

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences et Techniques

Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé

Laboratoire d'Immunologie, CNRS UMR 6101

N°

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES
Discipline : Science de la vie

Présentée et soutenue publiquement par
Christophe Sirac
Le 25 novembre 2003

« Régulation concertée de l'expression des chaînes
d'immunoglobulines et conséquences de ses
anomalies en pathologie »

Directeur de Thèse : Michel Cogné

Jury

Président : Pr. Raymond Julien, Professeur (UMR INRA 1061, Limoges)
Rapporteurs : Dr. Daniel Corcos, Chargé de recherche (INSERM, Paris)
Dr. Claudine Schiff, Directeur de recherche (INSERM, Marseille)
Examineurs : Pr. Guy Touchard, Professeur-Praticien Hospitalier (CHU, Poitiers)
Dr. Amine Khamlichi, Chargé de recherche (CNRS, Limoges)

REMERCIEMENTS

J'ai cru comprendre que la place impartie aux remerciements dans une thèse était systématiquement limitée à un maximum de 2 pages... Pas facile de se limiter, j'ai donc été obligé de résumer un texte qui, s'il avait réellement reflété mes pensées risquait de grossir un peu plus un manuscrit bien assez épais.

Mes premiers remerciements vont à la personne qui m'a accueilli, dirigé, inspiré, motivé, encouragé, aidé et ce, jusqu'aux derniers instants de ce travail (allant jusqu'à me faire une manip complémentaire à 3 heures de l'envoi du manuscrit...). Merci Michel pour la confiance que tu as eu en moi, j'espère ne pas la décevoir. Quant aux thèses à passer tous les ans, je ne suis pas contre mais admetts qu'à cause de ça, je n'ai pas manipulé pendant au moins 15 jours... La perte de temps !!!

Je remercie Monsieur Daniel Corcos et Madame Claudine Schiff de me faire l'honneur de juger ce travail. Merci également à Monsieur Raymond Julien d'avoir accepté la présidence de ce jury ainsi que de m'avoir accueilli dans la maîtrise de biochimie en des temps incertains. Un grand merci à Monsieur Guy Touchard pour tout le temps qu'il a passé à examiner les reins des diverses souris « à dépôts » (ainsi que sans dépôts d'ailleurs, mais elles finiront bien par en avoir!). Je le remercie également pour la disponibilité dont il a fait preuve dans les derniers moments de cette thèse et je suis très fier qu'il puisse au final juger ce travail qui est aussi un peu le sien. Enfin, je tiens à remercier Amine Khamlichi pour toute l'affection dont il a fait preuve ces derniers temps, et plus sérieusement, pour les nombreux échanges, parfois houleux mais toujours consistants, que nous avons eu la chance d'avoir en tant que « voisins de pailleasse ». Merci aussi d'accepter de juger ce travail.

Je remercie tous mes collègues du 3^{ème} présents et passés de m'avoir supporté avec autant de gentillesse durant toutes ces années, Hei-lann, Jacques, Stéphane, Lolotte, Véro, Horia, Coco, Yves, Christian, Vincent pour son aide précieuse, Eric, qui même de loin, trouvait le moyen de me donner des coups de mains (welcome home), Zélhia a qui j'ai fait subir en direct mes mauvaises humeurs (désolé!!!), Maha, pour son sourire constant et nos discussions effrénées en anglais approximatif (en tout cas me concernant) et Flo ma douce collègue de DEA, pailleasse, soutenance... Merci aussi à tous les autres collègues de l'UMR, Thomas pour toutes les cervelles jetées à travers tempus, Eliza, les (jeunes) filles du 3^{ème} (Marie-Hélène, Mireille, Danielle : ce fut un réel plaisir de partager votre bureau), Christophe « du second », Elodie, Steph, Bertrand, Fafa, Barbara, Caro, « docteur ès dépôts » Cathy, Sophie qui m'a très largement rendu, par son aide et son attention de tous les instants, le temps que je lui aie consacré lorsqu'elle n'était encore que « stagiaire » et enfin Emily qui, si elle n'a pas encore son doctorat (mais ça ne saurait tarder), est déjà diplômée dans l'art de remonter le moral. Je n'oublierais pas non plus la gentillesse, la disponibilité et le sourire de Sylvie lors de mes fréquentes incursions à l'animalerie.

Merci à tout le personnel essentiellement féminin (ce n'est pas moi qui m'en plaindrais) du CHU, avec une attention particulière à Jacquotte, gardienne plus qu'efficace du cytomètre, Josiane et Sonia, Mireille Drouet pour m'avoir injecté le virus de la manip de cyto de 21h (tu remarqueras que je l'ai conservé jusqu'à la fin) et Ahmed Boumédiène.

Merci aux personnes du bâtiment de biotechnologies, enseignants et étudiants, avec un petit clin d'œil particulier à Carole (tous dans la même galère) et Chantal Jayat pour son avis expert en cytométrie.

Un grand merci à Lolo avec qui, au-delà de nos collaborations scientifiques productives, s'est nouée une réelle amitié débutée bien des années plus tôt.

Mention spéciale au jeune Franck, pour son aide experte en maladies de dépôts et pour notre échange de compétence qui est allé beaucoup plus loin que scientifique (pêche à la mouche, musique, encore que...).

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui, par leur aide au quotidien, ont su me donner les moyens, la confiance et le courage d'affronter les difficultés et qui sont donc indissociables de ces années de thèse. Tout d'abord mes (formidables) parents et mes frères, Jean-Marc (occasionnellement co-financier de mes nombreuses années d'études...) et Denis, ainsi que les amis, Alex, Gilles, Thierry, Manels (et leurs douces respectives). Merci à Cha, Flo, Isa et Zab pour la patience et la gentillesse dont elles ont fait preuve (merci aussi de m'avoir nourri ces dernières semaines...).

Enfin, je ne pourrais terminer ces remerciements sans parler de ma « petite sœur » Isa qui, du début à la fin de ces années (la dernière petite nuit blanche restera dans les annales), a toujours été là, dans les pires comme dans les meilleurs moments, avec comme ligne directrice l'envie d'aider, d'écouter, de comprendre et de supporter un frère pas toujours digne d'une aussi forte amitié.

Sommaire

REMERCIEMENTS	2
INTRODUCTION GENERALE	7
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	11
<i>I. GÉNÉRALITÉS SUR LES IMMUNOGLOBULINES</i>	<i>12</i>
<i>I. GÉNÉRALITÉS SUR LES IMMUNOGLOBULINES</i>	<i>13</i>
I.1. Structure des Immunoglobulines.....	13
I.2. Organisation, Réarrangements et Expression des Gènes d'Immunoglobulines	14
I.2.1. Gènes des chaînes lourdes	14
I.2.2. Gènes des chaînes légères.....	15
I.2.2.a. Locus kappa.....	15
I.2.2.b. Locus lambda	17
I.2.3. Mécanismes des réarrangements des gènes d'Ig	17
I.2.3.a. Le modèle "ordonné".....	17
I.2.3.b. Signaux et composants de la recombinaison.....	18
I.3. Régulation de l'Expression des Immunoglo-bulines.....	22
I.3.1. Régulation des réarrangements : modèle de l'accessibilité.....	22
I.3.2. Régulation transcriptionnelle	24
I.3.2.a. Promoteurs des gènes V.....	24
I.3.2.b. Enhancers, silencers et régions d'attachement à la matrice	26
I.3.3. Régulation des transcrits d'Ig.....	28
I.3.3.a. Epissage des transcrits d'Ig	28
I.3.3.b. Surveillance des ARN	29
I.3.4. Régulation post-traductionnelle des Ig.....	33
I.3.4.a. Glycosylation.....	33
I.3.4.b. Assemblage et transport des Ig.....	33
<i>II. ONTOGENÈSE B : LES ETAPES DE LA DIFFÉRENCIATION DES LYMPHOCYTES</i>	<i>38</i>
<i>B.....</i>	<i>38</i>
II.1. Phase Indépendante de l'Antigène	38
II.1.1. Engagement vers le lignage B : le stade pré-pro-B	40
II.1.2. Les premiers réarrangements des gènes d'immunoglobulines : le stade pro-B.....	40
II.1.3. Formation, expression membranaire et rôles du pré-BCR : le stade pré-B.....	42
II.2. Phase Dépendante de l'Antigène	47
II.2.1. Une première étape directement dépendante des antigènes... du soi : le stade B immature	47
II.2.2. A la découverte de la rate : le stade B transitionnel	49
II.2.3. La réponse cellulaire T-dépendante : les cellules B folliculaires.....	51
II.2.4. Activation par les antigènes T-indépendants : les cellules B1 et les cellules de la zone marginale (MZ).....	53
II.3. Exclusion Allélique et Edition du BCR.....	54
II.3.1. Exclusion allelique des chaînes lourdes	55
II.3.2. Le paradoxe du maintien de l'exclusion allélique dans le contexte de l'édition du BCR	57

**III. CONSÉQUENCES DE LA DÉRÉGULATION DE L'EXPRESSION CONCERTÉE
DES CHAÎNES D'IG LORS DES SYNDROMES IMMUNO-PROLIFÉRATIFS B : LES
NÉPHROPATHIES ASSOCIÉES AUX CHAÎNES LÉGÈRES D'IG MONOCLONALES**

.....	63
III.1. Syndromes Immunoprolifératifs B et Production d'Ig Monoclonales.....	64
III.2. Néphropathies Liées aux Dépôts de Chaînes Légères d'Immunoglobulines.....	67
III.2.1. Néphropathies glomérulaires liées au dépôt de chaînes légères monoclonales.....	69
III.2.1.a. Le syndrome de Randall ou LCDD.....	69
III.2.1.b. L'amylose à chaînes légères d'Ig (AL).....	70
III.2.2. Néphropathies tubulaires liées aux dépôts de chaînes légères monoclonales.....	71
III.2.2.a. Néphropathie à cylindres myélomateux (NCM) ou « rein de myélome ».....	72
III.2.2.b. Syndrome de Fanconi associé aux chaînes légères d'Ig monoclonales.....	74
RESULTATS DISCUSSION	80
PREMIERE PARTIE : EXCLUSION ALLELIQUE	81
Article 1: "Immunoglobulin light chain inclusion allows B cell differentiation to proceed up to its terminal stages without promoting auto-immunity".....	82
Article 2 : « RNA surveillance contributes to exclusion of nonfunctional κ alleles and detects premature termination within the last κ exon ».....	84
DEUXIEME PARTIE : SYNDROME DE FANCONI	87
Article 3 : « Unusual clinical, pathologic and molecular features in Fanconi Syndrome induced by a monoclonal V κ III light chain in a patient with Waldenström's Macroglobulinemia »	88
Article 4 : « A transgenic model of acquired Fanconi's syndrome demonstrates the role of the κ chain V domain and the potential reversibility of renal damage ».....	91
PERSPECTIVES	95
Surveillance des ARN :.....	96
Modèle de souris « knock-in » V κ J κ :.....	97
Syndrome de Fanconi :.....	99
ANNEXES	101
Article 5 : Somatic hypermutation witnesses allelic inclusion at the transcriptional level for non-functionally rearranged IgH genes of mature B cells.....	102
Brevet : MAMMIFERE NON-HUMAIN TRANSGENIQUE POUR LA REGION CONSTANTE DE LA CHAINE LOURDE DES IMMUNO-GLOBULINES HUMAINES DE CLASSE A ET SES APPLICATIONS.....	103
Article 6 : Expression of membrane IgA can substitute for IgM throughout B cell differentiation.....	104
Article 7 : Immunoglobulin decreased solubility diseases : pathologies of the V domains ?	105
BIBLIOGRAPHIE.....	106

ABREVIATIONS

[-/-] : homozygote négatif	J : région de jonction
[-/+] : hétérozygote	JH : segment de jonction de chaîne lourde
[+/+] : homozygote positif	LCDD : light chain deposition disease (maladie de dépôt de chaînes légères)
Ac : anticorps	LHCDD : light and heavy chain deposition disease (maladie de dépôt de chaînes lourdes et légères)
ADN : Acide désoxyribonucléique	MAR : Matrix association Region (région d'attachement à la matrice)
Ag : antigène	MGUS : monoclonal gammopathy of undetermined significance (gammopathies bénignes)
ARN : acide ribonucléique	MIDD : monoclonal immunoglobulin deposition disease (maladie de dépôt d'immunoglobulines monoclonales)
ARNm : acide ribonucléique messenger	NAS : nonsense-associated altered splicing
BCR : récepteur des cellules B	NCM : néphropathie à cylindre myéломateux
BiP : immunoglobulin binding protein	NMD : Nonsense-mediated mRNA decay (dégradation des ARNm non-sens)
BLNK : B-cell linker protein	PALS : manchons périartériolaires spléniques
C : région constante	PDI : protein disulphide-isomerase
CDR : complementary determining region (protéine se liant aux immunoglobulines)	PDGF : platelet derived growth factor
CH : région constante de chaîne lourde	PLC : phospholipase C
CL : région constante de chaîne légère	PolyA : site de polyadénylation
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	PTC : premature termination codon (codons stop prématurés)
D : région de diversité	RAG : Recombination activating gene (gène activant la recombinaison)
Da : dalton	RSS : séquence signal de recombinaison
DH : segment de diversité de chaîne lourde	TCP : Cellules tubulaires proximales
DO : absorbance	TCR : récepteur des cellules T
Eμ : séquence stimulatrice intronique des chaînes lourdes	TdT : déoxynucléotidyltransférase
Eκ : séquence stimulatrice intronique des chaînes légères kappa	THP : protéine de Tamm-Horsfall
ELISA : enzyme linked immunosorbent assay (test avec un immunoabsorbant lié à une enzyme)	TNF : tumor necrosis factor
Fab : domaine de liaison à l'antigène d'une immunoglobuline	TGF : transforming growth factor
Fc : domaine effecteur d'une immunoglobuline	UPF : up frameshift protein
FDC : Follicular dendritic cells (cellules dendritiques folliculaires)	UPR : unfolded protein response
FISH : hybridation <i>in situ</i> fluorescente	V : Variable
FR : framework (région « armature »)	Vκ : domaine variable des chaînes légères κ
FS : syndrome de Fanconi	VH : région variable de chaîne lourde
GFP : green fluorescent protein	VL : région variable de chaîne légère
HCDD : heavy chain deposition disease (maladie de dépôt de chaînes légères)	
HSA : heat stable antigen	
Ig : immunoglobuline	
IgH : locus de chaîne lourde d'immunoglobulines	
IL : interleukine	

INTRODUCTION GENERALE

La fonction du système immunitaire est d'assurer la défense de l'organisme contre le pathogènes ainsi que de contrôler certains dérèglements cellulaires aboutissant à la formation de tumeurs. Il possède pour cela une capacité d'apprentissage permettant la tolérance des antigènes du soi et l'élimination des antigènes du non soi (le plus souvent d'origine bactérienne, virale, parasitaire), au moins lorsque l'irruption de ces derniers dans l'organisme se fait dans un contexte d'agression et d'inflammation (selon la théorie « du danger » de Polly Matzinger). A l'intérieur de ce système, la réponse immunitaire humorale aboutit à la sécrétion d'immunoglobulines solubles ou anticorps. Ces anticorps, sécrétés par les cellules de la lignée lymphocytaire B sont capables de lier spécifiquement un antigène dans le but de le neutraliser ou de l'éliminer. Une longue série de phénomènes d'activation et de coopération cellulaire est en règle nécessaire avant d'aboutir à la sécrétion d'un anticorps spécifique par une cellule de la lignée lymphoïde B. L'activation des cellules B requiert notamment l'expression à la surface cellulaire d'une forme membranaire de l'immunoglobuline ou récepteur des cellules B (BCR). La mise en place de ce récepteur et plus tard la sécrétion de l'immunoglobuline par un clone cellulaire B nécessitent d'une part une série de réarrangements intra-géniques (permettant l'assemblage de gènes d'immunoglobulines fonctionnels) mais aussi tout un processus séquentiel de sélection, initialement modélisé par Burnet selon « la théorie de la sélection clonale ». La théorie de la sélection clonale, postulat fondateur de l'immunologie moderne, a avancé 3 hypothèses :

- Lors de leur différenciation dans les organes lymphopoïétiques centraux (thymus et moelle osseuse), les lymphocytes apparaissent munis de récepteurs capables de reconnaître de façon prédéterminée l'ensemble des antigènes.
- Chaque lymphocyte ne possède qu'un seul récepteur, l'ensemble des lymphocytes possédant ce récepteur définissant un clone.
- Un antigène pénétrant dans l'organisme sélectionne les clones capables de le reconnaître et les active pour produire des effecteurs spécifiques, par exemple des anticorps.

Si cette théorie est restée relativement valide dans ses grandes lignes, les concepts de l'immunologie moderne l'ont beaucoup nuancée, notamment en montrant que les images du soi constituaient en fait les références à partir duquel se formait un répertoire initial très auto-réactif, en montrant que la reconnaissance d'un antigène par un récepteur n'est le plus souvent pas innée mais relève d'un réel apprentissage des antigènes extérieurs, et en admettant également que beaucoup de récepteurs du système immunitaire sont en fait polyspécifiques. La description de modalités variées d'acquisition de la tolérance par les cellules B (incluant l'apoptose, l'anergie et l'édition du BCR...) est également venue affiner ces concepts. Quel qu'en soit le substratum physiologique, la

sélection clonale postule donc que les cellules B subissent au cours de l'ontogénèse une sélection directement dépendante de la spécificité de leur récepteur pour l'antigène. Ainsi, à chaque étape de l'ontogénèse B, des mécanismes de délétion clonale par apoptose, d'inactivation des cellules (anergie) ou de modification du BCR (« BCR editing ») permettent de ne conserver que les cellules exprimant un BCR fonctionnel et de limiter l'apparition ou les capacités d'activation de cellules exprimant un récepteur autoréactif. Cette sélection nécessite que chaque cellule ne possède qu'un seul type de récepteur à sa surface et n'a donc de sens pour les cellules B que par la grâce d'un phénomène annexe qui conduit à la mono spécificité habituelle des lymphocytes B : « l'exclusion allélique ».

En dépit de cette régulation étroite des différentes étapes de la différenciation des cellules B, des dérèglements peuvent survenir et avoir de graves conséquences. Ainsi, un échappement aux mécanismes d'établissement de la tolérance du soi, peut conduire à l'apparition (ou à l'activation) de cellules auto-réactives (à l'occasion d'une réaction inflammatoire, d'une réaction croisée entre un antigène du soi et antigène du non-soi, ou encore d'une immunosuppression et d'une « baisse de vigilance » des cellules T régulatrices).

D'autres part, dans certains cas pathologiques, la prolifération anormale et incontrôlée d'un clone cellulaire B peut survenir et entraîner des conséquences redoutables, liées à la prolifération tumorale elle-même et/ou à la production d'une Ig monoclonale de structure anormale. Lors des syndromes immunoprolifératifs affectant la lignée B, la multiplication d'un clone plasmocytaire peut ainsi avoir deux types d'implications néfastes pour l'organisme. D'une part l'envahissement par le clone malin peut être responsable d'un syndrome tumoral (avec notamment des conséquences graves pour les lignées hématopoïétiques lorsqu'il y a envahissement médullaire), d'autre part la sécrétion importante d'une Ig monoclonale peut s'accompagner d'effets délétères de cette Ig (précipitation, activité auto-anticorps, apparition de dépôts pouvant altérer le fonctionnement de divers organes vitaux, principalement le rein...). Dans ce dernier cas, les dépôts sont le plus souvent constitués essentiellement d'une chaîne légère d'immunoglobuline, conséquence d'une rupture de la stœchiométrie chaînes lourdes/chaînes légères dans les plasmocytes malins. La néphrotoxicité de ces chaînes légères est liée aux caractéristiques de leurs régions variables et à leur instabilité en l'absence de chaînes lourdes, favorisant la précipitation, l'agrégation en fibrilles amyloïdes ou encore la cristallisation de ces chaînes légères. Cette néphrotoxicité se manifeste en particulier au niveau rénal par quatre grands types de dépôts tissulaires extra ou intracellulaires définissant (par ordre de fréquence décroissante) : la

tubulopathie à cylindres (ou rein de myélome), l'amylose AL, le syndrome de Randall (ou maladie de dépôts de chaînes légères : LCDD) et le syndrome de Fanconi.

Les travaux présentés dans ce manuscrit sont une contribution à l'étude des mécanismes régulant l'expression des chaînes d'immunoglobulines au cours du développement normal des cellules B ainsi que dans un cas de maladies par dépôts d'immunoglobulines. Nous avons pour cela notamment réalisé un modèle de souris transgénique ayant une insertion génique dirigée au sein du locus κ (en remplacement de $J\kappa$) d'un exon réarrangé codant pour la région variable d'une chaîne légère κ monoclonale humaine. Cette chaîne était à l'origine d'un syndrome de Fanconi compliquant un myélome à chaînes légères chez un patient. Ce modèle nous a ainsi permis non seulement d'étudier le phénomène d'exclusion allélique et d'édition du BCR dans une souris knock-in pour un gène d'Ig κ humain mais aussi d'obtenir un modèle expérimental de maladie de dépôts. Dans la perspective de la mise au point d'autres modèles, nous avons également travaillé à l'étude des caractéristiques moléculaires conduisant d'autres chaînes d'immunoglobulines monoclonales à former des dépôts ou à induire un syndrome de Fanconi

D'autre part, et toujours dans le cadre de l'étude des mécanismes qui régulent l'expression des différentes chaînes du BCR, nous avons poursuivi une étude du rôle de la surveillance des ARNm dans le processus d'exclusion allélique et montré comment ce processus évite la production par les cellules B, de chaînes d'immunoglobulines anormales et tronquées telles qu'elles pourraient résulter du fait de la transcription préservée des allèles non fonctionnels.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

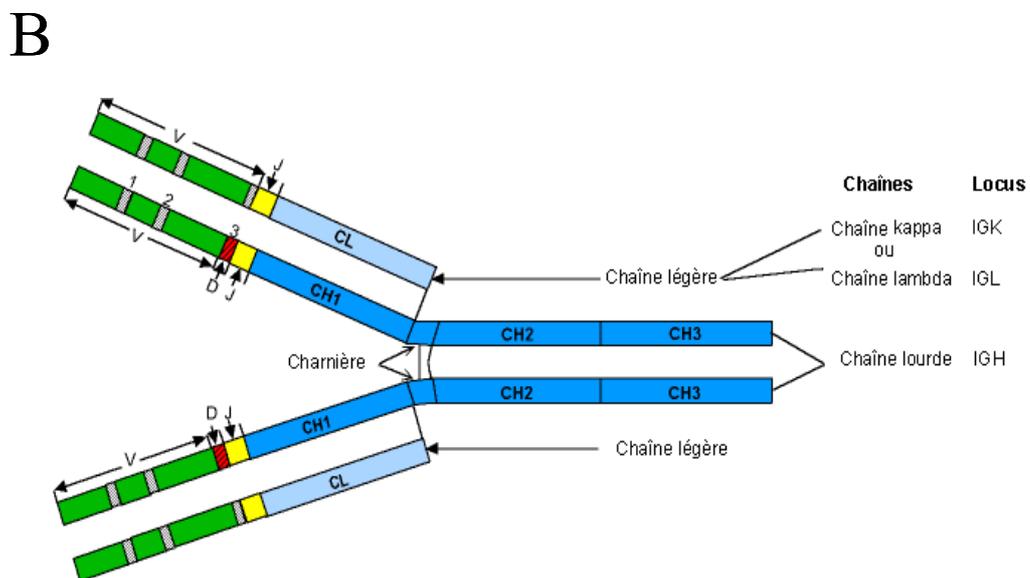
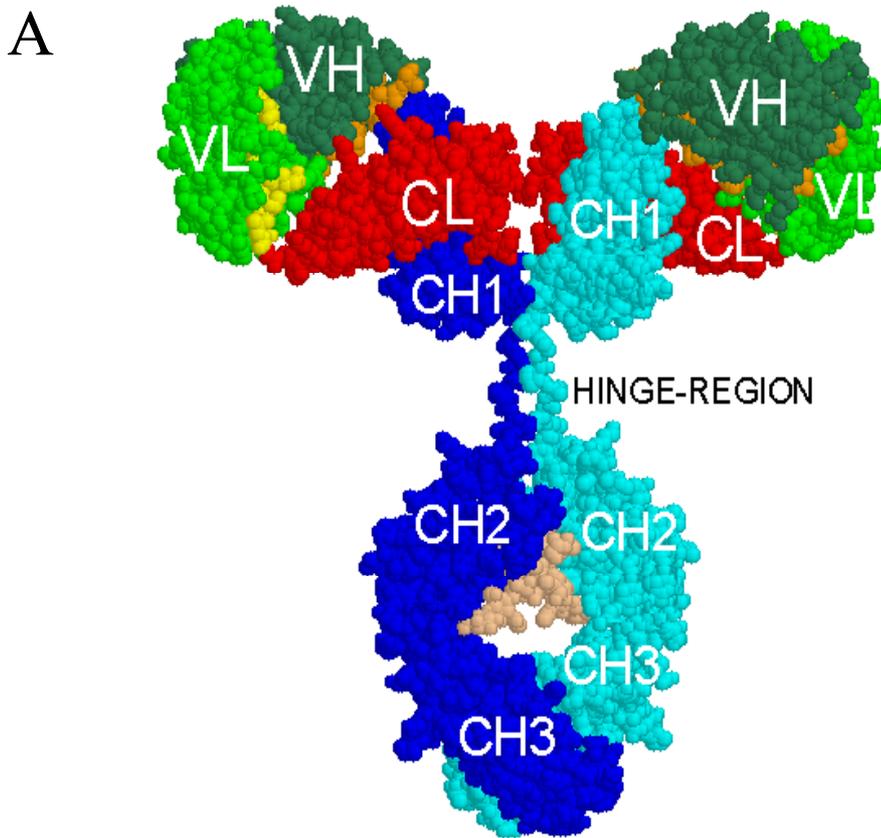


Figure 1: Structure des immunoglobulines (Ig)

A. Représentation tri-dimensionnelle d'une IgG

B. Représentation bi-dimensionnelle d'une Ig

VH, VL: régions variables des chaînes lourdes et légères

CH, CL: régions constantes des chaînes lourdes et légères

Hinge: région charnière

(D'après Lefranc 2003)

I. GENERALITES SUR LES IMMUNOGLOBULINES

I.1. STRUCTURE DES IMMUNOGLOBULINES

La structure des Ig, qu'elles soient exprimées à la surface des lymphocytes B (où elles ont la fonction de récepteur de l'Ag) ou excrétées par les plasmocytes, repose sur l'assemblage de deux chaînes lourdes identiques (H) associées par des ponts di-sulfures à 2 chaînes légères (L) également identiques. Il existe également des liaisons covalentes (S-S) entre les deux chaînes lourdes. L'ensemble forme un tétramère d'environ 150 kDa (Edelman, 1970 ; Porter, 1973 ; Burton, 1987) (fig.1). Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'antigène tandis que les domaines constants des chaînes lourdes confèrent ses propriétés effectrices à l'immunoglobuline (fig.1). On distingue, d'après la structure et les fonctions effectrices de leur région constante, deux types de chaînes légères (κ et λ) et 5 classes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , ϵ et α) définissant respectivement les IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Chez la souris, les IgG sont subdivisées en sous-classes IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.

Sur le plan structural, les régions variables et constantes partagent une structure tri-dimensionnelle répondant à la définition de la superfamille des immunoglobulines et caractérisée par des domaines d'homologie d'une longueur d'environ 110 acides aminés organisés en feuillets β -plissés. La structure tertiaire de ces domaines est maintenue par quatre régions très conservées : les régions d'armature ou "framework regions" (FR1, FR2, FR3, FR4). Au sein des parties variables, trois régions d'une dizaine d'acides aminés, dites hypervariables ou encore appelées régions déterminant la complémentarité avec l'Ag (CDR1, CDR2, CDR3), s'associent pour former le site de liaison à l'Ag.

I.2. ORGANISATION, REARRANGEMENTS ET EXPRESSION DES GENES D'IMMUNOGLOBULINES

I.2.1. GENES DES CHAINES LOURDES

Les gènes des chaînes lourdes sont situés sur le chromosome 12 de la souris et le chromosome 14 chez l'homme. Ils comprennent chez la souris plus de 200 segments VH (dont une trentaine de pseudogènes), une douzaine de segments DH (segments dits de " diversité " propres au locus de chaînes lourdes) et un groupe de quatre segments JH. On trouve ensuite huit gènes codant les régions constantes des huit classes et sous-classes d'immunoglobulines, répartis selon l'ordre suivant: μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ , et α (fig 2). Chaque gène constant est composé de multiples exons codant les domaines structuraux propres à chaque chaîne lourde ainsi que les régions charnières pour les IgG, enfin des exons indépendants codent les régions intra-cytoplasmiques et trans-membranaires pour chaque isotype.

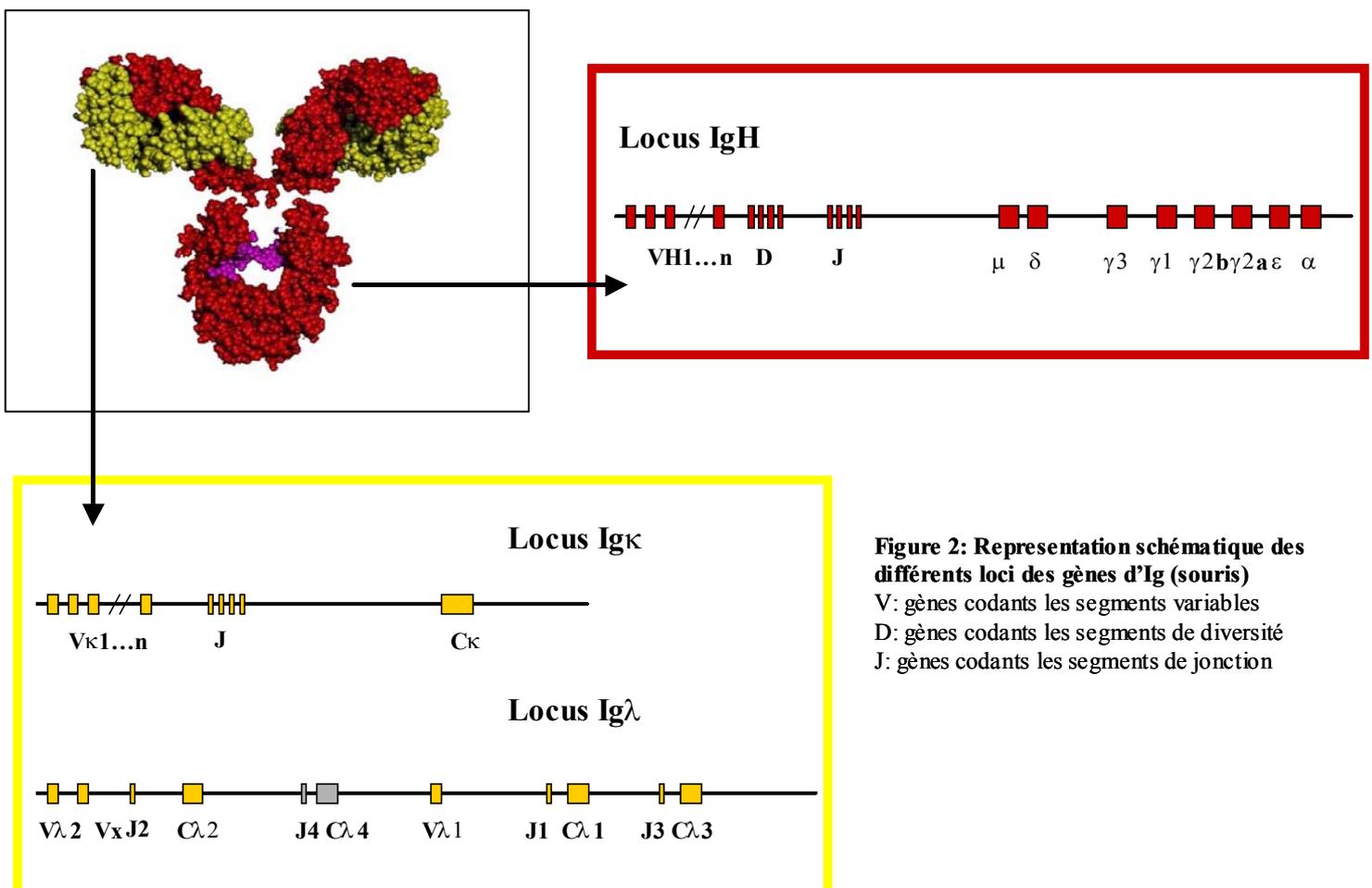


Figure 2: Representation schématique des différents loci des gènes d'Ig (souris)
V: gènes codants les segments variables
D: gènes codants les segments de diversité
J: gènes codants les segments de jonction

Les segments VH peuvent être classés par homologies de séquence en 15 familles (Kofler et coll, 1992 ; Mainville et coll, 1996) et les segments D en 4 familles (Kurosawa et Tonegawa, 1982 ; Ichihara et coll, 1989 ; Feeney et Riblet, 1993).

L'assemblage d'un gène fonctionnel de chaîne lourde nécessite dans un premier temps, le rapprochement d'un segment JH avec un segment DH (induisant la délétion de l'ADN compris entre ces segments) puis le réarrangement de cette association D-JH avec un segment VH, le tout aboutissant à la formation d'un exon VDJ qui codera la région variable de la chaîne lourde. Les parties comprises entre les différents segments sont délétées lors de ces réarrangements sous forme d'un ADN circulaire ou épisode. La partie variable obtenue est associée à la région constante par épissage de l'ARN messager (fig. 3). Le passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des Ig s'effectue par épissage alternatif d'un même transcrit primaire de chaîne lourde (Early et coll, 1980 ; Rogers et coll, 1980 ; Maki et coll, 1981 ; Rogers et coll, 1981, Gally et coll., 1987). De plus, les exons V sont précédés d'une petite séquence de 60 à 90 paires de bases (pb), la séquence signal ou leader (L), codant la majeure partie (N-terminale) du peptide signal de la protéine (Pargent et coll., 1991 ; Huber et coll., 1993 ; Weichhold et coll., 1993 ; Zachau et coll., 1993 ; Abbas et coll., 1997).

1.2.2. GENES DES CHAINES LEGERES

1.2.2.a. Locus kappa

Les gènes des chaînes légères κ sont situés sur le chromosome 6 de la souris (sur le chromosome 2 chez l'homme). La disposition germinale des gènes murins comprend plus de 150 segments V_{κ} (dont 93 sont fonctionnels et répartis en 18 sous groupes d'homologies) et 5 segments J_{κ} (dont 4 sont fonctionnels) qui codent la région variable de la chaîne, tandis qu'un seul segment code la partie constante C_{κ} (fig. 2). Les segments V_{κ} sont positionnés soit dans le même sens, soit en sens inverse par rapport à l'orientation du locus J_{κ} - C_{κ} (Lorenz et coll, 1988 ; Weishhold et coll, 1990 ; Thiebe et coll, 1999). Comme pour les gènes de chaînes lourdes, la formation d'un gène fonctionnel nécessite des réarrangements durant lesquels un segment V_{κ} est accolé au hasard à un

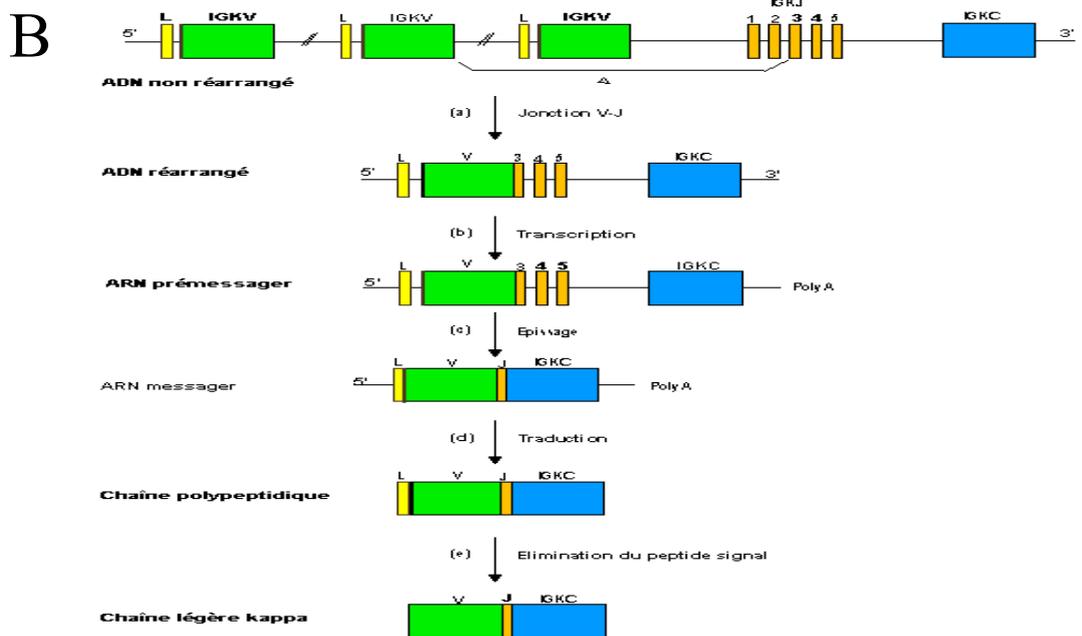
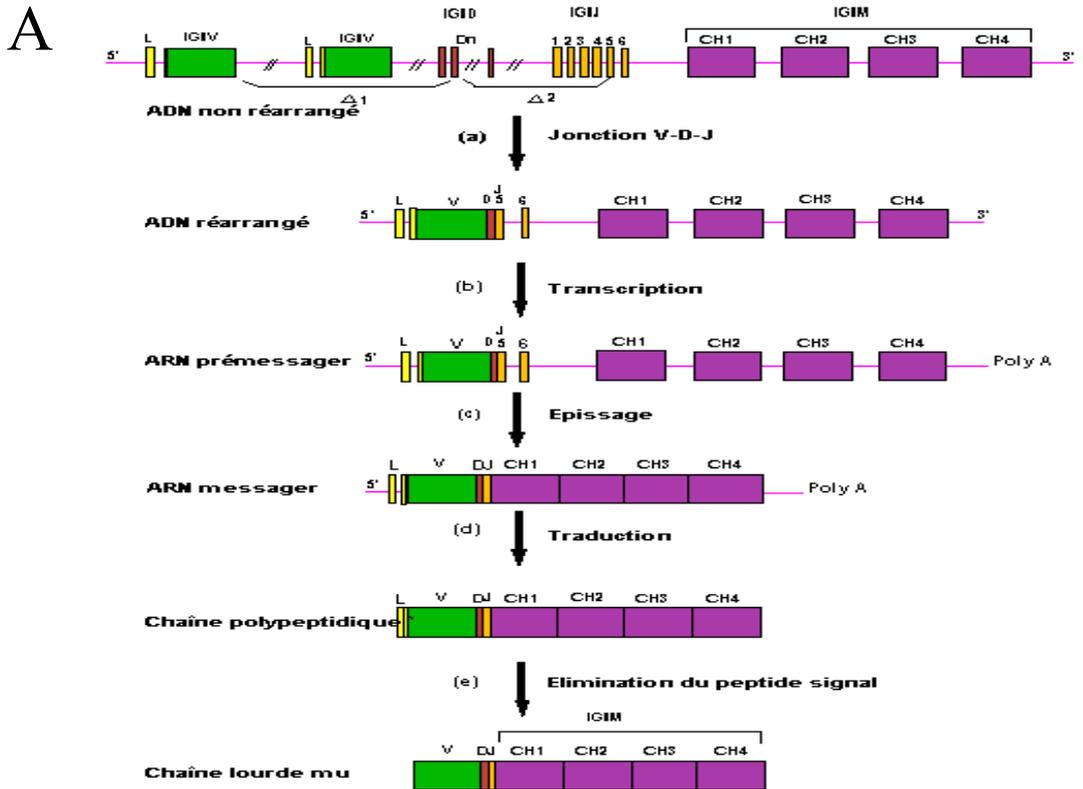


Figure 3: Réarrangements et synthèse des Ig

- Synthèse d'une chaîne lourde $Ig\mu$
 - Synthèse d'une chaîne légère $Ig\kappa$
- (a) Réarrangements V(D)J; (b) Transcription d'un ARN pré-messager; (c) Epissage des introns; (d) Traduction; (e) Clivage du peptide signal
(D'après Lefranc, 2003)

des quatre segments $J\kappa$ fonctionnels. De même, les régions variables VJ et constantes sont associées lors de la transcription par épissage de l'ARN messager (fig.3).

I.2.2.b. Locus lambda

Les gènes des chaînes légères λ sont sur le chromosome 16 de la souris (sur le chromosome 22 chez l'homme), répartis en 4 familles comprenant chacune une paire de segments $J\lambda$ et $C\lambda$ ($J\lambda 1$ à $J\lambda 4$ et $C\lambda 1$ à $C\lambda 4$) ; le locus de la souris ne comporte que 3 segments variables $V\lambda$ (fig.2), le segment $V\lambda 1$ s'associe préférentiellement à $J\lambda 3$ et $J\lambda 1$ alors que les segments $V\lambda 2$ et $V\lambda 3$ s'associent préférentiellement à $J\lambda 2$ (les segments $J\lambda 4$ et $C\lambda 4$ étant défectifs). Le peu de diversité des segments variables chez la souris explique probablement en partie le faible pourcentage de lymphocytes B exprimant une chaîne légère λ (environ 5% de cellules $\lambda+$ contre 95% de $\kappa+$ soit un rapport de 1/20). Ce rapport est largement supérieur chez l'homme (1/3) qui possède presque autant gènes codant des régions variables λ que de gènes codant les régions variables κ (Lefranc et Lefranc, 1999).

I.2.3. MECANISMES DES REARRANGEMENTS DES GENES D'IG

I.2.3.a. Le modèle "ordonné"

Les gènes des immunoglobulines doivent subir des recombinaisons somatiques afin de pouvoir s'exprimer et permettre la production d'une immunoglobuline entière. Toute une série de réarrangements intra-géniques ont donc lieu au niveau des loci des gènes des Ig. Ces réarrangements ont lieu lors du développement précoce des lymphocytes B dans la moelle osseuse, et respectent le plus souvent un ordre précis (le modèle "ordonné" décrit par Alt et Baltimore, 1984) débutant par le rapprochement d'une région DH vers une région JH très tôt lors de l'ontogenèse B (stade pro-B). Vient ensuite se recombiner sur cet assemblage DJ un gène VH afin de former l'exon codant la région variable de la chaîne lourde. Si ces réarrangements permettent l'expression d'un ARN messager non aberrant (c'est à dire ne comportant pas de codons stop, ni de

phase de lecture incorrecte), la chaîne lourde μ est alors synthétisée et exportée à la membrane en association avec la " pseudo-chaîne légère " (composée de deux protéines invariantes 5 et VpreB chez la souris) et les molécules de transduction du signal intracellulaire Ig- α et Ig- β , formant ainsi le pré-BCR (stade pre-B). Le rôle de ce pré-BCR est indispensable au bon déroulement du développement des cellules B et a en particulier été souvent considéré comme essentiel dans l'induction des réarrangements des gènes des chaînes légères. Il est en effet très habituel que les gènes des chaînes légères soient réarrangés après ceux des chaînes lourdes et de façon séquentielle, gènes κ d'abord puis gènes λ , lorsque les réarrangements κ n'ont pas permis d'aboutir à un exon VJ fonctionnel (Korsmeyer et coll., 1982 ; Brauninger et coll., 2001 ; Engel et coll., 1999 ; Hieter et coll., 1981). Cependant, de nombreuses exceptions sont venues en partie infirmer cette théorie du modèle ordonné. En particulier, il a été démontré que certains réarrangements κ pouvaient avoir lieu avant la formation d'une chaîne lourde fonctionnelle (Ehlich et coll., 1993 ; Novobrantseva et coll., 1999 ; Chen et coll., 1993) et que des réarrangements des gènes λ pouvaient avoir lieu en même temps, ou même avant les gènes κ . (Liu et coll., 1997 ; Hauke et coll., 1988 ; Berg et coll., 1990 ; Pauza et coll., 1993 ; Oberdoerffer et coll., 2003).

Dans tous les cas, l'expression des gènes recombinés des chaînes lourdes et légères aboutit à l'expression à la membrane de la cellule B d'une IgM composée de la chaîne lourde μ et d'une chaîne légère κ ou λ (stade B immature). En l'absence d'auto-réactivité du récepteur, le lymphocyte B va pouvoir accéder au stade mature caractérisé par la co-expression en surface du produit des gènes des chaînes lourdes μ et δ qui vont former respectivement des IgM et IgD possédant toutes les deux le même domaine variable et donc la même spécificité antigénique. Cette co-expression résulte d'un épissage alternatif de l'exon VDJ soit sur le gène μ soit sur le gène δ . De même, la sécrétion des Ig résulte du choix par épissage alternatif d'un site de polyadénylation éliminant de l'ARN messenger le ou les exons codant la région hydrophobe trans-membranaire (permettant l'ancrage des Ig de membranes) et la région cytoplasmique qui joue un rôle dans la transduction du signal (pour revue : Reth et coll., 1991 ; Cambier et coll., 1994 ; Preud'homme et coll. 2000)

I.2.3.b. Signaux et composants de la recombinaison

Malgré ces différences dans leur contrôle spatio-temporel, les mécanismes de réarrangement mis en œuvre demeurent relativement identiques pour les gènes variables des chaînes lourdes et légères

(ou des gènes du TCR) (pour revue : Tonegawa, 1983 et Yancopoulos et coll., 1986). Ainsi, tous les segments V, D et J sont bordés par des séquences particulières appelées " séquences signal de recombinaison " (RSS) très conservées entre les loci et les espèces (fig 4). Ces sites spécifiques sont composés d'une séquence quasi-invariante de 7 nucléotides (heptamère de séquence consensus CACAGTG) et d'une autre de 9 nucléotides (nonamère, séquence consensus ACAAAAACC) séparées par une région de 12 ou 23 nucléotides aléatoires (espaceur). Ces séquences sont présentes en 3' des gènes V, en 5' des gènes J et flanquent les gènes D. Les réarrangements ne peuvent avoir lieu qu'entre des RSS possédant des séparateurs de longueurs différentes (un 12-RSS avec un 23-RSS ou l'inverse) permettant d'éviter des réarrangements non désirés. Ainsi, chaque segment D est flanqué du même types de RSS en 5' et en 3', ne l'autorisant ainsi qu'à réarranger avec les RSS compatibles d'un V en 5' et d'un J en 3' et évitant la formation d'exons V_H-J_H ou $V_H-D-D-J_H$ (sauf dans le cas particulier des D irréguliers chez l'homme formant des association de type VDDJ) (Meek et coll., 1989). De même, tous les segments V d'un même locus étant flanqués de la même RSS, il ne peut survenir de réarrangement V-V (par délétion entre deux segments d'orientation inverse ou par inversion entre deux segments d'orientation identique). Deux mécanismes de recombinaisons co-existent en effet : si les deux RSS sont en orientation opposée, la recombinaison se fait par délétion de la région d'ADN comprise entre les deux segments, sous forme d'un ADN circulaire ou épisode. Dans ce cas, les signaux de recombinaisons sont éliminés du chromosome (fig 4). Au contraire, un réarrangement par inversion peut avoir lieu entre deux RSS de même orientation. Dans ce cas, les jonctions des signaux RSS sont conservées sur le chromosome. Ces réarrangements par inversion sont particulièrement fréquents sur le locus κ où nombre de régions V sont en position inverse par rapport au sens de transcription de l'exon C (Alt et coll., 1982 ; Blackwell et coll., 1988 ; pour revue Zachau : 2000 et site internet <http://www.med.univ-muenchen.de/biochemie/zachau/kappa.htm>). Cette particularité des gènes V_κ favorise une diversité de réarrangements secondaires lors de l'édition du BCR puisque les réarrangements par inversion, contrairement à ceux par délétion, permettent la rétention sur le chromosome de toutes les régions V présentes à l'origine sur le locus germinale. (Weichhold et coll., 1990). Il a aussi été montré que la composition des RSS influe directement sur l'efficacité des réarrangements (Hesse et coll., 1989, Bassing et coll., 2000). Ainsi, les RSS des gènes κ , proches de la séquence consensus, seraient plus efficaces que ceux des gènes λ et contribueraient à la faible représentation des ces derniers (Ramsden et coll., 1991).

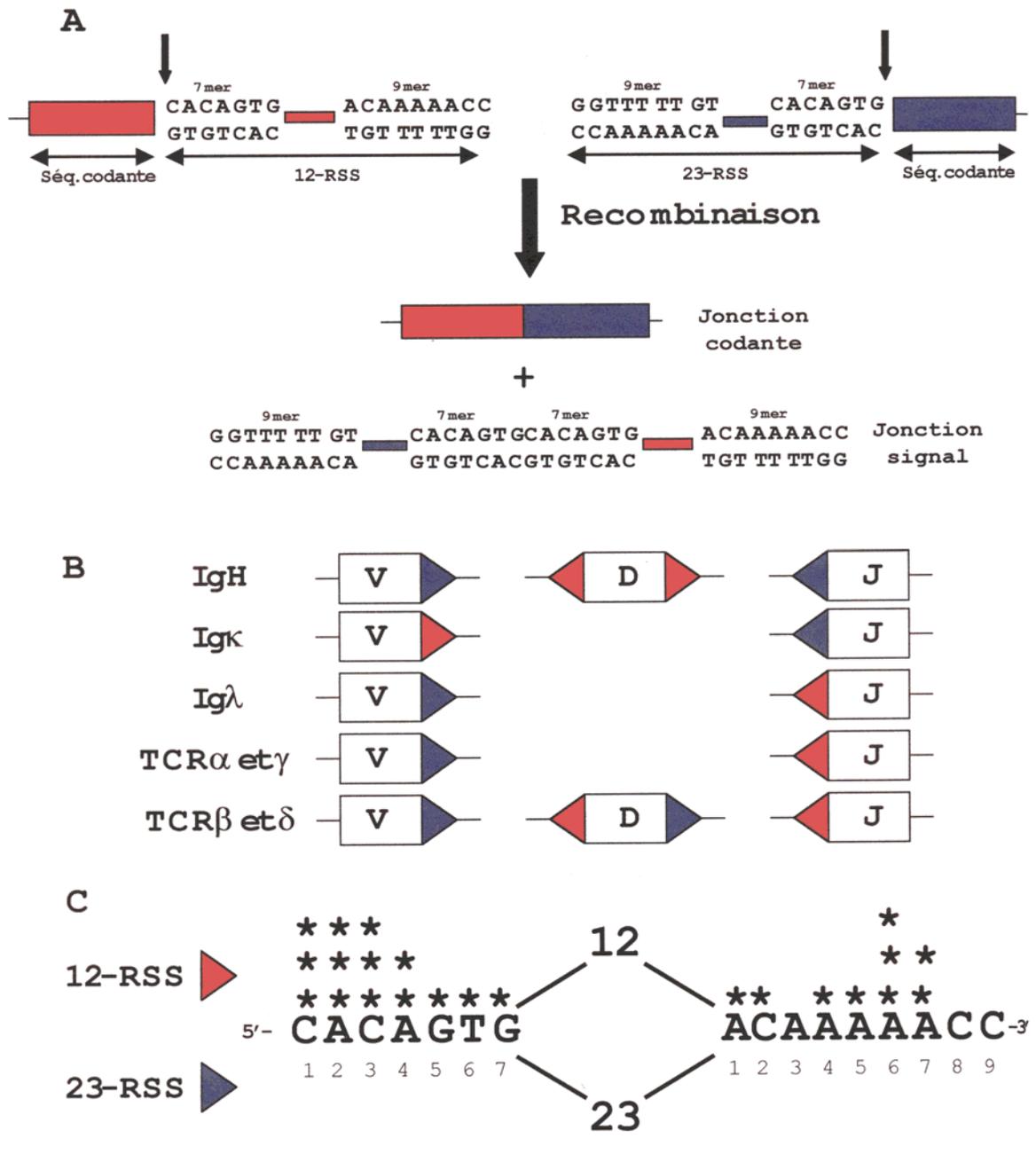


Figure 4 : Les séquences signal de recombinaison (RSS)

- **Règle 12/23.** La recombinaison V(D)J n'est initiée qu'entre deux segments géniques bordés par des RSS de longueur différente. Une coupure double-brin génère la fusion des segments codants
- **Organisation des deux catégories de RSS aux différents loci des Ig et du TCR.** Le triangle bleu représente une 23-RSS et le triangle rouge une 12-RSS.
- **Contribution de chaque nucléotide composant l'heptamère et le nonamère.** Les astérisques (*) au-dessus de chaque nucléotide indiquent leur importance fonctionnelle relative.

(Adapté de Lewis, 1994)

Plusieurs enzymes sont nécessaires à la reconnaissance, au clivage et à l'assemblage des régions V(D)J. Ces recombinaisons nécessitent tout d'abord une reconnaissance des séquences RSS au niveau desquels va avoir lieu une coupure double brin de l'ADN. Cette étape est réalisée par le produit des gènes RAG-1 et RAG-2 (Recombination Activating Gene) dont l'expression n'est détectée qu'aux stades de développement durant lesquels ont lieu les réarrangements V(D)J (Schatz, 1989, Oettinger et coll., 1990). Ils sont à eux seuls responsables du confinement des réarrangements des gènes du BCR et du TCR aux seules lignées lymphoïdes B et T et leur importance a été indiscutablement démontrée *in vivo* chez la souris. En effet, l'inactivation par recombinaison homologue d'un seul des gènes RAG suffit à empêcher toute initiation des réarrangements V(D)J et ces animaux présentent une sévère immunodéficiência due au blocage très précoce du développement lymphocytaire T et B. L'expression des gènes RAG lors du développement lymphocytaire B est strictement contrôlée : une première vague d'expression a lieu au stade pro-B permettant les réarrangements au niveau du locus des chaînes lourdes puis au stade pré-B pour les réarrangements des gènes des chaînes légères. Dès la formation et l'expression membranaire d'un récepteur à l'antigène fonctionnel, l'expression des enzymes RAG est rapidement et définitivement réprimée. Cependant, en périphérie, un petit nombre de cellules B encore très immatures et/ou possédant des BCR autoréactifs continuent d'exprimer brièvement ces enzymes (Meffre et coll., 1998 ; Monroe et coll., 1999 ; Yu et coll., 1999).

La jonction entre deux RSS se fait de façon précise tandis que celle des régions codantes réarrangées est au contraire imprécise et remaniée par l'ajout ou la suppression d'un nombre aléatoire de nucléotides. Ces éventuelles imprécisions augmentent la diversité des régions variables au niveau des jonctions (celles-ci codant en outre pour la région CDR3). L'ajout de nucléotides au niveau des jonctions est lié d'une part à la formation transitoire d'épingles à cheveux au niveau des extrémités codantes, qui seront clivées de façon asymétrique (générant des insertions de type " P " pour palindromiques) puis raboutées par le complexe DNA-PK/Ku70/Ku80 ; et d'autre part à l'action d'une terminal déoxynucléotidyltransférase (TdT), présente principalement au moment des réarrangements des chaînes lourdes (stade pro-B), capable d'ajouter des séquences riches en G/C de longueur variable (appelées insertions " N ") aux extrémités codantes avant que ces dernières ne soient ligaturées par les enzymes de jonction. (Li et coll., 1993).

1.3. REGULATION DE L'EXPRESSION DES IMMUNOGLO-BULINES

Les réarrangements, la transcription et au final, la production des Ig sont soumis à une régulation fine tout au long de la maturation des lymphocytes B. Cette régulation met en jeu différents mécanismes permettant un contrôle spatio-temporel spécifique sous l'action de stimuli externes tels que les cytokines, les activateurs polyclonaux, l'antigène... et sous l'effet d'interactions cellulaires directes avec tout un réseau de cellules auxiliaires. C'est l'action concertée de tous ces stimuli qui permettra finalement d'induire et de réguler la production d'une Ig spécifique ou non de l'antigène.

1.3.1. REGULATION DES REARRANGEMENTS : MODELE DE L'ACCESSIBILITE

L'existence de séquences (RSS) où d'enzymes (RAG) spécifiques aux lignées lymphoïdes B et T n'explique pas à elle seule le haut niveau de régulation des réarrangements V(D)J. D'ailleurs, ces caractères communs aux deux lignées expliquent difficilement la spécificité cellulaire quasi-parfaite (la lignée T présentant parfois malgré tout des réarrangements incomplets DJH) des réarrangements des gènes d'Ig (lymphocytes B) et des gènes du TCR (cellules T). Il a ainsi été établi que le ciblage s'exerçait grâce à des modifications de l'accessibilité à la recombinaison des différents segments constituant les loci des gènes d'Ig et du TCR. Les mécanismes physiques et biochimiques de cette accessibilité mettent en jeu plusieurs phénomènes entre lesquels tous les liens n'ont pas encore été clairement établis : remodelage chromatinien par hyperacétylation des histones et ouverture des nucléosomes, repositionnement de nucléosomes, déméthylation de l'ADN, modification de la méthylation des histones, initiation de la transcription, modifications des interactions avec la matrice nucléaire, regroupement des loci accessibles dans des compartiments nucléaires (foci) spécialisés, etc....

La structure de la chromatine est un élément crucial dans le modèle de l'accessibilité ainsi que dans la régulation de l'expression des gènes en général, et de ceux des immunoglobulines en particulier. La décondensation des structures chromatidiennes permet l'accès des protéines agissant directement sur l'ADN : polymérase, enzymes diverses et facteurs de transcription (pour revue : Felsenfeld, 1992 ; Kadonaga, 1998). Ainsi, l'accessibilité du locus des Ig, comme celle des autres

loci, implique des événements de modification de la chromatine (par exemple par hyper-acétylation des histones) mais aussi des modifications covalentes de l'ADN (déméthylation). Il a longtemps été admis que la présence de transcrits germinaux reflétait l'ouverture des loci des Ig et donc leur accessibilité aux enzymes de la recombinaison (pour revue : Sleckman et coll., 1996). Cependant, plusieurs démonstrations d'un découplage entre l'initiation de la transcription et les réarrangements ont été faites (Okada et coll., 1994 ; Alvarez et coll., 1995 ; Fernex et coll., 1995 ; Ferradini et coll., 1996 ; Delpy et coll. 2002).

Dans les témoins de l'accessibilité d'un locus, la sensibilité à la DNase I est fréquemment utilisée. La recherche de sites hyper-sensibles est depuis longtemps utilisée dans le but de définir les sites de fixation d'éléments régulateurs (régions promotrices ou activatrices dont nous parlerons dans ce chapitre). Il a été montré que cette hyper-sensibilité à la DNase I était corrélée au changement de conformation de la chromatine en particulier à l'hyper-acétylation des histones (Eden et coll., 1998). Des études de la sensibilité à la DNase I dans des cellules B ont montré que les gènes des Ig réarrangés fonctionnellement sont plus sensibles que les loci non réarrangés qui sont transcriptionnellement inactifs (Storb et coll., 1981 ; Weischet et coll., 1982 ; Mather et Perry, 1983 ; Persiani et Selsing, 1989). En outre, les histones H1 semblent préférentiellement associés avec les loci non réarrangés (Rose et Garrard, 1984). Ces premières études suggèrent l'existence de modifications de la structure chromatinienne des gènes des Ig, mais ces changements pourraient aussi n'être qu'une conséquence de la transcription du gène réarrangé fonctionnellement et ne pas être impliqués dans la régulation de la recombinaison V(D)J.

Des changements de l'état de méthylation des gènes des Ig ont été intensément étudiés. Comme pour la transcription, la méthylation de l'ADN semble avoir un rôle répressif sur la recombinaison V(D)J. Cette hypothèse d'une répression des réarrangements induite par la méthylation des gènes des Ig est étayée par de nombreuses observations. Ainsi, l'analyse du profil de méthylation des gènes des chaînes lourdes et légères montre que les loci sont méthylés dans les tissus non lymphoïdes et que l'initiation de la recombinaison V(D)J au cours du développement des précurseurs lymphocytaires est associée à une déméthylation des séquences Ig (Storb et Arp, 1983 ; Mather et Perry, 1983 ; Goodhardt et coll., 1993 ; Mostoslavsky et coll., 1998). De la même manière, la déméthylation semble être importante pour induire le réarrangement de constructions transgéniques (Engler et coll., 1993 ; Goodhardt et coll., 1993 ; Demengeot et coll., 1995 ; Fernex et coll., 1995). Des travaux effectués à l'aide de substrats artificiels de recombinaison tendent également à démontrer une relation entre l'état de méthylation d'un locus et sa capacité à réarranger.

Des minichromosomes contenant des séquences RSS transfectés transitoirement dans une lignée pré-B sont efficacement réarrangés (Hsieh et Lieber, 1992). Par contre, la fréquence des réarrangements est fortement diminuée si ces mêmes constructions ont été méthylées au préalable. Il est à noter que dans ce système, la diminution de la recombinaison V(D)J n'est observée qu'après répllication des minichromosomes et augmentation de la résistance aux nucléases du substrat de recombinaison, suggérant que l'inhibition des réarrangements n'est peut être pas directement liée à l'état de méthylation mais implique des changements de la structure chromatinienne.

I.3.2. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE

La régulation de la transcription des gènes d'Ig est similaire à celle d'autres gènes, et fait intervenir principalement des séquences nucléotidiques *cis* et des protéines se fixant à ces séquences (éléments *trans* régulateurs). Les interactions multiples entre ces différents éléments sont complexes et permettent un contrôle rigoureux de l'expression et de la spécificité cellulaire B des gènes d'Ig. Plusieurs types d'éléments *cis*-régulateurs ont été identifiés : les promoteurs (responsables de la transcription appropriée et efficace de ces gènes), les activateurs transcriptionnels (« enhancers »), les atténuateurs (« silencers ») et les régions d'ancrage à la matrice (« MAR : Matrix Association Region ») (pour revue : Ernst et Smale, 1995) (fig.5). Toutes ces séquences régulatrices comportent des sites de fixation pour les facteurs de transcription et agissent de façon concertée. La majorité de ces facteurs de transcription ne sont pas spécifiques de la lignées lymphoïde B mais l'action synergique de plusieurs d'entre eux peut, elle, s'avérer B-spécifique.

I.3.2.a. Promoteurs des gènes V

Les promoteurs des gènes d'Ig, localisés en amont des segments V, D et C (à l'exception de C δ) comportent une séquence TATA (TATA box) commune à tous les types de promoteurs et nécessaire à la transcription. Cependant, les promoteurs des gènes V se caractérisent par une séquence octamérique différente (inversée) entre les promoteurs des gènes V des chaînes lourdes

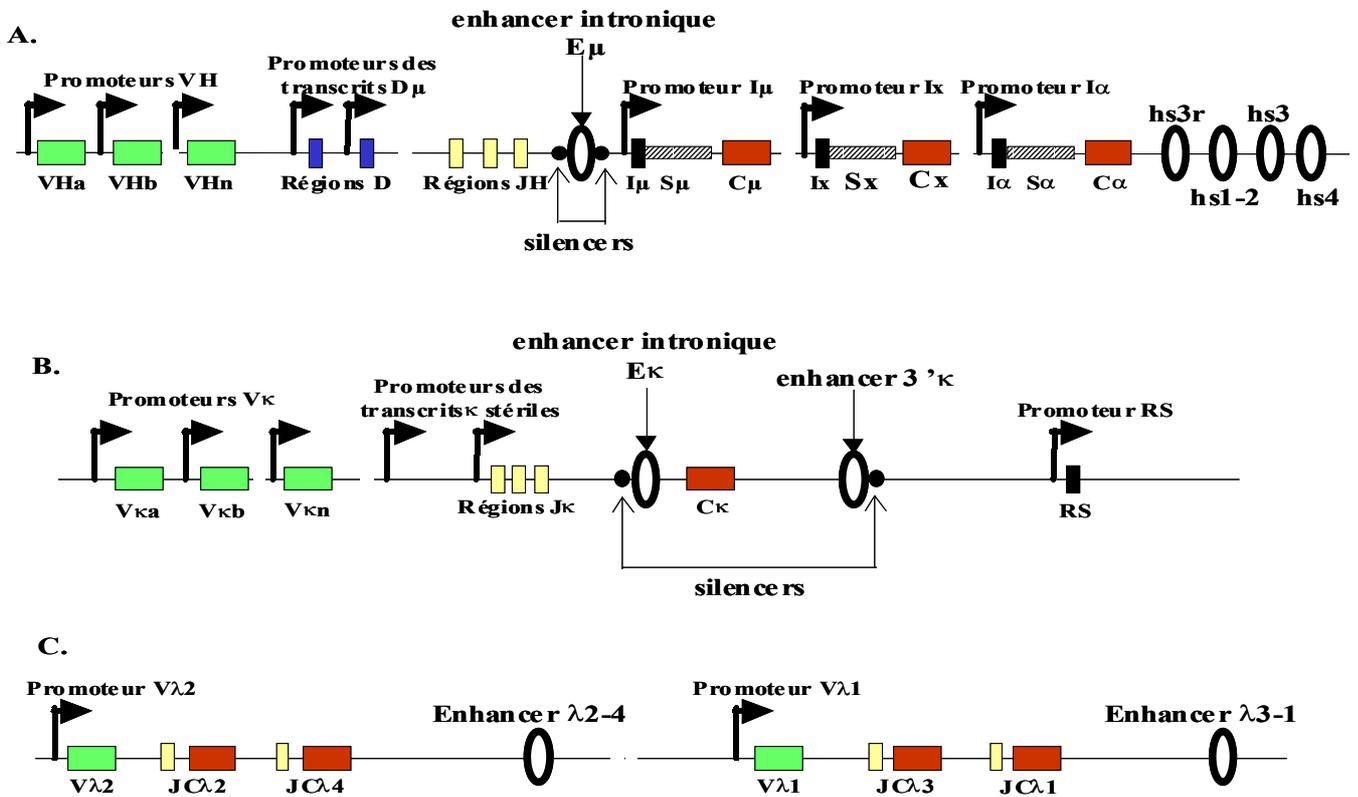


Figure 5. Activateurs transcriptionnels et promoteurs des loci des gènes d'Ig (de la souris).

A : locus de chaînes lourdes.

B : locus κ .

C : locus λ .

(RS : séquence recombinante ; hs : région hypersensible à la DNase)

(d'après Max 1993)

(ATGCAAAT) et légères (ATTTGCAT) et impliquée, en association avec les autres éléments régulateurs du locus (enhancers en particulier), dans la spécificité cellulaire (Falkner et Zachau, 1984 ; Ballard et Bothwell, 1986). En effet, l'un des facteurs se fixant aux séquences octamériques (oct-2) n'a été retrouvé que dans les lymphocytes B (Staudt et coll., 1988). Il est à noter cependant que la disruption génique de oct-2 n'affecte pas les réarrangements des gènes d'Ig (Corcoran et coll., 1993 ; Schubart et coll., 2001) mettant en lumière le caractère redondant des différents facteurs régulateurs. D'autres séquences conservées sont présentes sur les promoteurs V de la souris tels qu'une région riche en pyrimidines, un motif de fixation au facteur de transcription Ig/EBP-1, un motif $\mu E3$ et un heptamère conservé sur les promoteurs VH (Eaton et Calame, 1987 ; Kemler et coll., 1989).

Comme nous l'avons signalé précédemment, ces promoteurs peuvent être faiblement actifs en configuration germinale et cette activité, reflète l'accessibilité du locus. Cependant, seul le promoteur situé en amont du segment V réarrangé est fortement activé grâce au rapprochement et à l'action concomitante des activateurs transcriptionnels introniques et de ceux situés en 3' des

locus. Le rôle de ces activateurs transcriptionnels ne se limite pas à un renforcement de la transcription mais aussi, améliore la spécificité cellulaire de la transcription des gènes d'Ig.

I.3.2.b. Enhancers, silencers et régions d'attachement à la matrice

Les premiers enhancers ont été mis en évidence grâce à des délétions au sein de l'intron qui sépare les gènes J et C. De telles délétions se traduisent par un effondrement du taux de réarrangement et de transcription (Serwe et Sablitzky, 1993 ; Tadeka et coll., 1993 ; Chen et coll., 1993 ; Xu et coll., 1996 ; Sakai et coll., 1999). Ces séquences relativement stimulatrices sont spécifiques de tissu car elles demeurent sans effet lorsqu'elles sont transfectées, après couplage à un gène reporter, dans une cellule non lymphoïde. Cette spécificité tissulaire résulte de l'interaction avec des protéines qui n'existent que dans les cellules lymphoïdes tels que oct-2, OCA-B mais aussi de mécanismes plus complexes mettant en jeu des régulateurs négatifs exprimés à certains stades de la maturation B. La structure de ces séquences n'est pas la même dans les gènes des chaînes légères et dans les gènes des chaînes lourdes. La séquence stimulatrice intronique des chaînes légères kappa (E_{κ}) est composée essentiellement d'une séquence κB qui lie le facteur de transcription NF- κB dans l'induction de la transcription kappa (Lenardo et coll., 1987) et de trois séquences κE dont le mécanisme d'action n'est pas encore connu. La séquence stimulatrice intronique des chaînes lourdes (E_{μ}) est constituée d'une séquence octamérique identique à celle des promoteurs VH mais aussi d'un « noyau dur » responsable de l'essentiel de l'activité de l'enhancer, constitué d'un site μA , d'un site μB et de 5 sites μE fixant des protéines activatrices de type « hélice-boucle-hélice » (pour revue : kadesh, 1992). La position de ces éléments activateurs leur permet d'être préservés lors de tous les événements de recombinaison survenant sur les loci d'Ig, réarrangements V(D)J mais aussi commutation de classe des IgH, pour lesquels leur présence semble importante bien que non obligatoire (Bottaro et coll., 1998).

D'autres régions stimulatrices ont été caractérisées, tels que le promoteur-activateur compris dans l'élément DQ52 du locus IgH (Kottmann et coll., 1992) ou des éléments en 5' du locus Jk (Ferradini et coll., 1996). Parmi ces autres régions, les activateurs situés en 3' des loci IgH et Igk se révèlent être des éléments majeurs dans le bon déroulement des événements de recombinaison et de transcription des Ig. Ils contiennent tous les deux des sites de fixation à des facteurs de transcription similaires à ceux des activateurs introniques. L'enhancer 3'kappa fonctionne en

synergie avec l'activateur intronique afin de permettre l'expression et les réarrangements normaux du locus I κ k (Inlay et coll., 2002) et participe activement à la régulation spatio-temporelle des réarrangements V κ -J κ . En ce qui concerne l'activateur 3'IgH, présent chez le rat (Pettersson et coll., 1990), la souris (Davariach et coll., 1991 ; Lieberson et coll., 1991), l'homme (Mills et coll., 1997 ; Chen et Birshstein, 1997 ; Pinaud et coll., 1997) et le lapin (Volgina et coll., 2000), la présence à son voisinage de plusieurs éléments de régulation distincts a compliqué la compréhension de son action (pour revue : Khamlichi et coll., 2000). En effet, celle-ci ne peut se concevoir qu'en considérant comme une unité fonctionnelle l'ensemble de la région régulatrice qui occupe les 30 kilobases les plus distaux en 3' du locus IgH. Ainsi, même si l'insertion d'un gène de résistance à la néomycine en remplacement d'un des éléments induit une forte diminution de la commutation isotypique (Cogné et coll., 1994 ; Manis et coll., 1998), leur délétion individuelle n'entraîne aucun phénotype particulier (Manis et coll., 1998). Ce n'est que très récemment que l'action redondante de ces différents activateurs a été mise en évidence dans une expérience de délétion où deux de ces éléments étaient éliminés du locus. Ces travaux ont clairement démontré le rôle essentiel des deux éléments les plus distaux dans la transcription germinale des gènes constant de chaînes lourdes et dans la commutation isotypique (Pinaud et coll., 2001).

Les éléments atténuateurs (silencers) sont le plus souvent localisés dans les régions d'ancrage à la matrice nucléaire (régions MAR), et, comme les promoteurs et les enhanceurs, possèdent des sites de liaison à des facteurs de régulation *trans*. Même si le rôle précis de ces régions MAR, situées à proximité des enhanceurs introniques, reste controversé, ils semblerait qu'elles participent à la spécificité cellulaire B (Kadesh et coll., 1986 ; Pierce et coll., 1991), et modifient la structure de la chromatine pour amplifier la propagation d'un état d'accessibilité du locus au voisinage de l'activateur (Forrester et coll., 1994).

La complexité de la régulation transcriptionnelle des gènes d'Ig résulte dans le fait qu'un seul site de liaison peut être reconnu par plusieurs facteurs fonctionnellement distincts (Schreiber et coll., 1988), que ces mêmes facteurs, ubiquitaires ou B-spécifiques, peuvent eux-même se lier à plusieurs éléments régulateurs distincts puis interagir entre eux (Peterson et Calame, 1987 ; Kelmer et coll., 1989) et que leur action peut donc être modulée par la présence d'autres facteurs se liant directement à eux ou à des sites voisins sur l'ADN ou encore modifiant la courbure de l'ADN (Benezra et coll., 1990 ; Sun et coll., 1991 ; Genetta et coll., 1994). On doit aussi garder toujours présent à l'esprit la capacité de nombreux facteurs dits « transcriptionnels » d'interagir également avec les enzymes de remodelage chromatinien (histones acétylases), soit directement (pour NF- κ B

par exemple) soit par l'intermédiaire de facteurs intégrateurs comme CBP/P300. Cependant un modèle simplifié peut être dessiné dans lequel le rapprochement d'une région promotrice des enhancers intronique et 3' aurait pour effet d'augmenter la transcription des gènes V et C.

1.3.3. REGULATION DES TRANSCRITS D'IG

1.3.3.a. Epissage des transcrits d'Ig

Les gènes de chaînes lourdes d'Ig incluent des exons susceptibles de subir un épissage alternatif et codant soit des régions d'ancrage membranaire soit des peptides spécifiques des chaînes sécrétées. La régulation de cet épissage alternatif des ARN pré-messagers est donc capitale pour la maturation des lymphocytes B. Elle intervient d'une part lors de la différenciation des lymphocytes B immatures (exprimant une IgM membranaire sans IgD associée) en cellules B matures co-exprimant alors IgM et IgD membranaires. Cette régulation est aussi impliquée dans la maturation des cellules en plasmocytes excréteurs (pour revue : Guise et coll., 1989). Dans les cellules B immatures, il semble que le gène δ soit méthylé et que la transcription initiée à partir du promoteur VH ne s'étende pas au-delà du gène μ , donnant lieu à un transcrit mature qui est épissé de façon à ne coder que la forme membranaire de la chaîne μ (Maki et coll., 1981). La situation devient plus complexe encore dans les cellules B mûres, où un seul transcrit primaire inclut l'ensemble des séquences μ_s , μ_m , δ_m et δ_s (m pour membranaire et s pour sécrété) (Wall et Kuehl, 1983). Les mécanismes exacts de la régulation post-transcriptionnelle des ARN pré-messagers μ/δ ainsi que des formes membranaires et excrétées des Ig restent encore mal connus. L'épissage alternatif pourrait être orienté par le clivage préalable des ARNm au niveau de leur site de polyadénylation, ou bien pourrait être contrôlé par une structure spécifique des introns, capables de promouvoir l'une ou l'autre forme d'épissage avant même la polyadénylation (Danner et Leder, 1985 ; Peterson et Perry, 1986). Par ailleurs, la stabilité des ARNm augmente lors de la différenciation terminale des cellules B, et la synthèse importante de ribosomes au sein du plasmocyte ralentit probablement la dégradation enzymatique des ARNm des Ig, s'accompagnant d'une augmentation de la demi-vie des ARNm qui codent les formes sécrétées des chaînes lourdes (Jack et Wabl, 1988 ; Mason et coll., 1988).

I.3.3.b. Surveillance des ARN

Des mutations intervenant au sein des régions codantes de l'ADN peuvent provoquer des transformations de codons spécifiques d'acides aminés en codon stop. Ainsi, lors de la traduction, il peut y avoir un arrêt prématuré de l'élongation de la chaîne polypeptidique entraînant la production de protéines tronquées dont la présence peut s'avérer dramatique (cas de certaines β -thalassémies héréditaires, Hall et Thein, 1994). Or, seuls de très rares observations de ces protéines tronquées ont été faites, mettant en évidence l'existence de mécanismes de contrôle en amont de la synthèse protéique : c'est la surveillance des ARN. Le mécanisme le mieux connu de cette surveillance s'appelle la NMD (« Nonsense-mediated mRNA decay » pour dégradation des ARN messagers non-sens). Il permet de dégrader plus rapidement des ARNm contenant des codons stop prématurés ou PTC (« premature termination codon ») (pour revue Li et Wilkinson, 1998 ; Hentze et Kulozik, 1999 ; Culbertson, 1999 ; Kim et Dreyffuss, 2001). En règle générale, la NMD chez les mammifères n'a lieu que sur des ARN possédant au moins un intron et requière la présence d'un PTC situé à une distance minimum d'environ 50 nucléotides en 5' de la dernière jonction exon-exon (Hentze et Kulozik, 1999) (fig.6).

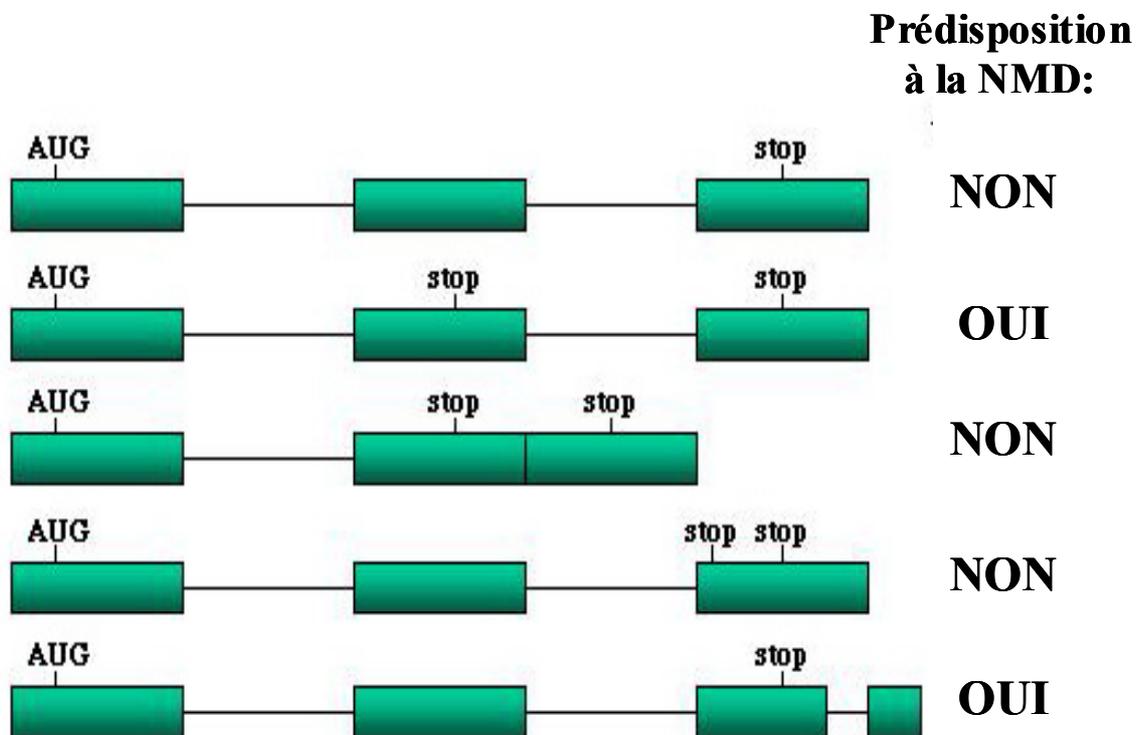


Figure 6: La « règle des deux signaux » pour la reconnaissance des codons stop prématurés (PTC)

Adapté de Li et Wilkinson, 1998 (revue).

Elle met en jeu un ensemble de facteurs nommés Upf1p, Upf2p et Upf3p (pour « up frameshift protein ») qui vont former le complexe UPF directement impliqué dans la dégradation des ARN contenant des PTC (Lykke-Andersen et coll., 2000). Ce complexe se lie aux transcrits dans le noyau au niveau des jonctions exon-exon puis est décroché soit lors de la traduction après translocation dans le cytoplasme, soit même plus précocement sous l'action de ribosomes intra-nucléaires qui auraient pour vocation de tester la « traductibilité » des transcrits. Lorsque la séquence contient des PTC précédant une jonction exon-exon, le complexe UPF n'est donc pas décroché par la machinerie de traduction et déclenche le processus de NMD. Ainsi, des inhibiteurs de la traduction comme le cycloheximide provoquent une forte diminution de la dégradation des transcrits mutés (Carter et coll., 1995). La localisation nucléaire de ces 3 composants du complexe UPF a maintenant été démontrée même si le facteur Upf1p ne semble recruté qu'une fois la machinerie de traduction complexée aux ARNm (Mendell et coll., 2002) (fig.7).

Dans le contexte des réarrangements aléatoires et plus tard, des mutations somatiques que subissent les gènes des Ig, l'apparition de PTC est fréquemment observée et 2/3 des réarrangements V(D)J devraient notamment se trouver hors phase, codant ainsi des chaînes tronquées restreintes à un domaine variable isolé (donc de structure très proches de certaines protéines normales des cellules pré-B, telles Vpré-B1, V-préB2 et V pré-B3). Il a en fait été montré que la synthèse de protéines tronquées résultant de tels réarrangements hors-phase était en grande partie supprimée par la NMD (Li et Wilkinson, 1998). Ce processus de NMD s'écarte cependant quelque peu des règles énoncées au paragraphe précédent et par exemple, les transcrits non-sens du TCR β , sont efficacement dégradés lorsque leurs PTC ne sont distants que de 8 à 10 nucléotides de la dernière jonction exon-exon. Cet exemple met en lumière les aspects encore incompris des mécanismes moléculaires de NMD. Dans le même registre, on comprend encore très mal comment des PTC peuvent modifier l'épissage de certains pré-ARNm, avec un processus de dégradation qui semble étroitement connecté à la traduction des ARNm (alors que cette traduction n'est censée intervenir que sur des messagers déjà épissés). Ainsi, la NMD nécessite des informations fournies par l'épissage et la traduction des ARN alors que ces deux phénomènes apparaissent dans des compartiments cellulaires distincts (respectivement noyau et cytoplasme). Cette localisation nucléaire ou cytoplasmique de la NMD est encore sujette à controverse. En effet, pour identifier des PTC, une lecture des ARN épissés par des mécanismes similaires à la traduction est nécessaire, or, ce n'est que très récemment qu'a été démontrée une machinerie de traduction intranucléaire (Iborra et coll., 2001). Plusieurs moyens ont été mis en œuvre afin de déterminer la localisation de la NMD : Thermann et ses collaborateurs (1998) ont inhibé la synthèse de protéines qui sont

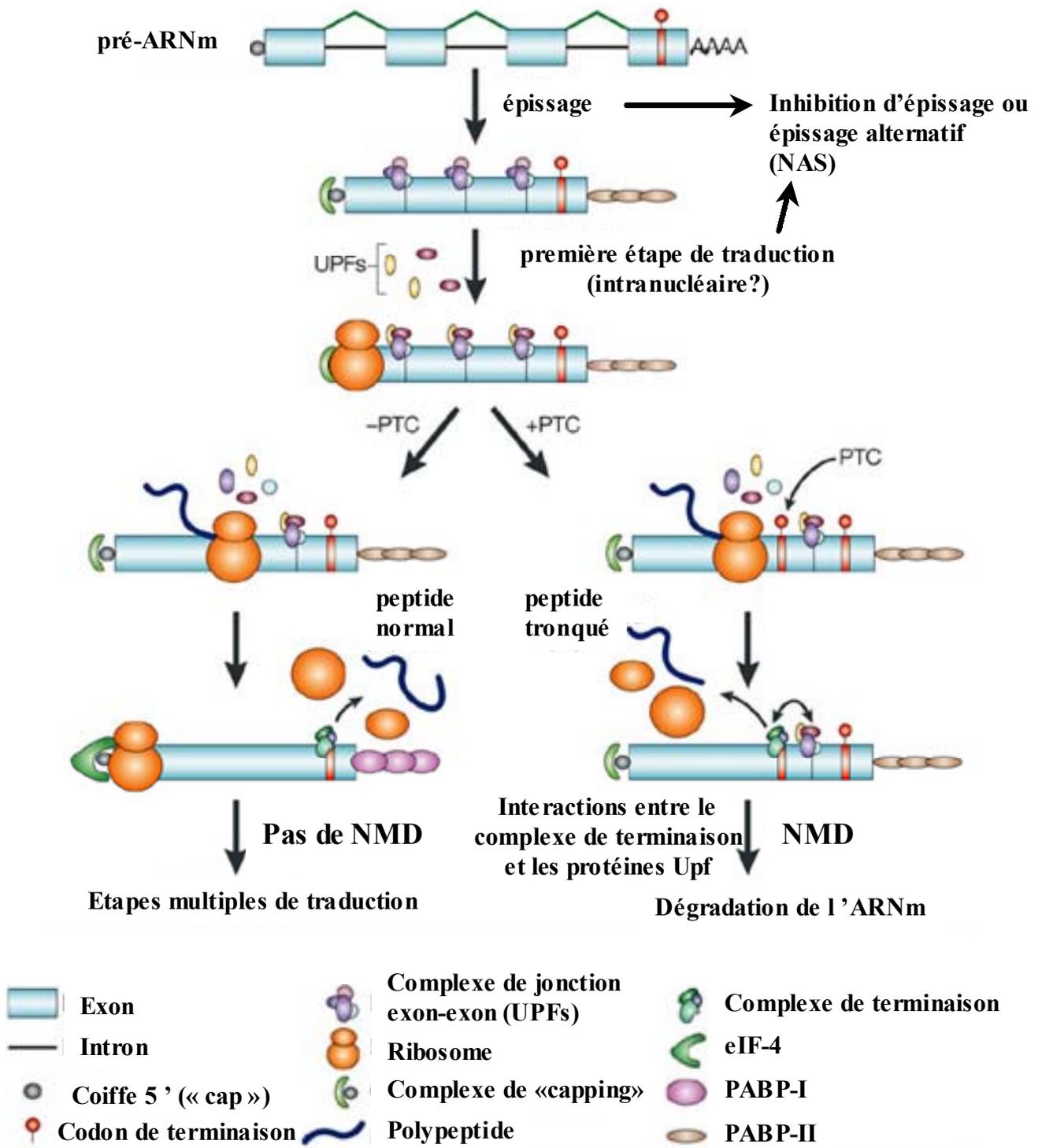


Figure 7: Résumé des mécanismes de surveillance des ARNm
Adapté de Cartegni et coll. (2002)

capables de réguler la traduction d'un ARNm de la β -globine contenant un PTC et qui sont spécifiquement cytoplasmiques (IRP : « iron regulatory protein »). Le résultat est une abolition de la dégradation des transcrits mutés. A l'opposé, des expériences d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) ont démontré l'accumulation proche du site de transcription d'ARN non épissés contenant des PTC (Mühlemann et coll., 2001) ainsi que leur dégradation dans le noyau (Bühler et coll., 2002) appuyant ainsi l'hypothèse d'un contrôle des ARN à l'intérieur même du noyau.

Enfin, la complexité des mécanismes de surveillance des ARN est encore augmentée par l'existence des phénomènes d'inhibition d'épissage et d'induction d'épissage alternatif (NAS pour « nonsense-associated altered splicing ») qui est souvent associé au terme de NMD bien que les mécanismes en soient relativement éloignés. Le NAS en lui-même ne provoque pas une dégradation accrue des ARN non-sens mais inhibe leur épissage (Lozano et coll., 1994 ; Aoufouchi et coll., 1996 ; Mühlemann et coll., 2001), paradoxalement nécessaire à la dégradation par NMD, ou provoque des épissages alternatifs visant à éliminer les PTC présents dans une séquence (Wang et coll., 2002a). Comme la NMD, ce processus requière une lecture préalable des ARN afin de reconnaître les PTC mais cette reconnaissance du cadre de lecture se ferait avant même l'épissage des pré-ARNm ce qui reste sujet à controverse dans le milieu scientifique. Un autre hypothèse met en jeu un rétro-contrôle induit par la NMD sur les transcrits non-épissés d'un même allèle dans le noyau. Cependant, de récentes découvertes ont mis en évidence que les deux phénomènes possédaient des mécanismes de fonctionnement différents. En particulier, la déplétion d'Upf2p abolit totalement la NMD sans affecter le NAS prouvant que ce dernier fonctionne de façon indépendante de la NMD (Wang et coll., 2002b ; Mendell et coll., 2002).

Concernant les gènes des Ig et du TCR, il a été montré que les deux phénomènes coexistaient et y constituaient l'une des plus efficaces situations de surveillance ARN décrite chez les mammifères (Baumann et coll., 1985 ; Lozano et coll., 1994 ; Connor et coll. 1994 ; Aoufouchi et coll., 1996 ; Mühlemann et coll., 2001 ; Gudikote et Wilkinson, 2002). L'importance de l'efficacité de ce processus de minoration des ARNm contenant des PTC semble en adéquation directe avec la fréquence élevée des aberrations inhérentes aux nombreux remaniements que subissent ces gènes. La surveillance des ARN permet ainsi d'éviter la forte production de protéines tronquées qui pourraient interférer dans l'assemblage normal des récepteurs à l'Ag (pré-BCR, BCR et TCR) et permet le maintien de l'exclusion allélique au niveau traductionnel tout au long de la maturation de ces cellules (en l'absence d'une exclusion allélique établie au niveau transcriptionnel). Ce dernier

point fera l'objet d'un plus grand approfondissement dans le chapitre concernant l'ontogenèse B et l'article 2 de cette thèse.

I.3.4. REGULATION POST-TRADUCTIONNELLE DES IG

I.3.4.a. Glycosylation

Toutes les classes d'Ig sont glycosylées, chaque région constante de chaînes lourdes possédant au moins un site de glycosylation dans l'exon codant le domaine CH2 (région Fc, fig.1). Certains des rôles de ces glycosylations sont clairement établis tandis que d'autres restent encore à explorer. Elles sont impliquées dans le repliement et l'assemblage correct des Ig et protègent de la dégradation intracellulaire (pour revue : Wall et Kuehl, 1983). Par des expériences d'inhibition de la glycosylation, il a été montré que la glycosylation n'était pas nécessaire pour l'expression des Ig à la membrane des cellules B mais qu'elle était obligatoire pour la sécrétion par les plasmocytes de certains isotypes (IgA, IgE et certains IgM). De plus, il est maintenant clairement établi que les sucres présents dans la région Fc participent directement à certaines fonctions effectrices des anticorps comme la fixation du complément ou les interactions avec les récepteurs Fc permettant la phagocytose du complexe antigène-anticorps (pour revue : Jefferis et coll., 1998). Le rôle potentiel d'anomalies de glycosylation des Ig a été évoqué dans diverses pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde (pour revue : Rudd et coll., 2001) ou certaines néphropathies (néphropathies à IgA, amylose AL, syndrome de Randall) (Feehally et Allen, 1999 ; Preud'homme et al, 1994 ; Stevens, 2000).

I.3.4.b. Assemblage et transport des Ig

L'expression membranaire et la sécrétion des Ig requière, comme pour les autres protéines, le repliement et l'assemblage correct des chaînes polypeptidiques qui les constituent. En cas d'anomalie dans le déroulement de ce processus, les polypeptides "anormaux" sont retenus à l'intérieur du réticulum endoplasmique (RE) par des protéines chaperones, puis transportés vers le cytosol par l'intermédiaire d'un canal protéique (Sec-61) pour être dégradés ultérieurement par le protéasome (Sommer et Wolf 1997, Wiertz et coll. 1996). Ces protéines chaperones interviennent autant dans le repliement et l'assemblage des Ig que dans leur transport intracellulaire. Parmi celles-ci, la mieux caractérisée est la protéine BiP (pour immunoglobulin binding protein) qui fait

partie de la famille hsp70 des protéines du choc thermique, et dont l'expression est ubiquitaire (Haas et Wabl 1983, Sommer et Wolf 1997). Elle possède un motif KDEL caractéristique des protéines résidant uniquement au niveau du RE. Des études *in vitro* ont montré que la BiP fixe préférentiellement des peptides comportant un motif heptamérique HyXH₂HyXH₂Hy, dans lequel Hy est un résidu hydrophobe et X un acide aminé quelconque. Ce motif, présent dans un grand nombre de protéines, est normalement masqué après leur repliement correct (Blond-Elguindi et coll. 1993). Il existe des sites de fixation à la BiP à la fois dans les domaines V et C des chaînes H et L (Knarr et coll. 1995). L'activité de la BiP est dépendante de l'ATP (Wei et Hendershot 1998). A l'état normal, durant l'assemblage de la molécule d'Ig, la BiP s'associe transitoirement avec les chaînes lourdes et légères dont elle facilite le repliement correct et l'assemblage, permettant alors leur excrétion ou leur expression à la membrane cellulaire. Si les polypeptides sont mal assemblés, la BiP les retient dans le RE, initiant ainsi le processus de dégradation. Dans le cas des chaînes lourdes μ et δ , si la BiP interagit de façon transitoire avec de multiples domaines, seule son interaction avec le domaine CH1 semble durable et impliquée dans le processus de rétention dans le RE. Il a en outre été montré *in vivo* à l'aide d'une chaîne lourde simplifiée (VH-CH1) que la présence d'une chaîne légère est nécessaire au repliement correct du CH1 et à sa dissociation de la BiP. En revanche, *in vitro*, l'addition d'ATP permet la dissociation du complexe BiP-chaîne lourde et le repliement du CH1, en l'absence de chaîne légère. Ces données suggèrent que les chaînes légères sont impliquées indirectement dans le repliement du CH1, en favorisant sa dissociation de la protéine chaperone, permettant ultérieurement l'excrétion de l'Ig complète sous sa forme normale (H2L2) (Lee et coll. 1999). Dans les cas des maladies de chaînes lourdes (sécrétion d'une chaîne lourde seule par un plasmocyte malin), le domaine CH1 (au moins) est délété ce qui évite la rétention de la protéine dans le RE et permet son excrétion, les domaines CH2 ou CH3 restants étant capables de dimériser et ne se liant pas à la BiP. De plus, les chaînes lourdes produites ont souvent une délétion partielle ou complète du domaine V (Hendershot et coll. 1987, Cogné et coll. 1992). Dans de rares cas de maladies des chaînes lourdes, la délétion se limite au domaine V (et non CH1) de la chaîne lourde. Cependant, en raison de la production de chaînes légères monoclonales entières formant des liaisons non-covalentes transitoires avec la chaîne lourde μ , celle-ci est excrétée malgré la présence de CH1 (Cogné et coll. 1992). Hormis dans ces cas particuliers de protéines tronquées, les chaînes lourdes libres entières ne sont jamais excrétées en l'absence de chaînes L associées. Par contre, les mutants de cellules B ne produisant pas de chaînes lourdes sont fréquents et peuvent abondamment excréter des chaînes légères libres. La plupart de ces chaînes légères libres interagissent de façon transitoire avec la BiP par l'intermédiaire de leurs domaines V et peuvent être excrétées sous la forme de monomères ou de dimères. Certaines

mutations dans le domaine V des chaînes légères peuvent cependant altérer le repliement correct du domaine VL, et en favorisant la liaison à la BiP, réduisent ou inhibent totalement leur excrétion. Il a ainsi été établi que la simple substitution dans le domaine V d'une glycine (en position 15) en arginine suffit à bloquer l'excrétion d'une chaîne légère λ II par une lignée de cellules myélomateuses (Wu et coll. 1983). L'importance du type de mutation a été démontrée à l'aide d'expériences de mutagenèse dirigée suivies de transfections dans des cellules non lymphoïdes. Si la seule substitution de l'alanine 60 par une valine dans une chaîne V λ I n'a aucune influence, le remplacement de la phénylalanine 62 par une sérine induit un blocage de l'excrétion (Dul et Argon 1990). A l'opposé, certaines mutations de la séquence des chaînes légères, comme la substitution d'une alanine en position 64 par une glycine dans le cas de la chaîne légère κ ISE, peuvent augmenter de façon considérable le débit d'excrétion (Rocca et coll. 1993). Les résidus cystéine présents à l'extrémité carboxy-terminale des chaînes légères d'Ig interviennent également dans le processus de rétention au sein du RE. Les chaînes légères comportent cinq résidus cystéine : quatre sont impliqués dans la formation de ponts disulfures intra-chaînes au sein des domaines V et C, et le cinquième dans la formation d'un pont intermoléculaire avec la chaîne lourde. La formation de ces ponts disulfures est catalysée par une enzyme présente dans le RE, la PDI (pour « Protein disulfide-isomerase »). En l'absence de liaison avec une chaîne lourde, le cinquième cystéine peut former une liaison covalente réversible avec les protéines de la matrice extracellulaire du RE, induisant leur rétention dans ce compartiment. L'excrétion de ces chaînes légères peut alors être restaurée par des agents réducteurs ou par l'adjonction d'une chaîne lourde (Reddy et coll. 1996, Leitzgen et coll. 1997). Ainsi, à l'aide d'expériences de co-transfection de gènes de chaîne lourde, a été montrée la possibilité d'obtenir l'excrétion d'une molécule d'Ig entière, « libérant » ainsi une chaîne légère auparavant bloquée dans le RE (Dul et coll. 1992, Leitzgen et coll. 1997). Le transport intracellulaire des Ig est régulé par d'autres protéines chaperones. La GRP78 forme un complexe avec la BiP, se liant à certaines séquences hydrophobes des chaînes d'Ig, immédiatement après leur translocation dans le RE. Une troisième protéine la GRP94 (membre de la famille Hsp90) est capable de se lier aux Ig dont le repliement est achevé, après la dissociation du complexe BiP-Ig (Melnick et coll. 1994). Les molécules chaperones sont elles-mêmes régulées au moment de la différenciation du lymphocyte B en plasmocyte, par le facteur de transcription Xbp-1. Ce facteur constitue l'un des éléments de la voie UPR (Unfolded Protein Response), qui, outre les protéines chaperones, contrôle plusieurs facteurs de transcription et peut induire l'apoptose de la cellule en cas d'accumulation excessive de protéines dans le RE (Gass et coll. 2002). Les signaux impliqués dans la différenciation des plasmocytes, en particulier l'IL-4, contrôlent l'expression de

Xbp-1. Enfin, le facteur Xbp-1 est lui-même nécessaire à la production de l'IL-6 indispensable à la survie des plasmocytes (Iwakoshi et coll. 2003).

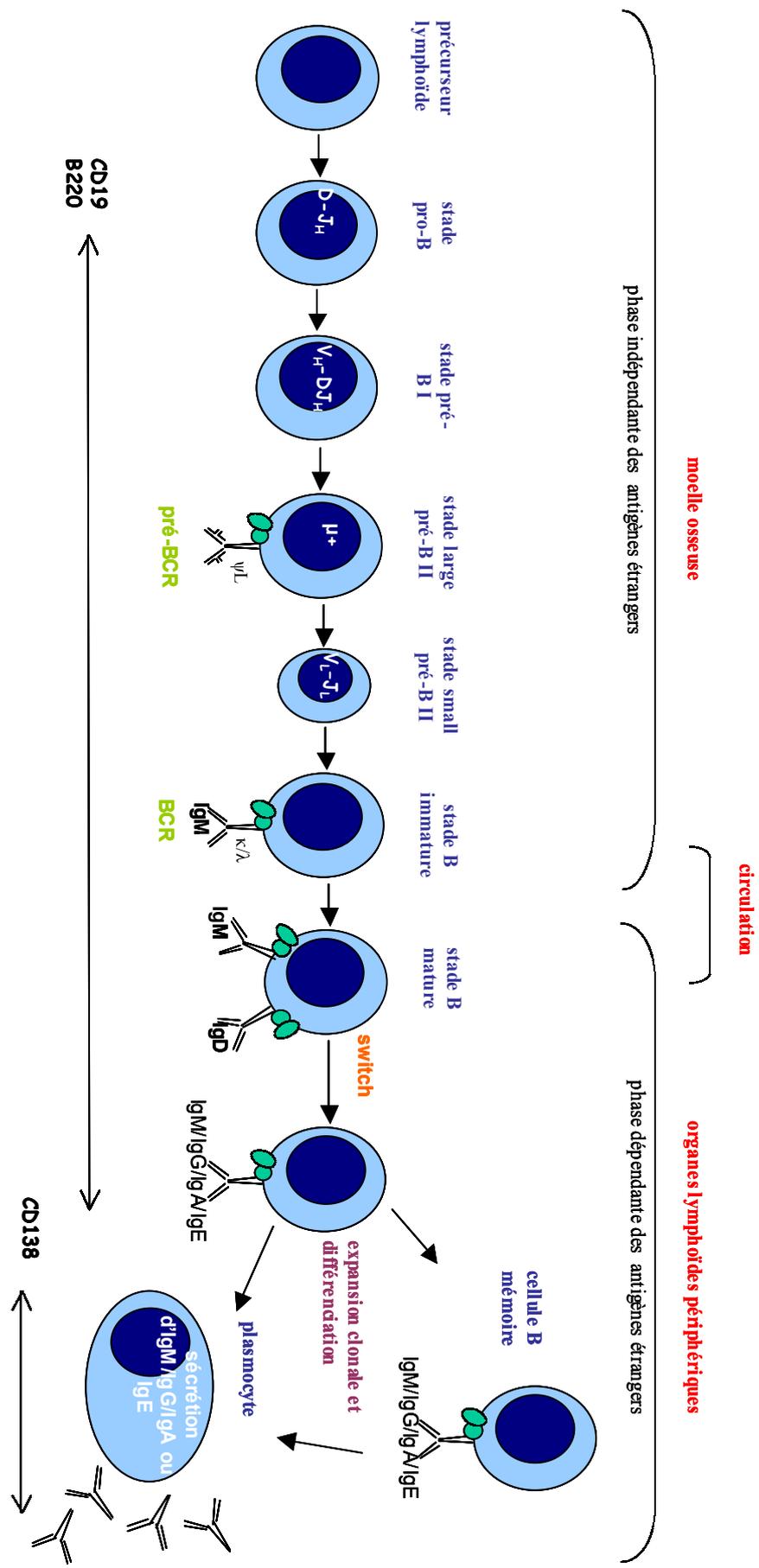


Figure 8: Etapes de l'ontogenèse B.
 Les principales étapes de réarrangements des gènes d'Ig sont représentées ainsi que les récepteurs à l'antigène

II. ONTOGENESE B : LES ETAPES DE LA DIFFERENCIATION DES LYMPHOCYTES B

On peut séparer l'ontogenèse des lymphocytes B en deux phases principales :

Une phase de différenciation et de maturation indépendante de l'antigène. Elle se déroule principalement dans la moelle osseuse et aboutit à la formation de lymphocytes B immatures exprimant une Ig de surface qui vont pouvoir alors répondre aux antigènes.

Une phase d'activation et de différenciation finale dépendante des antigènes du soi d'abord puis du non-soi en périphérie (rate, ganglions lymphatiques et plaques de Peyer). Elle aboutit à la formation de plasmocytes et de cellules B mémoires spécifiques d'un antigène étranger.

Les différentes étapes de ce processus de différenciation vont amener les cellules à exprimer tout un ensemble de récepteurs et à répondre à divers médiateurs directement impliqués dans le processus ordonné aboutissant à l'expression et/ou la sécrétion d'une immunoglobuline spécifique d'un antigène (fig.8).

II.1. PHASE INDEPENDANTE DE L'ANTIGENE

La théorie de la sélection clonale de Burnet (1959) postule que la sélection d'un lymphocyte B fait suite à la reconnaissance par un antigène étranger de l'immunoglobuline exprimée par cette cellule et que avant cette rencontre, l'ensemble des lymphocytes comporte de façon innée des cellules capables de reconnaître n'importe quel antigène. Même si cette théorie reste en grande partie vraie pour la phase dépendante de l'antigène, de nombreux travaux ont depuis démontré le rôle direct de l'immunoglobuline dans la sélection des cellules B avant même sa rencontre avec un quelconque antigène étranger. Ainsi, au delà de la sélection cellulaire postulée par Burnet, il apparaît que les cellules B subissent une sélection et un apprentissage directement dépendants de leur récepteur dès les stades précoces de leur différenciation (pour revue : Meffre et coll., 2000 ; Nemazee et Hogquist, 2003). L'évolution des progéniteurs hématopoïétiques vers les cellules B matures

nécessite un microenvironnement particulier produit par les cellules stromales de la moelle osseuse qui vont agir directement par adhésion aux cellules B (Stem Cell Factor qui interagit avec le récepteur c-kit des précurseurs B) ou par l'intermédiaire de la sécrétion de cytokines indispensables à la maturation ces cellules B (interleukine 7 par exemple) (pour revue : Bertrand et coll., 2000).

Les différents stades définissant le développement des cellules B dans la moelle osseuse ont fait l'objet de nombreuses nomenclatures différentes résultant des critères particuliers choisis par les différentes équipes pour définir chacune des étapes : état des réarrangements des gènes d'Ig (Melchers et coll., 1995), expression de différentes molécules spécifiques du lignage B (Osmond et coll., 1994, Hardy et coll., 1991). Malgré les efforts d'unification (Osmond et coll., 1998), ces nomenclatures entretiennent des confusions sur les termes choisis et nous allons tenter de simplifier ce schéma en suivant une nomenclature simple pré-pro-B, pro-B (pas de chaîne μ en surface), pré-B (chaîne μ en surface mais pas de chaîne légères), B immature (IgM à la surface) et B mature (IgM et IgD de surface) (fig. 9).

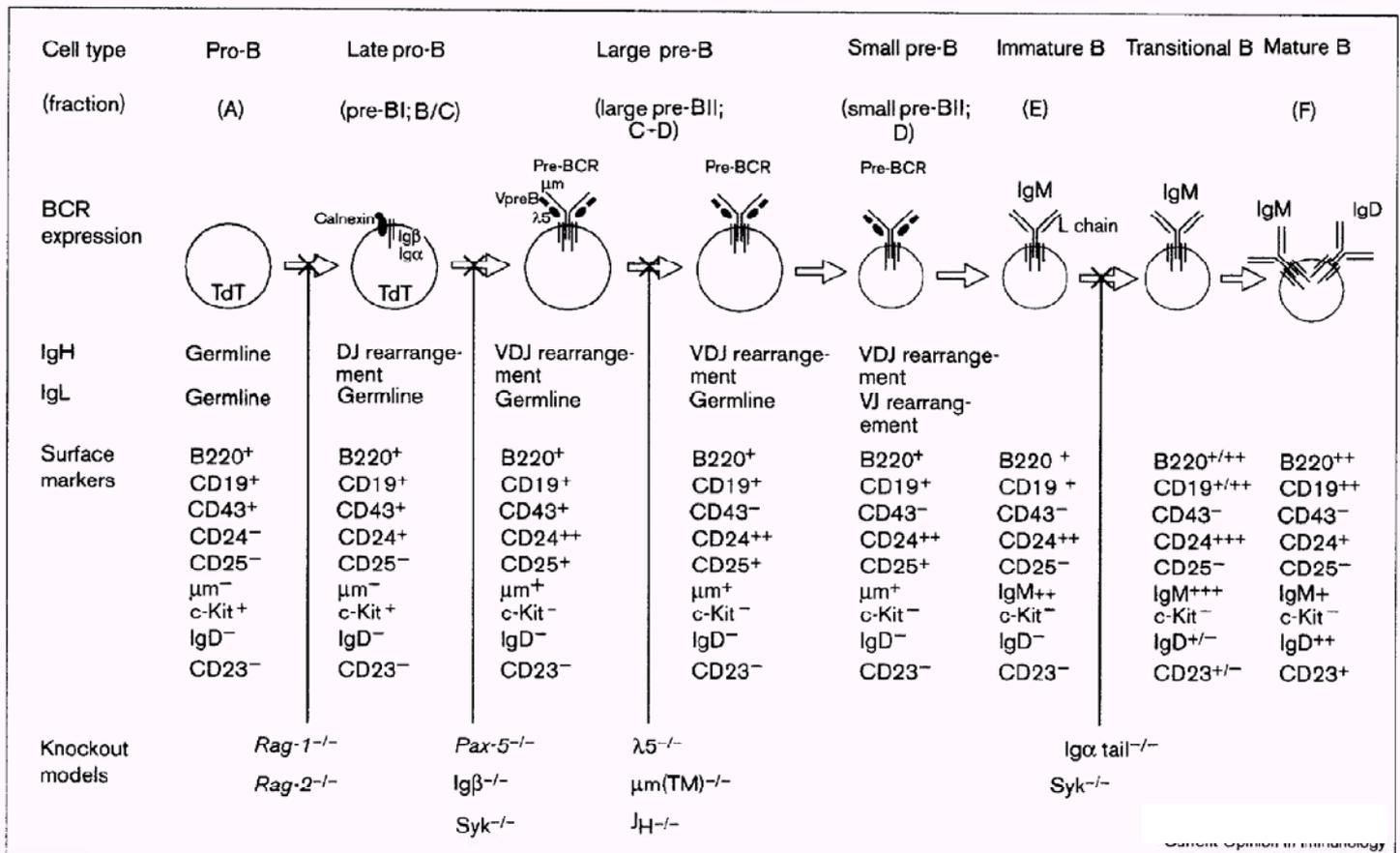


Figure 9: Récapitulatif des différentes étapes de maturation des cellules B dans la moelle osseuse. Les différentes nomenclatures rencontrées dans la littérature (Osmond, Hardy et Melchers) sont représentées, ainsi que les stades de réarrangements des gènes d'immunoglobulines et les marqueurs de surface. Les blocages de différenciation observés dans des modèles souris KO sont indiqués. (D'après Benschop et Cambier, 1999)

II.1.1. ENGAGEMENT VERS LE LIGNAGE B : LE STADE PRE-PRO-B

Les cellules B se développent à partir des cellules souches hématopoïétiques principalement du foie foetal avant la naissance puis de la moelle osseuse après la naissance. La différenciation B proprement dite commence lorsque des cellules souches lymphoïdes s'engagent dans le lignage B caractérisé par la présence à la surface du marqueur B220 (récepteur du CD45). Le stade pré-pro-B correspond à des cellules n'ayant pas encore engagé de réarrangements (parfois quelques réarrangements DJ sont détectés) mais possédant déjà le marqueur B220 en surface (Hardy et coll., 1991) et exprimant faiblement les enzymes RAG. D'autres marqueurs sont présents tels que CD43 et c-kit (CD117). D'autres part, *in vitro*, ces cellules ne se différencient qu'en lymphocytes B, démontrant ainsi que le lignage B commence avant même le début des recombinaisons DH-JH (Allman et Hardy, 1999). Différents facteurs de transcriptions sont précocément impliqués dans la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques en progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) puis en cellules B (pour revue : Reya et Grosschedl, 2000 ; Busslinger et coll., 2000 ; Kee et Murre, 2001). L'inactivation des gènes codant les facteurs de transcriptions Ikaros ou PU.1 (ou la surexpression de formes dominantes négatives) provoque une absence totale de la lignée B (et de la lignée T). Ikaros agit directement sur le remodelage de la chromatine et sur l'acétylation des histones nécessaires à l'initiation des réarrangements (Kim et coll., 1999). Le lignage B apparaît donc de manière totalement indépendante du BCR.

II.1.2. LES PREMIERS REARRANGEMENTS DES GENES D'IMMUNOGLOBULINES : LE STADE PRO-B

C'est à ce stade que se font les réarrangements D-J et V-DJ des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobulines. Les enzymes RAG ainsi que la TdT sont fortement exprimés. Comme précédemment, ces cellules expriment en surface le CD43 et c-kit. On peut séparer ce stade selon que les réarrangements observés soient surtout D-J (pro-B intermédiaires) ou V-DJ (pro-B tardifs). Hardy et ses collaborateurs séparent ces deux stades par l'apparition en surface de la protéine BP-1. A ce stade, l'engagement vers le lignage B est encore réversible et il a été montré le rôle essentiel du facteur de transcription B-spécifique Pax5 (BSAP) dans le maintien de ce lignage. Un arrêt de l'expression de Pax5 à ce stade, même après l'initiation des réarrangements D-J, induit l'arrêt de la

maturation des cellules pro-B, ces cellules pouvant alors donner naissance à d'autres cellules des lignées lymphoïdes (lymphocytes T, cellules NK) et myéloïde (macrophages, cellules dendritiques) (Nutt et coll., 1999 ; Mikkola et coll., 2002). Les produits du gène E2A jouent aussi un rôle dans le maintien du lignage B et ils sont impliqués dans le développement vers le stade pré-B et dans l'accessibilité des loci d'Ig aux recombinaisons (pour revue : Kee et coll., 2000). Les protéines Ig α et Ig β (qui font partie des composants du BCR et participent activement à la signalisation par ce BCR dans les cellules B plus matures) sont détectées à la membrane des cellules pro-B en association avec la calnexine (Nagata et coll., 1997). Une signalisation peut être induite par ce complexe permettant le recrutement de protéines tyrosine kinases *via* leurs motifs ITAM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif ») et il a été montré que dans des souris RAG-2 $-/-$, cette signalisation permet l'acquisition de certains marqueurs du stade pré-B (Nagata et coll., 1997). D'autre part, un autre complexe formé des pseudo-chaînes légères VpreB et $\lambda 5$ (14.1 chez l'homme) associées à plusieurs glycoprotéines dont la gp130 (appartenant à la famille des cadhérines) est présent en surface des cellules pro-B murines (Karasuyama et coll., 1993) et humaines (Meffre et coll., 1996). Ce complexe peut induire un influx de calcium après activation par des anticorps anti-VpreB (Lemmers et coll., 1999). Ces deux complexes sont considérés comme des précurseurs du BCR présents au stade pro-B et sont potentiellement impliqués dans le passage vers le stade pré-B.

Une première sélection par le BCR peut avoir lieu à ce stade. En effet, les réarrangements aléatoires D-J peuvent, une fois sur trois (cadre de lecture RF2), aboutir à la formation d'une forme tronquée de la chaîne μ , D μ . Cette chaîne ne possédant pas de domaine V peut être exprimée à la surface de la cellule en association avec la pseudo-chaîne légère et les composants du BCR Ig α et Ig β . Or, le cadre de lecture RF2 correspondant à cette chaîne D μ n'est pas retrouvé ensuite pour les Ig exprimées par les cellules B matures murines. Soit ces segments DJ sont remplacés par d'autres par un phénomène d'édition du récepteur, soit les cellules exprimant de telles protéines tronquées D μ sont éliminées dès le stade pro-B (Reth et coll., 1986 ; Gu et coll., 1991 ; Home et coll., 1996). Cette contre-sélection nécessite la transmission d'un signal par les protéines transductrices Ig α et Ig β (Gong et coll., 1996) et constitue ainsi la première sélection induite directement par le « pro-BCR ». Cette sélection est l'un des exemples de différence « homme / souris » puisqu'en effet les segments D sont exprimés chez l'homme dans les trois cadres de lecture possibles.

Les réarrangements des gènes VH sur les segments DJH ont lieu au stade pro-B tardif et nécessitent une accessibilité induite par l'action de Pax5 et de l'interleukine 7 (IL-7)

particulièrement au niveau des segments VH les plus distaux (5' du locus des chaînes lourdes) (Nutt et coll., 1997 ; Corcoran et coll., 1998 ; Hesslein et coll., 2003). Un réarrangement fonctionnel VDJ va alors permettre la production d'une chaîne μ complète qui pourra être exportée à la membrane en association avec $Ig\alpha$, $Ig\beta$ et les pseudo-chaînes légères, formant ainsi le pré-BCR.

II.1.3. FORMATION, EXPRESSION MEMBRANAIRE ET ROLES DU PRE-BCR : LE STADE PRE-B

Le modèle ordonné développé par Alt et coll. (1987) suggérait qu'une cellule pré-B soit capable de reconnaître un réarrangement productif du locus des chaînes lourdes pour pouvoir alors initier les réarrangements au locus des chaînes légères. Or, comme nous l'avons vu précédemment, une chaîne lourde seule n'est pas exportée à la membrane ce qui limite les possibilités de signalisation permettant d'induire 1) la sélection des cellules qui possèdent une chaîne μ fonctionnelle et 2) les réarrangement des gènes de chaînes légères. La découverte de deux gènes chez la souris codant les protéines VpreB et $\lambda 5$ a permis de mieux comprendre comment une telle régulation pouvait avoir lieu (Sakagushi et melchers, 1986 ; Kudo et Melchers, 1987). VpreB et $\lambda 5$ ont des séquences relativement homologues respectivement aux domaines variables et constants d'une chaîne légère λ , excepté pour les parties N-terminale de $\lambda 5$ et C-terminale de VpreB, très conservées entre les différentes espèces mais n'ayant aucune homologie de séquence avec des gènes connus. Elles peuvent s'associer entre elles et avec la chaîne μ dans le réticulum endoplasmique et permettre son expression à la membrane en association avec $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ (Tsubata et Reth, 1990 ; Karasuyama et coll., 1990). Ce complexe forme le pré-BCR (fig.10). Il existe deux gènes dont les séquences sont presque identiques (98% d'homologie, Dul et coll., 1996) codant pour VpreB chez la souris (VpreB-1 et -2) (un seul chez l'homme) et un gène codant pour $\lambda 5$ (14.1 chez l'homme). Un troisième gène codant pour un VpreB-3 a été découvert récemment mais son rôle reste à déterminer : il s'associerait de façon transitoire aux chaînes μ lors de l'assemblage du pré-BCR dans le réticulum endoplasmique et pourrait ainsi servir de protéine chaperone (Rosnet et coll., 1999).

Le rôle essentiel du pré-BCR a été démontré par des expériences de recombinaison homologue chez la souris dans lesquelles des composants du pré-BCR sont affectés. Ainsi, la délétion du

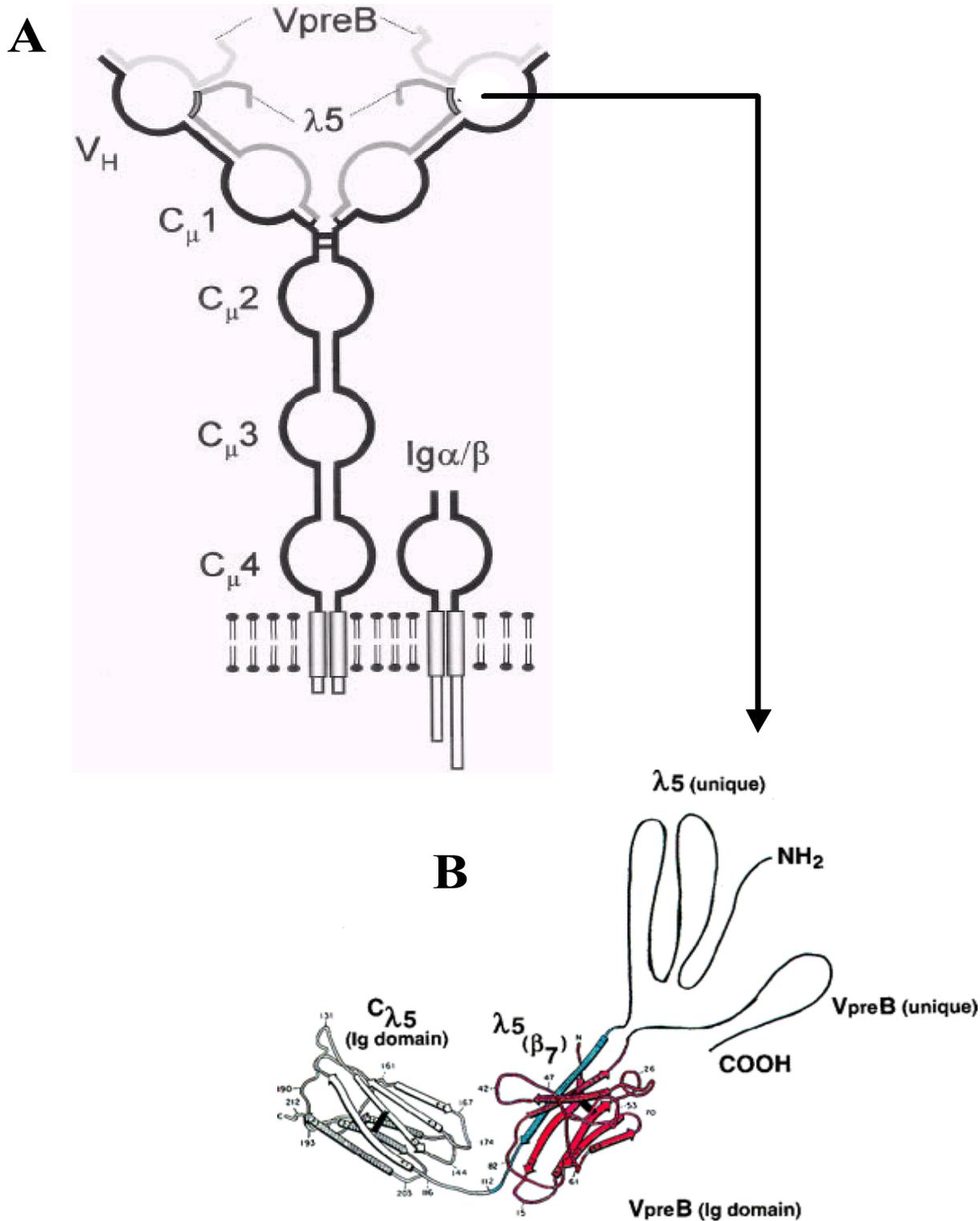


Figure 10: Le pré-BCR

- A.** **Représentation schématique du complexe formant le pré-BCR.** La chaîne lourde μ est associée à la pseudo-chaîne légère $\lambda 5/VpreB$ et aux molécules de transduction du signal $Ig\alpha/\beta$.
- B.** **Structure hypothétique de l'association $\lambda 5/VpreB$.** Les parties homologues aux Ig et les parties uniques sont indiquées.

domaine transmembranaire de la chaîne μ (Kitamura et coll., 1991), des molécules $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ (Gong et Nusseizweig, 1996 ; Pelanda et coll., 2002) ou des tyrosine kinases impliquées dans la signalisation du pré-BCR telle que Btk (Bruton's tyrosine kinase responsable de la mutation Xid pour X-linked immunodeficiency chez la souris) (Rawlings et coll., 1993 ; Thomas et coll., 1993) induisent un blocage du développement B à la transition pro-B/pré-B. De même, chez l'homme, la grande majorité des déficits génétiques montrant un blocage du développement B sont directement liés à un défaut de signalisation du BCR. Des mutations ne permettant pas l'expression membranaire de la chaîne μ (Yel et coll., 1996), d' $Ig\alpha$ (Minegishi et coll., 1999) et de certaines protéines intracytoplasmiques impliquées dans la signalisation induite par le pré-BCR telles que Btk ou BLNK (« B-cell linker protein ») induisent aussi un blocage au stade pro-B (pour revue : Conley et coll., 2000 ; Schiff et coll., 2000).

Concernant la pseudo chaîne légère, la délétion génique de $\lambda 5$ provoque un blocage partiel du développement B puisque les souris jeunes possèdent quelques cellules pré-B et B matures et que des souris plus âgées ont un nombre presque normal de cellules B matures fonctionnelles (Kitamura et coll., 1992 ; Rolink et coll., 1993). Le phénotype des souris délétées pour VpreB-1 et VpreB-2 est identique (Mundt et coll., 2001) ainsi que celui des souris triple déficientes VpreB-1, VpreB-2 et $\lambda 5$ (Shimizu et coll., 2002). Chez l'Homme au contraire, une mutation dans le gène 14.1 provoque une agammaglobulinémie totale similaire à celles observées lors de mutations des gènes codant la tyrosine kinase Btk ou la chaîne μ (Minegishi et coll., 1998). Le blocage partiel observé chez la souris peut être expliqué par l'existence de cellules exprimant une chaîne légère conventionnelle dès le stade pro-B (Ehlich et coll., 1993 ; Novobrantseva et coll., 1999). Ces chaînes légères peuvent alors s'associer à la chaîne μ en remplacement de la pseudo-chaîne légère et le complexe peut donc être exporté à la membrane et induire les signaux nécessaires au développement des cellules pré-B (Pelanda et coll., 1996 ; Papavasiliou et coll., 1996). Le phénotype observé chez l'humain pourrait résulter dans ce cas d'une régulation plus stringente des étapes de réarrangements « ordonnés », interdisant toute expression de chaînes légères au stade pro-B (Ghia et coll., 1996).

Les rôles du pré-BCR sont multiples : il permet d'induire la multiplication des cellules exprimant une chaîne μ fonctionnelle, la différenciation des cellules pré-B et l'exclusion allélique des chaînes lourdes (voir chapitre sur l'exclusion allélique) (pour revue : Melchers et coll., 2000 ; Martensson et coll., 2002 ; Burrows et coll., 2002). Dans ce processus, la pseudo-chaîne légère semble directement responsable du biais observé dans le répertoire des domaines VH des chaînes lourdes

des cellules B matures. En effet, certaines familles de gènes VH ne s'associent pas avec la pseudo-chaîne légère et sont donc sous-représentées dans le pool de cellules matures en comparaison avec leur représentation au stade pro-B (Keyna, 1995 ; Ye et coll., 1996 ; ten Boekel, 1997 ; Melchers, 1999). Cependant, il semble que ce phénomène ne soit observé que chez la souris, puisque le biais observé chez l'homme concerne essentiellement une délétion des chaînes lourdes possédant des CDR3 longs ou chargés positivement et que ce phénomène serait plus dû au caractère auto-réactif de telles chaînes lourdes qu'à un quelconque défaut d'association aux pseudo-chaînes légères (Meffre et coll., 2001 ; Casellas et coll., 2003).

Le moyen par lequel le pré-BCR est capable d'induire un signal reste encore très controversé. La question est de savoir s'il existe un ligand spécifique du pré-BCR dans la moelle osseuse qui serait capable d'activer cette signalisation. Plusieurs travaux tendent à montrer qu'un tel ligand n'est pas nécessaire pour le développement des cellules pré-B. Ainsi, *in vitro*, la prolifération et la différenciation des cellules pro-B en cellules B immatures ne nécessite pas le micro-environnement procuré *in vivo* par les cellules stromales (Rolink et coll., 2000). Ceci a été très récemment confirmé par le rôle que tient le domaine non-Ig (N-terminal) de $\lambda 5$ dans cette signalisation indépendante d'un ligand ou d'une coopération cellulaire externe (Ohnishi et Melchers, 2003). Cette étude n'exclut cependant pas la possibilité de l'existence d'un ligand qui serait alors produit par les cellules pré-B elles-mêmes. D'autre part, des chaînes lourdes tronquées de l'ensemble de leur domaine variable (VDJ) et par conséquent, ne s'associant ni à la pseudo-chaîne légère, ni à une chaîne légère conventionnelle, autorisent un développement pré-B normal avec induction de l'exclusion allélique des chaînes lourdes, prolifération normale des pré-B et induction des réarrangements des gènes des chaînes légères (Corcos et coll., 1991 ; Corcos et coll., 1995, Shaffer et Schlissel, 1997). Ces chaînes lourdes tronquées (que l'on observe dans certains cas de maladies de chaînes lourdes et chez certaines lignées lymphoblastoïdes) ne requièrent pas la présence de VpreB et $\lambda 5$ pour induire les signaux de maturation, ce qui va à l'encontre de la nécessité d'un ligand. Cependant, ce dernier cas de figure ne correspond qu'à des pathologies rares et ne reflète clairement pas le développement normal de la majorité des cellules B. De plus, une telle chaîne lourde tronquée pourrait en fait induire un signal constitutif tel que cela a été observé pour des récepteurs aux facteurs de croissances dont le domaine de liaison est tronqué (Corcos et coll., 1995 ; Corcos et coll., 2001). D'autres équipes ont cherché à démontrer l'existence d'un ligand du pré-BCR. Ainsi, il avait été montré que des pré-BCR solubles murins et humains pouvaient interagir avec les cellules stromales (Bradl et Jack, 2001) et l'existence d'un ligand spécifique du pré-BCR humain exprimé par les cellules stromales de la moelle osseuse, la galectine-1, a été

récemment mise en évidence (Gauthier et coll., 2002). Cette interaction se fait par le domaine unique N-terminal de $\lambda 5$ et induit la phosphorylation des molécules transductrices $Ig\alpha$ et $Ig\beta$. Cette interaction n'a pas été retrouvée chez la souris où la liaison du pré-BCR semble se faire à l'héparane sulfate protéoglycane de la matrice extracellulaire associée aux cellules stromales (Bradl et coll., 2003).

Les mécanismes d'activation du pré-BCR ne sont donc pas encore clairement élucidés. Cependant, les études menées sur cette question permettent de mettre en évidence certains points communs qui pourront être utiles aux futures investigations :

Dans tous les cas, le signal nécessitant la présence d' $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ n'est induit qu'après une agrégation de plusieurs pré-BCR ou chaînes μ tronquées à la surface des cellules pré-B. Que cette agrégation se fasse par l'intermédiaire d'un ligand externe (Gauthier et coll., 2002) ou non (Corcos et coll., 1995, Ohnishi et coll., 2003) reste à déterminer.

La partie unique N-terminale de $\lambda 5$ semble essentielle dans l'induction du signal par le pré-BCR normal. Il est possible que la partie unique C-terminale de $VpreB$ puisse avoir aussi un rôle dans ce processus même si à ce jour aucune étude n'a permis de le démontrer.

Au final, même si l'importance du pré-BCR dans le développement B n'est plus à démontrer, les mécanismes permettant de comprendre son activation restent encore indéterminés. Quoiqu'il en soit, une cellule incapable d'assembler son pré-BCR est éliminée ce qui montre que la sélection clonale des lymphocytes B n'est pas uniquement dépendante d'un antigène étranger mais commence très tôt dans le développement grâce à une sélection par leur récepteur.

Les premières cellules pré-B exprimant leur pré-BCR en surface sont de grande taille (large pre-B) et entrent rapidement en cycle cellulaire grâce au signal induit par leur récepteur. Après plusieurs cycles (2 à 7), des cellules pré-B plus petites (small pre-B) et n'exprimant plus le pré-BCR (pour revue : Melchers et coll., 1999) peuvent alors débuter les réarrangements au loci des chaînes légères pour former un BCR « naïf » car n'ayant pas encore rencontré d'antigène.

II.2. PHASE DEPENDANTE DE L'ANTIGENE

II.2.1. UNE PREMIERE ETAPE DIRECTEMENT DEPENDANTE DES ANTIGENES... DU SOI : LE STADE B IMMATURE

La fin du stade pré-B est caractérisée par la réinduction des enzymes de recombinaison RAG-1 et RAG-2 et l'apparition d'une accessibilité des locus des chaînes légères à ces enzymes. C'est seulement à ce stade que survient un haut niveau de réarrangements des gènes des chaînes légères, s'installant plus précocément pour le locus κ que pour le locus λ (pour revue : Gorman et Alt, 1998), contribuant ainsi à l'exclusion isotypique des chaînes légères. Nous verrons dans les chapitres concernant l'exclusion allélique que cette exclusion allélique ou isotypique des chaînes légères semble moins absolue que celle des chaînes lourdes. A l'issue du stade pré-B, l'expression de la pseudo-chaîne légère est arrêtée et la chaîne μ ne peut donc plus être exportée à la membrane tant qu'une chaîne légère conventionnelle n'est pas produite. De la même façon qu'au stade pré-B, l'exportation à la membrane ne pourra se faire que si la chaîne légère produite s'assemble avec la chaîne μ déjà présente (Melchers, 1999) ce qui implique non seulement que le réarrangement VJ soit productif (1 cas sur 3) mais que la chaîne légère produite ait une conformation lui permettant de s'associer à la chaîne μ . Si tel est le cas, l'IgM ainsi présente à la membrane va être à nouveau testée pour ne pas reconnaître d'auto-antigènes. Les cellules B immatures sont donc très sensibles au signal induit par le BCR. Si ce signal est trop important, signe d'une activation par un antigène du soi, des réarrangements secondaires vont avoir lieu pour produire de nouvelles chaînes légères jusqu'à ce que le BCR ne soit plus auto-réactif (Tiegs et coll., 1993 ; Hertz et Nemazee, 1997 ; Melamed et Nemazee, 1997 ; Pelanda et coll., 1997). Si aucune chaîne légère ne permet d'empêcher cette réactivité, la cellule entre alors en anergie (Pike et coll., 1982 ; Goodnow et coll., 1988) ou est éliminée par apoptose (Hartley et coll., 1993 ; Norvell et coll., 1995). Il semblerait qu'une suite d'évènements chronologiques intervenant au stade B immature permette d'éliminer ou de limiter les capacités d'activation des cellules auto-réactives avant leur exportation vers les organes lymphoïdes périphériques : édition du BCR puis anergie ou apoptose. L'anergie semble intervenir plus fréquemment que l'apoptose lorsque le BCR ne présente qu'une faible réactivité au soi. Ceci a été mis en évidence par des expériences durant lesquelles des cellules B immatures étaient exposées à différentes concentrations d'anti-IgM mimant ainsi l'effet d'antigènes du soi. En présence d'une forte concentration d'anti-IgM, les cellules étaient éliminées par apoptose tandis

qu'avec des concentrations plus faibles, elles entraînent en anergie, état caractérisé par une durée de vie limitée (Fulcher et Basten, 1994), une diminution de la prolifération, une hypo-réactivité aux mitogènes ou à la réponse T-dépendante (Pike et coll., 1982 ; Adams et coll., 1990), une diminution de l'expression du BCR à la surface (Goodnow et coll., 1988 ; Bell et Goodnow, 1994) et, découlant peut être de cette dernière observation, une diminution de la signalisation par le BCR (Inaoki et coll., 1997). Les résultats obtenus par traitement des cellules B immatures avec de l'anti-IgM ont plus tard été confirmés dans de nombreuses études menées sur des souris transgéniques exprimant des BCR auto-réactifs anti-ADN ou spécifique du lysozyme (Goodnow et coll., 1988 ; Erikson et coll., 1991). Il faut noter que si ce système de prévention de l'autoréactivité vaut pour le compartiment principal des cellules B périphériques (dites B2), un autre compartiment plus minoritaire dit B1 ou CD5+ (se localisant préférentiellement dans le péritoine et dans la zone marginale de la rate), est au contraire sélectionné positivement lors de sa maturation via l'expression de BCRs auto-réactifs (pour revue : Cariappa et Pillai, 2002).

Dans tous les cas, ces systèmes de sélection des cellules B immatures sont particulièrement efficaces puisqu'ils sont responsables de l'élimination d'un nombre considérable de cellules avant leur migration vers les organes lymphoïdes périphériques. Sur les 40 millions de « petites cellules pré-B » produites chaque jour dans la moelle d'une souris, seulement 20 millions vont accéder au stade B immature avec expression d'un IgM membranaire et 90% de ces cellules seront à leur tour éliminées avant d'avoir pu quitter la moelle osseuse (Osmond, 1991 ; Osmond, 1993 ; Rolink et coll., 1998).

Comme pour le pré-BCR, toute altération dans la signalisation du BCR peut induire un arrêt ou une perturbation du développement vers le stade B mature. Ainsi, Ig α et Ig β (Torres et coll., 1993, Meffre et Nussenzweig, 2002) ainsi que nombres de kinases telles que Lyn, Btk ou Vav-2 impliquées dans cette signalisation sont indispensables dans le processus de sélection et de maturation des cellules B immatures (Hibbs et coll., 1995 ; Khan et coll., 1995 ; Doody et coll., 2001). Outre le BCR, l'activation de la signalisation à ce stade est aussi dépendante de l'action de co-récepteurs tels que CD19, CD22 ou CD45, dont l'inactivation influe sur le développement normal des cellules B immatures (Khan et coll., 1995 ; Engel et coll., 1995 ; Cyster et coll., 1996 ; Shvitiel et coll., 2002) et dont l'action à ce stade précoce diffère sans doute de celle qu'ils exercent au stade B mature (Healy et coll., 1997).

Les cellules B immatures expriment une IgM de surface mais très peu ou pas du tout d'IgD ; elles expriment aussi fortement le marqueur de surface HSA/CD (HSA high) (Allman et coll., 1993).

Une fois sélectionnées, elles peuvent quitter la moelle osseuse et migrer vers la rate. Le développement vers le stade mature est alors caractérisé par l'apparition de l'expression membranaire d'IgD en plus d'IgM et la diminution de l'expression de HSA (HSA low). Cette évolution vers le stade B mature passe par un stade intermédiaire durant lequel vont avoir lieu des modifications de la réponse induite par le BCR. En effet, la ligation du BCR qui jusqu'alors stoppait le développement, va progressivement induire la prolifération des cellules B immatures dans la rate. Ce stade, qui correspond aux cellules B immatures ayant émigré dans la rate, est appelé stade B transitionnel et constitue la dernière étape avant la rencontre des antigènes exogènes.

II.2.2. A LA DECOUVERTE DE LA RATE : LE STADE B TRANSITIONNEL

Les cellules B transitionnelles font le lien entre les cellules B immatures de la moelle osseuse et les cellules B matures périphériques. Elles représentent une étape importante de la maturation B puisque c'est à ce stade que la cellule va perdre sa sensibilité à la sélection négative par le BCR, gagner les follicules de la rate et devenir sensible aux signaux induits par les lymphocytes T (pour revue : Chung et coll., 2003). Lors de ce processus, deux tiers des cellules B transitionnelles n'accéderont pas au stade mature. Ces cellules B immatures récemment émigrées possèdent des caractères phénotypiques en commun avec leurs homologues de la moelle osseuse tels que l'expression forte de HSA, les marqueurs de surface 493 (Rolink et coll., 1998) et AA4 (Allman et coll., 1999), une forte expression d'IgM à la membrane et l'absence du récepteur à une L-sélectine (CD62L) nécessaire pour l'entrée des cellules B matures dans les ganglions lymphatiques (Loder et coll., 1999). Ce dernier point permet d'expliquer l'absence de cellules B transitionnelles dans ces organes. Elles expriment aussi faiblement les enzymes RAG-1 et RAG-2 (Yu et coll., 1999) et pourraient donc être encore capable de modifier leur BCR par un processus appelé « révision du récepteur » (Hikida et coll., 1996 ; Han et coll., 1996 ; Hertz et coll., 1998, pour revue : Nussenzweig, 1998) (cette expression prolongée des RAGs est cependant contestée par certains auteurs, tels Monroe et coll., 1999). Les études menées sur des souris transgéniques exprimant le gène codant la « green fluorescent protein » (GFP) sous le contrôle de séquences régulatrices du gène RAG-2 (Yu et coll., 1999) ou sur des souris « knock-in » pour un gène codant une protéine de fusion RAG-2/GFP (Monroe et coll., 1999) ont finalement souligné l'aspect marginal de ce processus dans les modifications du BCR sur les cellules B périphériques. En effet, peu de cellules B périphériques semblent exprimer les enzymes RAG-1 et 2 y compris après immunisation (Yu et coll., 1999 ; Gärtner et coll., 2000 ; Igarashi et coll., 2001).

Le compartiment des cellules B transitionnelles montre une certaine hétérogénéité et a été récemment séparé en deux sous populations : les cellules B transitionnelles de type 1 (T1) et de type 2 (T2) (Loder et coll., 1999). Il s'avère que le phénotype des cellules T1 est très proche de celui des cellules immatures de la moelle avec absence d'IgD membranaire, expression de CD23 ou du co-récepteur du BCR CD21 et propension à l'apoptose lorsque leur BCR est stimulé par un ligand externe (Su et coll., 2002 ; Petro et coll., 2002). La population des cellules T2 quant à elle est beaucoup plus proche phénotypiquement mais aussi physiquement des cellules B matures : Elles expriment IgD ainsi que CD21 et CD23 (qui sont tous les deux des marqueurs utilisés comme témoin d'activation des cellules B), et surtout elles répondent par une prolifération à la stimulation de leur BCR (Su et coll., 2002 ; Petro et coll., 2002) et sont sensibles aux signaux d'aide induits par les cellules T (Chung et coll., 2002). De plus, les cellules T2 sont retrouvées dans les follicules où ont lieu la présentation des antigènes exogènes et l'activation T-dépendante des cellules B matures tandis que les cellules T1 se situent à l'extérieur de cette zone dans les manchons lymphoïdes péri-artériolaires (PALS). Ainsi, la progression des cellules B du stade T1 vers le stade T2 serait caractérisée par l'acquisition de la compétence immune en réponse aux antigènes exogènes T-dépendants. Cette acquisition ne peut avoir lieu que si la cellule présente un BCR parfaitement fonctionnel ce qui démontre que cette maturation est directement dépendante de l'Ig de surface. Une des premières études à avoir mis en évidence cette nécessité d'un BCR fonctionnel pour passer du stade B transitionnel au stade B mature fut une étude de délétion conditionnelle du BCR (Lam et coll., 1997) : la délétion du BCR dans les cellules B périphériques bloque toute différenciation des cellules B transitionnelles en cellules B matures. Depuis, l'étude de nombreux modèles de souris transgéniques où des mutations affectent la signalisation par le BCR a permis de montrer qu'une altération du signal empêche soit le passage du stade T1 au stade T2 soit le passage du stade T2 au stade B mature. Ainsi, les mutations du domaine cytoplasmique d'Ig- α (Loder et coll., 1999), de syk (Turner et coll. 1997) empêchent le passage des T1 aux T2 et les souris déficientes pour CD45 (Pani et coll., 1997), Btk (Loder et coll., 1999 ; Su et Rawlings, 2002), BLNK (« B-cell linker protein ») (Pappu et coll., 1999 ; Xu et coll., 2000) ou encore PLC γ (Wang et coll., 2000) et vav (Doody et coll., 2001) montrent un blocage du développement des cellules B au stade transitionnel T2.

Etant donné l'importance de la signalisation du BCR à ce stade, une question peut se poser qui n'a pour l'instant pas de réponse : quelle est la nature du ligand, si ligand il y a, qui permet ce développement vers les cellules B matures à longue durée de vie ?

Quoiqu'il en soit, les cellules B T2 apparaissent donc comme des cellules prêtes à s'engager rapidement dans une réponse immune T-dépendante. Elles vont alors finir d'émigrer dans les zones centrales des follicules où vont leur être présentés des antigènes exogènes dans un micro-environnement constitué notamment par des lymphocytes T helpers (T_H) et des cellules présentatrices d'antigènes, les FDC (pour « Follicular Dendritic Cells »). Les cellules B qui initient la formation de follicules et qui participent donc directement à la réponse aux antigènes T-dépendant, sont les cellules B matures folliculaires qui vont pouvoir entrer dans le processus de maturation de l'affinité pour devenir des cellules sécrétrices ou des cellules B mémoires produisant un anticorps de haute affinité pour l'antigène (pour revue : MacLennan, 1994).

II.2.3. LA REPONSE CELLULAIRE T-DEPENDANTE : LES CELLULES B FOLLICULAIRES

Les centres germinatifs situés dans les follicules sont le siège de la réponse des cellules B « naïves » aux antigènes T-dépendants. On y observe une expansion rapide et oligoclonale des cellules B activées par un antigène. Les FDC peuvent présenter ces antigènes aux BCR des cellules B sous forme de complexes antigènes/anticorps exposés sur la membrane des FDC. Les IgM polyspécifiques de basse affinité (anticorps naturels) qui préexistent à toute réponse immune, jouent un rôle important dans la genèse de ces premiers complexes Ag/Ac captés par les FDC. Les cellules B peuvent alors internaliser l'Ag et devenir des cellules présentatrices d'antigènes pour les cellules T_H par le biais de leur CMH de type II. C'est sous l'effet de cette coopération B/T que va avoir lieu la maturation de l'affinité des anticorps en parallèle à une compétition des cellules B pour une interaction la plus affine possible avec les FDC (Berek et coll., 1991 ; Jacob et coll., 1991 ; Kuppers et coll., 1993). Les cellules B à ce stade vont accumuler des mutations somatiques au niveau des séquences de leur domaine variable modifiant ainsi leur affinité pour l'antigène. Ces cellules expriment faiblement la protéine anti-apoptotique bcl-2 et fortement le récepteur Fas (CD95) (Yoshino et coll., 1994) et semblent donc destinées à mourir sauf si des signaux de survie leur sont adressés par les lymphocytes T_H reconnaissant le même antigène (pour revue : Liu et Arpin, 1997). Ainsi, si les mutations accumulées améliorent l'affinité pour l'antigène, les cellules seront sauvées et pourront proliférer avant d'entrer dans les compartiments B mémoires ou plasmocytes (Liu et coll., 1991). Au contraire, si les mutations ne changent pas, voire diminuent l'affinité, ou si les interactions avec les lymphocytes T_H n'ont pas lieu (cas d'anticorps autoréactifs), ces cellules sont alors éliminées par apoptose (pour revue MacLennan, 1994 ; van

Eijk et coll., 2002). Différents facteurs tels que des interactions entre des récepteurs de la famille TNF/TNFR (CD40/CD40L, CD30/CD30L, BAFF/BAFF-R...) ou la sécrétion d'interleukines sont impliqués dans la survie ou l'induction d'apoptose des cellules B. Ces mêmes facteurs sont souvent impliqués aussi dans la commutation de classe des cellules exprimant un anticorps de haute affinité (pour revue : Liu et Arpin, 1997). Certaines d'entre elles vont devenir des cellules plasmocytaires, sécrétrices d'anticorps tandis que d'autres, qui expriment plus fortement le gène bcl-2 (Schitteck et rajewsky, 1990 ; Pascual et coll., 1994), vont constituer le répertoire immunologique « mémoire ». Les cellules B mémoires constituent un groupe minoritaire de cellules à très longue durée de vie (probablement jusqu'à plusieurs dizaines d'années chez l'homme). Elles n'expriment en général plus d'IgD, peuvent avoir des localisations préférentielles (telles que les muqueuses pour les cellules ayant commuté vers la production d'IgA) (Liu et coll., 1995) et ont la faculté de répondre très rapidement à des pathogènes externes. En effet, elles peuvent présenter rapidement et efficacement l'antigène aux lymphocytes T lors d'une réponse secondaire et se différencier en plasmocytes. Cette différenciation peut se faire en dehors des centres germinatifs (Liu et coll., 1991) bien que les cellules B mémoires puissent aussi recommencer de nouveaux cycles de sélection et d'hypermutation dans les centres germinatifs, permettant ainsi d'optimiser la mémoire immunitaire de l'individu (Berek et Milstein, 1988).

Après la réponse immunitaire, certains plasmocytes se localisent au niveau de la zone marginale des manchons périartériolaires spléniques (PALS) et au niveau de la moelle osseuse. Ils y exercent une fonction de sécrétion d'anticorps qui diffusent dans l'ensemble de l'organisme. La durée de vie de ces cellules sécrétrices est controversée : ces plasmocytes semblent avoir une durée de vie longue (Slifka et coll., 1998) mais certains pourraient aussi naître de la transformation rapide d'une cellule B mémoire (à longue durée de vie) suite à une stimulation antigénique (Ochsenbein et coll., 2000).

D'autres cellules B activées sont retrouvées en périphérie et interviennent dans les réponses immunes T-indépendantes. Leurs origines restent encore controversées mais leur action est essentielle puisque ce sont ces cellules qui vont constituer la première ligne de défense contre les micro-organismes : ce sont les cellules B de la zone marginale folliculaire (MZ) de la rate et les cellules B1 que l'on retrouve essentiellement dans les cavités péritonéales.

II.2.4. ACTIVATION PAR LES ANTIGENES T-INDEPENDANTS : LES CELLULES B1 ET LES CELLULES DE LA ZONE MARGINALE (MZ)

80 à 90% des cellules B de la rate sont des cellules folliculaires impliquées dans les réponses T-dépendantes. Cependant, d'autres populations B co-existent. Parmi elles, et représentant 5 à 10% des cellules B de la rate, les cellules B de la zone marginale (MZ) des manchons périartériolaires spléniques (PALS) ont des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles les distinguant des cellules B issues des centres germinatifs : elles expriment fortement IgM et CD21, faiblement IgD et CD23 et ne montrent aucun signe de maturation de l'affinité, ce qui les différencie des autres populations de cellules B présentes dans la rate (transitionnelles, matures folliculaires et mémoires) (Dammers et coll., 2000). Elles ne semblent pas nécessiter la présence de lymphocytes T pour être sélectionnées et activées puisqu'elles sont présentes chez les souris nues ou thymectomisées (Kumararatne et MacLennan, 1982). Elles sont aussi caractérisées par un état d'activation élevé leur permettant de répondre rapidement à un antigène T-indépendant par différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps (Oliver et coll., 1997 ; Oliver et coll., 1999).

Les cellules B1 sont, elles, situées en dehors de tout organe lymphoïde dans les cavités péritonéales. Leur origine est controversée : il semblerait qu'elles dérivent de précurseurs issus du foie fœtal mais de récentes études tendent à montrer qu'elles pourraient dériver aussi des précurseurs médullaires ou des cellules B périphériques « classiques » (B2) chez l'adulte (Chumley et coll., 2000 ; Arnold et coll., 2000 ; Wortis et Berland, 2001). Elles expriment le marqueur de surface CD5 qui les différencie des autres populations de cellules B.

Cependant, les cellules B1 et MZ partagent de nombreuses caractéristiques (pour revue : Martin et Kearney, 2000) : Elles ont une longue durée de vie, sont toutes deux dans un état pré-activé, expriment fortement l'IgM et faiblement IgD, possèdent de nombreux marqueurs de surface communs et n'ont que très rarement subi de commutation de classe ou d'hypermutation. Mais au delà de leur ressemblance phénotypique, elles partagent des fonctions similaires dans la réponse aux antigènes T-indépendants. De par leur capacité d'activation et de différenciation très rapide en plasmocytes, elles interviennent efficacement dans la réponse précoce « innée » lors de l'intrusion de divers pathogènes dans l'organisme (Ochsenbein et coll., 1999 ; Martin et coll., 2001 ; pour revue : Martin et Kearney, 2000). Elles sont aussi à l'origine des autoanticorps « naturels » polyréactifs de faible affinité dont les fonctions sont multiples : élimination des débris cellulaires, transports de cytokines ou encore formation des complexes antigènes/anticorps présentés aux

cellules B folliculaires par les FDC dans les centres germinatifs (pour revue : Coutinho, 1995 ; Stall et coll., 1996). Ces cellules naturellement autoréactives seraient à l'origine de plusieurs maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux ou la polyarthrite rhumatoïde. Ces cas sont la conséquence de l'apparition de clones de cellules B1 ou MZ qui ont subi une maturation de l'affinité et une commutation de classe, produisant donc des anticorps de plus haute affinité pour les auto-antigènes (Arnold et coll., 1988 ; Mantavani et coll., 1993 ; Gilbert et coll., 1996).

Ces cellules B périphériques particulières présentent l'originalité d'être positivement sélectionnées par des antigènes du soi et indiquent que des différences dans le niveau de signalisation du BCR en réponse à ces antigènes peuvent déterminer la localisation des cellules B et leur rôle en périphérie (Hayakawa et coll., 1999 ; pour revue : Cariappa et Pillai, 2002).

II.3. EXCLUSION ALLELIQUE ET EDITION DU BCR

Le modèle de la sélection clonale de Burnet proposait que chaque cellule B ne possède qu'un seul récepteur à l'antigène. Ce modèle reste aujourd'hui le plus communément accepté et rend compte de la situation de l'immense majorité des cellules B périphériques obéissant à l'« exclusion allélique ». Au vu des mécanismes extrêmement stringents de différenciation et de sélection par le BCR, ce phénomène apparaît comme essentiel dans la génération de cellules B fonctionnelles. Il implique que pour chaque composant des chaînes d'immunoglobulines (chaînes lourdes et chaînes légères) ne soit exprimé qu'un seul allèle. Trois modèles initiaux ont été proposés afin d'expliquer ce phénomène : le modèle de « toxicité », le modèle « stochastique » et le modèle « régulé ».

Le modèle de « toxicité » (Walb et Steinberg, 1982), postulant que la présence de chaînes lourdes d'immunoglobulines différentes dans une même cellule induirait un signal d'apoptose, a été infirmé par l'étude d'animaux transgéniques possédant deux gènes fonctionnels de chaînes lourdes insérés dans chacun des allèles du locus physiologique (Sonoda et coll., 1997). Dans ce modèle, bien que la majorité des cellules B présentent les deux BCR en surface, les animaux ont un nombre normal de cellules B périphériques.

Le modèle « stochastique » postule que la probabilité de deux réarrangements productifs est très faible (Coleclough et coll., 1981) tandis que le modèle « régulé » avance que lorsque qu'un réarrangement est productif, la présentation à la membrane du produit du gène réarrangé, sous la

forme du pré-BCR pour les chaînes lourdes et plus tard du BCR pour les chaînes légères, va induire un rétro-contrôle négatif bloquant les réarrangements sur les autres allèles. Nous allons voir que ces deux modèles expliquent en grande partie le phénomène d'exclusion allélique au niveau des chaînes lourdes mais que le processus d'édition du récepteur, qui joue un rôle majeur dans les mécanismes de tolérance du soi, rend plus complexe les mécanismes conduisant à la monospécificité des cellules B.

II.3.1. EXCLUSION ALLELIQUE DES CHAINES LOURDES

Le rôle essentiel de la signalisation induite par le pré-BCR dans l'établissement de l'exclusion allélique des chaînes lourdes a été définitivement établi par l'étude de souris transgéniques dont l'exon codant le domaine transmembranaire du gène μ (μ MT) a été délété (Kitamura et coll., 1991). De tels animaux montrent un blocage du développement à la fin du stade pro-B et l'étude des réarrangements des chaînes lourdes a montré que de nombreuses cellules possédaient des réarrangements VDJ productifs sur les deux allèles et que les cellules B sécrétrices d'anticorps issues d'animaux hétérozygotes exprimaient deux chaînes lourdes (Kitamura et coll., 1992). Des études sur des souris exprimant un transgène de chaîne lourde avaient déjà permis d'avancer l'hypothèse que l'ancrage à la membrane du pré-BCR permettait d'induire l'inhibition des réarrangements VDJ sur le deuxième allèle des chaînes lourdes (Nussenzweig et coll., 1987 ; Manz et coll., 1988) et ceci grâce à un arrêt de l'expression des enzymes RAG-1 et 2 (Grawunder et coll., 1995) peut-être induit indirectement par l'entrée en cycle. Ce modèle semble moins clair lorsqu'il s'agit de délétions des composants du pré-BCR, $\lambda 5$ et VpreB (Kitamura et coll., 1992 ; Mundt et coll., 2001 ; Shimizu et coll., 2002). Dans tous les cas, les auteurs ont constaté un phénotype proche de celui des souris μ MT, même si un petit nombre de cellules matures est observé (avec une accumulation dans les souris âgées). Par contre dans le cas des délétions des pseudo-chaînes légères, les cellules B matures montrent une exclusion allélique complète même s'il n'y a pas de chaîne μ détectée à la membrane des cellules bloquées (pro-B tardif) de la moelle osseuse (ten Boekel et coll., 1998 ; Mundt et coll., 2001 ; Shimizu et coll., 2002). Les méthodes de détection ne peuvent cependant certainement pas exclure l'hypothèse qu'un très petit nombre de cellules puisse exprimer le pré-BCR puis se multiplier et s'accumuler en périphérie. L'une des hypothèses avancées pour expliquer ces résultats serait le remplacement de la pseudo-chaîne légère par une

chaîne légère conventionnelle κ . En effet chez la souris, des réarrangements des loci κ peuvent avoir lieu au stade pro-B (Ehlich et coll., 1993 ; Novobrantseva et coll., 1999), permettant ainsi l'expression d'un BCR à la surface des cellules dès les stade précoces de développement. Cependant, de telles chaînes légères sont caractérisées par la présence d' insertions N car les réarrangements ont lieu à un stade où l'enzyme TdT est exprimée (Bentolila et coll., 1999 ; Delpy et coll., soumis). Or ces insertions ne sont pas observées sur les gènes κ exprimés dans les cellules B matures des souris $\lambda 5^{-/-}$ (Rolink et coll., 1996). Puisque le domaine transmembranaire des chaîne μ est indispensable aux signaux induisant la prolifération et l'exclusion allélique, il semble possible que d'autres protéines présentes au stade pro-B permettent l'exportation à la membrane de la chaîne μ , telle que VpreB-3 (Ohnishi et Takemori, 1995 ; Rosnet et coll., 1999). Alternativement, la chaîne μ pourrait induire un signal dès son ancrage dans la membrane du réticulum endoplasmique (pour revue : Melchers et coll., 1999 ; Martensson et coll., 2002). Cette régulation induite par le pré-BCR ou toutes autres formes membranaires tronquées de la chaîne μ ($D\mu$ ou les chaînes lourdes sans domaine VDJ, $\Delta\mu$) (Corcos, 1991 ; Shaffer et Schlissel, 1997) est au final extrêmement stringente mais ne permet pas d'expliquer 1) l'absence de doubles réarrangements VDJ productifs simultanés au stade pro-B, 2) le maintien de l'exclusion allélique des chaînes lourdes lors des réarrangements des gènes des chaînes légères. Si le premier point peut être en partie expliqué par le modèle stochastique (la probabilité qu'il y ait deux réarrangements productifs VDJ en même temps serait quasi-nulle ; Melchers et coll., 1999), le second est habituellement interprété par une «perte de l'accessibilité» du deuxième allèle dot la démonstration reste à faire. Cependant, il a récemment été suggéré que l'exclusion allélique pouvait être pré-établie avant même le début des réarrangements au niveau de l'accessibilité des loci grâce à une démethylation asymétrique des deux allèles et une réplication asynchrone (Mostoslavsky et coll., 1998 ; Mostoslavsky et coll., 2001). Dans cette hypothèse, seul l'un des deux locus serait d'emblée apte à s'exprimer fortement, tandis que l'autre serait voué à rester dans un état faiblement transcrit, les cellules de la lignée B ne disposant en ce cas non pas de deux chances de réussir l'assemblage d'un locus fonctionnel réarrangé, mais d'une seule pour chaque chaîne lourde et légère (Skok et coll., 2001). Ce système séduisant de répression de la transcription sur un allèle est déjà connu pour certains gènes de cytokines (Hollander et coll., 1998 ; Hu-Li et coll., 2001) mais ne peut totalement rendre compte de la régulation des gènes des chaînes d'Ig. En particulier, ce modèle est mis en défaut par l'observation d'une inclusion des chaînes lourdes lorsque deux gènes VDJ réarrangés sont insérés dans les deux allèles des chaînes lourdes, la grande majorité des cellules B matures co-exprimant alors les deux gènes (Sonoda et coll., 1997). On peut

avancer que la faible présence de transcrits observés sur un des deux allèles dans les cellules B activées est aussi due à l'élimination des transcrits non productifs par le phénomène de NMD puisque nous avons vu que ce processus pouvait avoir lieu directement à l'intérieur du noyau (Gudikote et Wilkinson, 2002 ; Bühler et coll., 2002). Dans ce cas, comme nous allons le voir pour les chaînes légères d'Ig, la NMD n'interviendrait pas dans l'établissement de l'exclusion allélique au niveau des réarrangements mais permettrait de maintenir cette exclusion au niveau traductionnel. Enfin, il existe quelques très rares cas de cellules B matures produisant deux chaînes lourdes en surface (1 sur 10^4) (Barreto et Cumano, 2000), qui pourraient résulter d'un défaut de sélection par le pré-BCR. En effet, nous avons vu que les pseudo-chaînes légères induisaient un biais dans l'usage des domaine VH car certains d'entre eux n'avaient pas la capacité de s'y associer, empêchant ainsi l'expression du pre-BCR à la membrane (Keyna et coll., 1995 ; ten Boekel et coll., 1997). Si une telle cellule est alors sélectionnée grâce à l'expression d'une autre chaîne lourde résultant de réarrangements sur le deuxième allèle, il se peut que dans certains cas, la chaîne légère produite au stade B immature puisse elle, s'associer aux deux chaînes lourdes présentes alors dans la cellule (Barreto et Cumano, 2000).

Au final, l'exclusion allélique au niveau des chaînes lourdes apparaît comme extrêmement efficace et peut s'expliquer par différents processus qui fonctionnent de concert pour maintenir la monospécificité des cellules B tout au long de leur maturation. Si ces processus sont assez clairement établis pour les chaînes lourdes d'Ig, il est plus difficile d'expliquer l'efficacité de l'exclusion allélique au niveau des chaînes légères dans le contexte de l'édition du BCR (avec des réarrangements secondaires fréquents et essentiels à l'établissement de la tolérance du soi).

II.3.2. LE PARADOXE DU MAINTIEN DE L'EXCLUSION ALLELIQUE DANS LE CONTEXTE DE L'EDITION DU BCR

D'après Melchers et ses collaborateurs (2000), la multiplication des cellules sélectionnées par leur chaîne lourde fonctionnelle va « diluer » le pré-BCR qui, après quelques cycles, ne pourra plus signaler ni la prolifération, ni l'arrêt des réarrangements aux loci des chaînes lourdes. Cette théorie permettrait d'expliquer la ré-induction de la machinerie de recombinaison observée au stade « small pré-B ». D'autre part, ce système permettrait aussi d'expliquer le biais observé entre les VH utilisés dans les pro-B et ceux présents au stade B immature : plus la pseudo-chaîne légère

s'associe bien avec la chaîne lourde, plus la cellule présentera de pré-BCR à sa membrane et plus elle pourra faire de cycles de division. Une fois les divisions terminées, les enzymes RAG sont à nouveau exprimées et vont pouvoir initier les réarrangements aux loci des chaînes légères. Les loci des chaînes légères sont différents de ceux des chaînes lourdes en deux points : 1) en tout, 6 allèles de chaînes légères sont disponibles chez la souris, 2 allèles pour les gènes *Igk* et 2 séries de gènes indépendamment exprimées au locus *Igλ* et ils ne possèdent pas de domaine de diversité (D) (voir partie I.2.2.b) ; 2) les gènes codant les chaînes κ sont organisés de façon à pouvoir subir plusieurs réarrangements successifs impliquant à chaque fois un domaine $V\kappa$ plus en 5' du locus et un domaine $J\kappa$ plus en 3', permettant d'éliminer un précédent réarrangement (fig.3). Contrairement aux gènes de chaînes lourdes, cette organisation particulière des loci de chaînes légères ne semblait pas en faveur d'une optimisation de l'exclusion allélique. La découverte du processus d'édition du BCR, grâce à l'étude de souris transgéniques exprimant une immunoglobuline autoréactive (Gay et coll., 1993 ; Tiegs et coll., 1993), a permis de comprendre l'intérêt physiologique d'une telle organisation. Dans ces souris, la spécificité antigénique de l'immunoglobuline transgénique est altérée grâce au réarrangement et à l'expression d'une chaîne légère endogène. Cette altération permet d'éliminer l'autoréactivité de l'immunoglobuline. Ce mécanisme d'induction de la tolérance a par la suite été vérifié dans des souris où les gènes d'Ig autoréactifs étaient placés dans leurs loci naturels, ainsi que dans des souris sauvages (Pelandra et coll., 1997 ; Retter et Nemazee, 1998). Devant l'importance d'un tel phénomène, il apparaît que l'organisation des loci des chaînes légères (particulièrement le locus κ) est idéale pour optimiser l'édition du BCR au détriment de l'exclusion allélique.

En fait, l'exclusion allélique des chaînes légères suit dans les grandes lignes le même modèle ordonné que celui des chaînes lourdes : réarrangements du locus κ avant le locus λ (Hieter et coll., 1981 ; Engel et coll., 1999 ; Brauninger et coll., 2001), accessibilité d'un seul des loci de chaînes légères (Mostoslavsky et coll., 1998 ; Mostoslavsky et coll., 2001, Goldmit et coll., 2002) et signaux de prolifération et d'arrêt des réarrangements induits par l'expression membranaire d'un BCR non autoréactif (Torres et coll., 1996 ; Pelanda et coll., 1997 ; Monroe et coll., 1999 ; Yu et coll., 1999). La différence avec les chaînes lourdes réside dans le fait que lorsque le BCR est autoréactif ou présente un défaut d'assemblage, plutôt que d'être éliminée, la cellule va continuer d'exprimer les enzymes de recombinaison et réaliser des réarrangements secondaires pour produire une nouvelle chaîne légère. Comment dans ce contexte, l'exclusion allélique peut-elle être maintenue ?

Tout d'abord, l'accessibilité aux recombinaisons est privilégiée sur l'allèle déjà réarrangé (Constantinescu et Schlissel, 1997, Mehr et coll., 1999) certainement grâce à l'hyperméthylation des autres loci (Mostoslavsky et coll., 1998 ; Goldmit et coll., 2002). De par l'organisation du locus des chaînes légères κ , les réarrangements secondaires sur un même locus induisent la perte du premier réarrangement et donc le maintien d'une seule chaîne légère dans la cellule. De plus, il a été montré que les premiers réarrangements avaient lieu préférentiellement sur les domaines $J\kappa$ les plus en amont du locus ($J\kappa1$ et $J\kappa2$) facilitant ainsi la possibilité de réarrangements secondaires sur ce même allèle (Yamagami et coll., 1999 ; meffre, 2001). Les réarrangements aux loci des chaînes légères λ n'ont lieu qu'après ceux des loci κ (Hieter et coll., 1981 ; Engel et coll., 1999 ; Brauninger et coll, 2001). Ainsi, si les réarrangements successifs sur le premier allèle κ n'ont pas permis la production d'un BCR fonctionnel non autoréactif, les réarrangements suivants auront lieu préférentiellement sur le deuxième locus κ (Mehr et coll., 1999). Enfin, des réarrangements particuliers (réarrangements RS) peuvent induire la perte du gène codant le domaine $C\kappa$ ainsi que de toutes les séquences régulatrices entourant ce gène (Hieter et coll., 1981 ; Moore et coll., 1985 ; Siminovitch et coll., 1985). Dans des conditions physiologiques normales (les transgènes d'Ig autoréactifs pouvant être à l'origine d'une altération de la régulation de l'exclusion allélique), à quelques exceptions près (Pauza et coll., 1993 ; Giachino et coll., 1995), les cellules matures exprimant une chaîne λ ont des réarrangements hors-phases sur leurs gènes κ et présentent un fort pourcentage de délétions de type RS (Retter et Nemazee, 1998 ; Brauninger et coll., 2001). De plus, Brauninger et ses collaborateurs (2001) montrent que les réarrangements $V\kappa J\kappa$ dans les cellules λ^+ qui ont éliminé leur gène $C\kappa$ par recombinaison RS utilisent préférentiellement les segments $J\kappa4$ et $J\kappa5$, attestant de leurs multiples tentatives de réarrangements aux loci κ avant l'expression de la chaîne λ . Enfin, bien qu'aucun mécanisme d'inhibition transcriptionnelle au locus des chaînes légères n'est été clairement démontré, il semble que la présence de transcrits κ hors phase, comme c'est le cas pour les transcrits anormaux de chaînes lourdes, soient fortement diminuée dans les cellules B matures en comparaison avec la fréquente observation de réarrangements non fonctionnels. En effet, 30% des cellules B matures possèdent de tels réarrangements (Coleclough et coll., 1981 ; Arakawa et coll., 1996) mais seulement 7% des séquences d'ADN complémentaires obtenues après amplification montrent un décalage dans leur cadre de lecture (Troutaud et coll., 1999). Il semble donc que l'exclusion allélique ne soit pas restreinte au stade où ont lieu les réarrangements mais puisse intervenir plus tard particulièrement au niveau traductionnel. Les transcrits hors phase qui possèdent des codons STOP prématurés (PTC) pourraient potentiellement induire la production de protéines tronquées pouvant interférer

dans l'assemblage normal des chaînes d'Ig fonctionnelles. La démonstration d'une inhibition de l'épissage de transcrits rendus anormaux par le phénomène d'hypermutation somatique (Lozano et coll., 1994 ; Aoufouchi et coll., 1996) est synonyme de l'existence d'un mécanisme de surveillance de l'ARN au niveau des transcrits des chaînes légères. Reste que l'évaluation d'un tel processus au niveau des transcrits anormaux générés lors des réarrangements V-J (2 cas sur 3) n'a pas encore été faite et fera l'objet de l'article 1 de ce manuscrit.

Dans tous les cas, les processus mis en place permettent le maintien de la monospécificité du BCR tout au long de la maturation des cellules B et ce, malgré le phénomène d'édition du BCR.

L'édition du BCR est une sérieuse entorse à la théorie de la sélection clonale de Burnet (1959), selon laquelle chaque cellule B présenterait un récepteur défini dont l'autoréactivité serait sanctionnée par une délétion clonale. En fait, il semble aujourd'hui que les cellules B subissent un apprentissage du soi au cours duquel elles vont pouvoir modifier la spécificité de leur récepteur. Plusieurs études ont démontré l'intensité de ce phénomène dans le développement des lymphocytes B. Tout d'abord, Retter et Nemazee (1998) ont montré que dans les cellules B λ^+ , presque la moitié des réarrangements $V\kappa J\kappa$ présents sur les loci κ inactivés par recombinaison RS étaient en phase. Ils en ont déduit que les produits de ces gènes étaient certainement autoréactifs et qu'ils avaient donc été éliminés grâce à l'édition du BCR. Plus récemment, l'utilisation de souris dont l'un des allèles κ présente une insertion $V\kappa J\kappa$ fonctionnelle et dont le gène $C\kappa$ de l'autre allèle a été remplacé par son homologue humain (permettant ainsi de différencier les deux allèles), a montré qu'en présence de l'ensemble des chaînes lourdes disponibles chez la souris, 25% des cellules B périphériques exprimaient l'allèle initialement non réarrangé ($C\kappa$ humain) (Casellas et coll., 2001). Mais la signification d'un tel procédé apparaît de plus en plus claire depuis qu'il a été très récemment démontré que la majorité des Ig (55 à 75%) produites à la sortie du stade pré-B sont en fait auto et/ou polyréactives (Wardemann et coll. 2003). Cela explique l'importante perte de cellules avant l'accession au stade mature (Osmond, 1991 ; Osmond, 1993 ; Rolink et coll., 1998), le biais dans le répertoire du BCR observé à cette même transition (Chen et coll., 1995 ; Levine et coll., 1999) et place l'édition du BCR comme un moyen important de limiter les pertes occasionnées par cette autoréactivité en donnant des « secondes chances » à la cellule avant d'induire sa délétion. Cela est en accord avec les observations selon lesquelles il semblerait que l'élimination par apoptose des cellules présentant un BCR autoréactif ou non fonctionnel n'arrive que très tard dans le développement des B immatures ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle la cellule va d'abord tenter de changer la spécificité de son récepteur avant d'être éliminée (Melamed

et coll., 1998 ; Sandel et Monroe, 1999). Ainsi, la sélection par le récepteur précéderait la sélection cellulaire (Melamed et coll., 1998).

Les mécanismes moléculaires de cette sélection sont encore mal compris. Paradoxalement, un certain niveau d'expression du BCR à la surface semble requis pour permettre le développement des cellules B immatures (Braun et coll., 2000 ; Kouskoff et coll., 2000 ; Shvitiel et coll., 2002) mais une signalisation induite par la liaison de ce même BCR exprimé plus fortement va entraîner un arrêt du développement et l'induction de réarrangements secondaires (Tiegs et coll., 1993 ; Pelanda et coll., 1997 ; Kouskoff et coll., 2000) (fig.11). Il faut ajouter à cela que certaines cellules B (particulièrement les cellules B1 autoréactives) peuvent être positivement sélectionnées par un antigène du soi (Hayakawa et coll., 1999). Ainsi, la fenêtre du niveau de signalisation dans laquelle le BCR va être sélectionné positivement est extrêmement précise et va influencer le trafic de la cellule B vers l'un ou l'autre compartiment B (Lam et Rajewsky, 1999). Alternativement, il est aussi possible, comme c'est le cas pour les lymphocytes T, que le développement des cellules B immatures nécessitent l'interaction de leur BCR avec un ligand et que la nature du signal induit par cette interaction permette ou non la sélection des cellules. A ce jour, aucune étude n'a permis de mettre en évidence un tel procédé de sélection pour les lymphocytes B.

En conclusion, l'exclusion allélique est un processus complexe mettant en jeu de nombreuses régulations qui vont aboutir à la monospécificité des cellules B impliquées dans la réponse immune. Ce phénomène est très efficace puisque malgré les nombreux réarrangements successifs que peuvent subir les gènes d'immunoglobulines lors du développement des cellules B, le nombre de cellules exprimant plusieurs BCR distincts en périphérie est extrêmement faible. Il reste de plus à déterminer si de telles cellules interviennent efficacement dans la réponse immune puisque jusqu'ici, aucune étude n'a démontré l'existence d'anticorps composés de deux chaînes légères distinctes in vivo mettant en avant la possibilité de l'existence d'un modèle modifié de la « toxicité » de Walb et Steinberg (1982). Enfin, Il reste aussi à vérifier la place qu'occupent les cellules « éditées » dans le pool de cellules B matures dans des conditions physiologiques normales. Le faible pourcentage de cellules B λ^+ chez la souris et l'usage préférentiel des segments J κ 1 et J κ 2 dans les cellules B périphériques (Meffre et coll., 2001) semble en effet diminuer l'importance de ce processus en faveur d'une sélection cellulaire classique telle que l'avait envisagée Burnet (1959).

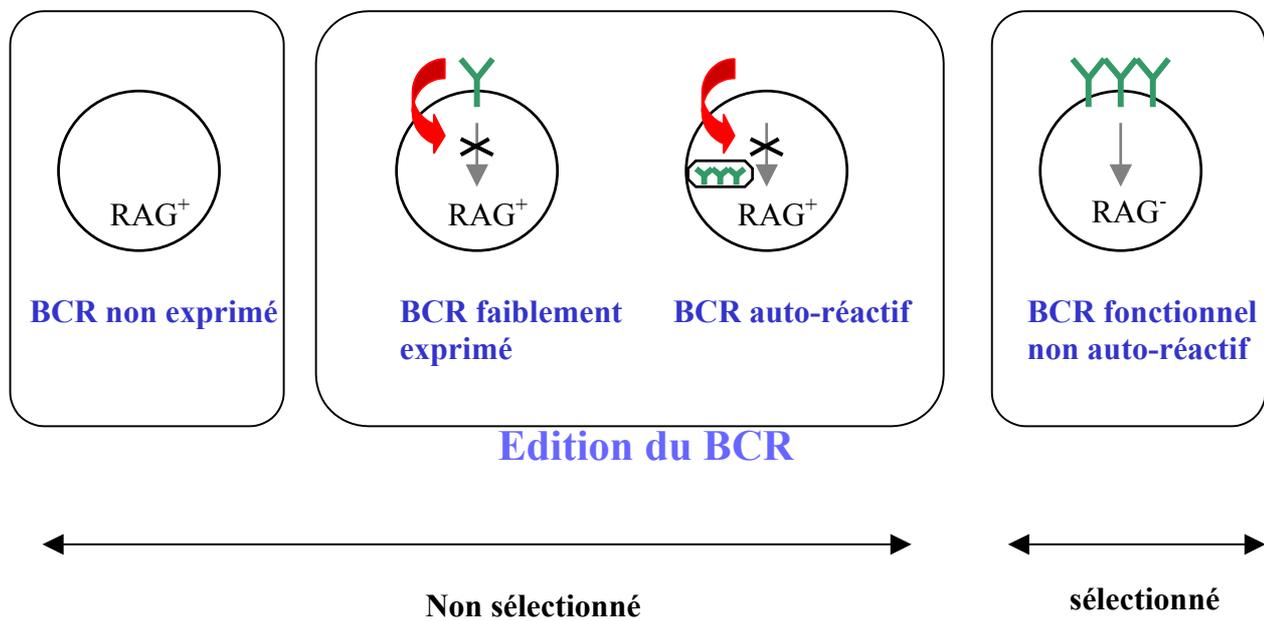


Figure 11: Représentation schématique des processus de sélection par le BCR dans la moelle osseuse. L'absence de BCR en surface des cellules B, sa faible expression ou son autoréactivité n'inhibent pas les réarrangements. Par contre, l'expression normale d'un BCR non autoréactif induit l'arrêt des réarrangements. (Librement inspiré de Nemazee et Hogquist, 2003)

III. CONSEQUENCES DE LA DEREGULATION DE L'EXPRESSION CONCERTEE DES CHAINES D'IG LORS DES SYNDROMES IMMUNO-PROLIFERATIFS B: LES NEPHROPATHIES ASSOCIEES AUX CHAINES LEGERES D'IG MONOCLONALES

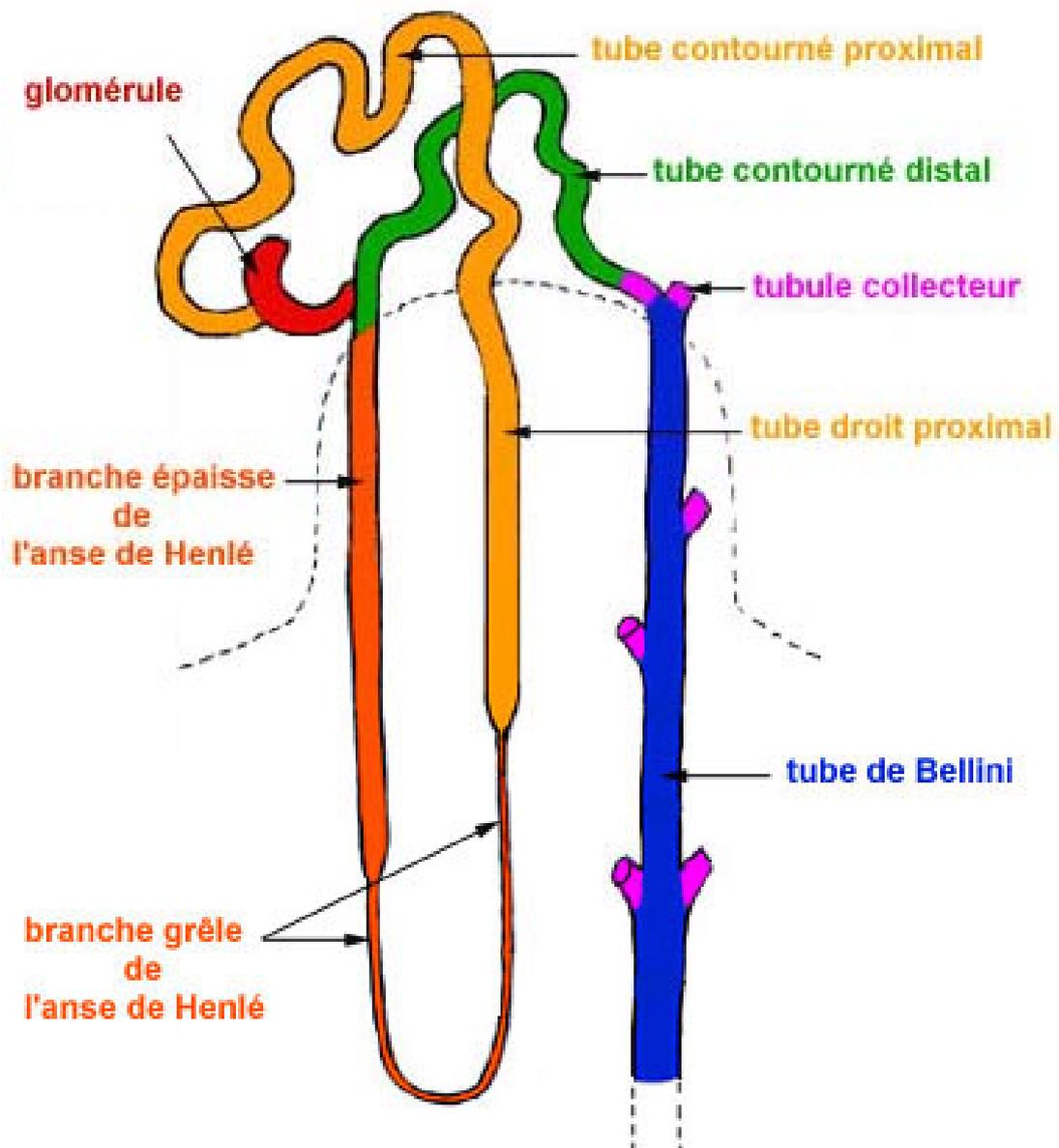


figure 12: Représentation schématique du néphron

A chaque étape de la maturation d'un lymphocyte B, un contrôle étroit à lieu afin d'aboutir à la production d'une immunoglobuline unique, fonctionnelle et non autoréactive. Les populations B normales sont ainsi constituées de la somme de multiples clones de spécificités variées et l'homéostasie de ces populations repose sur un contrôle fin de la prolifération et de l'activation de ces clones au cours et au décours des réponses immunes. Cependant, en pathologie humaine, on observe parfois l'émergence de clones B anormalement abondants et homogènes, traduisant la prolifération monoclonale (parfois mais non constamment maligne) de cellules généralement « bloquées » à l'un ou l'autre stade de la différenciation B. La multiplication incontrôlée de ces clones se fait alors indépendamment de la fonctionnalité de leur récepteur. Ainsi, lors de syndromes immunoprolifératifs affectant les plasmocytes, on peut observer la sécrétion d'une Ig monoclonale complète ou incomplète (chaîne lourde tronquée ou chaîne légère seule), dont la présence en grande quantité peut avoir de graves conséquences dues à leur spécificité antigénique (cas d'autoanticorps) ou à des propriétés particulières pouvant provoquer leur précipitation ou leur dépôt au niveau de divers organes, principalement le rein (pour revue : Cogné et coll., 2003). Ces dépôts peuvent alors altérer le fonctionnement de ces organes (pour revue : Solomon et Weiss, 1988, Preud'homme et coll., 1994, Ronco et coll., 1995). Le plus souvent, une rupture de la stœchiométrie chaînes lourdes/chaînes légères dans les plasmocytes malins conduit à la production en excès d'une chaîne légère libre que l'on retrouve alors sous forme de protéine dites de Bence Jones dans les urines des patients et qui peut-être responsable à elle seule d'une pathologie spécifique (pour revue : Cogné et coll., 1992 ; Preud'homme et coll., 1994). Les particularités de leur domaine variable et leur instabilité en l'absence de chaînes lourdes peut alors être à l'origine de la pathogénicité de ces chaînes légères libres monoclonales.

III.1. SYNDROMES IMMUNOPROLIFÉRATIFS B ET PRODUCTION D'IG MONOCLONALES

Les différents syndromes immunoprolifératifs de la lignée B sont volontiers classés et caractérisés en fonction du stade de maturation majoritairement représenté au sein du clone malin. En effet, dans la majorité des cas, les cellules proliférantes sont issues d'un même clone cellulaire, bloqué dans sa maturation (sauf dans quelques exceptions telles les macroglobulinémies de Waldenström) et vont donc exprimer en surface (cas des lymphocytes) ou sécréter (cas des plasmocytes) la même

Ig. Cette règle est à l'origine du caractère monoclonal de l'Ig produite lors de ces proliférations exceptionnelles des lymphomes folliculaires au cours desquels les cellules du clone tumoral peuvent continuer à accumuler des mutations somatiques au niveau de leur région V. Il est à noter que le processus transformant est souvent initié très tôt (stade pro-B ou pré-B) même dans le cas de prolifération de cellules B majoritairement matures.

Les lymphomes, caractérisés par la prolifération monoclonale de cellules lymphocytaires dans les organes lymphoïdes périphériques et les leucémies, caractérisées par des proliférations de cellules pouvant circuler abondamment dans le sang périphérique, impliquent des cellules B à des stades de maturation souvent relativement précoces (pré-B ou B) et n'excrétant donc pas d'Ig (Preud'homme et Seligmann, 1972a). Cependant, une Ig monoclonale sérique est décelable dans 5 à 20% des cas de leucémie lymphoïde chronique (Pangalis et coll., 1999 ; Garrand et coll., 2000) et des techniques de détection sensibles telles que l'immunoblot permettent parfois de mettre en évidence la présence d'un composant monoclonal sérique correspondant à l'Ig de membrane du clone malin (Beaume et coll., 1994). (De rarissimes et sévères leucémies à plasmocytes sont également parfois rencontrées ou peuvent compliquer un myélome.)

La macroglobulinémie de Waldenström est caractérisée par une prolifération dans les différents compartiments B (moelle osseuse, rate et ganglions périphériques) d'un clone cellulaire à différents stades de maturation allant des lymphocytes B exprimant une Ig de membrane jusqu'aux plasmocytes pouvant alors sécréter une IgM monoclonale en grande quantité (Preud'homme et Seligmann, 1972b ; Kyle et Garton, 1987). Dans ce cas, la prolifération lymphocytaire B se fait sans arrêt de la maturation mais toutes les cellules expriment la même Ig soit sous forme membranaire, soit sous forme sécrétée. On observe fréquemment chez les patients atteints de cette pathologie la présence d'une protéinurie de Bence-Jones dans les urines correspondant à la présence d'une chaîne légère libre, le plus souvent de type κ .

Les gammopathies bénignes (MGUS pour « Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance ») regroupent les cas cliniques pour lesquels un pic d'Ig monoclonale sérique est observé en l'absence de toute prolifération cellulaire monoclonale avérée. La présence d'une protéinurie de Bence-Jones est parfois observée mais le plus souvent avec des taux relativement faibles, en rapport avec la faible « masse cellulaire » du clone B qui prolifère.

Le myélome multiple est au contraire caractérisé par une prolifération monoclonale beaucoup plus agressive (et pouvant atteindre une forte masse tumorale) de plasmocytes préférentiellement

localisés au niveau de la moelle osseuse (pour revue : Greaves, 1986). La prolifération de ces plasmocytes induit dans la grande majorité des cas, l'apparition d'une Ig monoclonale sérique en plus ou moins grande quantité avec, dans 80% des cas, un excès notable de chaînes légères libres dans les urines des patients. Différents profils d'Ig monoclonales peuvent être observés par des techniques immunochimiques permettant de distinguer plusieurs types de sécrétion du composant monoclonal (Bergsagel, 1972 ; Durie et Salmon, 1975) :

Une molécule complète d'Ig monoclonale est détectée sous la forme d'un pic sérique unique. Dans ce cas, les plasmocytes malins produisent les chaînes légères et les chaînes lourdes de manière stœchiométrique d'où la présence uniquement d'une chaîne d'Ig complète.

Une molécule complète d'Ig monoclonale et accompagnée d'un excès de la chaîne légère sous forme libre, pouvant se traduire par un deuxième pic sérique ou surtout par une élimination urinaire abondante de ce composant de faible masse moléculaire (ultrafiltré par le glomérule), sous la forme d'une protéinurie de Bence Jones. Cette forme de myélome est la plus fréquente et est responsable d'une prévalence élevée de complications viscérales, en particulier rénales, liées à la précipitation ou au dépôts des chaînes légères libres monoclonales.

De façon moins fréquente (environ 5 à 10 % des myélomes), le clone plasmocytaire peut perdre la capacité d'excréter des chaînes lourdes. Dans la majorité des cas, les plasmocytes ne produisent aucune chaîne lourde mais il peut aussi arriver qu'une chaîne lourde anormale soit produite mais ne soit pas sécrétée et subisse une dégradation intra-cellulaire. Le seul composant monoclonal décelable est alors une chaîne légère libre.

Dans environ 1% des myélomes, aucun composant monoclonal n'est détecté. Les raisons de cette absence d'Ig monoclonale sériques sont multiples : elle peut résulter d'une dégradation rapide par protéolyse d'une Ig sécrétée, d'une déposition rapide (notamment glomérulaire) dans les organes pouvant entraîner une clairance sérique quasi-totale (Cogné et coll., 1991), de la dégradation intracytoplasmique d'une Ig « anormale » (Cogné et Preud'homme, 1990, Cogné et Guglielmi, 1993) ou d'une absence totale de synthèse de l'Ig (Blade et Kyle, 1999).

Enfin, quelques très rares cas de myélomes produisant une chaîne lourde isolée tronquée ont été décrits (Cogné et coll., 1992).

III.2. NEPHROPATHIES LIEES AUX DEPOTS DE CHAINES LEGERES D'IMMUNOGLOBULINES

Les maladies par dépôts d'Ig monoclonales résultent de propriétés particulières des composants monoclonaux impliqués, et constituent des complications fréquentes et sévères des syndromes immunoprolifératifs de la lignée B affectant des cellules productrices d'anticorps (MGUS, myélome, macroglobulinémie de Waldenström) (pour revue : Preud'homme et coll., 1994). Certaines maladies consécutives à la production d'une Ig monoclonale peuvent être systémiques et affecter des organes aussi divers que le cœur, le foie, la rate ou encore le rein, situation la plus fréquente. La gravité de ces maladies est liée à la localisation des dépôts tissulaires (notamment cardiaque) et à leur diffusion, et elles peuvent engager le pronostic vital des patients souvent d'avantage que l'extension des clones tumoraux. Dans certains cas, ce sont les complications rénales qui peuvent amener à soupçonner l'existence d'une immunoprolifération sous-jacente non encore détectée ou à faible masse tumorale. C'est notamment le cas des gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS) (Ronco et coll., 2001). Les néphropathies liées aux dépôts ou à la précipitation des Ig monoclonales sont le plus souvent induites par des chaînes légères libres, qui sont produites seules ou en excès lors de la majorité des proliférations plasmocytaires. Cependant des Ig entières ou des chaînes lourdes seules sont parfois à l'origine de certaines néphropathies. Leur classification histopathologique repose sur l'étude de la biopsie rénale par les techniques de microscopie optique, d'immunofluorescence directe et de microscopie électronique, qui permettent de définir la topographie, la composition précise et l'organisation ultrastructurale des dépôts extracellulaires ou des inclusions intracellulaires d'Ig monoclonales (Preud'homme et coll., 1994) (tableau 1). Nous allons, dans ce chapitre, nous limiter à la description des maladies rénales liées aux dépôts de chaînes légères d'Ig, qui se caractérisent par quatre grands types de dépôts tissulaires extra ou intracellulaires définissant (par ordre de fréquence décroissante) : la néphropathie à cylindres myélomateux (NCM), l'amylose AL, le syndrome de Randall (ou maladie de dépôts de chaînes légères : LCDD) et le syndrome de Fanconi (FS). Cette dernière pathologie sera plus largement détaillée. En effet, les travaux consacrés aux maladies par dépôts d'Ig monoclonales durant cette thèse se sont focalisés sur la mise au point d'un modèle expérimental de SF chez l'animal et sur l'étude des caractéristiques moléculaires des chaînes légères impliquées dans cette pathologie.

Dépôts organisés					
Dépôts microtubulaires			Dépôts fibrillaires (Rouge Congo +)		Cristaux
Cryo. Type I	Cryo. Type II	GOMMID	Amylose AL	Amylose AH	- SF - Néphropathie à cylindres myélomateux
IgG IgA IgM λ ou κ	IgM anti-IgG	IgG1 (λ ou κ) IgG2κ IgG3κ	Chaîne légère λ ou κ	Chaîne lourde tronquée	Chaîne légère λ ou κ

Dépôts non organisés (amorphes)					
MIDD (type "Randall")			Dépôts amorphes de type "non- Randall"		Cryo. Type I
LCDD	HCDD	LHCDD			
Chaîne légère κ ou λ	Chaîne lourde tronquée	Chaîne lourde + Chaîne légère	IgG2κ IgG3κ ou λ IgMκ	Chaîne légère λ	IgG IgA IgM λ ou κ

Tableau 1. Classification des néphropathies à dépôts d'immunoglobulines monoclonales
(D'après Preud'homme et coll. 1994, adapté)

Abréviations : amylose AL : amylose à chaînes légères monoclonales, AH : amylose à chaînes lourdes monoclonales, Cryo : cryoglobuline; GOMMID : Glomerulonephritis with Organized Microtubular Monoclonal Ig Deposits, HCDD : Heavy Chain Deposition Disease, LCDD : Light Chain Deposition Disease, LHCDD : Light and Heavy Chain Deposition Disease, MIDD : Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease, SF : syndrome de Fanconi.

III.2.1. NEPHROPATHIES GLOMERULAIRES LIEES AU DEPOT DE CHAINES LEGERES MONOCLONALES

III.2.1.a. Le syndrome de Randall ou LCDD

La LCDD (pour Light Chain Deposition Disease), décrite pour la première fois par Randall en 1976, correspond à des dépôts extracellulaires de chaînes légères non-organisés, d'aspect amorphe en microscopie électronique, le long des membranes basales glomérulaires et tubulaires, et se caractérise dans sa forme typique par des lésions de glomérulosclérose diffuse. Le même type de dépôts, mais constitués de chaînes lourdes seules (HCDD, pour Heavy Chain Deposition Disease) ou des deux composants d'une Ig complète (LHCDD, pour Light and Heavy Chain Deposition Disease) ont aussi plus rarement été décrits (Aucouturier et coll., 1993 ; Preud'homme et coll., 1994). L'ensemble de ces pathologies est regroupé sous le terme de MIDD (pour Monoclonal Immunoglobulin Deposition Disease). Ces dépôts ne comportent pas la propriété de biréfringence en lumière polarisée après coloration au rouge Congo, mais sont très réactifs à la coloration à l'acide périodique de Schiff, indiquant l'implication de glycoprotéines. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence des anomalies structurales de la majorité des chaînes légères impliquées dans des LCDD (Preud'homme et coll., 1980), avec notamment un poids moléculaire anormalement élevé pouvant résulter de la présence de résidus glycosylés dans la région variable (Sox et Hood, 1970 ; Spiegelberg et coll., 1970), qui pourraient jouer un rôle dans leur agrégation et leur précipitation. Les chaînes κ sont plus fréquemment observées que les chaînes λ , avec une prévalence particulière pour le sous groupe V κ IV (Denoroy et coll., 1994). L'alignement des différentes séquences primaires n'a pas permis pas de retrouver de caractères communs aux différentes chaînes légères de LCDD, mais chacune comporte des particularités du domaine variable qui pourraient être à l'origine de leur caractère néphrotoxique (Bellotti et coll., 1991 ; Cogné et coll., 1991 ; Khamlichi et coll., 1992 ; Rocca et coll., 1993 ; Decourt et coll., 1996 ; Decourt et coll., 1998). Ces chaînes légères stimulent la production rénale (en particulier par les cellules mésangiales) de différents facteurs de croissance, tels que le PDGF- β ou le TGF- β , favorisant le développement des lésions de sclérose glomérulaire (Herrera et coll., 1994 ; Zhu et coll., 1995). Le rôle prépondérant des caractéristiques structurales intrinsèques des chaînes légères dans la LCDD à été démontré, par la récurrence des néphropathies après transplantation rénale (Gerlag et coll., 1986), ainsi que par des modèles expérimentaux animaux développés par notre équipe, dans lesquels la greffe d'hybridomes syngéniques (SP2/0) sécrétant une chaîne légère κ humaine

responsable de LCDD à des souris Balb/c, a permis de reproduire chez l'animal les lésions glomérulaires typiques de la maladie (Khamlichi et coll., 1995).

III.2.1.b. L'amylose à chaînes légères d'Ig (AL)

Les amyloses regroupent des pathologies au cours desquelles des protéines normalement solubles, polymérisent pour former des fibrilles insolubles dont le diamètre externe varie de 7 à 10 nm . Les fibrilles sont toujours associées à d'autres protéines telles que le composant P et des protéoglycanes. Les dépôts envahissent les espaces extracellulaires de différents organes, altérant la structure et la fonction des tissus touchés. Les affinités tinctoriales des fibrilles amyloïdes organisés en feuillets β , sont caractéristiques avec une biréfringence en lumière polarisée après coloration au rouge Congo, nécessaire au diagnostic histologique de l'amylose. Des dépôts amyloïdes composés de chaînes légères d'Ig ont été décrits pour la première fois par Glenner et ses collaborateurs (1971). De rares observations d'amylose à chaînes lourdes monoclonales (amylose AH) ont été rapportées, mais aucun cas d'amylose mettant en jeu les deux types de chaînes n'a encore été observé (pour revue : Stone, 1990 ; Sipe, 1992). L'amylose AL complique le plus souvent des proliférations plasmocytaires à faible masse tumorale. Il s'agit généralement d'une pathologie systémique, la fréquence de la néphropathie amyloïde dominant celle des autres manifestations, cardiaques, hépatiques ou neurogènes périphériques (Ronco et coll., 2001). Les dépôts glomérulaires amyloïdes prédominent dans le mésangium et le long de la membrane basale glomérulaire, et sont associés à des dépôts vasculaires. Les localisations tubulaires et interstitielles sont moins fréquentes. En immunofluorescence, les dépôts amyloïdes fixent habituellement les conjugués anti-chaînes légères κ ou λ , mais de façon inconstante. Ce phénomène est attribué à la disparition du domaine C (reconnu par les anticorps utilisés) dans les dépôts, sous l'effet de la protéolyse locale, ou à l'absence d'accessibilité des épitopes en raison de l'organisation fibrillaire. L'examen de la biopsie rénale en microscopie électronique est particulièrement utile au stade initial des lésions glomérulaires, où les dépôts ne sont pas toujours détectés en microscopie optique. Les fibrilles amyloïdes, non branchées, orientées en tout sens, ont typiquement une longueur inférieure à 1 μm et un diamètre externe inférieur à 10 nm. Elles prennent parfois un aspect en collier de perles, avec une périodicité de 5,5 nm (pour revue, Ronco et coll. 2001, Touchard 2003).

Une prédominance des chaînes λ est observée avec une surreprésentation du sous groupe V λ VI (Solomon et coll., 1982 ; Gertz et Kyle, 1990 ; Ozaki et coll., 1994). De très nombreuses séquences des chaînes légères amyloïdogènes ont été caractérisées. Elles ne montrent pas clairement de motif « amyloïdogène » consensuel pouvant rendre compte de leur propension à polymériser. Toutefois, à l'instar de ce qui a été décrit pour les chaînes légères de LCDD, la combinaison de certains résidus hydrophobes et de glycosylations dans le domaine variable pourrait favoriser la formation des fibrilles (Dwulet et coll., 1986 ; Aucouturier et coll., 1992 ; Stevens et coll., 1995 ; pour revue : Stevens et Argon, 1999 ; Pozzi et Locatelli, 2002). Etant donné la méconnaissance des mécanismes impliqués dans les propriétés amyloïdogènes des chaînes légères d'Ig et a fortiori des facteurs pouvant inhiber la formation des dépôts, le traitement de l'amylose AL reste le plus souvent dirigé contre la prolifération B elle-même (en dépit de son caractère généralement faiblement prolifératif ou relativement indolent). Si les tentatives de traitement par la 4'-iodo-4'-desoxydoxorubicine, qui en se liant aux dépôts d'amylose interfère avec la formation des fibrilles, se sont montrés décevants (Gianni et coll., 1995), de nouveaux espoirs thérapeutiques sont nés avec le développement d'un inhibiteur compétitif de la fixation du composant amyloïde P aux fibrilles amyloïdes (le CPHPC) qui est actuellement à l'étude chez l'homme avec des résultats initiaux encourageants (Pepys, 2002).

III.2.2. NEPHROPATHIES TUBULAIRES LIEES AUX DEPOTS DE CHAINES LEGERES MONOCLONALES

Le faible poids moléculaire des chaînes légères d'Ig (environ 22kDa pour les formes monomériques et 44 kDa pour les formes dimériques) permet leur filtration passive par le glomérule. Elles sont ensuite réabsorbées par les cellules tubulaires proximales (TCP) selon un processus d'endocytose mettant en jeu deux récepteurs multi-ligands fonctionnant en tandem, la mégaline et la cubuline (Batuman et coll., 1998 ; Birn et coll., 2001) puis dégradées par les enzymes du compartiment lysosomal (en particulier, la cathepsine B). Les acides aminés résiduels sont alors adressés vers le pôle basolatéral de la cellule puis excrétés dans la circulation sanguine. Dans les conditions physiologiques, 90% des chaînes légères sont ainsi réabsorbées et catalysées par les TCP. Cependant, lors des syndromes immunoprolifératifs, la concentration de chaînes légères libres peut augmenter de façon considérable saturant les mécanismes d'endocytose. Ces chaînes peuvent alors parvenir dans les tubules distaux puis dans l'urine définitive (Ronco et coll.,

2001). Sous certaines conditions essentiellement dues à leurs propriétés structurales particulières, ces chaînes légères en excès peuvent alors former des dépôts intra ou extracellulaires dans différentes parties du tubule, altérant son fonctionnement et pouvant aboutir à une insuffisance rénale. Deux néphropathies sont associées aux dépôts de chaînes légères d'Ig dans les tubules : la néphropathie à cylindres myélomateux qui affecte de façon prédominante les tubules distaux, et le syndrome de Fanconi qui induit un dysfonctionnement généralisé de la réabsorption tubulaire proximale couplée au sodium. Les travaux effectués au cours de cette thèse ont essentiellement porté sur cette dernière pathologie .

III.2.2.a. Néphropathie à cylindres myélomateux (NCM) ou « rein de myélome »

La NCM est la forme la plus fréquente des complications rénales observées au cours du myélome. Une étude autopsique réalisée en 1990 sur des patients atteints de myélome a montré que 32% étaient atteints de NCM contre 11% pour l'amylose AL et 5% pour la LCDD. D'autres études avec histologie rénale complète ont montré une prévalence encore supérieure pouvant aller jusqu'à 87% des patients atteints de myélome (Pozzi et coll., 1987 ; Pasquali et coll., 1990 ; Ganeval et coll., 1992 ; pour revue : Kyle, 1989). Cette complication est de plus certainement sous-estimée, la biopsie rénale étant rarement pratiquée en l'absence de protéinurie importante chez les patients atteints de myélome. Dans la majeure partie des cas, et contrairement aux autres néphropathies liées aux dépôts d'Ig monoclonales, les patients atteints de NCM ont une forte masse tumorale avec une protéinurie de Bence Jones abondante (Rota et coll., 1987 ; Pozzi et coll., 1987 ; Ganeval et coll., 1992 ; Winearls, 1995). La NCM est caractérisée par la formation de cylindres dans les lumières des tubes rénaux particulièrement distaux et dans le tube collecteur (fig.13). L'obstruction tubulaire induite par ces cylindres, associé à la réduction du débit de filtration glomérulaire et l'augmentation de la pression tubulaire est à l'origine de l'insuffisance rénale de la NCM (Weiss et coll., 1981). Ces cylindres sont le plus souvent formés de la chaîne légère monoclonale associée à une glycoprotéine fibrillaire produite par les cellules tubulaires de la branche ascendante large de l'anse de Henle, la protéine de Tamm-Horsfall (THP). La liaison des chaînes légères à la THP se fait par l'intermédiaire de leur domaine CDR3 s'associant avec une séquence de 9 acides aminés (résidus 225-233) de la THP (Huang et coll., 1993 ; Huang et Sanders, 1995). La liaison des chaînes légères monoclonales d'Ig à la THP est ainsi inhibée par un anticorps dirigé contre le site de liaison de la THP ou par un peptide synthétique identique au

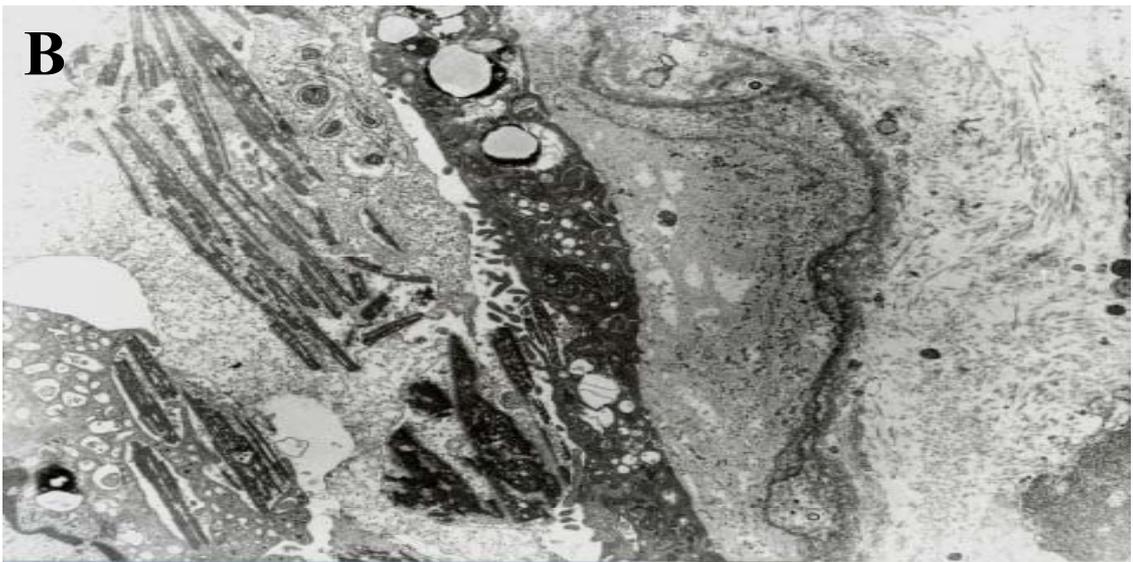


Figure 13. Néphropathie à cylindres myélomateux.

A. Présence d'un cylindre myélomateux caractéristique dans les urines (microscopie optique à contraste de phase, x 200).

B. Formations cristallines dans la lumière d'un tube contourné distal, provoquant une réaction macrophagique (microscopie électronique, x 4.000).

CDR3 (Ying et Sanders, 2001). La réactivité des chaînes légères responsables de NCM avec la THC est cependant très inconstante (Huang et coll., 1993) et certains cylindres pourraient n'être formés que de la chaîne légère, particulièrement lors du développement précoce de la maladie. La structure intrinsèque des chaînes légères de NCM semble être à l'origine de la formation des dépôts, et leur concentration dans le fluide tubulaire directement corrélée avec leur capacité de liaison à la THP. En effet, une diminution de la quantité de chaînes légères par le traitement du myélome ou une baisse de la concentration intratubulaire induite par l'augmentation du flux urinaire permet de prévenir l'association avec la THP et donc la formation de dépôts (Ganeval et coll., 1992 ; Ying et Sanders, 1998). La diversité des chaînes légères impliquées dans la NCM n'a pas permis de mettre en évidence de caractéristiques communes au niveau moléculaire mais, à la différence de chaînes contrôles non néphrotoxiques, elles montrent une résistance partielle ou totale à la protéolyse par la trypsine, la pepsine et la cathepsine B qui pourrait être à l'origine de leur accumulation (Leboulleux et coll., 1995 ; Birn et coll., 2003). La sévérité de l'insuffisance rénale est aussi probablement liée à la réaction inflammatoire tubulo-interstitielle induite par la THP, et par la réabsorption des chaînes légères par les cellules proximales tubulaires (Thomas et coll., 1993 ; Sengul et coll., 2002 ; Sengul et coll., 2003).

III.2.2.b. Syndrome de Fanconi associé aux chaînes légères d'Ig monoclonales

Le syndrome de Fanconi (SF) correspond à une dysfonction généralisée de la réabsorption tubulaire proximale dépendant du sodium. Celle-ci se traduit par une aminoacidurie généralisée, une glycosurie normo-glycémique, une acidose tubulaire proximale, une hypophosphorémie et une hypouricémie par fuite urinaire, souvent associées à une hypokaliémie. Chez l'adulte, le SF peut résulter de certaines maladies héréditaires, telles que des cytopathies mitochondriales, mais il est le plus souvent acquis, par exposition à diverses drogues ou métaux lourds, au cours de certaines maladies auto-immunes ou de proliférations plasmocytaires (Lee et coll., 1972 ; Maldonado, 1975 ; Kyle, 1989). Le syndrome de Fanconi est une complication assez rare des dyscrasies plasmocytaires, puisque moins de 70 cas ont été décrits à ce jour. Cependant, la prévalence de cette pathologie est probablement sous estimée, en raison de formes incomplètes non diagnostiquées, ou de la présence d'une insuffisance rénale sévère pouvant masquer les signes de tubulopathie proximale (Bouiller et coll., 1999 ; Ronco et coll., 2003). Le SF est souvent découvert devant l'insuffisance rénale, ou une ostéomalacie secondaire à l'hypophosphatémie et aux

anomalies du métabolisme de la vitamine D. Dans la quasi-totalité des cas, le diagnostic du SF précède la découverte de la prolifération plasmocytaire sous-jacente (Maldonado et coll., 1975 ; Messiaen et coll., 2000 ; Ronco et coll., 2001).

Les premières descriptions de SF associées à un myélome remontent à une cinquantaine d'année (Sirota et Hamerman, 1954 ; Engle et Wallis, 1957). Cependant, ce n'est que bien plus tard grâce à des techniques d'immunofluorescence et d'immuno-microscopie électronique, qu'il a été démontré que les inclusions cristallines observées dans les cellules tubulaires proximales des patients atteints de myélomes avec SF étaient constituées de chaînes légères d'Ig (Thorner et coll., 1983) correspondant à la chaîne légère monoclonale circulante (Truong et coll., 1989 ; Orfila et coll., 1991) (fig.14). L'étude de Maldonado et ses collaborateurs (1975), menées sur 17 cas, a permis de préciser les caractéristiques typiques du SF associé aux chaînes légères monoclonales : des inclusions cytoplasmiques organisées en cristaux visibles dans le cytoplasme des cellules tubulaires et des cellules lymphoplasmocytaires tumorales, l'existence d'une protéinurie de Bence Jones exclusivement de type κ et la découverte du SF précédant habituellement celle d'une dyscrasie plasmocytaire de faible masse tumorale (Maldonado et coll. 1975). Récemment, à partir d'une revue de la littérature et de onze observations personnelles, Messiaen et coll. (2000) ont montré que la présentation clinique et pathologique du SF peut être plus hétérogène (Messiaen et coll. 2000). Ainsi, même si la majorité des cas de SF sont associés à des myélomes de faible masse tumorale ou à des MGUS, certains cas de myélomes à forte masse tumorale, de lymphomes B, de leucémies chroniques ou de maladies de Waldenström peuvent aussi être associés à un SF (pour revue : Lacy et Gertz, 1999). D'autres part, la présence de cristaux dans les cellules tubulaires proximales n'est pas systématique (Messiaen et coll., 2000 ; Decourt et coll., 2003) La chaîne légère responsable de SF est de type κ dans la quasi-totalité des cas ; toutefois, quelques rares observations ont montré la possibilité de SF associé à une chaîne légère de type λ (Thorner et coll. 1983, Rikitake et coll. 1989, Yokota et coll. 1989, Isobe et coll. 1998).

Seules quelques études moléculaires de chaînes légères monoclonales responsables de SF ont été réalisées (tableau 2). La première séquence complète a été publiée par notre groupe (Aucouturier et coll., 1993) et concernait une chaîne correspondant au sous-groupe de variabilité V κ I impliquée dans la formation d'inclusions cristallines intracellulaires aussi bien dans les TCP que dans les plasmocytes tumoraux du patient (*CHEB*). L'étude des urines du patient a montré la présence de la chaîne légère monoclonale sous forme mono et dimérique ainsi que la présence d'un fragment de 12 kDa correspondant aux 107 acides aminés de la région variable de l'Ig. Des cristaux ont pu être

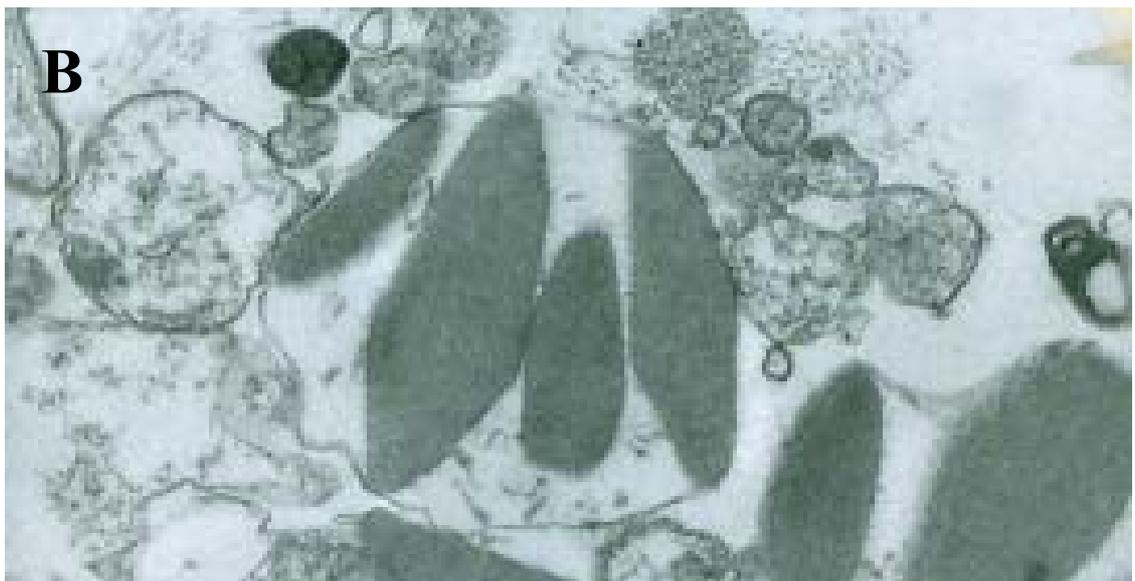
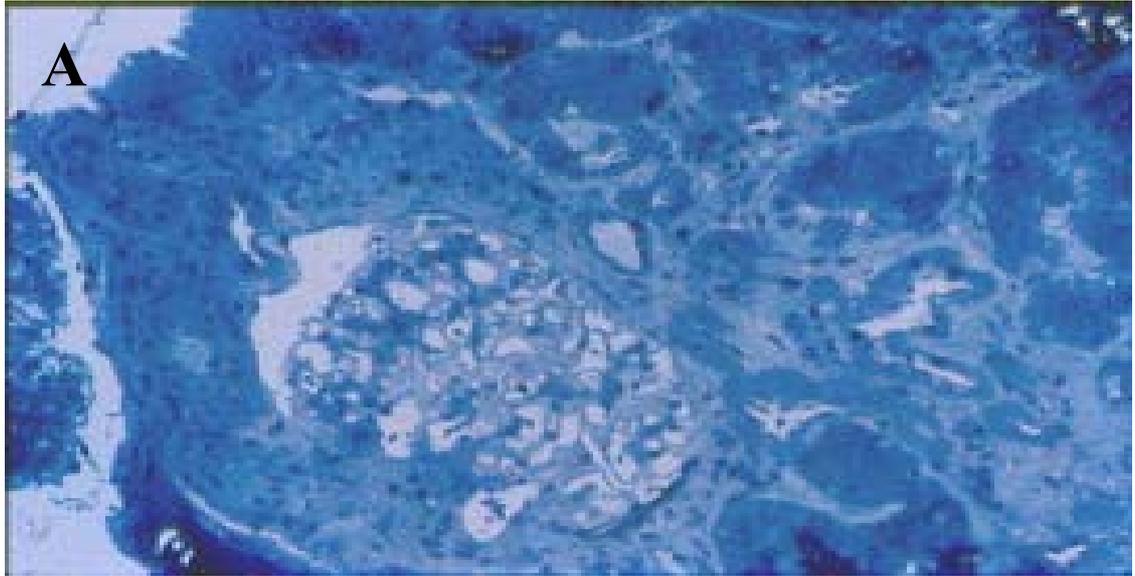


Figure 14. Syndrome de Fanconi à chaîne légère monoclonale κ .

A. Coupes semi-fines. Nombreux cristaux intra-cytoplasmiques dans les cellules épithéliales tubulaires proximales (microscopie optique, coloration au bleu de toluidine, x 250).

B. Inclusions cristallines dans des vacuoles intra-cytoplasmiques de cellules épithéliales tubulaires proximales exfoliées (microscopie électronique, x 26.000).

reproduits *in vitro* avec la chaîne légère complète ainsi qu'avec le fragment de 12 kDa démontrant ainsi l'importance du fragment V κ dans le processus de cristallisation. D'autre part, la digestion enzymatique par la pepsine et la trypsine a permis à chaque fois d'obtenir un fragment de 12kDa résistant à des digestions prolongées jusqu'à 72 heures. La séquence déduite de l'ADNc a permis de montrer qu'elle dérivait du gène germinale O2/O12 mais possédait des mutations ponctuelles inhabituelles dans la région variable : le remplacement du résidu isoleucine en position 21 (normalement invariant) par une phénylalanine ; la substitution d'une sérine en position 30 par une alanine (entraînant une inversion de la charge) ; la présence de résidus thréonine 31 et isoleucine 94, très rarement décrits à ces positions.

Par la suite, plusieurs autres études ont permis de caractériser de la même manière une dizaine de chaînes légères κ responsables de SF (Leboulleux et coll., 1995 ; Rocca et coll., 1995 ; Deret et coll., 1999 ; Decourt et coll., 2003 ; pour revue : Messiaen et coll., 2000). Ces chaînes montrent une forte homologie de structure puisqu'elles appartiennent toutes, à une exception près, au sous-groupe de variabilité V κ I et dérivent uniquement de deux gènes germinaux (O2/O12 et O8/O18). Dans une seule observation de myélome à forte masse tumorale, caractérisé par l'absence de cristaux et la présence d'une NCM, la chaîne légère monoclonale appartient au sous-groupe de variabilité V κ III et dérive de la lignée germinale L6 (*VAL*) (Deret et coll. 1999) . Les propriétés de cristallisation des chaînes légères V κ I sont associées à la résistance du fragment V κ de 12 kDa à la protéolyse par diverses enzymes, trypsine, pepsine, et surtout cathepsine B, principale enzyme lysosomale impliquée dans la dégradation des protéines dans la cellule tubulaire proximale. En revanche, les chaînes légères κ responsables de SF sans cristaux sont sensibles à la protéolyse dans deux cas sur trois (dont le patient *VAL*).

De manière intéressante, seules quelques mutations ponctuelles du domaine V semblent liées aux propriétés pathogènes de ces chaînes légères. Ainsi, le remplacement de la sérine en position 30 du gène germinale O2/O12 par un résidu non-polaire ou hydrophobe apparaît notamment responsable de la résistance à la protéolyse par la cathepsine B et semble essentiel dans la formation des cristaux. Ce point a été démontré à l'aide du modèle de greffe de tumeur élaboré dans notre laboratoire. Par mutagenèse dirigée, le gène codant la chaîne légère *CHEB* a été modifié afin de remplacer le résidu non polaire (Alanine en position 30) par le résidu polaire (sérine) normalement trouvé dans le gène germinale. Alors que l'injection à des souris Balb/C d'hybridomes syngéniques (lignées SP2/0) produisant la chaîne légère *CHEB* normale induit la formation de cristaux intracytoplasmiques similaires à ceux observés chez le patient, la greffe de cellules produisant la

chaîne mutée n'entraîne pas la formation de cristaux (Decourt et coll., 1999). La même expérience a été réalisée en remplaçant le résidu non polaire en position 94 (isoleucine) et a permis d'obtenir des résultats similaires. Toutefois, la présence d'un résidu hydrophobe en position 30 n'implique pas la cristallisation (exemple : la protéine *LEC*), et la chaîne *MEN* forme des cristaux en dépit de l'absence de résidu non-polaire en position 30 (tableau 2). Les chaînes légères responsables de SF ont une faible propension à former des dimères. Ce phénomène pourrait être lié à l'absence de résidus exposés dans la boucle CDR3 (impliquée dans la dimérisation), ou à une diminution de l'interaction entre les domaines C liée à la perte d'un pont disulfure (Roussel et coll. 1999). L'exposition de surfaces hydrophobes (normalement enfouies lorsque les chaînes légères sont organisées en dimères) pourrait être à l'origine de la résistance à la protéolyse ou entraîner d'autres effets pathogènes (Aucouturier et coll. 2001).

Initialement, un scénario a été évoqué pour expliquer la néphrotoxicité des chaînes légères impliquées dans le SF : les chaînes légères réabsorbées par les TCP, de par leur résistance à la protéolyse, s'accumuleraient dans les lysosomes sous la forme cristaux, engorgeant le compartiment endo-lysosomal, et perturbant ainsi la fonction de réabsorption des cellules tubulaires proximales. Cependant, certaines chaînes légères responsables de FS ne présentent pas de résistance à la protéolyse et ne forment pas de cristaux (Deret et coll., 1999 ; Decourt et coll., 2003). D'autre part, dans le modèle de greffe cité précédemment (Decourt et coll., 1999), l'inhibition de la formation des cristaux secondaire au remplacement du résidu non polaire en position 94, n'a pas permis de faire disparaître les anomalies de réabsorption du phosphore observées avec la chaîne *CHEB* non mutée.

Au final, les mécanismes conduisant à l'inhibition des fonctions de réabsorption apicale dépendant du sodium à la suite de l'accumulation des chaînes légères monoclonales dans le cytoplasme des cellules tubulaires proximales restent mal compris et n'excluent pas une toxicité directe potentielle des chaînes légères. Celle-ci pourrait résulter soit d'interactions avec les mécanismes mitochondriaux permettant de fournir (via la phosphorylation oxydative) l'énergie nécessaire à ses transports ioniques dans la cellule tubulaire (Niaudet et coll., 1996), soit d'une inhibition directe de certaines protéines de transport, telles que les cotransports apicaux couplés au sodium ou la Na-K-ATPase basolatérale (Guan et coll., 1999), soit enfin, d'une altération du recyclage membranaire de ces transporteurs secondaire aux perturbations du compartiment endolysosomal engorgé par les chaînes légères monoclonales (Nicastri et coll., 1998).

Patient	Sous-groupe de variabilité	Gène V germinale	Cristaux	Cylindres myélo-mateux	Masse tumorale	Mutations remarquables	Résistance à la protéolyse
1 (SAN)	ND	ND	++	-	MGUS	ND	ND
2 (CHE)	VκI	O2/O12	++	-	Faible	Résidu NP (Ala30)	+
3 (TRE)	VκI	O2/O12	++	-	Faible	Résidu NP (Ala30)	+
4 (SCH)	VκI	O2/O12	++	-	Faible	Résidu NP (Ala30)	+
5 (TRO)	VκI	O2/O12	+	-	MGUS	Résidu H (Ile30)	+
6 (MEN)	VκI	O8/O18	++	-	MGUS	Résidu chargé (His32)	+
7 (BAR)	ND	ND	++	+(?)	MGUS	ND	ND
8 (HAL)	VκI	O8/O18	++	++	Elevée	Résidu chargé (Arg30)	-
9 (VAL)	VκIII	L6	-	++	Elevée	Résidu Lys54 exposé	-
10 (LEC)	VκI	O2/O12	-	+	Elevée	Résidu H (Leu30)	+
11 (DEL)	VκI	O8/O18	-	-	MGUS	Résidu P (Glu50)	+
12 (MAS)	VκI	O8/O18	+/-	++	Faible	Résidu P (Glu50)	ND

Tableau 2 : Propriétés des chaînes légères responsables de SF

Abréviations : P= polaire, NP = non-polaire, H = hydrophobe, ND : non déterminé,

MGUS : gammopathie bénigne

(Adapté et modifié de Messiaen et coll. 2000)

RESULTATS DISCUSSION

PREMIERE PARTIE : EXCLUSION ALLELIQUE

**ARTICLE 1: “*IMMUNOGLOBULIN LIGHT CHAIN INCLUSION
ALLOWS B CELL DIFFERENTIATION TO PROCEED UP TO ITS
TERMINAL STAGES WITHOUT PROMOTING AUTO-IMMUNITY*”**

(manuscrit en préparation)

Lors du développement des cellules B, l'assemblage du BCR se fait selon un processus ordonné permettant d'abord l'expression d'une chaîne lourde μ . Lorsque cette chaîne s'est convenablement associée aux pseudochaînes légères pour former le pré-BCR, des signaux induisent la multiplication de ces clones puis l'induction des réarrangements aux loci des chaînes légères (voir chapitre II de ce manuscrit). A leur tour, les réarrangements des chaînes légères se font selon un processus séquentiel avec en premier lieu les réarrangements sur les allèles κ puis, λ . Lorsque l'association d'une chaîne légère avec la chaîne lourde déjà présente permet l'assemblage et l'expression à la membrane d'un BCR non autoréactif, la cellule est alors sélectionnée pour accéder au pool des cellules périphériques. Ce procédé ordonné de réarrangements est à l'origine du phénomène d'exclusion allélique (ou isotypique s'agissant des chaînes λ), essentiel dans la génération du répertoire B selon la théorie de la sélection clonale de Burnet (1959) (voir chapitre II.3 du manuscrit). Cependant, plusieurs travaux ont démontré l'existence d'un faible taux de cellules B périphériques exprimant deux chaînes lourdes distinctes (Barreto et Cumano, 2000) ou, plus fréquemment, deux chaînes légères, une κ et une λ (Giachino et coll., 1995). D'autre part, de par l'absence d'anticorps spécifiques (les anticorps anti-chaînes légères reconnaissant généralement le domaine constant), il est difficile d'apprécier le nombre exact de cellules exprimant plusieurs chaînes légères de même isotype. Récemment, il a cependant été montré que seul environ 1,5% des lymphocytes de la rate co-exprimaient deux chaînes légères différentes grâce à l'utilisation de souris transgéniques possédant une insertion du domaine constant de chaîne légère humaine sur l'un des allèles κ (Casellas et coll., 2001). L'exclusion allélique des chaînes légères semble donc très efficace mais montre quelques exceptions qui sont souvent attribuées aux réarrangements secondaires très fréquents au loci des chaînes légères (Retter et coll., 1998 ; Casellas et coll., 2001). En particulier, lors d'études sur des souris exprimant des Ig transgéniques autoréactives, il a été montré que l'édition du BCR pouvait générer des cellules « incluses », présentant deux ou plusieurs BCR, dont l'un pouvait s'avérer autoréactif. Dans ce cas, l'absence d'exclusion allélique « diluerait » l'anticorps autoréactif et permettrait la sélection positive et la migration dans les organes périphériques de la cellule (Iliev et coll., 1994 ; Kenny et coll., 2000 ; Li et coll., 2001).

Cependant dans tous ces cas, la présence d'une chaîne lourde transgénique autoréactive impossible à inactivée (contrairement aux chaînes légères lors des réarrangements secondaires) peut influencer les résultats observés. Dans ce travail, nous avons étudié les effets de l'insertion génique d'un gène $V\kappa J\kappa$ humain réarrangé en lieu et place des domaines $J\kappa$ du locus endogène de la souris.

Résultats et discussion de l'article 1:

Les animaux générés dans ce travail expriment une chaîne légère chimérique composée des domaines $V\kappa J\kappa$ humain associés au domaine constant $C\kappa$ de souris. L'étude des animaux hémizygotés (et possédant une délétion complète des domaines $J\kappa$ sur le deuxième allèle) ou homozygotés montre une réduction du nombre de lymphocytes B périphériques et un niveau d'expression de la chaîne légère chimérique plus faible que les chaînes légères endogènes de souris sauvages directement corrélée à l'apparition de cellules incluses (exprimant une chaîne λ endogène et la chaîne chimérique). La perte de l'exclusion allélique semble due au faible niveau d'expression du BCR qui ne permet pas l'arrêt des réarrangements au locus λ . En effet, les souris hémizygotés pour la mutation (et qui expriment le plus faiblement la chaîne légère chimérique) montrent un plus grand nombre de cellules incluses que les souris homozygotés. Nous montrons que de telles cellules sont aptes à subir la commutation de isotypique et sécréter des anticorps hybrides κ et λ . L'étude des sérums de souris hémizygotés pour la mutation révèlent un taux d'anticorps hybrides 10 fois supérieur à celui de souris sauvages sans pour autant montrer de quelconques signes d'autoréactivité. Nous avons purifié les anticorps hybrides et montré que, de façon similaire aux sérums totaux, aucun signe d'autoréactivité n'était présent.

Ces cellules ne semblent donc pas contre-sélectionnées lors de leur maturation. Cela indique que l'exclusion allélique des chaînes légères n'est pas un pré-requis au développement des cellules B sous la condition de la tolérance du soi et qu'elle relève plus certainement d'événements stochastiques.

ARTICLE 2: « RNA SURVEILLANCE CONTRIBUTES TO EXCLUSION OF NONFUNCTIONAL κ ALLELES AND DETECTS PREMATURE TERMINATION WITHIN THE LAST κ EXON »

(Accepté le 13 avril 2004 à Proceedings of the National Academy of Sciences, USA)

Comme nous l'avons vu précédemment (chapitre I de ce manuscrit), la recombinaison V(D)J peut induire l'addition ou la délétion de nucléotides de façon aléatoire. Dans certains cas, ces réarrangements génèrent un décalage du cadre de lecture pouvant induire la présence de codons stop prématurés (PTC pour Premature Termination Codon) et par conséquent, la possibilité de produire une chaîne d'immunoglobuline tronquée. Or, bien qu'une forte proportion de lymphocytes matures périphériques possède un allèle non fonctionnel aux loci IgH et/ou IgL, l'expression de telles chaînes tronquées n'est pas observée dans les cellules B normales. Au contraire, les processus de sélection et d'exclusion allélique (détaillée dans le chapitre II de ce manuscrit) permettent la croissance de cellules exprimant une Ig fonctionnelle et non autoréactive codée par un seul allèle de chaînes lourdes et légères. Les mécanismes de l'exclusion allélique ont surtout été étudié lors des étapes précoces des réarrangements V(D)J et aucune étude ne permet d'affirmer qu'une inhibition transcriptionnelle pourrait avoir lieu au niveau des gènes d'Ig « exclus ». Au contraire, l'observation de transcrits κ stériles dans les cellules matures et la récente démonstration d'une transcription germinale sur les deux allèles des chaînes κ dès les stades précoces de développement (Singh et coll., 2003) semble en opposition avec l'existence d'une telle régulation. Cependant, au locus des chaînes κ, environ 30% des cellules matures présente un allèle productif et un allèle non fonctionnel (Coleclough et coll., 1981 ; Arakawa et coll., 1996) mais seulement 7% des séquences d'ADN complémentaire obtenues après amplification montrent un décalage du cadre de lecture (Troutaud et coll., 1999). Ce faible taux de transcrits stériles semblent d'une part, confirmer le fait qu'une inhibition de la transcription, si elle existe, est pour le moins incomplète et d'autre part, met en avant la possibilité d'une surveillance des ARN au niveau des transcrits hors-phase d'Ig. En effet, l'élimination précoce (par le phénomène de NMD pour Nonsense Mediated Decay) et/ou l'inhibition d'épissage (par le phénomène de NAS pour Nonsense Altered Splicing) de ces transcrits pourrait contribuer à la faible représentation de l'allèle hors-phase parmi le pool de transcrits matures (Aoufouchi et coll., 1996). Nous avons déjà vu que la NMD était particulièrement efficace au niveau des transcrits de chaînes lourdes (chapitre I.3.3) mais peu d'études ont été menées sur les chaînes légères. De plus, l'étude de la surveillance des

ARN au niveau de ces transcrits semble particulièrement intéressante puisque ces gènes sont composés de seulement trois exons. Des mutations dans le deuxième exon lors du phénomène d'hypermutation somatique ont révélé l'existence d'une inhibition de l'épissage (NAS) des transcrits contenant des PTC (Lozano et coll., 1994 ; Aoufouchi et coll., 1996). Cependant, aucune étude n'a permis d'apprécier le rôle de la surveillance des ARN lors des décalages du cadre de lecture provoqués par les recombinaisons V-J. De plus, les PTC créés par des jonctions V-J hors phases se situent soit dans le dernier exon, soit à seulement 3 nucléotides en aval de la dernière jonction exon-exon. Ces PTC ne possèdent donc pas les éléments classiquement considérés comme requis pour le processus de NMD. Il nous a dès lors paru intéressant d'explorer les mécanismes de régulation qui inhibent la synthèse d'Ig tronquées.

Résultats et discussion de l'article 2 :

Afin d'analyser l'efficacité de la surveillance des ARN, nous avons étudié la fréquence des transcrits κ présentant ou non un décalage du cadre de lecture. Cette étude a été menée d'une part dans les cellules pro-B issues de souris inactivées au locus IgH précédemment réalisées au laboratoire par Laurent Delpy (Delpy et coll., 2002) et d'autre part dans les cellules B à différents stades de différenciation issues de souris sauvages.

Le premier modèle nous a permis de nous affranchir des processus habituels de sélection cellulaire qui privilégient les cellules exprimant une Ig fonctionnelle. Les cellules pro-B issues de ces souris effectuent activement des réarrangements au locus κ comme cela a été précédemment démontré dans d'autres souris inactivées au locus IgH (Bentolila et coll., 1999) et l'analyse des transcrits primaires montrent une grande diversité d'utilisation des segments $J\kappa$ et $V\kappa$ démontrant le mode stochastique de réarrangements dans ces cellules n'ayant subi aucune contrainte de sélection (fig.1 de l'article). L'analyse des régions CDR3 de ces séquences montre une forte hétérogénéité de longueur (de 6 à 12 acides aminés) contrastant avec la forte prédominance de CDR3 de 9 acides aminés observés normalement dans des cellules B matures. Ceci peut s'expliquer par l'expression de la TdT au stade pro-B qui n'est normalement plus exprimée au stade habituel des réarrangements κ (pré-B) (Victor et coll., 1994). De plus dans les souris sauvages, les processus de sélection pourraient privilégier des CDR3 de 9 acides aminés de par leur meilleure capacité à s'associer aux chaînes lourdes d'Ig (pour revue Meffre et coll., 2000).

De manière très intéressante, l'analyse des transcrits matures par séquençage direct ou l'analyse de la longueur des CDR3 par la technique de Genescan montre que si le nombre de

réarrangements hors-phases au niveau de l'ADN et des transcrits primaires (non épissés) correspond à ce que l'on peut attendre d'un processus stochastique, celui-ci diminue fortement dans les transcrits matures. Nous démontrons que ce processus peut être en partie attribué à de la NMD puisque une inhibition de la synthèse protéique par du cycloheximide, connue pour bloquer le processus de NMD (Carte et coll., 1995), induit une augmentation des transcrits matures hors-phases. Ce processus d'élimination des transcrits hors-phase a lieu aussi efficacement dans le cas de PTC situés dans le dernier ou l'avant dernier exon ce qui met en lumière l'existence d'une surveillance des transcrits κ ne requérant pas les éléments classiquement considérés comme requis pour le processus de NMD.

Les mêmes expériences ont été menées sur des cellules B à différents stades de maturation de souris sauvages. En accord avec de précédentes études, la totalité des transcrits matures dont nous avons étudiés la séquence sont fonctionnels mais la présence d'un taux élevé de transcrits primaires hors-phases démontre 1) l'existence d'une transcription des allèles κ exclus excluant la potentielle inhibition transcriptionnelle de ces allèles, 2) la grande efficacité des processus de surveillance des ARN de chaînes légères κ , γ compris dans les cellules B matures.

Ainsi, ce travail met en lumière un mécanisme supplémentaire permettant d'expliquer le maintien de l'exclusion allélique des chaînes légères dans des cellules possédant deux allèles réarrangés et ceci, non pas au niveau transcriptionnel, mais au niveau traductionnel.

DEUXIEME PARTIE : SYNDROME DE FANCONI

ARTICLE 3 : « UNUSUAL CLINICAL, PATHOLOGIC AND MOLECULAR FEATURES IN FANCONI SYNDROME INDUCED BY A MONOCLONAL VKIII LIGHT CHAIN IN A PATIENT WITH WALDENSTRÖM'S MACROGLOBULINEMIA »

(Soumis à *Kidney International*)

Notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années aux caractéristiques moléculaires des Ig responsables des diverses néphropathies associées aux dyscrasies plasmocytaires. Ainsi, les séquences primaires de plusieurs chaînes légères d'Ig monoclonales responsables de SF ont pu être caractérisées. La stratégie utilisée consiste à cloner l'ADN complémentaire de la chaîne incriminée à partir d'extraits de moelle osseuse des patients (ce qui est le plus souvent rendu facile par la prolifération monoclonale plasmocytaire) et d'en déduire la séquence protéique. La dizaine de séquences étudiées par cette méthode a fait apparaître plusieurs caractéristiques communes (voir chapitre III.2.2.b), mais laisse aussi transparaître une certaine hétérogénéité de structure, avec certaines différences entre les chaînes légères possédant la propriété de former des cristaux, et celles qui ne cristallisent pas. A cette hétérogénéité biochimique s'ajoute une hétérogénéité clinique du SF : la majorité des SF compliquent des myélomes de faible masse tumorale, mais certains cas s'associent à des proliférations plasmocytaires sévères (tableau 2). D'autres part, bien que fréquentes, les propriétés de cristallisation ou de résistance à la protéolyse des chaînes légères ne sont pas constantes (Deret et coll., 1999 ; Decourt et coll., 2003 ; pour revue : Messiaen et coll., 2000). Bien que le faible nombre de séquences analysées ne permette pas d'établir une corrélation absolue, il semble que les chaînes de SF ne cristallisant pas et/ou n'étant pas résistantes à la protéolyse, soient fréquemment associées à des myélomes à forte masse tumorale (Deret et coll., 1999 ; Messiaen et coll., 2000).

Résultats et discussion de l'article 3:

L'étude effectuée dans cette publication a été réalisée en collaboration avec l'équipe de néphrologie de Poitiers et a porté sur l'observation d'un patient (SOU) atteint d'un SF complet consécutif à une maladie de Waldenström. La biopsie rénale montre un infiltrat interstitiel lympho-plasmocytaire tumoral par les lymphocytes B CD20+. Les cellules tubulaires proximales sont le siège d'une

athrocytose protéique abondante constituée de chaînes légères monoclonales κ . Aucune structure cristalline n'est observée dans le cytoplasme des cellules tubulaires proximales ou des lymphocytes tumoraux interstitiels en microscopie électronique. Le patient a reçu un traitement par fludarabine qui a permis une rémission de la maladie hématologique accompagnée d'une amélioration des manifestations rénales du SF.

Nous avons réalisé l'étude de la séquence complète de la chaîne légère κ monoclonale *SOU*, déduite de l'ADN complémentaire. La chaîne *SOU* comporte un segment variable de type $V\kappa III$ dérivant du gène germinale L2/L16 normalement réarrangé à un segment $J\kappa IV$. Aucune mutation de la région constante n'a été mise en évidence mais sept mutations ponctuelles ont été observées dans la région variable par comparaison avec les séquences germinales. Une seule de ces mutations n'a jamais été décrite (substitution d'un résidu lysine invariant en position 107 par un acide glutamique) et induit une nette modification de charge et de polarité. La modélisation en 3 dimensions de la chaîne *SOU* a aussi permis de mettre en évidence une potentielle modification des forces électrostatiques en position 92, due à la proximité d'un acide aspartique avec les chaînes latérales de deux autres résidus (valine 2 et sérine 32). Enfin, la chaîne *SOU* se singularise par des mutations dans la région du peptide signal, communes à une autre chaîne légère $V\kappa III$ (*REV*) impliquée dans une LCDD. Ces mutations, dans le cas de *REV*, induisent une délétion du premier acide aminé N-terminal, résultant en une séquence protéique débutant par un groupe inhabituel de 3 acides aminés hydrophobes. Le rôle potentiel de cette particularité dans la toxicité de ces chaînes reste à déterminer mais il sera intéressant de vérifier si une telle délétion a lieu dans la protéine *SOU* par l'étude de sa séquence protéique. Nous avons par ailleurs testé la sensibilité de la chaîne *SOU*, isolée et purifiée à partir des urines du patient, à la protéolyse. A l'opposé de *CHEB*, une autre chaîne $V\kappa I$ responsable de SF, la protéine *SOU* est entièrement digérée par le trypsine. A notre connaissance, une seule autre chaîne du sous-groupe de variabilité $V\kappa III$ a été décrite lors d'un SF (*VAL*) (Deret et coll., 1999). De manière intéressante, comme la chaîne *SOU*, cette chaîne n'est ni associée à la formation de cristaux intracellulaires, ni résistante à la protéolyse. Cependant, aucune similarité entre les chaînes légères $V\kappa III$ de SF n'a pu être mise en évidence lors de la comparaison des séquences des deux chaînes *SOU* et *VAL*, qui ne présentent pas non plus de motif commun avec les chaînes $V\kappa I$ de SF initialement décrites par notre groupe (résultats non montrés).

Au final, ce travail confirme donc la possible association d'un SF sans cristaux à une prolifération plasmocytaire de malignité réduite. Cette étude permet aussi de montrer que les caractéristiques moléculaires des chaînes légères κ impliquées dans le FS sont plus hétérogènes que ne semblait le suggérer les études précédentes. Même si un nombre plus important de chaînes

légères de FS méritent d'être analysées, l'inconstance des propriétés de cristallisation ou de résistance à la protéolyse suggère un mécanisme direct de toxicité des chaînes légères dans l'inhibition des fonctions de réabsorption tubulaire proximale dépendant du sodium.

ARTICLE 4 : « A TRANGENIC MODEL OF ACQUIRED FANCONI'S SYNDROME DEMONSTRATES THE ROLE OF THE κ CHAIN V DOMAIN AND THE POTENTIAL REVERSIBILITY OF RENAL DAMAGE »

(Manuscrit provisoire)

Depuis la découverte des propriétés néphrotoxiques de certaines chaînes d'Ig, plusieurs modèles *in vitro* ont démontré les capacités d'agrégation de certaines chaînes légères, en particulier responsables d'amylose AL (Glennner et coll., 1971 ; Linke et coll. 1973 ; Klafki et coll., 1993). Ces études ont donné lieu à différentes hypothèses quant à la formation des fibrilles amyloïdes, avec comme point commun l'importance de la région variable. Plus récemment, d'autres travaux utilisant des modèles *in vitro* ont démontré l'importance de certains résidus spécifiques dans l'agrégation des chaînes légères amyloïdogènes (Hurle et coll., 1994 ; Helms et Wetzell, 1996). La formation de fibrilles à partir de chaînes légères issues de patients atteints d'amylose AL a aussi été étudiée sur des cultures de cellules mésangiales (Tagouri et coll., 1996). Les auteurs ont démontré le rôle actif de ces cellules dans la formation des dépôts, mais aussi la nécessité d'autres facteurs favorisants tel que l'Amyloid Enhancing Factor.

Les modèles *in vivo*, réalisés par l'injection de protéines de Bence-Jones, ou *ex vivo*, induits par la perfusion de néphrons, ont quand à eux permis de démontrer le caractère néphrotoxique de certaines chaînes légères d'Ig (Clyne et coll., 1974 ; Koss et coll., 1976 ; Smolens et coll., 1986 ; Sanders et coll., 1987 ; Solomon et coll., 1991 ; Solomon et coll., 1992). Cependant, ces modèles ne reproduisent pas les conditions physiologiques car ils nécessitent l'injection de très importantes quantités de protéines allant jusqu'à plusieurs grammes dans le cas du modèle d'amylose AL de Solomon et collaborateurs (1992). De plus, ils ne permettent que la reproduction transitoire des stades initiaux de la maladie, le sacrifice des animaux étant réalisé très rapidement après les injections. Afin de contourner le caractère limitant et non reproductible de l'injection de grandes quantités de protéines de Bence Jones, notre équipe a établi en 1995 un modèle plus proche de la pathologie humaine, par « greffe de tumeurs » (Khamlichi et coll., 1995). Dans ce modèle, l'ADN complémentaire correspondant à la chaîne pathogène est cloné dans un vecteur permettant une forte expression dans les cellules de la lignée B (Khamlichi et coll., 1994 ; Chauveau et coll., 1998). Ces constructions sont transfectées dans des cellules SP2/0 (hybridome murin syngénique ne produisant aucune Ig endogène). Les clones de cellules transfectées (« *transfectomes* ») sécrétant

les plus importantes quantités de chaînes sont alors injectés par voie intrapéritonéale à des souris Balb/c. Celles-ci développent une tumeur avec une forte expression de la chaîne légère pathogène humaine. Les études histologiques menées sur les organes prélevés après sacrifice des animaux (4 à 8 semaines après injection) ont révélé des lésions typiques de la maladie et identiques à celles observées chez le patient dont provient la chaîne légère étudiée. Ce modèle a permis de reproduire les lésions rénales de LCDD grâce à l'ADNc correspondant à la chaîne légère du patient *FRA* (Khamlichi et coll., 1995) et plus récemment, celles d'un syndrome de Fanconi et d'une NCM grâce respectivement aux ADNc correspondant à la chaîne légère du patient *CHEB* et à la chaîne témoin 269 (Decourt et coll., 1999). Outre le fait que ce système ne nécessite pas de purifier la protéine pathogène, il permet aussi de modifier à loisir la séquence de la chaîne légère par mutagenèse dirigée. Ainsi, il a été montré que la modification d'un seul acide aminé d'une chaîne κ responsable d'un syndrome de Fanconi peut empêcher sa cristallisation dans les cellules tubulaires rénales (Decourt et coll., 1999). Malheureusement, dans ces modèles, la survie des souris reste brève en raison du développement rapide des cellules tumorales injectées aux souris. Ceci compromet l'exploration métabolique *in vivo* de animaux, l'étude des mécanismes physiopathologiques à l'origine des anomalies de la réabsorption tubulaire proximale ainsi que toute approche thérapeutique. Pour parer à ces problèmes, nous avons entrepris de mettre au point un modèle de souris transgéniques dans lequel la chaîne légère *CHEB* responsable d'un FS est produite et sécrétée par les cellules de la lignée B.

Résultats et discussion de l'article 4:

Les souris transgéniques *CHEB* ont été réalisées grâce à l'insertion du gène codant les domaines V κ J κ de la chaîne légère humaine *CHEB*. Le vecteur de recombinaison utilisé a permis d'insérer ce gène en lieu et place des domaines J κ du locus endogène de la souris, annulant toute possibilité de réarrangements ultérieurs au locus κ . (figure 1). La transfection de cette construction dans des cellules ES de souris, puis l'injection de deux clones positifs dans des blastocystes de souris pseudo-gestantes à permis d'obtenir la transmission germinale stable de la mutation à la descendance. Ne possédant aucun anticorps spécifique de la région V κ J κ humaine, nous avons travaillé uniquement sur des animaux ne pouvant exprimer que la chaîne κ *CHEB*. Cela a pu être obtenu grâce à la délétion de l'ensemble de la région J κ après croisement des souris transgéniques avec des souris exprimant la recombinaise CRE (EIIa CRE). En effet, trois sites *loxP* (séquences reconnues par la recombinaise CRE) ont été insérés dans la construction, permettant après l'action

de la recombinase CRE d'obtenir des allèles délétés du gène de sélection seul (κ *CHEB*) ou délétés de l'ensemble de la région J κ et n'exprimant par conséquent plus de chaînes κ (κ DEL) (figure 1). La délétion du gène de sélection seul s'est avérée particulièrement complexe, puisque la majorité des descendances obtenues après croisement avec les souris EIIa CRE montraient une délétion complète de la construction. Ainsi, plus d'une centaine d'animaux ont du être testés afin d'obtenir une souris possédant un allèle avec le seul gène V κ J κ *CHEB* débarrassé du gène de sélection. L'analyse des souris hétérozygotes (κ -*CHEB*/ κ -DEL) ou homozygotes pour la mutation indique qu'une majorité des cellules B périphériques exprime une chaîne hybride κ *CHEB*, résultant de la traduction d'un ARN correctement épissé sur l'exon constant C κ de souris (figure 1C et figure 2A). Cependant les souris hétérozygotes montrent une plus faible expression de la chaîne κ *CHEB* au niveau membranaire que les souris homozygotes, ce qui est corrélé avec une plus faible quantité de chaînes κ sériques (figure 2B). Du fait de leur très faible taux de sécrétion et du très faible nombre de cellules exprimant la chaîne κ *CHEB* dans les souris possédant encore le gène de sélection (κ -neo), ces souris ne sont pas représentées dans la suite de l'étude.

L'études des reins en microscopie optique et électronique réalisée par l'équipe de néphrologie de Poitiers (Dr. Frank Bridoux et Pr. Guy Touchard) a révélé des lésions typiques d'un FS et similaires à celle du patient *CHEB* avec inclusions cristallines intracytoplasmiques. Ces lésions sont donc provoquées par la chaîne κ hybride, et ceci en l'absence du domaine constant humain. Elles sont plus sévères dans le cas des souris homozygotes que dans le cas des souris hétérozygotes, en directe corrélation avec la quantité de chaînes κ sériques (figure 3 ; figure 4A et B ; figure 5). Pour la première fois dans un modèle animal de néphropathie induite par une chaîne légère monoclonale, des études biochimiques ont pu être menées *in vivo*. Elles révèlent un dysfonctionnement de la réabsorption tubulaire proximale avec notamment une excrétion fractionnelle du phosphore et de l'acide urique (responsable d'une hypouricémie franche) significativement plus élevée que dans les souris « contrôles », ces deux caractéristiques étant typiques du diagnostic de FS. Une tendance à l'hypophosphatémie et une glycosurie sont aussi observées mais sans atteindre une significativité statistique. Il est à noter qu'au contraire des lésions tubulaires, aucune différence entre les souris hétéro et homozygotes n'est observées lors de ces études biochimiques, ce qui pourrait suggérer une toxicité directe et précoce de la chaîne légère *CHEB*, à des concentrations plus faibles que celles nécessaires à la formation des cristaux intracytoplasmiques.

Enfin, la présence de deux sites *loxP* entourant le gène V κ J κ *CHEB* nous a permis d'induire la délétion de la chaîne κ *CHEB* de manière conditionnelle après croisement avec des souris Mx-

CRE. Ces dernières expriment la recombinaise CRE en présence d'IFN α ou β ou après injection intrapéritonéale dans les animaux de pI-pC (mimant les ARN viraux et induisant donc indirectement la production d'IFN). Après croisement, nous avons obtenu deux lignées double transgéniques Mx-CRE hétérozygotes ou homozygotes pour le gène κ *CHEB*. Ces souris ont été soumises à des injections hebdomadaires de pI-pC pendant un mois et sacrifiées au bout de deux mois. La délétion s'est avérée efficace bien que non complète puisque des dosages de chaînes légères ont montré une forte diminution du taux sérique de chaînes κ , mais non leur disparition. L'analyse morphologique rénale par microscopie optique et électronique a cependant révélé la disparition totale des cristaux dans les souris hétérozygotes et une forte diminution des lésions dans les souris homozygotes (figure 4C et D).

En conclusion, nous avons démontré de manière définitive le rôle exclusif de certaines particularités du domaine V dans la toxicité tubulaire et dans la formation des cristaux fréquemment observés dans le SF. De plus, la réversibilité des lésions tubulaires proximales avec la délétion du gène $V\kappa J\kappa$ *CHEB* souligne l'intérêt des thérapeutiques visant à diminuer la production de la chaîne monoclonale en réduisant la masse tumorale. L'obtention de cette lignée animale stable constitue un matériel idéal pour l'exploration des mécanismes physiopathologiques conduisant à la dysfonction tubulaire proximale et devrait permettre d'explorer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les maladies par dépôts d'Ig.

PERSPECTIVES

SURVEILLANCE DES ARN :

Un aspect original et encore peu étudié de la régulation de l'expression des gènes d'Ig a été exploré au cours de ce travail. Il concerne les processus de surveillance des ARN. Nous avons montré que les transcrits de chaînes légères κ possédant des décalages du cadre de lecture (et induisant ainsi des mutations non-sens) étaient sujets à un processus de surveillance des ARN pouvant engendrer leur élimination ou l'inhibition de leur épissage et ainsi, permettre le maintien de l'exclusion allélique des chaînes légères dans des cellules possédant deux allèles réarrangés dont l'un « hors-phase ».

Trois observations intéressantes ressortent de cette étude et vont faire l'objet d'investigations plus poussées :

- Une part importante de la surveillance des ARNm κ relève de mécanismes différents de ceux de la NMD classique et ses mécanismes moléculaires restent donc à caractériser, en particulier quant à l'implication ou non des protéines Upf et d'une machinerie de traduction intra-nucléaire,
- La sensibilité des transcrits κ hors-phases à cette « voie alterne de la NMD » semble supérieure pour ceux ayant fait des réarrangements sur le segment J κ 5 que pour les autres segments J κ . Hors les séquences de tous les segments J κ sont très homologues et leurs différences majeures sont localisées au niveau des introns flanquants. Nos observations suggèrent donc un lien étroit entre épissage et « voie alterne de la NMD ». Elles suggèrent aussi qu'une séquence intronique telle que celle située immédiatement en aval des J κ , puisse jouer un rôle stimulateur des phénomènes de surveillance des ARN. Il serait intéressant d'apprécier le rôle de ces séquences introniques dans un système *in vitro* par la réalisation de vecteurs d'expression construits de façon à associer à un même exon V κ J κ des séquences introniques différentes, soient entières, soient tronquées. Un tel système serait propice à une analyse mutationnelle des séquences précisément impliquées dans le phénomène.
- notre étude nous a permis de montrer la puissance des méthodes d'analyse par électrophorèse par la méthode « Genescan » pour l'analyse de ces phénomènes au niveau des gènes d'Ig. De façon préliminaire, cette même méthode nous a permis de confirmer qu'une transcription des allèles non-fonctionnels de chaînes lourdes avait lieu à un niveau significatif dans les cellules B matures (confirmant ainsi les déductions indirectes faites lors de l'étude du taux de mutation somatique des allèles « en phase » versus « hors-phase », voir l'article 1 des annexes). Cette constatation nous incite à poursuivre largement ces tests

préliminaires, afin d'évaluer avec précision l'importance de la transcription bi-allélique des locus IgH dans les cellules B matures (et par voie de conséquence l'intérêt physiologique des phénomènes de type NMD à ce locus).

MODELE DE SOURIS « KNOCK-IN » $V_{\kappa}J_{\kappa}$:

L'étude des souris transgéniques possédant une insertion génique (knock-in) d'un domaine $V_{\kappa}J_{\kappa}$ humain en remplacement des gènes J_{κ} endogènes, nous a permis d'avancer l'hypothèse que l'exclusion allélique ou tout du moins isotypique des chaînes légères relevait certainement plus d'évènements stochastiques que d'une réelle régulation visant à éliminer les cellules exprimant plusieurs récepteurs.

Ce modèle a de plus été généré dans l'espoir d'étudier un autre phénomène encore non clairement élucidé : la révision du BCR. En effet, alors que de nombreux travaux initiaux tendaient à montrer que des recombinaisons secondaires pouvaient aussi avoir lieu en périphérie (notamment dans les centres germinatifs lors des processus de sélection par l'antigène) (Han et coll., 1997 ; Papavasiliou et coll., 1997 ; Hikida et Ohmori, 1998 ; Meffre et coll., 1998), l'étude des souris RAG:GFP (Monroe et coll., 1999 ; Yu et coll., 1999) a beaucoup relativisé l'ampleur de ce phénomène en montrant qu'il semblait se restreindre à des cellules encore immatures nouvellement émigrées de la moelle osseuse et exprimant encore un faible taux d'enzyme RAG. Ces données contradictoires méritent d'être approfondies et nous nous posons en particulier la question de savoir si des cellules B périphériques matures perdant l'expression d'une chaîne du BCR (comme cela doit arriver fréquemment lors de l'accumulation de mutations somatiques) peuvent bénéficier d'une chance de sauvetage par réinduction de RAG et réarrangement secondaire. Dans ce but, les souris knock-in utilisées au cours de ma thèse, ont été réalisées de manière à pouvoir induire une délétion conditionnelle du gène inséré. En effet, deux sites loxP ont été placés de part et d'autre du gène $V_{\kappa}J_{\kappa}$ humain. Après croisement avec des souris Mx1-cre, dans lesquelles le gène CRE est placé sous le contrôle du promoteur Mx1 inductible par les interférons (IFN) α/β (Kuhn et coll., 1996), il est possible d'induire la délétion du gène « floxé » par injection intrapéritonéale de pI-pC, un ARN double brin synthétique qui induit la production d'IFN α/β par les cellules de la réponse immunitaire non spécifique. Ce système semble fonctionner de façon efficace puisqu'il a permis de diminuer fortement le taux de chaînes légères κ après induction dans le modèle expérimental de SF détaillé dans l'article 4. D'autre part, comme on peut le voir dans cet article (figure 6 de l'article), la

délétion est relativement rapide et devrait ainsi nous permettre d'évaluer l'effet d'une délétion du BCR en périphérie causée par la perte d'une chaîne légère. Ce système a déjà été utilisé dans le cadre d'une délétion de chaîne lourde d'Ig (Lam et coll., 1997) mais de par l'organisation de leur gènes, les chaînes lourdes ne sont que très rarement sujettes à des réarrangements secondaires. Au contraire, la disponibilité du locus des chaînes légères λ dans notre modèle laisse la possibilité de ce type de réarrangements en périphérie. Nous nous proposons d'évaluer ainsi la stimulation éventuelle des phénomènes de révision du récepteur en mesurant de façon quantitative l'expression de RAG après délétion κ . Ces tests seront réalisés soit directement dans notre lignée transgénique soit après transfert de cellules B à différents stades de maturations dans des lignées immunodéficientes, permettant ainsi de nous affranchir du repeuplement du compartiment B périphérique par les cellules émigrant en permanence de la moelle osseuse d'animaux immunocompétents.

De plus, il est maintenant admis qu'une perturbation initiale de l'homéostasie d'un clone de cellules B constitue souvent la première étape vers l'apparition d'un syndrome lymphoprolifératif. Chez les patients immunodéficients (SIDA, immunosuppression post-greffe d'organe...) ou encore lors de maladies auto-immunes, de tels troubles de l'homéostasie des lymphocytes B s'accompagnent d'une hyperprolifération et d'une survenue fréquente de lymphomes. Notre modèle devrait permettre l'analyse des perturbations et/ou des mécanismes compensateurs de l'homéostasie des cellules B dans les divers compartiments, en réponse à une déplétion partielle de ces compartiments (notre modèle permettant vraisemblablement d'induire sous l'effet de l'expression Mx-cre et de la délétion κ l'apoptose d'une grande partie des cellules B matures et l'apparition brutale d'une lymphopénie). Même s'ils existe d'autres moyens d'induire une lymphopénie, celui-ci présente plusieurs avantages :

- il est spécifique des cellules B (contrairement à l'utilisation éventuelle de l'irradiation ou de drogues cytotoxiques qui provoqueraient de nombreux effets secondaires non spécifiques)
- il préserve totalement une partie des cellules B (exprimant des chaînes λ) dont les capacités de repeuplement des compartiments lymphoïdes périphériques pourront donc être étudiées sans que des techniques complexes de reconstitution par greffe de moelle osseuse ou de progéniteurs lymphoïdes ne soient nécessaires.
- Ces résultats nous permettront notamment de modéliser la restauration de l'homéostasie lymphocytaire en sortie de lymphopénie (telle qu'elle survient chez des patients après chimiothérapie lourde éventuellement suivie d'autogreffe de moelle).

- Enfin, il sera intéressant dans ce modèle de regarder si la délétion de la chaîne légère ne peut pas conduire à la production de chaînes lourdes tronquées telles que celles observées dans les « *maladies des chaînes lourdes* ». Ces pathologies largement étudiées par le laboratoire dans le passé sont caractérisées par la production de chaînes lourdes tronquées sécrétées en l'absence de chaîne légères. Encore totalement obscure, leur « histoire naturelle » a notamment été interprétée comme liée à la perte initiale par un clone B de la synthèse des chaînes légères, cet événement sélectionnant ensuite des variants de la chaîne lourde capables malgré cela d'échapper à une rétention intra-cellulaire. Notre système permettra donc de tester l'apparition de tels variants induite par la délétion « cre » du gène κ .

SYNDROME DE FANCONI :

La plupart des séquences de chaînes légères de SF étudiées font partie du sous groupe de variabilité V κ I, dérivent des gènes germinaux O2/O12 ou O8/O18 et partagent une propension fréquente à précipiter sous forme de cristaux, alors volontiers retrouvés dans le cytoplasme des cellules tubulaires proximales. Seules deux séquences analysées dans la littérature jusqu'ici, dont celle qui fait l'objet de l'article 3, dérivent du sous groupe de variabilité V κ III et de manière intéressante, aucune des deux ne présente de résistance à la protéolyse (pourtant caractéristique de la majorité des chaînes SF), ni ne forme de cristaux. Bien que les chaînes légères de SF ne formant pas de cristaux aient été souvent associées à la présence de masses tumorales élevées, notre étude montre qu'il ne s'agit pas là d'une constante et met en avant la possibilité d'une toxicité directe de certaines chaînes légères sur la réabsorption tubulaire proximale. L'étude d'un plus grand nombre de séquences de chaînes légères impliquées dans un SF semble être nécessaire à la compréhension de cette pathologie.

Nous avons aussi mis au point un modèle expérimental animal pour cette maladie. Ainsi, des souris transgéniques pour un gène V κ J κ humain de FS inséré dans le locus κ de souris (par ailleurs aussi utilisées pour l'article 2 de cette thèse) ont permis de reproduire les dépôts et les lésions tubulaires caractéristiques d'un FS et ce, en l'absence d'un domaine constant humain, démontrant définitivement le rôle essentiel des particularités du domaine variable dans les processus de dépôt des chaînes légères d'Ig. Grâce au système de délétion précédemment décrit, nous avons aussi montré la possible réversion des lésions sous l'effet d'une diminution du taux des chaînes

pathogéniques circulant dans l'organisme. D'autre part, des études biochimiques ont pu être menées pour la première fois sur un modèle animal de maladies de dépôts et ont révélé l'existence d'une inhibition des fonctions de réabsorption des cellules tubulaires proximales, faisant de ces souris un modèle d'étude idéal pour explorer les caractéristiques physiologiques de cette maladie et la mise au point de thérapies. Un projet d'étude protéomique est d'ailleurs actuellement évoqué avec le laboratoire du Pr. Robert Unwin de Londres, afin d'explorer plus avant notre modèle et de préciser notamment les modifications moléculaires survenant dans les cellules tubulaires sous l'effet de la présence des chaînes légères. Une étude des activités mitochondriales des différents complexes impliqués dans la phosphorylation oxydative sera également tout à fait indiquée dans ce modèle, en sollicitant la coopération de laboratoires maîtrisant ce type de mesures. Notre modèle montre en effet des anomalies morphologiques des mitochondries qui ne sont sans doute pas banales puisque l'on peut rappeler l'existence de formes génétiques du syndrome de Fanconi dont le mécanisme n'implique absolument pas les immunoglobulines mais diverses déficiences enzymatiques congénitales touchant la respiration mitochondriale.

Enfin, le système efficace utilisé pour modéliser le syndrome de Fanconi, par insertion génique au locus κ , devrait très prochainement être étendu et appliqué à la réalisation d'autres modèles expérimentaux de maladies par dépôts d'Ig, LCDD et plus particulièrement amylose AL. En effet, la physiopathologie de ces pathologies reste encore très partiellement comprise et le « vide thérapeutique » auquel sont confrontés les cliniciens face à ces patients rend particulièrement attractive et souhaitable l'obtention de modèles animaux adaptés à des essais thérapeutiques.

ANNEXES

***ARTICLE 5 : SOMATIC HYPERMUTATION WITNESSES ALLELIC INCLUSION AT THE
TRANSCRIPTIONAL LEVEL FOR NON-FUNCTIONALLY REARRANGED IGH GENES OF
MATURE B CELLS***

(en révision à Journal of Immunology)

***BREVET : MAMMIFERE NON-HUMAIN TRANSGENIQUE POUR LA
REGION CONSTANTE DE LA CHAINE LOURDE DES IMMUNO-
GLOBULINES HUMAINES DE CLASSE A ET SES APPLICATIONS***
(déposé, Novembre 2003)

***ARTICLE 6 : EXPRESSION OF MEMBRANE IGA CAN SUBSTITUTE FOR IGM
THROUGHOUT B CELL DIFFERENTIATION***

(Manuscrit en préparation)

ARTICLE 7 : IMMUNOGLOBULIN DECREASED SOLUBILITY DISEASES : PATHOLOGIES OF THE V DOMAINS ?

(Revue parue dans : « Monoclonal gammopathies of the kidney », Touchard G., Aucouturier P., Hermine O., Ronco P., eds., Kluwer. 2003)

BIBLIOGRAPHIE

A.

- Allman, D., Li, J. and Hardy, R.R. (1999) Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *J Exp Med*, **189**, 735-740.
- Allman, D.M., Ferguson, S.E., Lentz, V.M. and Cancro, M.P. (1993) Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J Immunol*, **151**, 4431-4444.
- Alt, F.W., Blackwell, T.K. and Yancopoulos, G.D. (1987) Development of the primary antibody repertoire. *Science*, **238**, 1079-1087.
- 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.
- Aoufouchi, S., Yelamos, J. and Milstein, C. (1996) Nonsense mutations inhibit RNA splicing in a cell-free system: recognition of mutant codon is independent of protein synthesis. *Cell*, **85**, 415-422.
- Arakawa, H., Shimizu, T. and Takeda, S. (1996) Re-evaluation of the probabilities for productive arrangements on the kappa and lambda loci. *Int Immunol*, **8**, 91-99.
- Arnold, B., Dill, O., Kublbeck, G., Jatsch, L., Simon, M.M., Tucker, J. and Hammerling, G.J. (1988) Alloreactive immune responses of transgenic mice expressing a foreign transplantation antigen in a soluble form. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 2269-2273.
- Arnold, L.W., McCray, S.K., Tatu, C. and Clarke, S.H. (2000) Identification of a precursor to phosphatidyl choline-specific B-1 cells suggesting that B-1 cells differentiate from splenic conventional B cells in vivo: cyclosporin A blocks differentiation to B-1. *J Immunol*, **164**, 2924-2930.
- Aucouturier, J., Dupuis, L. and Ganne, V. (2001) Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*, **19**, 2666-2672.
- Aucouturier, P., Bauwens, M., Khamlichi, A.A., Denoroy, L., Spinelli, S., Touchard, G., Preud'homme, J.L. and Cogne, M. (1993) Monoclonal Ig L chain and L chain V domain fragment crystallization in myeloma-associated Fanconi's syndrome. *J Immunol*, **150**, 3561-3568.
- Aucouturier, P., Khamlichi, A.A., Preud'homme, J.L., Bauwens, M., Touchard, G. and Cogne, M. (1992) Complementary DNA sequence of human amyloidogenic immunoglobulin light-chain precursors. *Biochem J*, **285 (Pt 1)**, 149-152.

B.

- Ballard, D.W. and Bothwell, A. (1986) Mutational analysis of the immunoglobulin heavy chain promoter region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 9626-9630.
- Barreto, V. and Cumano, A. (2000) Frequency and characterization of phenotypic Ig heavy chain allelically included IgM-expressing B cells in mice. *J Immunol*, **164**, 893-899.
- Batuman, V., Verroust, P.J., Navar, G.L., Kaysen, J.H., Goda, F.O., Campbell, W.C., Simon, E., Pontillon, F., Lyles, M., Bruno, J. and Hammond, T.G. (1998) Myeloma light chains are ligands for cubilin (gp280). *Am J Physiol*, **275**, F246-254.
- Baumann, B., Potash, M.J. and Kohler, G. (1985) Consequences of frameshift mutations at the immunoglobulin heavy chain locus of the mouse. *Embo J*, **4**, 351-359.

- Bell, S.E. and Goodnow, C.C. (1994) A selective defect in IgM antigen receptor synthesis and transport causes loss of cell surface IgM expression on tolerant B lymphocytes. *Embo J*, **13**, 816-826.
- Bellotti, V., Stoppini, M., Merlini, G., Zapponi, M.C., Meloni, M.L., Banfi, G. and Ferri, G. (1991) Amino acid sequence of k κ Sci, the Bence Jones protein isolated from a patient with light chain deposition disease. *Biochim Biophys Acta*, **1097**, 177-182.
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L. and Weintraub, H. (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, **61**, 49-59.
- Bentolila, L.A., Olson, S., Marshall, A., Rougeon, F., Paige, C.J., Doyen, N. and Wu, G.E. (1999) Extensive junctional diversity in Ig light chain genes from early B cell progenitors of mu MT mice. *J Immunol*, **162**, 2123-2128.
- Berek, C., Berger, A. and Apel, M. (1991) Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*, **67**, 1121-1129.
- Berek, C. and Milstein, C. (1988) The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol Rev*, **105**, 5-26.
- Berg, J., McDowell, M., Jack, H.M. and Wabl, M. (1990) Immunoglobulin lambda gene rearrangement can precede kappa gene rearrangement. *Dev Immunol*, **1**, 53-57.
- Bergsagel, D.E., Cowan, D.H. and Hasselback, R. (1972) Plasma cell myeloma: response of melphalan-resistant patients to high-dose intermittent cyclophosphamide. *Can Med Assoc J*, **107**, 851-855.
- Bertrand, F.E., Eckfeldt, C.E., Fink, J.R., Lysholm, A.S., Pribyl, J.A., Shah, N. and LeBien, T.W. (2000) Microenvironmental influences on human B-cell development. *Immunol Rev*, **175**, 175-186.
- Birn H, Leboulleux L, Moestrup SK, Ronco PM, Aucouturier P, Christensen EI 2003. Megalin, cubulin and immunoglobulin light chains: receptor-mediated uptake of light chains in kidney proximal tubule. In Monoclonal gammopathies and the kidney. G. Touchard, P. Aucouturier, O. Hermine, and P. Ronco, editors. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 37-48.
- Blackwell, T.K., Malynn, B.A., Pollock, R.R., Ferrier, P., Covey, L.R., Fulop, G.M., Phillips, R.A., Yancopoulos, G.D. and Alt, F.W. (1989) Isolation of scid pre-B cells that rearrange kappa light chain genes: formation of normal signal and abnormal coding joins. *Embo J*, **8**, 735-742.
- Blade, J. and Kyle, R.A. (1999) Nonsecretory myeloma, immunoglobulin D myeloma, and plasma cell leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, **13**, 1259-1272.
- Blond-Elguindi, S., Fourie, A.M., Sambrook, J.F. and Gething, M.J. (1993) Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *J Biol Chem*, **268**, 12730-12735.
- Bottaro, A., Young, F., Chen, J., Serwe, M., Sablitzky, F. and Alt, F.W. (1998) Deletion of the IgH intronic enhancer and associated matrix-attachment regions decreases, but does not abolish, class switching at the mu locus. *Int Immunol*, **10**, 799-806.
- Bradl, H. and Jack, H.M. (2001) Surrogate light chain-mediated interaction of a soluble pre-B cell receptor with adherent cell lines. *J Immunol*, **167**, 6403-6411.
- Bradl, H., Wittmann, J., Milius, D., Vettermann, C. and Jack, H.M. (2003) Interaction of murine precursor B cell receptor with stroma cells is controlled by the unique tail of lambda5 and stroma cell-associated heparan sulfate. *J Immunol*, **171**, 2338-2348.

- Braun, U., Rajewsky, K. and Pelanda, R. (2000) Different sensitivity to receptor editing of B cells from mice hemizygous or homozygous for targeted Ig transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7429-7434.
- Brauninger, A., Goossens, T., Rajewsky, K. and Kuppers, R. (2001) Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol*, **31**, 3631-3637.
- Buhler, M., Wilkinson, M.F. and Muhlemann, O. (2002) Intranuclear degradation of nonsense codon-containing mRNA. *EMBO Rep*, **3**, 646-651.
- Burnet F.M., The clonal selection theory of acquired immunity (The University Press, Cambridge, 1959)
- Burrows, P.D., Stephan, R.P., Wang, Y.H., Lassoued, K., Zhang, Z. and Cooper, M.D. (2002) The transient expression of pre-B cell receptors governs B cell development. *Semin Immunol*, **14**, 343-349.
- Busslinger, M., Nutt, S.L. and Rolink, A.G. (2000) Lineage commitment in lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol*, **12**, 151-158.

C.

- Cariappa, A. and Pillai, S. (2002) Antigen-dependent B-cell development. *Curr Opin Immunol*, **14**, 241-249.
- Carter, M.S., Doskow, J., Morris, P., Li, S., Nhim, R.P., Sandstedt, S. and Wilkinson, M.F. (1995) A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J Biol Chem*, **270**, 28995-29003.
- Casellas, D. and Moore, L.C. (2003) The juxtamedullary nephron preparation. *Methods Mol Med*, **86**, 413-427.
- Casellas, R., Shih, T.A., Kleinewietfeld, M., Rakonjac, J., Nemazee, D., Rajewsky, K. and Nussenzweig, M.C. (2001) Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science*, **291**, 1541-1544.
- Chen, C. and Birshtein, B.K. (1997) Virtually identical enhancers containing a segment of homology to murine 3'IgH-E(hs1,2) lie downstream of human Ig C alpha 1 and C alpha 2 genes. *J Immunol*, **159**, 1310-1318.
- Chen, J. and Alt, F.W. (1993) Gene rearrangement and B-cell development. *Curr Opin Immunol*, **5**, 194-200.
- Chen, J., Trounstein, M., Alt, F.W., Young, F., Kurahara, C., Loring, J.F. and Huszar, D. (1993) Immunoglobulin gene rearrangement in B cell deficient mice generated by targeted deletion of the JH locus. *Int Immunol*, **5**, 647-656.
- Chen, J., Trounstein, M., Kurahara, C., Young, F., Kuo, C.C., Xu, Y., Loring, J.F., Alt, F.W. and Huszar, D. (1993) B cell development in mice that lack one or both immunoglobulin kappa light chain genes. *Embo J*, **12**, 821-830.
- Chumley, M.J., Dal Porto, J.M., Kawaguchi, S., Cambier, J.C., Nemazee, D. and Hardy, R.R. (2000) A VH11V kappa 9 B cell antigen receptor drives generation of CD5+ B cells both in vivo and in vitro. *J Immunol*, **164**, 4586-4593.
- Chung, J.B., Sater, R.A., Fields, M.L., Erikson, J. and Monroe, J.G. (2002) CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. *Int Immunol*, **14**, 157-166.

- Chung, J.B., Silverman, M. and Monroe, J.G. (2003) Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol*, **24**, 343-349.
- Cogne, M. and Guglielmi, P. (1993) Exon skipping without splice site mutation accounting for abnormal immunoglobulin chains in nonsecretory human myeloma. *Eur J Immunol*, **23**, 1289-1293.
- Cogne, 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.
- Cogne, M. and Preud'homme, J.L. (1990) Gene deletions force nonsecretory alpha-chain disease plasma cells to produce membrane-form alpha-chain only. *J Immunol*, **145**, 2455-2458.
- Cogne, M., Preud'homme, J.L., Bauwens, M., Touchard, G. and Aucouturier, P. (1991) Structure of a monoclonal kappa chain of the V kappa IV subgroup in the kidney and plasma cells in light chain deposition disease. *J Clin Invest*, **87**, 2186-2190.
- Cogne, M., Silvain, C., Khamlichi, A.A. and Preud'homme, J.L. (1992) Structurally abnormal immunoglobulins in human immunoproliferative disorders. *Blood*, **79**, 2181-2195.
- Coleclough, C., Perry, R.P., Karjalainen, K. and Weigert, M. (1981) Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression. *Nature*, **290**, 372-378.
- Coleclough, C. and Wood, D. (1984) Introns excised from immunoglobulin pre-mRNAs exist as discrete species. *Mol Cell Biol*, **4**, 2017-2022.
- Conley, M.E., Rohrer, J., Rapalus, L., Boylin, E.C. and Minegishi, Y. (2000) Defects in early B-cell development: comparing the consequences of abnormalities in pre-BCR signaling in the human and the mouse. *Immunol Rev*, **178**, 75-90.
- Connor, A., Wiersma, E. and Shulman, M.J. (1994) On the linkage between RNA processing and RNA translatability. *J Biol Chem*, **269**, 25178-25184.
- Constantinescu, A. and Schlissel, M.S. (1997) Changes in locus-specific V(D)J recombinase activity induced by immunoglobulin gene products during B cell development. *J Exp Med*, **185**, 609-620.
- Corcoran, A.E., Riddell, A., Krooshoop, D. and Venkitaraman, A.R. (1998) Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature*, **391**, 904-907.
- Corcoran, L.M., Karvelas, M., Nossal, G.J., Ye, Z.S., Jacks, T. and Baltimore, D. (1993) Oct-2, although not required for early B-cell development, is critical for later B-cell maturation and for postnatal survival. *Genes Dev*, **7**, 570-582.
- Corcos, D., Dunda, O., Butor, C., Cesbron, J.Y., Lores, P., Bucchini, D. and Jami, J. (1995) Pre-B-cell development in the absence of lambda 5 in transgenic mice expressing a heavy-chain disease protein. *Curr Biol*, **5**, 1140-1148.
- Corcos, D., Grandien, A., Vazquez, A., Dunda, O., Lores, P. and Bucchini, D. (2001) Expression of a V region-less B cell receptor confers a tolerance-like phenotype on transgenic B cells. *J Immunol*, **166**, 3083-3089.
- Corcos, D., Iglesias, A., Dunda, O., Bucchini, D. and Jami, J. (1991) Allelic exclusion in transgenic mice expressing a heavy chain disease-like human mu protein. *Eur J Immunol*, **21**, 2711-2716.
- Coutinho, A., Kazatchkine, M.D. and Avrameas, S. (1995) Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol*, **7**, 812-818.

- Culbertson, M.R. (1999) RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet*, **15**, 74-80.
- Cyster, J.G., Healy, J.I., Kishihara, K., Mak, T.W., Thomas, M.L. and Goodnow, C.C. (1996) Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45. *Nature*, **381**, 325-328.

D.

- Dammers, P.M., Visser, A., Popa, E.R., Nieuwenhuis, P., Bos, N.A. and Kroese, F.G. (2000) Immunoglobulin VH gene analysis in rat: most marginal zone B cells express germline encoded VH genes and are ligand selected. *Curr Top Microbiol Immunol*, **252**, 107-117.
- Danner, D. and Leder, P. (1985) Role of an RNA cleavage/poly(A) addition site in the production of membrane-bound and secreted IgM mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 8658-8662.
- Decourt, C., Bridoux, F., Touchard, G. and Cogne, M. (2003) A monoclonal V kappa I light chain responsible for incomplete proximal tubulopathy. *Am J Kidney Dis*, **41**, 497-504.
- Decourt, C., Cogne, M. and Rocca, A. (1996) Structural peculiarities of a truncated V kappa III immunoglobulin light chain in myeloma with light chain deposition disease. *Clin Exp Immunol*, **106**, 357-361.
- Decourt, C., Rocca, A., Bridoux, F., Vrtovnik, F., Preud'homme, J.L., Cogne, M. and Touchard, G. (1999) Mutational analysis in murine models for myeloma-associated Fanconi's syndrome or cast myeloma nephropathy. *Blood*, **94**, 3559-3566.
- Decourt, C., Touchard, G., Preud'homme, J.L., Vidal, R., Beaufile, H., Diemert, M.C. and Cogne, M. (1998) Complete primary sequences of two lambda immunoglobulin light chains in myelomas with nonamyloid (Randall-type) light chain deposition disease. *Am J Pathol*, **153**, 313-318.
- Delpy, L., Le Bert, M., Cogne, M. and Khamlichi, A.A. (2003) Germ-line transcription occurs on both the functional and the non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes. *Eur J Immunol*, **33**, 2108-2113.
- Demengeot, J., Oltz, E.M. and Alt, F.W. (1995) Promotion of V(D)J recombinational accessibility by the intronic E kappa element: role of the kappa B motif. *Int Immunol*, **7**, 1995-2003.
- Denoroy, L., Deret, S. and Aucouturier, P. (1994) Overrepresentation of the V kappa IV subgroup in light chain deposition disease. *Immunol Lett*, **42**, 63-66.
- Deret, S., Denoroy, L., Lamarine, M., Vidal, R., Mougnot, B., Frangione, B., Stevens, F.J., Ronco, P.M. and Aucouturier, P. (1999) Kappa light chain-associated Fanconi's syndrome: molecular analysis of monoclonal immunoglobulin light chains from patients with and without intracellular crystals. *Protein Eng*, **12**, 363-369.
- Diaw, L., Siwarski, D., DuBois, W., Jones, G. and Huppi, K. (2000) Double producers of kappa and lambda define a subset of B cells in mouse plasmacytomas. *Mol Immunol*, **37**, 775-781.
- Doody, G.M., Bell, S.E., Vigorito, E., Clayton, E., McAdam, S., Tooze, R., Fernandez, C., Lee, I.J. and Turner, M. (2001) Signal transduction through Vav-2 participates in humoral immune responses and B cell maturation. *Nat Immunol*, **2**, 542-547.
- Dul, J.L. and Argon, Y. (1990) A single amino acid substitution in the variable region of the light chain specifically blocks immunoglobulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8135-8139.

- Dul, J.L., Argon, Y., Winkler, T., ten Boekel, E., Melchers, F. and Martensson, I.L. (1996) The murine VpreB1 and VpreB2 genes both encode a protein of the surrogate light chain and are co-expressed during B cell development. *Eur J Immunol*, **26**, 906-913.
- Dul, J.L., Burrone, O.R. and Argon, Y. (1992) A conditional secretory mutant in an Ig L chain is caused by replacement of tyrosine/phenylalanine 87 with histidine. *J Immunol*, **149**, 1927-1933.
- Durie, B.G. and Salmon, S.E. (1975) Cellular kinetics staging, and immunoglobulin synthesis in multiple myeloma. *Annu Rev Med*, **26**, 283-288.
- Dwulet, F.E., O'Connor, T.P. and Benson, M.D. (1986) Polymorphism in a kappa I primary (AL) amyloid protein (BAN). *Mol Immunol*, **23**, 73-78.

E.

- Early, P., Rogers, J., Davis, M., Calame, K., Bond, M., Wall, R. and Hood, L. (1980) Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. *Cell*, **20**, 313-319.
- Eaton, S. and Calame, K. (1987) Multiple DNA sequence elements are necessary for the function of an immunoglobulin heavy chain promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7634-7638.
- Edelman, G.M. (1970) The structure and function of antibodies. *Sci Am*, **223**, 34-42.
- Eden, S., Hashimshony, T., Keshet, I., Cedar, H. and Thorne, A.W. (1998) DNA methylation models histone acetylation. *Nature*, **394**, 842.
- Ehlich, A., Schaal, S., Gu, H., Kitamura, D., Muller, W. and Rajewsky, K. (1993) Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. *Cell*, **72**, 695-704.
- Engel, H., Rolink, A. and Weiss, S. (1999) B cells are programmed to activate kappa and lambda for rearrangement at consecutive developmental stages. *Eur J Immunol*, **29**, 2167-2176.
- Engle, R.L., Jr. and Wallis, L.A. (1957) The adult Fanconi syndrome. II. Review of eighteen cases. *Am J Med*, **22**, 13-23.
- Engler, P., Weng, A. and Storb, U. (1993) Influence of CpG methylation and target spacing on V(D)J recombination in a transgenic substrate. *Mol Cell Biol*, **13**, 571-577.
- Erikson, J., Radic, M.Z., Camper, S.A., Hardy, R.R., Carmack, C. and Weigert, M. (1991) Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature*, **349**, 331-334.
- Ernst, P. and Smale, S.T. (1995) Combinatorial regulation of transcription. I: General aspects of transcriptional control. *Immunity*, **2**, 311-319.

F.

- Falkner, F.G. and Zachau, H.G. (1984) Correct transcription of an immunoglobulin kappa gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature*, **310**, 71-74.
- Feehally, J. and Allen, A.C. (1999) Pathogenesis of IgA nephropathy. *Ann Med Interne (Paris)*, **150**, 91-98.
- Feeney, A.J. and Riblet, R. (1993) DST4: a new, and probably the last, functional DH gene in the BALB/c mouse. *Immunogenetics*, **37**, 217-221.

- Felsenfeld, G. (1992) Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature*, **355**, 219-224.
- Fernex, C., Capone, M. and Ferrier, P. (1995) The V(D)J recombinational and transcriptional activities of the immunoglobulin heavy-chain intronic enhancer can be mediated through distinct protein-binding sites in a transgenic substrate. *Mol Cell Biol*, **15**, 3217-3226.
- Ferradini, L., Gu, H., De Smet, A., Rajewsky, K., Reynaud, C.A. and Weill, J.C. (1996) Rearrangement-enhancing element upstream of the mouse immunoglobulin kappa chain J cluster. *Science*, **271**, 1416-1420.
- Forrester, W.C., van Genderen, C., Jenuwein, T. and Grosschedl, R. (1994) Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin mu gene on nuclear matrix attachment regions. *Science*, **265**, 1221-1225.

G.

- Ganeval, D., Rabian, C., Guerin, V., Pertuiset, N., Landais, P. and Jungers, P. (1992) Treatment of multiple myeloma with renal involvement. *Adv Nephrol Necker Hosp*, **21**, 347-370.
- Garand, R., Sahota, S.S., Avet-Loiseau, H., Talmant, P., Robillard, N., Moreau, A., Gaillard, F., Stevenson, F.K. and Bataille, R. (2000) IgG-secreting lymphoplasmacytoid leukaemia: a B-cell disorder with extensively mutated VH genes undergoing Ig isotype-switching frequently associated with trisomy 12. *Br J Haematol*, **109**, 71-80.
- Gartner, F., Alt, F.W., Monroe, R.J. and Seidl, K.J. (2000) Antigen-independent appearance of recombination activating gene (RAG)-positive bone marrow B cells in the spleens of immunized mice. *J Exp Med*, **192**, 1745-1754.
- Gass, J.N., Gifford, N.M. and Brewer, J.W. (2002) Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. *J Biol Chem*, **277**, 49047-49054.
- Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E. and Schiff, C. (2002) Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 13014-13019.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S. and Weigert, M. (1993) Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med*, **177**, 999-1008.
- Genetta, T., Ruezinsky, D. and Kadesch, T. (1994) Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol*, **14**, 6153-6163.
- Gerlag, P.G., Koene, R.A. and Berden, J.H. (1986) Renal transplantation in light chain nephropathy: case report and review of the literature. *Clin Nephrol*, **25**, 101-104.
- Gertz, M.A. and Kyle, R.A. (1990) Prognostic value of urinary protein in primary systemic amyloidosis (AL). *Am J Clin Pathol*, **94**, 313-317.
- Ghia, P., ten Boekel, E., Sanz, E., de la Hera, A., Rolink, A. and Melchers, F. (1996) Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J Exp Med*, **184**, 2217-2229.
- Giachino, C., Padovan, E. and Lanzavecchia, A. (1995) kappa+lambda+ dual receptor B cells are present in the human peripheral repertoire. *J Exp Med*, **181**, 1245-1250.
- Gianni, L., Bellotti, V., Gianni, A.M. and Merlini, G. (1995) New drug therapy of amyloidoses: resorption of AL-type deposits with 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin. *Blood*, **86**, 855-861.

- Gilbert, D., Brard, F., Jovelin, F. and Tron, F. (1996) Do naturally occurring autoantibodies participate in the constitution of the pathological B-cell repertoire in systemic lupus erythematosus? *J Autoimmun*, **9**, 247-257.
- Glenner, G.G., Terry, W., Harada, M., Isersky, C. and Page, D. (1971) Amyloid fibril proteins: proof of homology with immunoglobulin light chains by sequence analyses. *Science*, **172**, 1150-1151.
- Goldmit, M., Schlissel, M., Cedar, H. and Bergman, Y. (2002) Differential accessibility at the kappa chain locus plays a role in allelic exclusion. *Embo J*, **21**, 5255-5261.
- Gong, S. and Nussenzweig, M.C. (1996) Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science*, **272**, 411-414.
- Goodhardt, M., Cavelier, P., Doyen, N., Kallenbach, S., Babinet, C. and Rougeon, F. (1993) Methylation status of immunoglobulin kappa gene segments correlates with their recombination potential. *Eur J Immunol*, **23**, 1789-1795.
- Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, K. and et al. (1988) Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, **334**, 676-682.
- Gorman, J.R. and Alt, F.W. (1998) Regulation of immunoglobulin light chain isotype expression. *Adv Immunol*, **69**, 113-181.
- Grawunder, U., Leu, T.M., Schatz, D.G., Werner, A., Rolink, A.G., Melchers, F. and Winkler, T.H. (1995) Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity*, **3**, 601-608.
- Guan, Z., Buckman, S.Y., Springer, L.D. and Morrison, A.R. (1999) Both p38alpha(MAPK) and JNK/SAPK pathways are important for induction of nitric-oxide synthase by interleukin-1beta in rat glomerular mesangial cells. *J Biol Chem*, **274**, 36200-36206.
- Gudikote, J.P. and Wilkinson, M.F. (2002) T-cell receptor sequences that elicit strong down-regulation of premature termination codon-bearing transcripts. *Embo J*, **21**, 125-134.

H.

- Haas, I.G. and Wabl, M. (1983) Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature*, **306**, 387-389.
- Han, S., Zheng, B., Schatz, D.G., Spanopoulou, E. and Kelsoe, G. (1996) Neoteny in lymphocytes: Rag1 and Rag2 expression in germinal center B cells. *Science*, **274**, 2094-2097.
- Hardy, R.R. and Hayakawa, K. (1991) A developmental switch in B lymphopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 11550-11554.
- Hauke, G., Epplen, J.T., Chluba, J., Hollmann, A. and Peter, H.H. (1988) IgD/lambda plasmocytoma with immunoglobulin kappa light-chain genes in the germ-line configuration. *J Clin Immunol*, **8**, 407-413.
- Hauke, G., Epplen, J.T., Hollmann, A., Rother, E. and Peter, H.H. (1988) [Unusual rearrangements of immunoglobulin genes in a patient with IgD/lambda plasmacytoma]. *Immun Infekt*, **16**, 25-26.
- Healy, C.M., Enobakhare, B., Haskard, D.O. and Thornhill, M.H. (1997) Raised levels of circulating VCAM-1 and circulating E-selectin in patients with recurrent oral ulceration. *J Oral Pathol Med*, **26**, 23-28.

- Hendershot, L., Bole, D., Kohler, G. and Kearney, J.F. (1987) Assembly and secretion of heavy chains that do not associate posttranslationally with immunoglobulin heavy chain-binding protein. *J Cell Biol*, **104**, 761-767.
- Hentze, M.W. and Kulozik, A.E. (1999) A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell*, **96**, 307-310.
- Herrera, G.A., Shultz, J.J., Soong, S.J. and Sanders, P.W. (1994) Growth factors in monoclonal light-chain--related renal diseases. *Hum Pathol*, **25**, 883-892.
- Hertz, M., Kouskoff, V., Nakamura, T. and Nemazee, D. (1998) V(D)J recombinase induction in splenic B lymphocytes is inhibited by antigen-receptor signalling. *Nature*, **394**, 292-295.
- Hertz, M. and Nemazee, D. (1997) BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD- bone marrow B cells in vitro. *Immunity*, **6**, 429-436.
- Hertz, M. and Nemazee, D. (1998) Receptor editing and commitment in B lymphocytes. *Curr Opin Immunol*, **10**, 208-213.
- Hesse, J.E., Lieber, M.R., Mizuuchi, K. and Gellert, M. (1989) V(D)J recombination: a functional definition of the joining signals. *Genes Dev*, **3**, 1053-1061.
- Hesslein, D.G., Pflugh, D.L., Chowdhury, D., Bothwell, A.L., Sen, R. and Schatz, D.G. (2003) Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments. *Genes Dev*, **17**, 37-42.
- Hibbs, M.L., Tarlinton, D.M., Armes, J., Grail, D., Hodgson, G., Maglitto, R., Stacker, S.A. and Dunn, A.R. (1995) Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell*, **83**, 301-311.
- Hieter, P.A., Korsmeyer, S.J., Waldmann, T.A. and Leder, P. (1981) Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. *Nature*, **290**, 368-372.
- Hikida, M., Mori, M., Takai, T., Tomochika, K., Hamatani, K. and Ohmori, H. (1996) Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells. *Science*, **274**, 2092-2094.
- Hollander, G.A., Zuklys, S., Morel, C., Mizoguchi, E., Mobisson, K., Simpson, S., Terhorst, C., Wishart, W., Golan, D.E., Bhan, A.K. and Burakoff, S.J. (1998) Monoallelic expression of the interleukin-2 locus. *Science*, **279**, 2118-2121.
- Hsieh, C.L. and Lieber, M.R. (1992) CpG methylated minichromosomes become inaccessible for V(D)J recombination after undergoing replication. *Embo J*, **11**, 315-325.
- Huang, Z.Q., Kirk, K.A., Connelly, K.G. and Sanders, P.W. (1993) Bence Jones proteins bind to a common peptide segment of Tamm-Horsfall glycoprotein to promote heterotypic aggregation. *J Clin Invest*, **92**, 2975-2983.
- Huang, Z.Q. and Sanders, P.W. (1995) Biochemical interaction between Tamm-Horsfall glycoprotein and Ig light chains in the pathogenesis of cast nephropathy. *Lab Invest*, **73**, 810-817.
- Hu-Li, J., Pannetier, C., Guo, L., Lohning, M., Gu, H., Watson, C., Assenmacher, M., Radbruch, A. and Paul, W.E. (2001) Regulation of expression of IL-4 alleles: analysis using a chimeric GFP/IL-4 gene. *Immunity*, **14**, 1-11.

I.

- Iborra, F.J., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (2001) Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. *Science*, **293**, 1139-1142.

- Ichihara, Y., Hayashida, H., Miyazawa, S. and Kurosawa, Y. (1989) Only DFL16, DSP2, and DQ52 gene families exist in mouse immunoglobulin heavy chain diversity gene loci, of which DFL16 and DSP2 originate from the same primordial DH gene. *Eur J Immunol*, **19**, 1849-1854.
- Igarashi, H., Kuwata, N., Kiyota, K., Sumita, K., Suda, T., Ono, S., Bauer, S.R. and Sakaguchi, N. (2001) Localization of recombination activating gene 1/green fluorescent protein (RAG1/GFP) expression in secondary lymphoid organs after immunization with T-dependent antigens in rag1/gfp knockin mice. *Blood*, **97**, 2680-2687.
- Iliev, A., Spatz, L., Ray, S. and Diamond, B. (1994) Lack of allelic exclusion permits autoreactive B cells to escape deletion. *J Immunol*, **153**, 3551-3556.
- Inaoki, M., Sato, S., Weintraub, B.C., Goodnow, C.C. and Tedder, T.F. (1997) CD19-regulated signaling thresholds control peripheral tolerance and autoantibody production in B lymphocytes. *J Exp Med*, **186**, 1923-1931.
- Inlay, M., Alt, F.W., Baltimore, D. and Xu, Y. (2002) Essential roles of the kappa light chain intronic enhancer and 3' enhancer in kappa rearrangement and demethylation. *Nat Immunol*, **3**, 463-468.
- Isobe, T., Kametani, F. and Shinoda, T. (1998) V-domain deposition of lambda Bence Jones protein in the renal tubular epithelial cells in a patient with the adult Fanconi syndrome with myeloma. *Amyloid*, **5**, 117-120.
- Iwakoshi, N.N., Lee, A.H. and Glimcher, L.H. (2003) The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev*, **194**, 29-38.

J.

- Jack, H.M. and Wabl, M. (1988) Immunoglobulin mRNA stability varies during B lymphocyte differentiation. *Embo J*, **7**, 1041-1046.
- Jacob, J., Kassir, R. and Kelsoe, G. (1991) In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med*, **173**, 1165-1175.
- Jefferis, R., Lund, J. and Pound, J.D. (1998) IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev*, **163**, 59-76.

K.

- Kadonaga, J.T. (1998) Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell*, **92**, 307-313.
- Karasuyama, H., Kudo, A. and Melchers, F. (1990) The proteins encoded by the VpreB and lambda 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain. *J Exp Med*, **172**, 969-972.
- Karasuyama, H., Rolink, A. and Melchers, F. (1993) A complex of glycoproteins is associated with VpreB/lambda 5 surrogate light chain on the surface of mu heavy chain-negative early precursor B cell lines. *J Exp Med*, **178**, 469-478.
- Kee, B.L. and Murre, C. (2001) Transcription factor regulation of B lineage commitment. *Curr Opin Immunol*, **13**, 180-185.

- Kee, B.L., Quong, M.W. and Murre, C. (2000) E2A proteins: essential regulators at multiple stages of B-cell development. *Immunol Rev*, **175**, 138-149.
- Kemler, I., Schreiber, E., Muller, M.M., Matthias, P. and Schaffner, W. (1989) Octamer transcription factors bind to two different sequence motifs of the immunoglobulin heavy chain promoter. *Embo J*, **8**, 2001-2008.
- Kenny, J.J., Rezanka, L.J., Lustig, A., Fischer, R.T., Yoder, J., Marshall, S. and Longo, D.L. (2000) Autoreactive B cells escape clonal deletion by expressing multiple antigen receptors. *J Immunol*, **164**, 4111-4119.
- Keyna, U., Beck-Engeser, G.B., Jongstra, J., Applequist, S.E. and Jack, H.M. (1995) Surrogate light chain-dependent selection of Ig heavy chain V regions. *J Immunol*, **155**, 5536-5542.
- Khamlichi, A.A., Aucouturier, P., Silvain, C., Bauwens, M., Touchard, G., Preud'homme, J.L., Nau, F. and Cogne, M. (1992) Primary structure of a monoclonal kappa chain in myeloma with light chain deposition disease. *Clin Exp Immunol*, **87**, 122-126.
- Khamlichi, A.A., Pinaud, E., Decourt, C., Chauveau, C. and Cogne, M. (2000) The 3' IgH regulatory region: a complex structure in a search for a function. *Adv Immunol*, **75**, 317-345.
- Khamlichi, A.A., Rocca, A., Touchard, G., Aucouturier, P., Preud'homme, J.L. and Cogne, M. (1995) Role of light chain variable region in myeloma with light chain deposition disease: evidence from an experimental model. *Blood*, **86**, 3655-3659.
- Khan, W.N., Nilsson, A., Mizoguchi, E., Castigli, E., Forsell, J., Bhan, A.K., Geha, R., Sideras, P. and Alt, F.W. (1997) Impaired B cell maturation in mice lacking Bruton's tyrosine kinase (Btk) and CD40. *Int Immunol*, **9**, 395-405.
- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R. and Georgopoulos, K. (1999) Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity*, **10**, 345-355.
- Kim, V.N., Kataoka, N. and Dreyfuss, G. (2001) Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science*, **293**, 1832-1836.
- Kitamura, D., Kudo, A., Schaal, S., Muller, W., Melchers, F. and Rajewsky, K. (1992) A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell*, **69**, 823-831.
- Kitamura, D. and Rajewsky, K. (1992) Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature*, **356**, 154-156.
- Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, 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.
- Knarr, G., Gething, M.J., Modrow, S. and Buchner, J. (1995) BiP binding sequences in antibodies. *J Biol Chem*, **270**, 27589-27594.
- Kofler, R., Geley, S., Kofler, H. and Helmborg, A. (1992) Mouse variable-region gene families: complexity, polymorphism and use in non-autoimmune responses. *Immunol Rev*, **128**, 5-21.
- Korsmeyer, S.J., Hieter, P.A., Sharrow, S.O., Goldman, C.K., Leder, P. and Waldmann, T.A. (1982) Normal human B cells display ordered light chain gene rearrangements and deletions. *J Exp Med*, **156**, 975-985.
- Kottmann, A.H., Brack, C., Eibel, H. and Kohler, G. (1992) A survey of protein-DNA interaction sites within the murine immunoglobulin heavy chain locus reveals a particularly complex pattern around the DQ52 element. *Eur J Immunol*, **22**, 2113-2120.

- Kouskoff, V., Lacaud, G., Pape, K., Retter, M. and Nemazee, D. (2000) B cell receptor expression level determines the fate of developing B lymphocytes: receptor editing versus selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7435-7439.
- Kudo, A. and Melchers, F. (1987) A second gene, VpreB in the lambda 5 locus of the mouse, which appears to be selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Embo J*, **6**, 2267-2272.
- Kumararatne, D.S. and MacLennan, I.C. (1982) The origin of marginal-zone cells. *Adv Exp Med Biol*, **149**, 83-90.
- Kuppers, R., Zhao, M., Hansmann, M.L. and Rajewsky, K. (1993) Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Embo J*, **12**, 4955-4967.
- Kurosawa, Y. and Tonegawa, S. (1982) Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *J Exp Med*, **155**, 201-218.
- Kyle, R.A. (1989) Monoclonal gammopathies and the kidney. *Annu Rev Med*, **40**, 53-60.
- Kyle, R.A. and Garton, J.P. (1987) The spectrum of IgM monoclonal gammopathy in 430 cases. *Mayo Clin Proc*, **62**, 719-731.

L.

- Lacy, M.Q. and Gertz, M.A. (1999) Acquired Fanconi's syndrome associated with monoclonal gammopathies. *Hematol Oncol Clin North Am*, **13**, 1273-1280.
- Lam, K.P., Kuhn, R. and Rajewsky, K. (1997) In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*, **90**, 1073-1083.
- Lam, K.P. and Rajewsky, K. (1999) B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J Exp Med*, **190**, 471-477.
- Leboulleux, M., Lelongt, B., Mougnot, B., Touchard, G., Makdassi, R., Rocca, A., Noel, L.H., Ronco, P.M. and Aucouturier, P. (1995) Protease resistance and binding of Ig light chains in myeloma-associated tubulopathies. *Kidney Int*, **48**, 72-79.
- Lee, D.B., Drinkard, J.P., Rosen, V.J. and Gonick, H.C. (1972) The adult Fanconi syndrome: observations on etiology, morphology, renal function and mineral metabolism in three patients. *Medicine (Baltimore)*, **51**, 107-138.
- Lee, Y.K., Brewer, J.W., Hellman, R. and Hendershot, L.M. (1999) BiP and immunoglobulin light chain cooperate to control the folding of heavy chain and ensure the fidelity of immunoglobulin assembly. *Mol Biol Cell*, **10**, 2209-2219.
- Lefranc, M.P., Pallares, N. and Fripiat, J.P. (1999) Allelic polymorphisms and RFLP in the human immunoglobulin lambda light chain locus. *Hum Genet*, **104**, 361-369.
- Leitzgen, K., Knittler, M.R. and Haas, I.G. (1997) Assembly of immunoglobulin light chains as a prerequisite for secretion. A model for oligomerization-dependent subunit folding. *J Biol Chem*, **272**, 3117-3123.
- Lemmers, B., Gauthier, L., Guelpa-Fonlupt, V., Fougereau, M. and Schiff, C. (1999) The human (PsiL+mu-) proB complex: cell surface expression and biochemical structure of a putative transducing receptor. *Blood*, **93**, 4336-4346.
- Lenardo, M., Pierce, J.W. and Baltimore, D. (1987) Protein-binding sites in Ig gene enhancers determine transcriptional activity and inducibility. *Science*, **236**, 1573-1577.
- Li, S. and Wilkinson, M.F. (1998) Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity*, **8**, 135-141.
- Li, Y., Li, H. and Weigert, M. (2002) Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J Exp Med*, **195**, 181-188.

- Lieberson, R., Giannini, S.L., Birshstein, 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.
- Liu, D., Jenab, J. and Rosenberg, N. (1997) Kappa and lambda rearrangement occur simultaneously in transformed pre-B cells. *J Immunol*, **159**, 6061-6069.
- Liu, Y.J. and Arpin, C. (1997) Germinal center development. *Immunol Rev*, **156**, 111-126.
- Liu, Y.J., Barthelemy, C., de Bouteiller, O., Arpin, C., Durand, I. and Banchereau, J. (1995) Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. *Immunity*, **2**, 239-248.
- Liu, Y.J., Zhang, J., Lane, P.J., Chan, E.Y. and MacLennan, I.C. (1991) Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol*, **21**, 2951-2962.
- 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.
- Lorenz, W., Schable, K.F., Thiebe, R., Stavnezer, J. and Zachau, H.G. (1988) The J kappa proximal region of the human K locus contains three uncommon V kappa genes which are arranged in opposite transcriptional polarities. *Mol Immunol*, **25**, 479-484.
- Lozano, F., Maertzdorf, B., Pannell, R. and Milstein, C. (1994) Low cytoplasmic mRNA levels of immunoglobulin kappa light chain genes containing nonsense codons correlate with inefficient splicing. *Embo J*, **13**, 4617-4622.
- Lykke-Andersen, J., Shu, M.D. and Steitz, J.A. (2000) Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell*, **103**, 1121-1131.

M.

- MacLennan, I.C. (1994) Germinal centers. *Annu Rev Immunol*, **12**, 117-139.
- Mainville, C.A., Sheehan, K.M., Klamann, L.D., Giorgetti, C.A., Press, J.L. and Brodeur, P.H. (1996) Deletional mapping of fifteen mouse VH gene families reveals a common organization for three Igh haplotypes. *J Immunol*, **156**, 1038-1046.
- Maki, R., Roeder, W., Traunecker, A., Sidman, C., Wabl, M., Raschke, W. and Tonegawa, S. (1981) The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell*, **24**, 353-365.
- Maldonado, J.E., Velosa, J.A., Kyle, R.A., Wagoner, R.D., Holley, K.E. and Salassa, R.M. (1975) Fanconi syndrome in adults. A manifestation of a latent form of myeloma. *Am J Med*, **58**, 354-364.
- 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.
- Manz, J., Denis, K., Witte, O., Brinster, R. and Storb, U. (1988) Feedback inhibition of immunoglobulin gene rearrangement by membrane mu, but not by secreted mu heavy chains. *J Exp Med*, **168**, 1363-1381.
- Martensson, I.L., Rolink, A., Melchers, F., Mundt, C., Licence, S. and Shimizu, T. (2002) The pre-B cell receptor and its role in proliferation and Ig heavy chain allelic exclusion. *Semin Immunol*, **14**, 335-342.

- Martin, F. and Kearney, J.F. (2000) Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity*, **12**, 39-49.
- Martin, F. and Kearney, J.F. (2000) Selection in the mature B cell repertoire. *Curr Top Microbiol Immunol*, **252**, 97-105.
- Martin, F., Oliver, A.M. and Kearney, J.F. (2001) Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*, **14**, 617-629.
- Mason, J.O., Williams, G.T. and Neuberger, M.S. (1988) The half-life of immunoglobulin mRNA increases during B-cell differentiation: a possible role for targeting to membrane-bound polysomes. *Genes Dev*, **2**, 1003-1011.
- Mather, E.L. and Perry, R.P. (1983) Methylation status and DNase I sensitivity of immunoglobulin genes: changes associated with rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 4689-4693.
- Meek, K.D., Hasemann, C.A. and Capra, J.D. (1989) Novel rearrangements at the immunoglobulin D locus. Inversions and fusions add to IgH somatic diversity. *J Exp Med*, **170**, 39-57.
- Meffre, E., Casellas, R. and Nussenzweig, M.C. (2000) Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol*, **1**, 379-385.
- Meffre, E., Chiorazzi, M. and Nussenzweig, M.C. (2001) Circulating human B cells that express surrogate light chains display a unique antibody repertoire. *J Immunol*, **167**, 2151-2156.
- Meffre, E., Fougereau, M., Argenson, J.N., Aubaniac, J.M. and Schiff, C. (1996) Cell surface expression of surrogate light chain (ψ L) in the absence of μ on human pro-B cell lines and normal pro-B cells. *Eur J Immunol*, **26**, 2172-2180.
- Meffre, E. and Nussenzweig, M.C. (2002) Deletion of immunoglobulin beta in developing B cells leads to cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11334-11339.
- Mehr, I.J. and Seifert, H.S. (1998) Differential roles of homologous recombination pathways in *Neisseria gonorrhoeae* pilin antigenic variation, DNA transformation and DNA repair. *Mol Microbiol*, **30**, 697-710.
- Mehr, R., Shannon, M. and Litwin, S. (1999) Models for antigen receptor gene rearrangement. I. Biased receptor editing in B cells: implications for allelic exclusion. *J Immunol*, **163**, 1793-1798.
- Melamed, D., Benschop, R.J., Cambier, J.C. and Nemazee, D. (1998) Developmental regulation of B lymphocyte immune tolerance compartmentalizes clonal selection from receptor selection. *Cell*, **92**, 173-182.
- Melamed, D. and Nemazee, D. (1997) Self-antigen does not accelerate immature B cell apoptosis, but stimulates receptor editing as a consequence of developmental arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9267-9272.
- Melchers, F., Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T.H., Karasuyama, H., Ghia, P. and Andersson, J. (1995) Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr Opin Immunol*, **7**, 214-227.
- Melchers, F., ten Boekel, E., 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.
- Melchers, F., ten Boekel, E., Yamagami, T., Andersson, J. and Rolink, A. (1999) The roles of preB and B cell receptors in the stepwise allelic exclusion of mouse IgH and L chain gene loci. *Semin Immunol*, **11**, 307-317.

- Melnick, J., Dul, J.L. and Argon, Y. (1994) Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature*, **370**, 373-375.
- Mendell, J.T., ap Rhys, C.M. and Dietz, H.C. (2002) Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science*, **298**, 419-422.
- Messiaen, T., Deret, S., Mougnot, B., Bridoux, F., Dequiedt, P., Dion, J.J., Makdassi, R., Meeus, F., Pourrat, J., Touchard, G., Vanhille, P., Zaoui, P., Aucouturier, P. and Ronco, P.M. (2000) Adult Fanconi syndrome secondary to light chain gammopathy. Clinicopathologic heterogeneity and unusual features in 11 patients. *Medicine (Baltimore)*, **79**, 135-154.
- Mikkola, I., Heavey, B., Horcher, M. and Busslinger, M. (2002) Reversion of B cell commitment upon loss of Pax5 expression. *Science*, **297**, 110-113.
- Mills, F.C., Harindranath, N., Mitchell, M. and Max, E.E. (1997) Enhancer complexes located downstream of both human immunoglobulin Calpha genes. *J Exp Med*, **186**, 845-858.
- Minegishi, Y. and Conley, M.E. (2001) Negative selection at the pre-BCR checkpoint elicited by human mu heavy chains with unusual CDR3 regions. *Immunity*, **14**, 631-641.
- Minegishi, Y., Coustan-Smith, E., Wang, Y.H., Cooper, M.D., Campana, D. and Conley, M.E. (1998) Mutations in the human lambda5/14.1 gene result in B cell deficiency and agammaglobulinemia. *J Exp Med*, **187**, 71-77.
- Monroe, R.J., Seidl, K.J., Gaertner, F., Han, S., Chen, F., Sekiguchi, J., Wang, J., Ferrini, R., Davidson, L., Kelsoe, G. and Alt, F.W. (1999) RAG2:GFP knockin mice reveal novel aspects of RAG2 expression in primary and peripheral lymphoid tissues. *Immunity*, **11**, 201-212.
- Moore, M.W., Durdik, J., Persiani, D.M. and Selsing, E. (1985) Deletions of kappa chain constant region genes in mouse lambda chain-producing B cells involve intrachromosomal DNA recombinations similar to V-J joining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 6211-6215.
- 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.
- Mostoslavsky, R., Singh, N., Tenzen, T., Goldmit, M., Gabay, C., Elizur, S., Qi, P., Reubinoff, B.E., Chess, A., Cedar, H. and Bergman, Y. (2001) Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system. *Nature*, **414**, 221-225.
- Muhlemann, O., Mock-Casagrande, C.S., Wang, J., Li, S., Custodio, N., Carmo-Fonseca, M., Wilkinson, M.F. and Moore, M.J. (2001) Precursor RNAs harboring nonsense codons accumulate near the site of transcription. *Mol Cell*, **8**, 33-43.
- Mundt, C., Licence, S., Shimizu, T., Melchers, F. and Martensson, I.L. (2001) Loss of precursor B cell expansion but not allelic exclusion in VpreB1/VpreB2 double-deficient mice. *J Exp Med*, **193**, 435-445.

N.

- Nagata, K., Nakamura, T., Kitamura, F., Kuramochi, S., Taki, S., Campbell, K.S. and Karasuyama, H. (1997) The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity*, **7**, 559-570.
- Nemazee, D. and Hogquist, K.A. (2003) Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol*, **15**, 182-189.
- Niaudet, P. and Rotig, A. (1996) Renal involvement in mitochondrial cytopathies. *Pediatr Nephrol*, **10**, 368-373.

- Nicastri, A.L., Brandao de Almeida Prado, M.J., Sesso, A. and Brandao de Almeida Prado, E.B. (1998) Defective proximal tubule lysosomal acidification by Bence Jones proteins. An immunoelectron microscopy study. *Exp Nephrol*, **6**, 514-521.
- Norvell, A., Mandik, L. and Monroe, J.G. (1995) Engagement of the antigen-receptor on immature murine B lymphocytes results in death by apoptosis. *J Immunol*, **154**, 4404-4413.
- Novobrantseva, T.I., Martin, V.M., Pelanda, R., Muller, W., Rajewsky, K. and Ehlich, A. (1999) Rearrangement and expression of immunoglobulin light chain genes can precede heavy chain expression during normal B cell development in mice. *J Exp Med*, **189**, 75-88.
- Nussenzweig, M.C. (1998) Immune receptor editing: revise and select. *Cell*, **95**, 875-878.
- Nussenzweig, M.C., Shaw, A.C., Sinn, E., Danner, D.B., Holmes, K.L., Morse, H.C., 3rd and Leder, P. (1987) Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu. *Science*, **236**, 816-819.
- Nutt, S.L., Thevenin, C. and Busslinger, M. (1997) Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology*, **198**, 227-235.
- Nutt, S.L., Vambrie, S., Steinlein, P., Kozmik, Z., Rolink, A., Weith, A. and Busslinger, M. (1999) Independent regulation of the two Pax5 alleles during B-cell development. *Nat Genet*, **21**, 390-395.

O.

- Oberdoerffer, P., Novobrantseva, T.I. and Rajewsky, K. (2003) Expression of a targeted lambda 1 light chain gene is developmentally regulated and independent of Ig kappa rearrangements. *J Exp Med*, **197**, 1165-1172.
- Ochsenbein, A.F., Pinschewer, D.D., Odermatt, B., Carroll, M.C., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (1999) Protective T cell-independent antiviral antibody responses are dependent on complement. *J Exp Med*, **190**, 1165-1174.
- Ochsenbein, A.F., Pinschewer, D.D., Sierro, S., Horvath, E., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. (2000) Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 13263-13268.
- 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.
- Ohnishi, K. and Melchers, F. (2003) The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nat Immunol*, **4**, 849-856.
- Ohnishi, K. and Takemori, T. (1994) Molecular components and assembly of mu.surrogate light chain complexes in pre-B cell lines. *J Biol Chem*, **269**, 28347-28353.
- Okada, A. and Alt, F.W. (1994) Mechanisms that control antigen receptor variable region gene assembly. *Semin Immunol*, **6**, 185-196.
- Oliver, A.M., Martin, F., Gartland, G.L., Carter, R.H. and Kearney, J.F. (1997) Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol*, **27**, 2366-2374.
- Oliver, A.M., Martin, F. and Kearney, J.F. (1999) IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol*, **162**, 7198-7207.
- Orfila, C., Durand, D., Vega-Vidalle, C. and Suc, J.M. (1991) Immunofluorescent deposits on the tubular basement membrane in human renal transplant. *Nephron*, **57**, 149-155.

- 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. (1993) The turnover of B-cell populations. *Immunol Today*, **14**, 34-37.
- Osmond, D.G. (1994) Production and selection of B lymphocytes in bone marrow: lymphostromal interactions and apoptosis in normal, mutant and transgenic mice. *Adv Exp Med Biol*, **355**, 15-20.
- Osmond, D.G., Rolink, A. and Melchers, F. (1998) Murine B lymphopoiesis: towards a unified model. *Immunol Today*, **19**, 65-68.
- Ozaki, S., Abe, M., Wolfenbarger, D., Weiss, D.T. and Solomon, A. (1994) Preferential expression of human lambda-light-chain variable-region subgroups in multiple myeloma, AL amyloidosis, and Waldenstrom's macroglobulinemia. *Clin Immunol Immunopathol*, **71**, 183-189.

P.

- Pangalis, G.A., Angelopoulou, M.K., Vassilakopoulos, T.P., Siakantaris, M.P. and Kittas, C. (1999) B-chronic lymphocytic leukemia, small lymphocytic lymphoma, and lymphoplasmacytic lymphoma, including Waldenstrom's macroglobulinemia: a clinical, morphologic, and biologic spectrum of similar disorders. *Semin Hematol*, **36**, 104-114.
- Pani, G., Siminovitch, K.A. and Paige, C.J. (1997) The moth-eaten mutation rescues B cell signaling and development in CD45-deficient mice. *J Exp Med*, **186**, 581-588.
- Pappu, R., Cheng, A.M., Li, B., Gong, Q., Chiu, C., Griffin, N., White, M., Sleckman, B.P. and Chan, A.C. (1999) Requirement for B cell linker protein (BLNK) in B cell development. *Science*, **286**, 1949-1954.
- Pascual, V., Liu, Y.J., Magalski, A., de Bouteiller, O., Banchereau, J. and Capra, J.D. (1994) Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med*, **180**, 329-339.
- Pasquali, S., Casanova, S., Zucchelli, A. and Zucchelli, P. (1990) Long-term survival patients with acute and severe renal failure due to multiple myeloma. *Clin Nephrol*, **34**, 247-254.
- Pauza, M.E., Rehmann, J.A. and LeBien, T.W. (1993) Unusual patterns of immunoglobulin gene rearrangement and expression during human B cell ontogeny: human B cells can simultaneously express cell surface kappa and lambda light chains. *J Exp Med*, **178**, 139-149.
- Pelanda, R., Braun, U., Hobeika, E., Nussenzweig, M.C. and Reth, M. (2002) B cell progenitors are arrested in maturation but have intact VDJ recombination in the absence of Ig-alpha and Ig-beta. *J Immunol*, **169**, 865-872.
- Pelanda, R., Schaal, S., Torres, R.M. and Rajewsky, K. (1996) A prematurely expressed Ig(kappa) transgene, but not V(kappa)J(kappa) gene segment targeted into the Ig(kappa) locus, can rescue B cell development in lambda5-deficient mice. *Immunity*, **5**, 229-239.
- Pelanda, R., Schwers, S., Sonoda, E., Torres, R.M., Nemazee, D. and Rajewsky, K. (1997) Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity*, **7**, 765-775.

- Pepys, M.B., Herbert, J., Hutchinson, W.L., Tennent, G.A., Lachmann, H.J., Gallimore, J.R., Lovat, L.B., Bartfai, T., Alanine, A., Hertel, C., Hoffmann, T., Jakob-Roetne, R., Norcross, R.D., Kemp, J.A., Yamamura, K., Suzuki, M., Taylor, G.W., Murray, S., Thompson, D., Purvis, A., Kolstoe, S., Wood, S.P. and Hawkins, P.N. (2002) Targeted pharmacological depletion of serum amyloid P component for treatment of human amyloidosis. *Nature*, **417**, 254-259.
- Persiani, D.M. and Selsing, E. (1989) DNase I sensitivity of immunoglobulin light chain genes in Abelson murine leukemia virus transformed pre-B cell lines. *Nucleic Acids Res*, **17**, 5339-5348.
- Peterson, C.L. and Calame, K.L. (1987) Complex protein binding within the mouse immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol Cell Biol*, **7**, 4194-4203.
- Peterson, M.L. and Perry, R.P. (1986) Regulated production of mu m and mu s mRNA requires linkage of the poly(A) addition sites and is dependent on the length of the mu s-mu m intron. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 8883-8887.
- 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., Bruggemann, 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.
- Pierce, J.W., Gifford, A.M. and Baltimore, D. (1991) Silencing of the expression of the immunoglobulin kappa gene in non-B cells. *Mol Cell Biol*, **11**, 1431-1437.
- Pike, B.L., Boyd, A.W. and Nossal, G.J. (1982) Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**, 2013-2017.
- Pinaud, E., Aupetit, C., Chauveau, C. and Cogne, M. (1997) Identification of a homolog of the C alpha 3'/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH/hs1,2 enhancer downstream of the human immunoglobulin alpha 1 gene. *Eur J Immunol*, **27**, 2981-2985.
- Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M. and Cogne, M. (2001) Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity*, **15**, 187-199.
- Porter, R.R. (1973) Structural studies of immunoglobulins. *Science*, **180**, 713-716.
- Pozzi, C. and Locatelli, F. (2002) Kidney and liver involvement in monoclonal light chain disorders. *Semin Nephrol*, **22**, 319-330.
- Pozzi, C., Pasquali, S., Donini, U., Casanova, S., Banfi, G., Tiraboschi, G., Furci, L., Porri, M.T., Ravelli, M., Lupo, A. and et al. (1987) Prognostic factors and effectiveness of treatment in acute renal failure due to multiple myeloma: a review of 50 cases. Report of the Italian Renal Immunopathology Group. *Clin Nephrol*, **28**, 1-9.
- Preud'homme, J.L., Aucouturier, P., Touchard, G., Striker, L., Khamlichi, A.A., Rocca, A., Denoroy, L. and Cogne, M. (1994) Monoclonal immunoglobulin deposition disease (Randall type). Relationship with structural abnormalities of immunoglobulin chains. *Kidney Int*, **46**, 965-972.
- Preud'homme, J.L., Petit, I., Barra, A., Morel, F., Lecron, J.C. and Lelievre, E. (2000) Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Mol Immunol*, **37**, 871-887.
- Preud'homme, J.L. and Seligmann, M. (1972) Primary immunodeficiency with increased numbers of circulating B lymphocytes contrasting with hypogammaglobulinaemia. *Lancet*, **1**, 442.

Preud'homme, J.L. and Seligmann, M. (1972) Surface bound immunoglobulins as a cell marker in human lymphoproliferative diseases. *Blood*, **40**, 777-794.

R.

Radic, M.Z., Erikson, J., Litwin, S. and Weigert, M. (1993) B lymphocytes may escape tolerance by revising their antigen receptors. *J Exp Med*, **177**, 1165-1173.

Rajewsky, K. (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, **381**, 751-758.

Ramsden, D.A. and Wu, G.E. (1991) Mouse kappa light-chain recombination signal sequences mediate recombination more frequently than do those of lambda light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10721-10725.

Rawlings, D.J., Saffran, D.C., Tsukada, S., Largaespada, D.A., Grimaldi, J.C., Cohen, L., Mohr, R.N., Bazan, J.F., Howard, M., Copeland, N.G. and et al. (1993) Mutation of unique region of Bruton's tyrosine kinase in immunodeficient XID mice. *Science*, **261**, 358-361.

Reth, M.G., Jackson, S. and Alt, F.W. (1986) VHDJH formation and DJH replacement during pre-B differentiation: non-random usage of gene segments. *Embo J*, **5**, 2131-2138.

Retter, M.W. and Nemazee, D. (1998) Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J Exp Med*, **188**, 1231-1238.

Reya, T., O'Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R. and Grosschedl, R. (2000) Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*, **13**, 15-24.

Rikitake, O., Sakemi, T., Yoshikawa, Y., Nagano, Y. and Watanabe, T. (1989) Adult Fanconi syndrome in primary amyloidosis with lambda light-chain proteinuria. *Jpn J Med*, **28**, 523-526.

Rocca, A., Khamlichi, A.A., Aucouturier, P., Noel, L.H., Denoroy, L., Preud'homme, J.L. and Cogne, M. (1993) Primary structure of a variable region of the V kappa I subgroup (ISE) in light chain deposition disease. *Clin Exp Immunol*, **91**, 506-509.

Rocca, A., Khamlichi, A.A., Touchard, G., Mougnot, B., Ronco, P., Denoroy, L., Deret, S., Preud'homme, J.L., Aucouturier, P. and Cogne, M. (1995) Sequences of V kappa L subgroup light chains in Fanconi's syndrome. Light chain V region gene usage restriction and peculiarities in myeloma-associated Fanconi's syndrome. *J Immunol*, **155**, 3245-3252.

Rogers, J., Choi, E., Souza, L., Carter, C., Word, C., Kuehl, M., Eisenberg, D. and Wall, R. (1981) Gene segments encoding transmembrane carboxyl termini of immunoglobulin gamma chains. *Cell*, **26**, 19-27.

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.

Rolink, A., Haasner, D., Melchers, F. and Andersson, J. (1996) The surrogate light chain in mouse B-cell development. *Int Rev Immunol*, **13**, 341-356.

Rolink, A., Karasuyama, H., Grawunder, U., Haasner, D., Kudo, A. and Melchers, F. (1993) B cell development in mice with a defective lambda 5 gene. *Eur J Immunol*, **23**, 1284-1288.

Rolink, A.G., Andersson, J. and Melchers, F. (1998) Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. *Eur J Immunol*, **28**, 3738-3748.

- 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.
- Ronco, P.M., Mougnot, B., Touchard, G., Preud'homme, J.L. and Aucouturier, P. (1995) Renal involvement in hematological disorders: monoclonal immunoglobulins and nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **4**, 130-138.
- Ronco, P.M., Alyanakian, M.A., Mougnot, B. and Aucouturier, P. (2001) Light chain deposition disease: a model of glomerulosclerosis defined at the molecular level. *J Am Soc Nephrol*, **12**, 1558-1565.
- Ronco, P.M., Mougnot, B., Moulin, B., Bouiller, M., Messiaen, T. and Aucouturier, P. (2003) Adult Fanconi's syndrome due to monoclonal immunoglobulin light chains: an underdiagnosed disease with unexpected clinical and pathologic heterogeneity. In *Monoclonal gammopathies and the kidney*. G. Touchard, P. Aucouturier, O. Hermine, and P. Ronco, editors. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 75-86.
- Rose, S.M. and Garrard, W.T. (1984) Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. *J Biol Chem*, **259**, 8534-8544.
- Rosnet, O., Mattei, M.G., Delattre, O. and Schiff, C. (1999) VPRED3: cDNA characterization and expression in human and chromosome mapping in human and mouse. *Cytogenet Cell Genet*, **87**, 205-208.
- Rota, S., Mougnot, B., Baudouin, B., De Meyer-Brasseur, M., Lemaitre, V., Michel, C., Mignon, F., Rondeau, E., Vanhille, P., Verroust, P. and et al. (1987) Multiple myeloma and severe renal failure: a clinicopathologic study of outcome and prognosis in 34 patients. *Medicine (Baltimore)*, **66**, 126-137.
- Roussel, A., Spinelli, S., Deret, S., Navaza, J., Aucouturier, P. and Cambillau, C. (1999) The structure of an entire noncovalent immunoglobulin kappa light-chain dimer (Bence-Jones protein) reveals a weak and unusual constant domains association. *Eur J Biochem*, **260**, 192-199.
- Rudd, P.M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I.A. and Dwek, R.A. (2001) Glycosylation and the immune system. *Science*, **291**, 2370-2376.

S.

- Sakaguchi, N. and Melchers, F. (1986) Lambda 5, a new light-chain-related locus selectively expressed in pre-B lymphocytes. *Nature*, **324**, 579-582.
- 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 USA*, **96**, 1526-1531.
- Sandel, P.C. and Monroe, J.G. (1999) Negative selection of immature B cells by receptor editing or deletion is determined by site of antigen encounter. *Immunity*, **10**, 289-299.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A. and Baltimore, D. (1989) The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, **59**, 1035-1048.
- Schitteck, B. and Rajewsky, K. (1990) Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature*, **346**, 749-751.

- Schlissel, M.S. and Baltimore, D. (1989) Activation of immunoglobulin kappa gene rearrangement correlates with induction of germline kappa gene transcription. *Cell*, **58**, 1001-1007.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. and Schaffner, W. (1988) Identification of a novel lymphoid specific octamer binding protein (OTF-2B) by proteolytic clipping bandshift assay (PCBA). *Embo J*, **7**, 4221-4229.
- Sengul, S., Zwizinski, C. and Batuman, V. (2003) Role of MAPK pathways in light chain-induced cytokine production in human proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, **284**, F1245-1254.
- Sengul, S., Zwizinski, C., Simon, E.E., Kapasi, A., Singhal, P.C. and Batuman, V. (2002) Endocytosis of light chains induces cytokines through activation of NF-kappaB in human proximal tubule cells. *Kidney Int*, **62**, 1977-1988.
- 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.
- Shaffer, A.L. and Schlissel, M.S. (1997) A truncated heavy chain protein relieves the requirement for surrogate light chains in early B cell development. *J Immunol*, **159**, 1265-1275.
- Shimizu, T., Mundt, C., Licence, S., Melchers, F. and Martensson, I.L. (2002) VpreB1/VpreB2/lambda 5 triple-deficient mice show impaired B cell development but functional allelic exclusion of the IgH locus. *J Immunol*, **168**, 6286-6293.
- Shivtiel, S., Leider, N. and Melamed, D. (2002) Receptor editing in CD45-deficient immature B cells. *Eur J Immunol*, **32**, 2264-2273.
- Shivtiel, S., Leider, N., Sadeh, O., Kraiem, Z. and Melamed, D. (2002) Impaired light chain allelic exclusion and lack of positive selection in immature B cells expressing incompetent receptor deficient of CD19. *J Immunol*, **168**, 5596-5604.
- Siminovitch, K.A., Bakhshi, A., Goldman, P. and Korsmeyer, S.J. (1985) A uniform deleting element mediates the loss of kappa genes in human B cells. *Nature*, **316**, 260-262.
- Sirota, J.H. and Hamerman, D. (1954) Renal function studies in a adult subject with the Fanconi syndrome. *Am J Med*, **16**, 138-152.
- Skok, J.A., Brown, K.E., Azuara, V., Caparros, M.L., Baxter, J., Takacs, K., Dillon, N., Gray, D., Perry, R.P., Merckenschlager, M. and Fisher, A.G. (2001) Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat Immunol*, **2**, 848-854.
- Sleckman, B.P., Gorman, J.R. and Alt, F.W. (1996) Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu Rev Immunol*, **14**, 459-481.
- Slifka, M.K. and Ahmed, R. (1998) B cell responses and immune memory. *Dev Biol Stand*, **95**, 105-115.
- Solomon, A., Frangione, B. and Franklin, E.C. (1982) Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V lambda VI subgroup of human light chains with amyloidosis AL (lambda). *J Clin Invest*, **70**, 453-460.
- Sommer, T. and Wolf, D.H. (1997) Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *Faseb J*, **11**, 1227-1233.
- Sonoda, E., Pewzner-Jung, Y., Schwers, S., Taki, S., Jung, S., Eilat, D. and Rajewsky, K. (1997) B cell development under the condition of allelic inclusion. *Immunity*, **6**, 225-233.

- Sox, H.C., Jr. and Hood, L. (1970) Attachment of carbohydrate to the variable region of myeloma immunoglobulin light chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **66**, 975-982.
- Spiegelberg, H.L., Abel, C.A., Fishkin, B.G. and Grey, H.M. (1970) Localization of the carbohydrate within the variable region of light and heavy chains of human gamma g myeloma proteins. *Biochemistry*, **9**, 4217-4223.
- Stall, A.M., Wells, S.M. and Lam, K.P. (1996) B-1 cells: unique origins and functions. *Semin Immunol*, **8**, 45-59.
- Staudt, L.M., Clerc, R.G., Singh, H., LeBowitz, J.H., Sharp, P.A. and Baltimore, D. (1988) Cloning of a lymphoid-specific cDNA encoding a protein binding the regulatory octamer DNA motif. *Science*, **241**, 577-580.
- Stevens, F.J. (2000) Four structural risk factors identify most fibril-forming kappa light chains. *Amyloid*, **7**, 200-211.
- Stevens, F.J. and Argon, Y. (1999) Pathogenic light chains and the B-cell repertoire. *Immunol Today*, **20**, 451-457.
- Stevens, P.W., Raffin, R., Hanson, D.K., Deng, Y.L., Berrios-Hammond, M., Westholm, F.A., Murphy, C., Eulitz, M., Wetzel, R., Solomon, A. and et al. (1995) Recombinant immunoglobulin variable domains generated from synthetic genes provide a system for in vitro characterization of light-chain amyloid proteins. *Protein Sci*, **4**, 421-432.
- Stone, M.J. (1990) Amyloidosis: a final common pathway for protein deposition in tissues. *Blood*, **75**, 531-545.
- Storb, U. and Arp, B. (1983) Methylation patterns of immunoglobulin genes in lymphoid cells: correlation of expression and differentiation with undermethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 6642-6646.
- Storb, U., Engler, P., Manz, J., Gollahon, K., Denis, K., Lo, D. and Brinster, R. (1988) Expression of immunoglobulin genes in transgenic mice and transfected cells. *Ann N Y Acad Sci*, **546**, 51-56.
- Storb, U., Ritchie, K.A., O'Brien, R., Arp, B. and Brinster, R. (1986) Expression, allelic exclusion and somatic mutation of mouse immunoglobulin kappa genes. *Immunol Rev*, **89**, 85-102.
- Storb, U., Wilson, R., Selsing, E. and Walfield, A. (1981) Rearranged and germline immunoglobulin kappa genes: different states of DNase I sensitivity of constant kappa genes in immunocompetent and nonimmune cells. *Biochemistry*, **20**, 990-996.
- Su, T.T. and Rawlings, D.J. (2002) Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J Immunol*, **168**, 2101-2110.

T.

- ten Boekel, E., Melchers, F. and Rolink, A.G. (1997) Changes in the V(H) gene repertoire of developing precursor B lymphocytes in mouse bone marrow mediated by the pre-B cell receptor. *Immunity*, **7**, 357-368.
- ten Boekel, E., Melchers, F. and Rolink, A.G. (1998) Precursor B cells showing H chain allelic inclusion display allelic exclusion at the level of pre-B cell receptor surface expression. *Immunity*, **8**, 199-207.
- Thermann, R., Neu-Yilik, G., Deters, A., Frede, U., Wehr, K., Hagemeyer, C., Hentze, M.W. and Kulozik, A.E. (1998) Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *Embo J*, **17**, 3484-3494.

- Thiebe, R., Schable, K.F., Bensch, A., Brensing-Kuppers, J., Heim, V., Kirschbaum, T., Mitlohner, H., Ohnrich, M., Pourrajabi, S., Roschenthaler, F., Schwendinger, J., Wichelhaus, D., Zocher, I. and Zachau, H.G. (1999) The variable genes and gene families of the mouse immunoglobulin kappa locus. *Eur J Immunol*, **29**, 2072-2081.
- Thomas, J.D., Sideras, P., Smith, C.I., Vorechovsky, I., Chapman, V. and Paul, W.E. (1993) Colocalization of X-linked agammaglobulinemia and X-linked immunodeficiency genes. *Science*, **261**, 355-358.
- Thorner, P.S., Bedard, Y.C. and Fernandes, B.J. (1983) Lambda-light-chain nephropathy with Fanconi's syndrome. *Arch Pathol Lab Med*, **107**, 654-657.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M. and Nemazee, D. (1993) Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med*, **177**, 1009-1020.
- Tonegawa, S. (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, **302**, 575-581.
- Torres, R.M., Flaswinkel, H., Reth, M. and Rajewsky, K. (1996) Aberrant B cell development and immune response in mice with a compromised BCR complex. *Science*, **272**, 1804-1808.
- Touchard, G. (2003) Ultrastructural pattern and classification of renal monoclonal immunoglobulin deposits. In Monoclonal gammopathies and the kidney. G. Touchard, P. Aucouturier, O. Hermine, and P. Ronco, editors. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 95-117.
- Troutaud, D., Drouet, M., Decourt, C., Le Morvan, C. and Cogne, M. (1999) Age-related alterations of somatic hypermutation and CDR3 lengths in human V κ 4-expressing B lymphocytes. *Immunology*, **97**, 197-203.
- Truong, L.D., Mawad, J., Cagle, P. and Mattioli, C. (1989) Cytoplasmic crystals in multiple myeloma-associated Fanconi's syndrome. A morphological study including immunoelectron microscopy. *Arch Pathol Lab Med*, **113**, 781-785.
- Tsubata, T. and Reth, M. (1990) The products of pre-B cell-specific genes (lambda 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface. *J Exp Med*, **172**, 973-976.
- Turner, M., Gulbranson-Judge, A., Quinn, M.E., Walters, A.E., MacLennan, I.C. and Tybulewicz, V.L. (1997) Syk tyrosine kinase is required for the positive selection of immature B cells into the recirculating B cell pool. *J Exp Med*, **186**, 2013-2021.

W.

- Wall, R. and Kuehl, M. (1983) Biosynthesis and regulation of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*, **1**, 393-422.
- Wang, D., Feng, J., Wen, R., Marine, J.C., Sangster, M.Y., Parganas, E., Hoffmeyer, A., Jackson, C.W., Cleveland, J.L., Murray, P.J. and Ihle, J.N. (2000) Phospholipase C γ 2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity*, **13**, 25-35.
- Wang, J., Chang, Y.F., Hamilton, J.I. and Wilkinson, M.F. (2002) Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Mol Cell*, **10**, 951-957.
- Wang, J., Vock, V.M., Li, S., Olivas, O.R. and Wilkinson, M.F. (2002) A quality control pathway that down-regulates aberrant T-cell receptor (TCR) transcripts by a mechanism requiring UPF2 and translation. *J Biol Chem*, **277**, 18489-18493.

- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J.W., Meffre, E. and Nussenzweig, M.C. (2003) Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*, **301**, 1374-1377.
- Wei, J., Gaut, J.R. and Hendershot, L.M. (1995) In vitro dissociation of BiP-peptide complexes requires a conformational change in BiP after ATP binding but does not require ATP hydrolysis. *J Biol Chem*, **270**, 26677-26682.
- Weichhold, G.M., Klobeck, H.G., Ohnheiser, R., Combriato, G. and Zachau, H.G. (1990) Megabase inversions in the human genome as physiological events. *Nature*, **347**, 90-92.
- Weichhold, G.M., Ohnheiser, R. and Zachau, H.G. (1993) The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. *Genomics*, **16**, 503-511.
- Weischet, W.O., Glotov, B.O., Schnell, H. and Zachau, H.G. (1982) Differences in the nuclease sensitivity between the two alleles of the immunoglobulin kappa light chain genes in mouse liver and myeloma nuclei. *Nucleic Acids Res*, **10**, 3627-3645.
- Weiss, J.H., Williams, R.H., Galla, J.H., Gottschall, J.L., Rees, E.D., Bhatena, D. and Luke, R.G. (1981) Pathophysiology of acute Bence-Jones protein nephrotoxicity in the rat. *Kidney Int*, **20**, 198-210.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A. and Ploegh, H.L. (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, **384**, 432-438.
- Winearls, C.G. (1995) Acute myeloma kidney. *Kidney Int*, **48**, 1347-1361.
- Wortis, H.H. and Berland, R. (2001) Cutting edge commentary: origins of B-1 cells. *J Immunol*, **166**, 2163-2166.
- Wu, G.E., Hozumi, N. and Murialdo, H. (1983) Secretion of a lambda 2 immunoglobulin chain is prevented by a single amino acid substitution in its variable region. *Cell*, **33**, 77-83.

X, Y, Z.

- Xu, S., Tan, J.E., Wong, E.P., Manickam, A., Ponniah, S. and Lam, K.P. (2000) B cell development and activation defects resulting in xid-like immunodeficiency in BLNK/SLP-65-deficient mice. *Int Immunol*, **12**, 397-404.
- Yamagami, T., ten Boekel, E., Andersson, J., Rolink, A. and Melchers, F. (1999) Frequencies of multiple IgL chain gene rearrangements in single normal or kappaL chain-deficient B lineage cells. *Immunity*, **11**, 317-327.
- Yancopoulos, G.D. and Alt, F.W. (1986) Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Annu Rev Immunol*, **4**, 339-368.
- Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Suh, H., Hood, L. and Alt, F.W. (1986) Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase. *Cell*, **44**, 251-259.
- Ye, J., McCray, S.K. and Clarke, S.H. (1996) The transition of pre-BI to pre-BII cells is dependent on the VH structure of the mu/surrogate L chain receptor. *Embo J*, **15**, 1524-1533.
- Yel, L., Minegishi, Y., Coustan-Smith, E., Buckley, R.H., Trubel, H., Pachman, L.M., Kitchingman, G.R., Campana, D., Rohrer, J. and Conley, M.E. (1996) Mutations in the mu heavy-chain gene in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med*, **335**, 1486-1493.
- Ying, W.Z. and Sanders, P.W. (1998) Dietary salt enhances glomerular endothelial nitric oxide synthase through TGF-beta1. *Am J Physiol*, **275**, F18-24.

- Ying, W.Z. and Sanders, P.W. (2001) Mapping the binding domain of immunoglobulin light chains for Tamm-Horsfall protein. *Am J Pathol*, **158**, 1859-1866.
- Yokota, N., Yamamoto, Y., Fujimoto, S. and Tanaka, K. (1989) Acute renal failure presenting as Fanconi syndrome with lambda light chain proteinuria and interstitial nephritis. *Clin Nephrol*, **31**, 277-278.
- Yoshino, T., Kondo, E., Cao, L., Takahashi, K., Hayashi, K., Nomura, S. and Akagi, T. (1994) Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes. *Blood*, **83**, 1856-1861.
- Yu, W., Misulovin, Z., Suh, H., Hardy, R.R., Jankovic, M., Yannoutsos, N. and Nussenzweig, M.C. (1999) Coordinate regulation of RAG1 and RAG2 by cell type-specific DNA elements 5' of RAG2. *Science*, **285**, 1080-1084.
- Yu, W., Nagaoka, H., Jankovic, M., Misulovin, Z., Suh, H., Rolink, A., Melchers, F., Meffre, E. and Nussenzweig, M.C. (1999) Continued RAG expression in late stages of B cell development and no apparent re-induction after immunization. *Nature*, **400**, 682-687.
- Zachau, H.G. (1993) The immunoglobulin kappa locus-or-what has been learned from looking closely at one-tenth of a percent of the human genome. *Gene*, **135**, 167-173.
- Zhu, L., Herrera, G.A., Murphy-Ullrich, J.E., Huang, Z.Q. and Sanders, P.W. (1995) Pathogenesis of glomerulosclerosis in light chain deposition disease. Role for transforming growth factor-beta. *Am J Pathol*, **147**, 375-385.