigenetic changes induced by DH recombination restricts recombinase to DJH junctions. *Nat. Immunol.* 13, 1205–1212.
- Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone

Bibliographie

marrow stromal cell niches. *Immunity* 25, 977–988.

Sun, J., Rothschild, G., Pefanis, E., and Basu, U. (2013). Transcriptional stalling in B-lymphocytes: a mechanism for antibody diversification and maintenance of genomic integrity. *Transcription* 4, 127–135.

T

Taylor, J.J., Pape, K.A., and Jenkins, M.K. (2012). A germinal center-independent pathway generates unswitched memory B cells early in the primary response. *J. Exp. Med.* 209, 597–606.

Terauchi, A., Hayashi, K., Kitamura, D., Kozono, Y., Motoyama, N., and Azuma, T. (2001). A pivotal role for DNase I-sensitive regions 3b and/or 4 in the induction of somatic hypermutation of IgH genes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 811–820.

Thomas-Claudepierre, A.-S., Schiavo, E., Heyer, V., Fournier, M., Page, A., Robert, I., and Reina-San-Martin, B. (2013). The cohesin complex regulates immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 210, 2495–2502.

Tidwell, J.A., Schmidt, C., Heaton, P., Wilson, V., and Tucker, P.W. (2011). Characterization of a new ARID family transcription factor (Brightlike/ARID3C) that co-activates Bright/ARID3A-mediated immunoglobulin gene transcription. *Mol. Immunol.* 49, 260–272.

Tinguely, A., Chemin, G., Péron, S., Sirac, C., Reynaud, S., Cogne, M., and Delpy, L. (2012). Cross talk between immunoglobulin heavy-chain transcription and RNA surveillance during B cell development. *Mol. Cell. Biol.* 32, 107–117.

Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I., and Nagasawa, T. (2004). Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 20, 707–718.

Truffinet, V., Pinaud, E., Cogné, N., Petit, B., Guglielmi, L., Cogné, M., and Denizot, Y. (2007). The 3' IgH locus control region is sufficient to deregulate a c-myc transgene and promote mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 6033–6042.

Tumas-Brundage, K., and Manser, T. (1997). The transcriptional promoter regulates hypermutation of the antibody heavy chain locus. *J. Exp. Med.* 185, 239–250.

U

Ubelhart, R., Bach, M.P., Eschbach, C., Wossning, T., Reth, M., and Jumaa, H. (2010). N-linked glycosylation selectively regulates autonomous precursor BCR function. *Nat. Immunol.* 11, 759–765.

Uchimura, Y., Barton, L.F., Rada, C., and Neuberger, M.S. (2011). REG- γ associates with and modulates the abundance of nuclear activation-induced deaminase. *J. Exp. Med.* 208, 2385–2391.

V

Vaidyanathan, B., Yen, W.-F., Pucella, J.N., and Chaudhuri, J. (2014). AIDing Chromatin and Transcription-Coupled Orchestration of Immunoglobulin Class-Switch Recombination. *Front. Immunol.* 5, 120.

Vallespinós, M., Fernández, D., Rodríguez, L., Alvaro-Blanco, J., Baena, E., Ortiz, M., Dukovska, D., Martínez, D., Rojas, A., Campanero, M.R., et al. (2011). B Lymphocyte commitment program is driven by the proto-oncogene c-Myc. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 6726–6736.

Bibliographie

- Victora, G.D., and Nussenzweig, M.C. (2012). Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 429–457.
- Vincent-Fabert, C., Truffinet, V., Fiancette, R., Cogné, N., Cogne, M., and Denizot, Y. (2009). Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 6926–6932.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogne, M., and Denizot, Y. (2010a). Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 116, 1895–1898.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogne, M., Pinaud, E., and Denizot, Y. (2010b). The IgH 3' regulatory region and its implication in lymphomagenesis. *Eur. J. Immunol.* 40, 3306–3311.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Rouaud, P., Baudet, C., Truffinet, V., Magnone, V., Guillaudeau, A., Cogne, M., Dubus, P., and Denizot, Y. (2012). A defect of the INK4-Cdk4 checkpoint and Myc collaborate in blastoid mantle cell lymphoma-like lymphoma formation in mice. *Am. J. Pathol.* 180, 1688–1701.
- Volpi, S.A., Verma-Gaur, J., Hassan, R., Ju, Z., Roa, S., Chatterjee, S., Werling, U., Hou, H., Will, B., Steidl, U., et al. (2012). Germline deletion of Igh 3' regulatory region elements hs 5, 6, 7 (hs5-7) affects B cell-specific regulation, rearrangement, and insulation of the Igh locus. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 2556–2566.

W

- Wang, J., and Boxer, L.M. (2005). Regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain gene 3'-enhancers induce c-myc deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. *J. Biol. Chem.* 280, 12766–12773.
- Wang, L., Wuerffel, R., Feldman, S., Khamlichi, A.A., and Kenter, A.L. (2009). S region sequence, RNA polymerase II, and histone modifications create chromatin accessibility during class switch recombination. *J. Exp. Med.* 206, 1817–1830.
- Wang, X., Fan, M., Kalis, S., Wei, L., and Scharff, M.D. (2014). A source of the single-stranded DNA substrate for activation-induced deaminase during somatic hypermutation. *Nat. Commun.* 5, 4137.
- Warner, N.L., Szenberg, A., and Burnet, F.M. (1962). The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. I. Dissociation of immunological responsiveness. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 40, 373–387.
- Webb, C.F., Bryant, J., Popowski, M., Allred, L., Kim, D., Harriss, J., Schmidt, C., Miner, C.A., Rose, K., Cheng, H.-L., et al. (2011). The ARID family transcription factor bright is required for both hematopoietic stem cell and B lineage development. *Mol. Cell Biol.* 31, 1041–1053.
- Weill, J.C., and Reynaud, C.A. (1996). Rearrangement/hypermutation/gene conversion: when, where and why? *Immunol. Today* 17, 92–97.
- Welner, R.S., Pelayo, R., and Kincade, P.W. (2008). Evolving views on the genealogy of B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 95–106.
- Whyte, W.A., Orlando, D.A., Hnisz, D., Abraham, B.J., Lin, C.Y., Kagey, M.H., Rahl, P.B., Lee, T.I., and Young, R.A. (2013). Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 153, 307–319.
- Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 93–106.
- Wu, L.C., and Zarrin, A.A. (2014). The production and regulation of IgE by the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 247–259.

Bibliographie

- Wu, L., Liu, Y., Zhu, X., Zhang, L., Chen, J., Zhang, H., Hao, P., Zhang, S., Huang, J., Zheng, J., et al. (2014). The immunoglobulin heavy chain VH6-1 promoter regulates Ig transcription in non-B cells. *Cancer Cell Int.* 14, 114.
- Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F.W., Cogne, M., Pinaud, E., and Kenter, A.L. (2007). S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* 27, 711–722.

X

- Xiang, H., Noonan, E.J., Wang, J., Duan, H., Ma, L., Michie, S., and Boxer, L.M. (2011). The immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancers induce Bcl2 deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. *Leukemia* 25, 1484–1493.
- Xu, Z., Zan, H., Pone, E.J., Mai, T., and Casali, P. (2012). Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 517–531.

Y

- Yancopoulos, G.D., and Alt, F.W. (1985). Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* 40, 271–281.
- Yancopoulos, G.D., Desiderio, S.V., Paskind, M., Kearney, J.F., Baltimore, D., and Alt, F.W. (1984). Preferential utilization of the most JH-proximal VH gene segments in pre-B-cell lines. *Nature* 311, 727–733.
- Ye, M., and Graf, T. (2007). Early decisions in lymphoid development. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 123–128.
- Yi, M., Wu, P., Trevorrow, K.W., Claflin, L., and Garrard, W.T. (1999). Evidence that the Igkappa gene MAR regulates the probability of premature V-J joining and somatic hypermutation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 6029–6039.
- Yokota, T., and Kanakura, Y. (2014). Role of tissue-specific AT-rich DNA sequence-binding proteins in lymphocyte differentiation. *Int. J. Hematol.* 100, 238–245.
- Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.-L., Wilson, T.E., and Lieber, M.R. (2003). R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.* 4, 442–451.
- Yuseff, M.-I., Pierobon, P., Reversat, A., and Lennon-Duménil, A.-M. (2013). How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 475–486.

Z

- Zaller, D.M., and Eckhardt, L.A. (1985). Deletion of a B-cell-specific enhancer affects transfected, but not endogenous, immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 5088–5092.
- Zarrin, A.A., Alt, F.W., Chaudhuri, J., Stokes, N., Kaushal, D., Pasquier, L. Du, and Tian, M. (2004). An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 5, 1275–1281.
- Zhang, T., Franklin, A., Boboila, C., McQuay, A., Gallagher, M.P., Manis, J.P., Khamlichi, A.A., and Alt, F.W. (2010). Downstream class switching leads to IgE antibody production by B lymphocytes lacking IgM switch regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 3040–3045.

Résumé

L'expression des immunoglobulines (Ig) par les cellules B est dictée par de multiples remaniements géniques appelées recombinaisons V(D)J, commutation de classe (CSR) et hypermutation somatique (SHM). Tous ces événements sont contrôlés par des éléments *cis*-régulateurs notamment au locus IgH. Les mieux décrits sont la région intronique E_{μ} et ses régions d'attachement à la matrice nucléaire $MAR_{SE_{\mu}}$ et la région régulatrice en 3' du locus IgH (3'RR), constituée de 4 éléments activateurs (hs3a ; hs1,2 ; hs3b ; hs4) et possédant une structure quasi-palindromique très conservée. Afin d'étudier ces régions régulatrices, nous avons analysé plusieurs modèles murins présentant la délétion de la totalité de la région E_{μ} , des $MAR_{SE_{\mu}}$, et de diverses parties de la 3'RR. Ces modèles ont mis au jour des fonctions insoupçonnées de ces régions régulatrices, à divers stades du développement B.

Au delà de son rôle régulateur des réarrangements précoces de D_H vers J_H , nous avons précisé la fenêtre d'action de région E_{μ} et son rôle sur la transcription et l'expression de la chaîne lourde μ du stade pré-B jusqu'au stade B transitionnel. L'activateur E_{μ} module en effet l'expression du pré-BCR et du BCR et par conséquent conditionne l'orientation des cellules B matures vers les compartiments de la zone marginale et folliculaire. Notre étude indique également que E_{μ} n'influence pas le choix des segments V_H au cours de la recombinaison VDJ. Nous montrons que les régions $MAR_{SE_{\mu}}$ sont impliquées dans le ciblage des gènes d'Ig par l'hypermutation somatique. Le mode d'action de ces régions $MAR_{SE_{\mu}}$ reste à définir mais nous décrivons qu'il est découplé de la transcription et qu'il affecte également des loci situés sur des chromosomes différents : loci codant les chaînes légères d'Ig (*Igk*) et loci des cibles illégitimes de AID (*Bcl6* et *Cd83*).

Une étude comparant un nouveau modèle murin déficient pour la région quasi-palindromique 3'IgH (de hs3a à hs3b) à deux autres modèles de notre laboratoire (3'RR KO et hs3b-hs4 KO) nous a permis d'identifier deux modules fonctionnels complémentaires dans la région 3'RR. Le module distal (hs4) impliqué dans la régulation de l'expression de la chaîne lourde du stade B immature au stade B naïf et le module proximal (de hs3a à hs3b) nécessaire aux stades matures pour la SHM et la CSR vers la majorité des isotypes après activation, mais également pour la synthèse des anticorps par les plasmocytes.

Abstract

Immunoglobulin (Ig) gene expression in B cells depends on multiple genetic rearrangements named V(D)J recombination, class switch recombination (CSR) and somatic hypermutation (SHM). These events are controlled by *cis*-regulatory elements which are, especially numerous within the IgH locus. Major IgH regulatory elements are E_{μ} composed of a core enhancer flanked by nuclear matrix attachment regions $MAR_{SE_{\mu}}$ and the regulatory region located at the 3' end of the locus (3'RR), composed of 4 enhancers (hs3a; hs1-2; hs3b; hs4) harbouring a highly conserved quasi-palindromic structure. To study these regulatory regions, we analyzed multiple mice models carrying endogenous deletions of either the entire E_{μ} region, $MAR_{SE_{\mu}}$ only or various parts of the 3'RR. These models revealed unsuspected functions for all IgH regulatory regions, at various stages of B cell development.

Beyond its role to control accessibility prior D_H to J_H rearrangements, we identified the window of activity for E_{μ} region and its particular role on transcription and expression of the μ heavy chain from pre-B to the transitional stages. Indeed, the E_{μ} enhancer modulates pre-BCR and BCR expression and consequently modulates the mature B cell fate toward marginal zone and follicular compartments. Our study also indicated that the absence of E_{μ} has no effect on V_H segment usage during V to DJ recombination. We also showed that $MAR_{SE_{\mu}}$ are implicated in the targeting of Ig genes by SHM. The mechanism by which $MAR_{SE_{\mu}}$ enhances SHM remains to be clarified but we showed that the process does not depend on transcription. Surprisingly $MAR_{SE_{\mu}}$ also modulates SHM occurring on genes located on different chromosomes: the Ig light chain loci (*Igk*) and AID off-targets loci (*Bcl6* and *Cd83*).

In a study comparing a new mouse model devoid of the 3' IgH quasi-palindromic region (hs3a to hs3b) to previous relevant models available in our laboratory (3'RR KO and hs3b-hs4 KO), we identified two complementary functional modules within the 3'RR. The distal module (hs4), which regulates Ig heavy chain expression (and therefore BCR expression) from the immature to mature naïve B cell stages and the proximal module (hs3a to hs3b and its quasi-palindromic structure) required at mature stages for SHM, CSR to most isotypes in activated B cells, and antibody production in plasma cells.