

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences et Techniques

Ecole Doctorale ED 258

UMR CNRS 6101 – Laboratoire d'Immunologie

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Hei-lanne DOUGIER

Le 18 octobre 2005

COMMUTATION DE CLASSE ET EFFET NEO SUR LES
INTERACTIONS DE LONGUE DISTANCE DANS LE LOCUS
DES CHAÎNES LOURDES D'IMMUNOGLOBULINES

Directeur de Thèse : Amine KHAMLICH I

Soutenue devant le jury composé de :

- Président :** Monsieur Michel Cogné - Professeur, Université de Limoges
- Rapporteurs :** Madame Michèle Goodhardt - Directeur de recherche CNRS, Paris
Monsieur Jean-Christophe Bories - Chargé de recherche INSERM, Paris
- Examineurs :** Monsieur Patrick Lestienne - Directeur de recherche INSERM, Bordeaux
Monsieur Louis Gastinel - Professeur, Université de Limoges
Monsieur Amine Khamlichi - Chargé de recherche CNRS, Limoges

SOMMAIRE

<u>ABREVIATIONS</u>	1
<u>INTRODUCTION</u>	2
<u>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</u>	3
I. Organisation des gènes d'immunoglobulines	3
I.1. Locus des chaînes légères.....	3
I.2. Locus des chaînes lourdes.....	3
II. Les différents stades du développement B	4
II.1. Le stade pré-pro-B.....	5
II.2. Le stade pro-B.....	5
II.3. Le stade pré-B.....	6
II.4. Le stade B immature.....	7
III : Génération du répertoire des cellules B :	7
III.1. Réarrangements des gènes d'immunoglobulines.....	7
III.2. Hypermutation somatique.....	9
III.2.1. La sélection clonale.....	10
III.2.2. Modèles d'étude.....	12
III.2.2.1. Transcription et hypermutation.....	12
III.2.2.2. AID et hypermutation somatique.....	13
III.2.2.3. Polymérase mutagènes et hypermutation somatique.....	15
III.3. La commutation isotypique.....	17
III.3.1. Les différents isotypes chez la souris.....	18
III.3.2. Intervention de cytokines.....	19
III.3.3. Transcription germinale et commutation isotypique.....	21
III.3.3.1. AID et commutation isotypique.....	23
III.3.3.2. Polymérase mutagènes et commutation isotypique.....	26
IV. La régulation des gènes d'Immunoglobulines	27
IV.1. Les promoteurs.....	27

IV.2. L'activateur transcriptionnel intronique E μ	29
IV.3. Le promoteur-activateur compris dans l'élément DQ52.....	31
IV.4. La région 3' IgH.....	31
V. Effets dus à l'insertion du gène de résistance à la néomycine.....	32
<u>POSITION DU PROBLEME</u>.....	35
<i>PARTIE 1</i>	35
PARTIE 2	37
<u>RESULTATS</u>.....	40
<i>PARTIE 1</i>	40
PARTIE 2	40
Manuscrit n°1 : Replacement of S μ sequences by neomycine resistance gene impairs μ gene expression and B cell development.	
Manuscrit n°2 : Germline trancription in mice bearing neo ^f gene downstream of I γ 3 exon in the immunoglobulin heavy chain.	
Manuscrit n 3 : Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells.	
Manuscrit n°4 : Interallelic class switch recombination can reverse allelic exclusion and allow <i>trans</i> -complementation of an IgH locus switching defect.	
<u>DISCUSSION</u>.....	ET
<u>PERSPECTIVES</u>.....	46
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>.....	55

ABREVIATIONS

aa : acides aminés	IFN : interféron
Ac : anticorps	Ig : immunoglobuline
ADN : acide désoxyribonucléique	IgH : chaîne lourde d'immunoglobuline
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	IL : interleukine
Ag : antigène	ITAM : “ immune receptor tyrosine-based activation motif”
AID : “Activation-Induced cytidine Deaminase”	J : segment de jonction
ARN : acide ribonucléique	LCR : région de contrôle du locus
ARNm : acide ribonucléique messenger	LPS : lipopolysaccharide bactérien
BCR : récepteur à l'antigène des cellules B	Kb : kilobase
CD40-L : ligand de CD40	KO : « knock out » : délétion de gène par recombinaison homologue
CDR : “complementarity-determining regions”	MAR : matrix attachment region
CG : centre germinatif	Néo^R : gène de résistance à la néomycine
C_H : région constante de la chaîne lourde d'immunoglobuline	NHEJ : jonctions d'extrémités non homologues
CPA : Cellule Présentatrice de l'Ag	PALS : “PeriArteriolar Lymphoid Sheat”
D : segment de diversité	PKC : protéine kinase C
DAG : diacylglycérol	RAG : gènes d'activation de la recombinaison
FDC : « Follicular Dendritic Cell »	RSS : séquence signal de recombinaison
HIGM 2 : syndrome d'hyper IgM de type 2	S : région de commutation « switch »
HS : site hypersensible à la DNase I	V : région variable

INTRODUCTION

Le système immunitaire possède des capacités de reconnaissance et de mémoire qui permettent normalement la tolérance des antigènes du soi et l'élimination des antigènes du non-soi. La réponse immunitaire humorale repose sur des récepteurs des cellules B, spécifiques des antigènes, qui seront ensuite sécrétés sous la forme d'anticorps : les immunoglobulines (Ig).

Ces protéines effectrices Ig synthétisées par les cellules de la lignée lymphocytaire B sont capables de lier spécifiquement un antigène avec pour but final l'élimination de ce dernier. Les immunoglobulines sont des tétramères protéiques composés de deux chaînes lourdes H identiques et deux chaînes légères L identiques reliées entre elles par des ponts disulfures. La plupart des vertébrés possède deux types de chaînes légères (κ et λ), qui peuvent s'associer à chacune des cinq classes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , α , ϵ). La comparaison des séquences protéiques de chaînes lourdes et légères a permis de distinguer deux régions rendant compte de la dualité fonctionnelle et structurale des Ig. La partie amino-terminale, appelée région variable V, est très différente d'une chaîne à une autre. Les régions variables des chaînes lourde et légère interagissent pour former le site de fixation de l'antigène déterminant ainsi la spécificité de l'Ig. La partie carboxy-terminale est, elle, très conservée entre les chaînes légères d'un même type et les chaînes lourdes d'une même classe. Cette région constante C confère à l'Ig ses fonctions effectrices (fixation de certains composants du complément, interaction avec des récepteurs spécifiques à la surface d'autres types cellulaires...) (Figure1).

Les mécanismes conduisant à l'expression des immunoglobulines par les cellules de la lignée lymphocytaire B sont particulièrement complexes. En effet, dès lors qu'une cellule est engagée dans la voie de la différenciation B, les gènes d'Ig vont subir un ensemble de réarrangements intra-géniques ordonnés et complexes pour devenir fonctionnels. Ces réarrangements, qui sont également des marqueurs de la maturation des cellules B, aboutissent à l'expression du récepteur à l'antigène de la cellule B (BCR).

Avant d'aborder mon travail de thèse, je vais rappeler l'organisation des gènes d'Ig, les mécanismes génétiques impliqués dans la synthèse des anticorps ainsi que les différents éléments, répartis sur tout le locus, participant à la régulation de cette synthèse au cours de la différenciation des cellules B.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Organisation des gènes d'immunoglobulines

I.1. Locus des chaînes légères

Les gènes des chaînes légères κ sont situés sur le chromosome 6 de la souris. La disposition germinale comprend entre 90 et 300 segments $V\kappa$ et 5 segments $J\kappa$ qui codent la région variable de la chaîne, et un seul segment codant la partie constante $C\kappa$ (Figure 2).

Les gènes des chaînes légères λ sont sur le chromosome 16 de la souris 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 ne comporte que deux segments variables $V\lambda$, le segment $V\lambda_1$ s'associe préférentiellement à $J\lambda_3$ et $J\lambda_1$ alors que le segment $V\lambda_2$ s'associe préférentiellement à $J\lambda_2$ (les segments $J\lambda_4$ et $C\lambda_4$ étant défectifs).

I.2. Locus des chaînes lourdes

Les gènes des chaînes lourdes, situés sur le chromosome 12 de la souris comprennent 100 à 200 segments V_H , une douzaine de segments D_H (ces segments appelés « de diversité » sont propres au locus de chaînes lourdes ou IgH) et un groupe de quatre segments J_H , suivis de huit gènes codant des régions constantes des huit classes et sous-classes d'immunoglobulines : μ , δ , γ_3 , γ_1 , γ_2b , γ_2a , ϵ et α (Figure 2). Chaque gène constant est composé de multiples exons codant les domaines structuraux propres à chaque chaîne lourde ainsi que les régions charnières pour certaines Ig, enfin des exons indépendants codent les régions intra-cytoplasmiques et trans-membranaires pour chaque isotype.

II. Les différents stades du développement B

Les Ig sont exclusivement produites par les lymphocytes B, résultat de la restriction de l'expression des gènes d'Ig à des stades précis du développement de ces cellules. La différenciation des cellules B est un processus complexe impliquant plusieurs stades définis par l'expression de marqueurs spécifiques à la surface des cellules et par l'état des réarrangements génomiques au sein des loci des Ig [Meffre et coll., 2000].

Les étapes de différenciation qui conduisent la cellule souche hématopoïétique au lymphocyte B immature se déroulent dans la moelle osseuse en l'absence de stimulation antigénique (phase indépendante de l'antigène). Elles dépendent de processus complexes comprenant les remaniements des segments de gènes codant pour le récepteur de l'antigène ainsi que des interactions avec les cellules stromales de la moelle osseuse.

Les stades de différenciation suivants se déroulent en périphérie et impliquent une migration à travers les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions, amygdale,...). Ces étapes de maturation sont dépendantes de l'antigène (phase dépendante de l'antigène). Elles conduisent les lymphocytes B immatures vers les stades ultimes de différenciation caractérisés par l'acquisition de mutations somatiques, la commutation isotypique, et l'émergence de plasmocytes et de cellules dites "à mémoire".

La phase du développement permettant l'évolution des progéniteurs lymphoïdes communs aux lymphocytes B immatures, dépend notamment de la possibilité pour un progéniteur B d'aboutir à des réarrangements efficaces des gènes codant pour les chaînes légères et les chaînes lourdes. Elle conduit donc à la synthèse et à l'expression à la membrane d'une Ig fonctionnelle. La différenciation progresse de la périphérie vers le centre de la moelle osseuse et les principales étapes peuvent être suivies selon l'état de réarrangement des gènes d'Ig et d'après l'expression ou la perte à la surface cellulaire de marqueurs de différenciation. Les réarrangements observés au sein du locus des Ig et le profil d'expression de marqueurs de surface sont donc de bons marqueurs des étapes de différenciation de la lignée B [Meffre et coll., 2000] (Figure 3).

II.1. Le stade pré-pro-B

Dans la moelle osseuse, le précurseur le plus précoce engagé dans la voie B a son locus Ig dans une configuration germinale (il n'a pas encore réarrangé les gènes d'Ig), mais il se distingue par une série de marqueurs de surface et se différencie uniquement en cellule B *in vitro* : c'est le stade pré-pro-B. Ces cellules expriment le marqueur B220 à la surface (récepteur du CD45). D'autres marqueurs sont présents tels que CD43 et c-kit (CD117) [Hardy et coll., 1991 ; Rolink coll., 1996a]. Ces cellules pré-pro-B, caractérisées par Li et collaborateurs (1996), expriment fortement le transcrit JH1 germinale (parfois appelé μ). Ce transcrit initié au niveau d'une séquence située immédiatement en amont de DQ52, constitue l'une des manifestations les plus précoces de l'engagement dans la voie B [Alessandrini et Desiderio, 1991 ; Schlissel et coll., 1991a].

Les cellules pré-pro-B expriment très faiblement les gènes *RAG-1* et *RAG-2* (pour « Recombination Activating Gene ») laissant ainsi supposer que l'accessibilité des gènes d'Ig précède l'activité recombinase.

II.2. Le stade pro-B

C'est à ce stade que les réarrangements des gènes d'Ig se mettent en place. Un premier réarrangement intragénique est détecté au sein du locus IgH, par la jonction d'un segment D_H avec un segment J_H, sur les deux chromosomes. Au cours des réarrangements DJ_H, une forme tronquée de la protéine μ (appelée D μ , dépourvue de région variable V_H) est parfois produite par le réarrangement du segment D à J_H dans le cadre de lecture RF2. Lorsque cette protéine D μ est formée, le développement B est bloqué par un signal négatif transduit *via* Ig α /Ig β [Gong et Nussenzweig, 1996].

Ces cellules pro-B expriment les protéines VpreB et $\lambda 5$ (appelées pseudo-chaînes légères) et les protéines Ig α et Ig β sont détectées à la membrane de ces cellules en association avec la calnexine [Nagata et coll., 1997]. Une signalisation peut-être induite par ce complexe permettant le recrutement de protéines tyrosines kinases via leurs motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosin-based Activation Motif) et il a été montré que dans des souris RAG2 *-/-*, cette signalisation permet l'acquisition de certains marqueurs du stade pré-B [Nagata et coll., 1997].

A ce stade, le marqueur CD19 apparaît, marqueur considéré comme très spécifique des cellules de la lignée B à l'exception des plasmocytes.

II.3. Le stade pré-B

Ce stade est caractérisé par l'assemblage d'un segment V_H avec les segments DJ_H réarrangés. Les réarrangements des gènes V_H sur les segments J_H nécessitent une accessibilité induite par l'action de Pax5 et de l'interleukine IL7 particulièrement au niveau des segments V_H les plus distaux (5' du locus des chaînes lourdes) [Nutt et coll., 1997 ; Corcoran et coll., 1998 ; Hesslein et coll., 2003]. Si le cadre de lecture est correct (on parle de réarrangement productif), une chaîne lourde μ sera produite, elle s'associera aux pseudo-chaînes légères et aux protéines $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ dans le réticulum endoplasmique, et le complexe sera exporté à la surface de la cellule. Ce complexe forme le récepteur des cellules pré-B (pré-BCR) [pour revue : Melchers et coll., 1993] (Figure 4). Seule la moitié des chaînes μ synthétisées peut s'associer à la pseudo chaîne légère [ten Boekel et coll., 1997], conséquence probable de la structure particulière de certains CDR3 (régions déterminant la complémentarité avec l'antigène) empêchant l'appariement des deux chaînes. Le stade pré-B est également caractérisé par la perte des marqueurs c-kit et CD43 et le début de l'expression du marqueur CD25 [Rolink et coll., 1994].

Contrairement au stade pro-B où les réarrangements DJ ont lieu sur les deux chromosomes, les réarrangements VDJ se produisent uniquement sur un seul chromosome. Il s'agit là d'un mécanisme de régulation très important, appelé exclusion allélique, qui permet à une cellule d'être monospécifique : le produit protéique d'un réarrangement productif VDJ sur un allèle va inhiber le réarrangement VDJ sur l'autre allèle, grâce à un signal transmis par les unités transductrices $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ associées à la chaîne lourde μ et aux pseudo-chaînes légères.

Le pré-BCR est indispensable au déroulement de l'ontogenèse B, son expression permet à la cellule pré-B de passer au stade ultérieur où la reprise des réarrangements s'effectue pour constituer un segment joint V_L-J_L sur le locus des chaînes légères. Le réarrangement du locus des chaînes légères « clôture » le stade pré-B et permet de passer au stade de cellule B immature.

II.4. Le stade B immature

Le complexe μ -Ig α /Ig β -pseudo-chaînes légères transduit un signal positif déclenchant les réarrangements VJ sur le locus de chaîne légère κ : c'est le stade B immature.

Ce stade est caractérisé par la production de chaînes légères classiques qui vont remplacer les pseudo-chaînes légères et donner naissance à une IgM de surface qui confère à la cellule une spécificité donnée de reconnaissance à l'antigène. Les lymphocytes B immatures sont alors sujets à un processus de sélection négative où les cellules possédant des Ig membranaires spécifiques pour les antigènes du soi sont éliminées par apoptose. Les cellules qui survivent quittent la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes périphériques (rate, ganglions...) où elles pourront subir les dernières étapes de maturation.

La reconnaissance d'un antigène, par des cellules B immatures exprimant l'IgM spécifique, va activer ces cellules qui vont se différencier en cellules B matures exprimant IgM et/ou IgD.

III : Génération du répertoire des cellules B :

III.1. Réarrangements des gènes d'immunoglobulines

Le grand nombre de segments V, D et J disponibles, les multiples combinaisons entre ces éléments (diversité combinatoire) ainsi que l'imprécision de leurs jonctions (diversité jonctionnelle) contribuent considérablement à la diversité des anticorps (Figure 5).

Les recombinaisons entre les différents segments codant les régions variables des gènes de chaînes lourde et légère s'effectuent à des sites spécifiques nommés RSS (séquence signal de recombinaison) situés en 5' et/ou en 3' des segments à assembler. Les RSS sont constituées de deux motifs consensuels de sept nucléotides (heptamère CACAGTG) et de neuf nucléotides très conservés (nonamère de séquence consensus ACAAAAACC) séparés par une séquence peu conservée (spacer) de 12 ou 23 nucléotides aléatoires [Tonegawa, 1983 ; pour revue : Hesslein et Schatz., 2001]. Même si ces spacer sont moins conservés que les heptamères et les nonamères constituant les RSS, ils interviennent dans l'utilisation des

séquences RSS et dans le clivage médié par les RAG [Nadel et coll., 1998 ; Jung et coll., 2003].

La recombinaison ne peut s'effectuer qu'entre RSS possédant un séparateur de taille différente (règle 12/23) [Sakano et coll., 1981 ; Eastman et coll., 1996 ; van Gent et coll., 1996]. Les RSS sont disposées en 5' et/ou 3' des segments à assembler de façon à ce que les recombinaisons ne puissent se faire qu'entre segments D_H et J_H puis V_H et D_H pour les chaînes lourdes, et qu'entre V_L et J_L pour les chaînes légères. Ainsi, chaque segment D est flanqué du même type 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 $V_H-D-D-J_H$ [Meek et coll., 1989]. A noter cependant qu'en de rares occasions, un réarrangement V_H-J_H peut avoir lieu [Koralov et coll., 2005]. 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. 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. 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].

Les recombinaisons V(D)J mettent en jeu une machinerie enzymatique composée des protéines RAG-1 et RAG-2 [Schatz et coll., 1989 ; Oettinger et coll., 1990]. Une déficience en RAG-1 ou RAG-2 aboutit à un blocage complet du développement B aux stades précoces, stades où les recombinaisons VDJ interviennent normalement [Mombaerts et coll., 1992 ; Shinkai et coll., 1992]. Ces deux protéines sont exprimées de manière simultanée, exclusivement dans les lymphocytes B et T, et spécifiquement au stade du développement où les gènes des récepteurs antigéniques sont réarrangés [Chun et coll., 1991 ; Mombaerts et coll., 1992]. Elles interviennent ainsi dans l'assemblage aussi bien des régions variables des gènes d'Ig que de celles du récepteur des cellules T [Yancopoulos et Alt, 1985 ; pour revue Nagaoka et coll., 2000 ; Bassing et coll., 2002]. La recombinase a pour cible les RSS et est nécessaire et suffisante au ciblage du processus de recombinaison V(D)J dès lors que les

gènes d'Ig sont "accessibles" aux réarrangements. Bien que les protéines RAG-1 et -2, par elles seules, soient capables de s'associer aux RSS et de réaliser des coupures *in vitro* [van Gent et coll., 1996], l'efficacité de ces réactions est cependant largement favorisée par la présence des protéines architecturales HMG-1 et HMG-2 (High mobility group protein) [Sawchuk et coll., 1997 ; van Gent et coll., 1997].

Suite au clivage des RSS par les protéines RAG, les segments générés sont réassociés via un mécanisme faisant intervenir le « Non Homologous End Joining » Pathway (NHEJ) [Dudley et coll., 2005]. Les enzymes impliquées dans le mécanisme de NHEJ, telles que Ku70, Ku80, DNA-PKcs et Artemis jouent un rôle important dans les réarrangements VDJ.

- Les fonctions potentielles du complexe Ku70 et Ku80 pendant le NHEJ seraient (1) la protection contre la dégradation des extrémités des ADN générées pendant la recombinaison VDJ [Getts et Stamato, 1994 ; Boulton et Jackson, 1996], (2) la juxtaposition des extrémités d'ADN résultant du clivage par les RAG avant la religation [Boulton et Jackson, 1996 ; Cary et coll., 1997], et (3) le recrutement ou l'activation de la réparation de l'ADN par l'activation d'enzymes telles que la ligase IV et le facteur XRCC4 notamment, ou des protéines détectant les dommages à l'ADN [Ramsden et Gellert, 1998 ; West et Lieber, 1998].

- Il a été montré que les DNA-PKcs phosphorylaient Artemis ainsi que d'autres membres du mécanisme NHEJ nécessaires à la formation des jonctions DJ ou VDJ [Ma et coll., 2002 ; Rooney et coll., 2002]. La forme phosphorylée d'Artemis possède une activité endonucléasique qui, *in vitro*, est capable d'ouvrir les épingles à cheveux générées par les RAG [Ma et coll., 2002] (Figure 6).

III.2. Hypermutation somatique

L'extrême souplesse dans les mécanismes de recombinaison V(D)J est une première source de grande diversité du répertoire B. L'hypermutation somatique permet d'amplifier cette diversité : la fréquence des mutations somatique est extraordinairement augmentée à la suite d'une stimulation antigénique. Cette réaction est essentiellement ciblée sur la région variable des gènes d'Ig des cellules B activées. Les mutations introduites permettent éventuellement d'augmenter l'affinité pour l'Ag [Neuberger et Milstein, 1995]. Les cellules B

qui expriment à leur surface des Ac de forte affinité et qui ont été sélectionnées positivement survivent et prolifèrent en priorité.

III.2.1. La sélection clonale

Suite à une immunisation avec un Ag étranger qui entraîne une réponse T-dépendante, on observe la formation de structures particulières appelées centres germinatifs (CG) (Figure 7). Ces structures apparaissent quelques jours après l'exposition à l'Ag et persistent pendant quelques jours à quelques semaines. Ils réapparaissent si l'organisme rencontre de nouveau le même Ag. La taille des CG diminue avec les immunisations successives [Liu et coll., 1991; Hollowood et McCartney, 1992]. Ils sont associés à l'expansion oligoclonale de cellules B spécifiques [Kroese et coll., 1987 ; Jacob et coll., 1991a], sont le site de l'hypermutation somatique [Kallberg et coll., 1993 ; Berek et coll., 1991], de la commutation isotypique (toujours dans le cadre d'une réponse T-dépendante), de la sélection positive [Nieuwenhuis et Ford, 1976], de la sélection négative (contre les anticorps de faible affinité ou contre les anticorps autoréactifs) [pour revue MacLennan, 1994] et de l'induction de la différenciation en cellules B mémoires [Klaus et coll., 1980 ; Coico et coll., 1983] ou en cellules plasmiques [Kosco et coll., 1989 ; Tew et coll., 1992].

Lorsque la cellule B entre dans le follicule primaire, son IgS n'est plus exprimée à la surface, et une phase de prolifération massive s'en suit : à ce stade on parle de centroblastes. Ce sont ces cellules qui sont la cible de l'hypermutation somatique. Des mutations ponctuelles, et parfois des insertions ou délétions, sont ainsi introduites dans la région variable, et certaines d'entre elles vont affecter l'affinité du BCR. Les mutations sont le plus souvent retrouvées au sein des CDR (les régions hypervariables) qui forment le site de fixation antigénique. En revanche ces mutations sont sous-représentées dans les FR qui constituent le « châssis » de cette région.

Dans les CG, on distingue deux zones principales dites zone sombre et zone claire. Les centroblastes sont localisés dans la zone sombre de forte densité, dans laquelle très peu de FDC sont présentes.

Dans la zone claire, zone apicale du centre germinatif, les lymphocytes sont de plus petite taille, et sont séparés par un large réseau de FDC. Ces lymphocytes ré-expriment leur IgS : ce sont les centrocytes. Dans cette zone il existe une étroite relation entre les différents acteurs cellulaires : les centrocytes, les FDC, mais aussi les cellules T, qui influencent

grandement l'activité individuelle de ces différents acteurs. Les FDCs jouent le rôle de CPA et peuvent retenir l'Ag sous forme de complexes immuns plusieurs mois. Les centrocytes exprimant un récepteur de haute affinité pour les épitopes présentés par les FDC sont sélectionnés positivement et peuvent alors se différencier en cellules B mémoires ou sécrétrices d'Ac (cellules plasmiques). Au contraire, si les mutations ne changent pas, voire diminuent l'affinité, ou si les interactions avec les lymphocytes T n'ont pas lieu (cas des anticorps autoréactifs), ces cellules sont alors éliminées par apoptose [MacLennan, 1994].

En effet, le fort taux d'apoptose dans la population des centrocytes montre qu'il existe un processus de sélection qui suit l'étape des mutations somatiques observées dans les centroblastes. Le choix se fait en fonction des co-signaux reçus par les acteurs cellulaires [Pulendran et coll., 1997]. La relation étroite entre les FDC et les cellules B semble se faire par CD54 et VCAM-1 sur les FDC et CD11a/CD18 et VLA/4 sur les centrocytes [Koopman et coll., 1991]. D'après les premières études, le signal de survie obtenu par le signal anti-Ig semblait être soutenu par TGF β [Holder et coll., 1992] et CD40. La nécessité de CD40 rend la présence des cellules T indispensable au maintien des CG. Des études *in vitro* ont démontré l'importance de CD40, puisque l'on obtient une survie à long terme des cellules *in vitro* avec un Ac anti-CD40 [Holder et coll., 1993]. En revanche, dans le mécanisme même de l'hypermutation somatique, l'intervention directe de CD40 est aujourd'hui contestée. Des études *in vitro* ont suggéré que l'hypermutation somatique était indépendante de l'interaction CD40-CD40L [Denépoux et coll., 2000]. Il existe probablement d'autres molécules d'adhésion cellulaire entre les cellules T et B impliquées dans cette étape.

Alors que l'on pensait au départ que le mécanisme de mutation somatique était restreint aux seuls gènes d'Ig, ce mécanisme semble opérer sur d'autres gènes. Des hypermutations aberrantes affectent notamment les proto-oncogènes PIM1, MYC, RhoH/TTF et PAX5 dans plus de 50% des lymphomes DLCL (Diffuse Large-Cell Lymphoma), tumeurs dérivant des centres germinatifs [Migliazza et coll., 1995 ; Paqualucci et coll., 2001 ; Zan et coll., 1999]. L'hypermutation somatique affecte également le gène BCL6 en générant des substitutions de bases et plus rarement des délétions ou des insertions [Pasqualucci et coll., 1998 ; Zan et coll., 2000]. Récemment les caractéristiques des mutations somatiques des régions variables des chaînes d'Ig ont été retrouvées dans les gènes B29 et mb1. On trouve au sein de ces gènes des motifs cibles RGYW/WRCY, ou WA, et les mutations sont localisées dans les 2,5 kb en aval du site d'initiation de la transcription. Pour B29, une région supplémentaire située entre 2,7 et 3 kb après le site d'initiation (partie cytoplasmique d'Ig β)

est aussi le site de mutation. Cette région serait importante dans la régulation du taux d'expression du BCR à la surface et donc de sa fonction [Gordon et coll., 2003].

III.2.2. Modèles d'étude

La démonstration qu'un transgène d'Ig peut être le substrat de l'hypermutation somatique [O'Brien et coll., 1987] a permis de développer un système intéressant pour l'analyse de ce mécanisme. Les systèmes transgéniques ont notamment permis de localiser les mutations dans la région V(D)J, et d'identifier avec précision des sites où certaines mutations se rencontrent plus fréquemment que d'autres, ces « hotspots » se situent en majorité au niveau des CDR [Sharpe et coll., 1991; Lozano et coll., 1993 ; Betz et coll., 1993 ; Betz et coll., 1994].

III.2.2.1. Transcription et hypermutation

Des lignées transgéniques ont permis de mettre en évidence l'implication des éléments *cis*-régulateurs du locus d'Ig dans l'hypermutation. Les éléments de régulation du locus des chaînes légères ont été mis en évidence plus facilement que ceux de la chaîne lourde.

Si dans un transgène κ , le promoteur $V\kappa$ est remplacé par celui de la β -globine, l'hypermutation est toujours détectée sur le transgène. En revanche, l'enhancer intronique ainsi que l'enhancer 3' sont requis pour une hypermutation optimale [Betz et coll., 1994]. La comparaison de plusieurs promoteurs a montré que des mutations étaient observées sur le transgène lorsque celui-ci était sous le contrôle de promoteurs transcriptionnels de natures différentes [Fukita et coll., 1998]. Il semble donc que la transcription est un pré-requis à l'hypermutation somatique et ce indépendamment du promoteur qui initie la transcription.

Ce sont les régions V du transgène κ qui sont la cible de l'hypermutation dans les CG. La délétion, au sein du transgène, de la MAR flanquant l'enhancer intronique $E\kappa_i$ abolit l'hypermutation. La baisse d'hypermutation est également observée si, $E\kappa_i$, le core de la région de l'enhancer kappa 3' ($E\kappa_3'$), ou la région flanquante $E3'$, sont individuellement éliminés. Certaines délétions affectant la mutation sont le reflet d'une baisse de l'expression du transgène. En effet, les mutations du transgène sont réduites de façon importante dans ceux qui expriment faiblement le transgène par comparaison aux cellules qui l'expriment fortement [Goyenechea et coll., 1997].

Toujours dans le but d'identifier les régions régulatrices de l'hypermutation, le promoteur normalement localisé en amont de la région V_{κ} a été dupliqué en amont de la région constante au sein d'un transgène κ . Non seulement les régions VJ étaient mutées, mais la région constante l'était également. La fréquence de mutation était identique entre les deux régions [Peters et Storb, 1996].

La régulation du gène λ dans ce processus a été moins étudiée. Afin d'identifier les éléments *cis*-activateurs responsables de l'hypermutation somatique, des souris transgéniques λ ont été obtenues. Ce transgène était régulé par l'enhancer intronique E_{μ} , et un promoteur de chaîne lourde. Les mutations somatiques ont été étudiées dans les hybridomes dérivés de ces souris. Bien que les taux d'expression du transgène λ soient normaux, les mutations dans la région variable du transgène n'ont pu être détectées [Hengstschläger, et coll., 1994].

Des souris transgéniques portant un mini-locus VDJ ont été générées [Taylor et coll., 1994; Wagner et coll., 1994]. Même en l'absence de l'enhancer 3' IgH dans ce mini-locus, des mutations somatiques ont été observées bien qu'à un taux très réduit [Wagner et coll., 1994]. D'autres éléments du locus IgH, distincts de *hs3b* et *hs4* (voir plus loin) semblent donc nécessaires à l'obtention de mutations efficaces [Le Morvan et coll., 2003].

La transcription joue donc un rôle-clé dans le mécanisme de l'hypermutation somatique. Bien que les séquences responsables du ciblage des mutations somatiques restent incertaines, la combinaison enhancer-promoteur est probablement critique. Par exemple, une construction contenant un promoteur fort, indépendamment de l'enhancer, permet une transcription constitutive, en revanche, les mutations sont dépendantes de la présence des enhancers Ig κ [Papavasiliou et Schatz, 2000]. Il n'est pas clair si les mutations dépendantes des enhancers sont position-dépendantes [Bachl et coll., 1998; Winter et coll., 1998] ou indépendantes [Klix et coll., 1998; Papavasiliou et Schatz, 2000]. Il est également possible qu'une distance optimale soit nécessaire pour obtenir une communication efficace entre promoteurs et enhancers.

III.2.2.2. AID et Hypermutation somatique

Par criblage soustractif de banques d'ADNc, une nouvelle protéine a été identifiée dans une lignée B (CH12) pouvant commuter *in vitro*. AID (Activation-Induced-cytidine-Deaminase) est exprimée dans les cellules B des centres germinatifs activés [Muramatsu et coll., 2000]. L'absence d'AID résulte dans l'arrêt de l'hypermutation somatique chez

l'homme et la souris [Muramatsu et coll., 2000 ; Revy et coll., 2000]. Par ailleurs, la surexpression d'AID dans des bactéries génère des mutations au sein de plusieurs gènes transcrits [Petersen-Mahrt et coll., 2002 ; Ramiro et coll., 2003]. Tout comme les protéines RAG dans le cas des recombinaisons VDJ, AID est nécessaire et suffisante pour l'hypermutation somatique de gènes exprimés dans des organes non lymphoïdes. Cependant, le spectre des mutations observées dans les cellules non lymphoïdes sur des substrats artificiels ne mime pas complètement ce qui se produit au niveau des lymphocytes B, suggérant que des facteurs B spécifiques et/ou des modifications d'AID contribuent à ce processus [Dudley et coll., 2005].

L'analyse de la séquence codante pour AID a révélé une forte homologie avec APOBEC-1, une enzyme d'édition de l'ARNm. APOBEC-1 est une sous-unité catalytique d'un complexe multiprotéique d'édition de l'ARN, elle agit sur l'ARNm de l'apolipoprotéine (ApoB). AID a ainsi été considérée dans un premier temps comme une nouvelle protéine d'édition de l'ARN agissant sur un ou plusieurs ARNm codant pour des endonucléases impliquées dans l'introduction de cassures dans l'ADN au cours de l'hypermutation [Muramatsu et coll., 1999]. Ce modèle est encore aujourd'hui soutenu par Honjo et collaborateurs. Cependant des expériences plus récentes suggèrent qu'AID pourrait agir directement sur l'ADN [Petersen-Mahrt et coll., 2002 ; Bransteitter et coll., 2003 ; Chaudhuri et coll., 2003 ; Dickerson et coll., 2003 ; Pham et coll., 2003 ; Yu et coll., 2004].

Ainsi, AID entraîne une déamination des cytidines (dC) en uridine (dU) dans l'ADN et c'est le mode de traitement de l'uridine, par les mécanismes de réplication et/ou de réparation, qui déterminera le devenir et le profil des mutations introduites (Figure 8).

La lignée humaine Ramos, possédant la capacité d'hypermuter *in vitro*, a été utilisée pour évaluer l'implication d'AID dans un autre contexte. Le taux de mutations observé dans la région variable des différents clones est proportionnel au niveau d'ARNm d'AID. Les mutations induites par AID semblent se localiser sur des hotspots riches en G ou C souvent localisés dans des motifs du type RGYW ou WRCY. L'action d'AID a été également étudiée dans des hybridomes représentatifs du stade plasmocytaire. Cette étude a révélé qu'AID était suffisante pour induire l'hypermutation somatique dans ces cellules [Martin et Scharff, 2002].

D'autre part, il a été montré que la lignée 18.81, représentative du stade pré-B, pouvait exprimer AID, et assurer l'hypermutation somatique [Bachl et coll., 2001], mais la signification de ces observations *in vivo* n'est pas évidente.

Il a également été démontré que cette protéine pouvait induire des mutations dans des cellules non B [Yoshikawa et coll., 2002]. Ceci suggère qu'AID agirait seule ou que les cofacteurs qui seraient nécessaires à son action sont ubiquitaires.

III.2.2.3. Polymérase mutagènes et hypermutation somatique

Afin de lutter contre des attaques d'agents endogènes ou environnementaux, les cellules ont mis en place des systèmes sophistiqués pour répondre aux dommages faits à l'ADN. Même lorsque ces systèmes sont fonctionnels, certaines lésions peuvent persister dans le génome au cours de la réplication, notamment lorsque la cellule présente trop de lésions ou lorsque un dommage particulier est partiellement réparé. Fréquemment ces lésions bloquent la réplication. Ce blocage peut être surmonté par l'intervention de polymérase translésionnelles.

Certaines de ces polymérase sont suspectées de jouer un rôle dans l'hypermutation somatique. Leur capacité à répliquer l'ADN avec une faible fidélité semble impliquer ces enzymes dans ce processus [Tissier et coll., 2000 ; Matsuda et coll., 2000 ; Kunkel et coll., 2003].

La lignée BL2 a été utilisée pour mettre en évidence le rôle de la polymérase ι . Le gène de la polymérase ι a été inactivé dans cette lignée par recombinaison homologue : aucune mutation somatique n'a pu être obtenue suite à l'engagement du BCR. En revanche le taux de mutation est rétabli lorsque cette protéine est ré-exprimée dans ces clones. Cependant, des souris de la lignée 129 naturellement dépourvues en polymérase ι ne présentent pas d'altérations au niveau de l'hypermutation somatique [McDonald et coll., 2003].

La polymérase ζ joue un rôle important dans l'hypermutation somatique [Diaz et coll., 2001 ; Zan et coll., 2001]. Elle est responsable de la plupart des mutations spontanées ou induites de l'ADN [Murakumo et coll., 2000 ; Zander et Bemark, 2004]. *In vivo*, l'inactivation du gène de la polymérase ζ est létale dès les premiers stades de développement embryonnaire [Bemark et coll., 2000 ; Grossmann et coll., 2000 ; Wittschieben et coll., 2000].

Le rôle de cette protéine dans l'hypermutation a été étudié dans une lignée humaine (CL-01) pouvant hypermuter *in vitro*. Le profil d'expression de plusieurs polymérase a été comparé à la suite de l'engagement du BCR. Il a été montré que l'expression de la polymérase ζ était modulée par l'engagement du BCR. De plus, l'inhibition des transcrits de la protéine par des oligonucléotides anti-sens entraînait une réduction importante des mutations

somatiques [Zan et coll., 2001]. Ainsi, la polymérase ζ serait régulée par l'engagement du BCR et jouerait un rôle critique dans l'hypermutation somatique.

Dans la même étude il a été montré que l'expression d'une autre enzyme, la polymérase η , était en revanche diminuée à la suite de l'engagement du BCR. L'augmentation d'expression de la polymérase ζ et la diminution de celle de la polymérase η semblent être dépendantes du degré de cross-linking du BCR [Zan et coll., 2001]. Des patients présentant des formes différentes de xeroderma pigmentosum, dans lesquels la polymérase η est réduite ou absente, présentent une diminution significative de la fréquence des mutations au niveau des régions V des Ig mais uniquement au niveau des paires de bases A:T [Zeng et coll., 2001].

L'analyse de souris déficientes en polymérase μ n'implique pas cette enzyme dans l'hypermutation somatique [Bertocci et coll., 2003], mais d'avantage un rôle dans les recombinaisons V(D)J [Ruiz et coll., 2001]. Cependant, Ruiz et collaborateurs ont récemment montré que la surexpression de la polymérase μ humaine dans des cellules Ramos, dans lesquelles l'hypermutation somatique est constitutive, augmente les mutations somatiques spécifiquement au niveau des bases G/C des régions V des gènes d'Ig. Ce qui laisse penser que la polymérase μ jouerait finalement un rôle dans l'hypermutation somatique, préférentiellement en générant des mutations G/C dans le cadre de la réparation infidèle de l'ADN [Ruiz et coll., 2004].

Plusieurs groupes [Bachl et Wabl, 1996; Green et coll., 1995 ; Zhu et coll., 1995 ; Zhu et coll., 1996] ont utilisé le mécanisme de réversion dans des cellules B transfectées. Les constructions transfectées contiennent des codons stop, et la capacité de réversion est mesurée et comparée dans différents modèles. Zhu et collaborateurs, ont par exemple étudié l'influence de l'isotype exprimé sur l'hypermutation des régions variables. Ils ont comparé la capacité de réversion (donc indirectement de l'hypermutation) dans des lignées B représentatives de différents stades de développement. Ces cellules ont été transfectées avec la partie constante $\gamma 2a$ ou μ , la partie variable étant identique. L'efficacité et la différence dans les taux de réversion observées entre les deux constructions dépendaient du stade de développement. Lorsque ces deux constructions sont co-transfectées dans la même cellule, le transgène $\gamma 2a$ subit plus de mutations que μ [Zhu et coll., 1996].

Une étude portant sur des transfectants stables de la lignée humaine BL2 exprimant des IgM et des IgA spécifiques du lysozyme de poulet montre que, IgM et IgA sont tous les deux capables d'induire l'hypermutation somatique indépendamment de la dose d'antigène. Les mutations présentent la plupart des caractéristiques de l'hypermutation somatique *in vivo*.

Notamment certaines modifications introduisent des codons stop au sein des régions codantes. [Glaudet et coll., 2004].

III.3. La commutation isotypique

Le processus de commutation de classe se révèle primordial pour la diversité fonctionnelle des réponses anticorps. Ce processus, sensible à l'action de différentes cytokines et activateurs des cellules B, se manifeste par un changement de classe des Ig exprimées sur la membrane puis sécrétées au cours de la différenciation des cellules B. Après avoir exprimé des IgM et/ou IgD, les lymphocytes B matures vont pouvoir exprimer des IgG, des IgA ou des IgE.

Le processus de commutation de classe permet d'associer successivement différentes régions constantes aux mêmes domaines de reconnaissance spécifiques d'un antigène. Les sites de recombinaison sont appelés « régions switch » (S) et sont composés de motifs répétés, riches en G/C, situés en 5' de chacun des gènes CH (excepté C δ). Les séquences S μ , S ϵ , S α , sont composées de pentamères tels que GGGGT, GAGCT, et GGGCT. La région S γ contient également ces éléments mais se distingue par la longueur de ces segments répétés [Dunnick et coll., 1993].

La recombinaison a lieu entre différents sites localisés dans les régions S. Les étapes de reconnaissance et de clivage des régions S demeurent incomprises. Des cassures à la fois double et simple brin pourraient être impliquées dans l'initiation de la commutation de classe [Wuerffel et coll., 1997; Chen et coll., 2001], et de fréquentes mutations sont retrouvées au voisinage des points de cassures [Stavnezer, 2000 ; Manis et coll., 2002a ; Kenter, 2003]. Les cassures d'ADN situées dans les régions S sont suivies d'une étape de réparation et de ligation impliquant le mécanisme NHEJ et les processus de réparation ubiquitaires, tels que les mécanismes de réparation des « mismatches ». L'ADN intermédiaire, sous forme circulaire, est délété et la région constante cible se retrouve à proximité de la région VDJ [Iwasato et coll., 1990].

Si les motifs répétés définissent ces régions S, leur délétion dans S μ n'entraîne pas un blocage complet du mécanisme de commutation isotypique [Luby et coll., 2001]. La baisse d'efficacité observée dans les souris délétées pour le core de S μ confirme leur implication dans ce mécanisme, mais la persistance de la commutation témoigne du fait qu'il suffit d'un nombre limité de motifs répétés pour la commutation isotypique.

III.3.1. Les différents isotypes chez la souris

Les IgM sont majoritairement produites au cours de la réponse primaire, alors que les IgG, IgA ou IgE sont majoritairement produites au cours d'une réponse secondaire ou tertiaire. Au cours de ce changement d'isotype ou commutation de classe, c'est le même gène réarrangé VDJ (moyennant l'hypermutation somatique et ses conséquences) qui sera éventuellement exprimé par la nouvelle classe d'Ig. La seule chose qui soit modifiée est la région constante de la chaîne lourde, et par conséquent ses fonctions effectrices (Figure 9).

IgG est l'isotype prédominant dans le sang et la lymphe. Les différentes sous-classes d'IgG ont des fonctions différentes, ce qui est essentiellement dû à leur capacité variable à lier les récepteurs Fc, et à activer le complément.

IgG3 joue un rôle important dans la réponse anti-bactérienne, et elle est très efficace dans la phagocytose. La déficience en IgG3, induite *in vivo* par la perturbation du gène, se traduit par une altération de la réponse immunitaire T-indépendante [Shapiro et coll., 1998].

IgG1 est impliquée dans la réponse immunitaire aux infections virales, mais IgG2a est dominant dans ce type de réponse. IgG2a peut activer le complément, et elle est particulièrement efficace dans le rôle de médiateur de la cytotoxicité en liant les récepteurs Fc sur les macrophages.

Dans les réponses immunitaires T-dépendantes, IgG1 est l'isotype dominant dans la lutte contre les infections virales et parasitaires. La voie du complément n'est pas activée mais IgG1 stimule efficacement la phagocytose.

Les IgA, prédominantes dans les sécrétions (de type respiratoire, digestif ou génital) sont fortement résistantes à la protéolyse enzymatique. Chez l'homme, le défaut d'IgA ne conduit pas à un déficit immunitaire dans la majorité des cas. Mais chez certains patients, ce déficit conduit à un manque de résistance aux infections respiratoires [Snapper et Finkelman, 1993]. Un modèle de souris déficientes en IgA montre que le développement lymphocytaire, de même que la prolifération sont normaux [Harriman et coll., 1999].

IgE est impliquée dans la défense parasitaire, mais peut également médier les réactions d'hypersensibilité. Les mastocytes et basophiles expriment des récepteurs à haute affinité pour IgE (FcεRI) qui peuvent lier les IgE monomériques en absence de l'Ag. Les Ag spécifiques induisent l'agrégation des complexes IgE-FcεR entraînant la sécrétion d'histamine impliquée dans les réactions d'hypersensibilité.

Il existe en revanche une voie d'hypersensibilité indépendante d'IgE. Chez des souris délétées pour Cε, on note la persistance d'une réaction anaphylactique en absence d'IgE [Oettgen et coll., 1994].

III.3.2. Intervention de cytokines

Différents modèles d'étude ont mis en évidence le contrôle de la production des différents isotypes par les cytokines. La commutation de classe est en partie régulée par l'emploi d'un panel de cytokines telles que l'IL-4, l'interferon-γ (IFN-γ), ou le transforming growth factor (TGF-β).

L'IL-4 fut la première cytokine décrite comme régulant l'expression de différents isotypes d'Ig. L'action de l'IL-4 est potentialisée par la présence du LPS. En effet, associés, ces deux facteurs permettent d'obtenir des taux importants de transcrits γ1 et ε [Bergstedt-Lindqvist et coll., 1984]. Seule, l'IL-4 induit la transcription de γ1 à de faibles taux et ne permet pas d'obtenir de transcrits ε dans les cellules B.

L'IL-4 et l'IFN-γ sont des antagonistes. L'addition d'IFN-γ réduit la commutation vers IgG1 et IgE dans les cellules B de souris stimulées par le LPS et l'IL-4 [Berton et coll., 1989]. L'addition d'IFN-γ à des cellules activées par le LPS induit la transcription de γ2a et par conséquent la commutation vers IgG2a [Collins et Dunnick, 1993]. De plus, l'IFN-γ inhibe les sécrétions d'IgG3 dans des cellules B induites par le LPS [Coffman et Carty, 1986].

Le TGF-β favorise la commutation vers IgA [Coffman et coll., 1989]. Le TGF-β est également impliqué dans la commutation vers IgG2b [Sonoda et coll., 1992]. D'autre part, TGF-β peut aussi inhiber la commutation vers IgE induite par le LPS et l'IL-4.

L'IL-5, impliquée dans la différenciation B, conduit, en association avec l'IL-4, à une augmentation du nombre de cellules exprimant IgG1.

L'IL-10 est capable d'augmenter la commutation de classe vers IgG3 des cellules B stimulées par le LPS [Shparago et coll., 1996]. En revanche, IL-10 inhibe fortement la commutation de classe vers IgA dans des cellules activées par une combinaison de LPS, IL-4, IL-5, et TGF-β.

En plus des cytokines, les signaux issus des contacts entre cellules T et B sont impliqués dans la commutation de classe. L'élément le plus important dans ces contacts est CD40-L exprimé sur les cellules T activées. La molécule CD40-L soluble induit en synergie

avec l'IL-4 la prolifération des cellules B. Le signal médié via CD40 induit la commutation de classe vers la majorité des isotypes.

La régulation de la spécificité isotypique par les cytokines se fait par la régulation transcriptionnelle des gènes CH. L'induction ou la suppression de la transcription germinale par les cytokines sont directement corrélées avec la commutation de classe vers l'isotype correspondant. L'action des cytokines semble s'exercer essentiellement au niveau des promoteurs germinaux. Des sites de fixation de certains facteurs de transcription dans les promoteurs germinaux ont été identifiés et agissent en réponse à l'action des cytokines. Les cytokines induiraient l'expression de plusieurs protéines, qui après avoir formé un complexe, se fixeraient sur les promoteurs germinaux [Rothman et coll., 1991 ; Lin et Stavnezer, 1992; Xu et Stavnezer, 1992 ; Ichiki et coll., 1993 ; Nilsson et Sidéras, 1993 ; Albrecht et coll., 1994 ; Delphin et Stavnezer, 1995 ; Warren et Berton, 1995]. Par exemple, la stimulation *in vitro* des cellules B avec le LPS induit la transcription germinale de $\gamma 3$ et $\gamma 2b$ par le recrutement du facteur de transcription NF- κ B. Le LPS et l'IL-4 induisent quand à eux la transcription germinale de $\gamma 1$ et ϵ par le recrutement de plusieurs facteurs de transcription (Figure 10).

III.3.3. Transcription germinale et commutation isotypique

Avant la commutation, les cellules B activées expriment un ou plusieurs ARN appelés transcrits germinaux codés par les différents gènes CH [Chaudhuri et Alt, 2004 ; Manis et coll., 2002b ; Stavnezer, 2000] Ce phénomène de transcription germinale se déroule aussi bien sur l'allèle exprimé que sur l'allèle exclu [Delpy et coll., 2003]. Tous les transcrits germinaux ont une structure analogue, présentant un site d'initiation localisé en 5' de chaque région S, site encore appelé promoteur I. Après initiation, la transcription se poursuit à travers la région S et les régions constantes jusqu'aux sites de polyadénylation [Dudley et coll., 2005]. L'épissage se fait normalement entre l'exon I et le site accepteur de CH1 (Figure 11). La présence de nombreux codons stop rendent ces transcrits stériles [Goodman et coll., 1993 ; pour revue : Chaudhuri et Alt, 2004]. La transcription germinale est régulée par les régions promotrices I dont l'activation est réalisée par le CD40, le LPS ou encore les cytokines [Stavnezer, 2000]

Le fait que tous les transcrits germinaux aient la même structure suggère qu'ils exercent, par eux-mêmes, une fonction importante. Des mutations ciblées qui abolissent ou altèrent la structure de ces transcrits indiquent qu'ils sont nécessaires au mécanisme de

commutation isotypique [Jung et coll., 1993 ; Zhang et coll., 1993 ; Bottaro et coll., 1994 ; Lorenz et coll., 1995 ; Seidl et coll., 1998]. De nombreuses études ont démontré le rôle de l'épissage des transcrits germinaux dans la commutation de classe. En effet des mutations sur les sites d'épissage diminuent de façon drastique la commutation de classe vers l'isotype correspondant [Hein et coll., 1998 ; Lorenz et coll., 1995]. La délétion ou le remplacement du promoteur et de l'exon I des gènes $\gamma 2b$ et $\gamma 1$ entraîne l'abolition de la commutation de classe vers ces isotypes [Jung et coll., 1993; Zhang et coll., 1993]. La transcription en elle-même n'est pas suffisante pour obtenir la commutation de classe, puisque le remplacement de l'exon I ϵ par un promoteur efficace (E_{μ} associé au promoteur VH) conduit à une transcription normale, mais ne permet pas la commutation de classe [Bottaro et coll., 1994].

La délétion d'une grande partie de I $\gamma 1$, incluant le site donneur d'épissage, inhibe la commutation de classe vers IgG1 [Jung et coll., 1993 ; Lorenz et coll., 1995]. Le remplacement de l'exon I $\gamma 1$ par le promoteur de la métallothionine, inhibe la commutation isotypique vers IgG1. Cependant, si un fragment de 114 bp contenant le site donneur d'épissage d'I $\gamma 1$ est inséré en aval du promoteur de la métallothionine, la commutation vers IgG1 sera restaurée [Hein et coll., 1998].

La corrélation entre la synthèse des transcrits germinaux et la commutation isotypique a conduit à proposer un modèle basé sur l'accessibilité de la chromatine. Grâce à la transcription germinale, les régions S deviendraient accessibles à des facteurs agissant en *trans* [Stavnezer-Nordgren et coll., 1986 ; Yancopolous et coll., 1986 ; Kaminski and Stavnezer, 2004]. A l'appui de cette hypothèse, il a été montré que les gènes CH en cours de commutation, étaient hypométhylés, hyperacétylés et présentaient des sites d'hypersensibilité à la DNase I dans le promoteur germinale [Stavnezer-Nordgren et coll., 1986 ; Schmitz et Radbruch, 1989; Berton et Vitetta, 1990 ; Nambu et al., 2003 ; Zhang, 2003 ; Kaminski and Stavnezer, 2004]. Cependant l'hyperacétylation des histones des régions S et des promoteurs germinaux ne suffit pas à induire la commutation isotypique sans transcription germinale [Nambu et al., 2003 ; Zhang, 2003].

La transcription germinale pourrait également aboutir à la formation de structures particulières au niveau de l'ADN susceptibles d'être des substrats pour les recombinaisons [Reaban et Griffin, 1990 ; Reaban et coll., 1994 ; Daniels et Lieber, 1995 ; Tian et Alt, 2000]. Lorsque les régions S sont transcrites, les transcrits vont s'associer au brin matrice formant ainsi des hybrides ARN-ADN [Reaban et Griffin, 1990 ; Reaban et coll., 1994 ; Daniels et Lieber, 1995 ; Tian et Alt, 2000 ; Mizuta et coll., 2003] (Figure 12). Récemment, il a été

montré que le brin non matriciel formait des boucles R simple brin. Ce phénomène a été montré *in vivo* et *in vitro* [Tian et Alt, 2000 ; Yu et coll., 2003 ; 2005]. De façon théorique, les hybrides ARN-ADN peuvent entraîner la formation d'autres structures au niveau du brin non transcrit. Par exemple, du fait de l'abondance de structures palindromiques au niveau des régions S, il peut se produire la formation de structures en « stem loop » [Tashiro et coll., 2001]. Il a également été décrit la possibilité pour le brin non codant de former des « G quartet » formés par des associations d'Hoogstein entre des résidus guanines [Dempsey et coll., 1999 ; Cocco et coll., 2003]. Cependant, leur formation n'a jamais été démontrée durant la commutation de classe *in vivo*.

Suite à la transcription germinale, la recombinaison se produit entre la région S μ en amont de C μ et la séquence homologue située en amont de l'exon de la chaîne lourde qui sera exprimée suite à la commutation de classe. Ce phénomène entraîne une délétion de la région génique se situant entre les deux sites de recombinaison sur chaque région switch. Jusqu'à présent chez la souris et l'homme, le phénomène de commutation isotypique était décrit comme un processus de *cis*-recombinaison, récemment il a été montré que des phénomènes de *trans*-recombinaison pouvaient avoir lieu [Reynaud et coll., 2005 : voir chapitre 2]. Il a récemment été montré dans notre laboratoire qu'un allèle non fonctionnel mais exerçant une transcription germinale normale [Delpy et coll., 2003] peut minimiser le défaut de commutation de classe dû à la délétion de HS3b/HS4 sur l'allèle exprimé par *trans*-recombinaison [Reynaud et coll, soumise : voir chapitre 2]. Ce processus serait directement lié à la transcription germinale normale sur l'allèle non fonctionnel.

III.3.3.1. AID et commutation isotypique

Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression d'AID est retrouvée dans les CG. En plus de l'hypermutation, un second mécanisme fondamental de modification des gènes d'Ig se déroule dans les CG : c'est la commutation de classe. AID est également impliquée dans ce mécanisme [Muramatsu et coll., 2000 ; Revy et coll., 2000 ; Chaudhury et coll., 2003 ; Dudley et coll., 2005].

In vitro, la surexpression d'AID dans une lignée cellulaire (CH12) est suffisante pour induire une augmentation de la commutation de classe d'IgM vers IgA. Inversement, la déficience en cette protéine entraîne un blocage complet de la commutation et induit un

phénotype semblable au syndrome hyper-IgM de type II. La stimulation *in vitro* avec du LPS et des cytokines de splénocytes de souris AID^{-/-} ne permet pas d'obtenir de commutation de classe malgré une transcription germinale normale. L'immunisation de ces souris n'induit pas de mutation significative dans les régions variables [Muramatsu et coll., 2000]. Ceci démontre que la dépendance en AID représente un point commun entre l'hypermutation et la commutation de classe. En effet, l'expression d'AID dans des lignées cellulaires non lymphoïdes induit la commutation isotypique et l'hypermutation somatique sur des substrats transfectés, suggérant qu'AID est suffisante pour assurer ces phénomènes, bien qu'à des taux plus faibles par rapport aux gènes endogènes [Okasaki et coll., 2003 ; Yoshikawa et coll., 2002].

Des études réalisées à l'aide de substrats extrachromosomiques pour la commutation de classe ont indiqué que le ciblage d'AID vers les régions switch est influencé par des facteurs spécifiques à la commutation de classe, ce qui tendrait à prouver qu'AID seule n'est pas suffisante [Shanmugam et coll., 2000 ; Ma et coll., 2002]. Des études suggèrent que des cofacteurs uniques collaboreraient avec AID pour faciliter indépendamment la commutation de classe et l'hypermutation somatique [Ta et coll., 2003 ; Shinkura et coll., 2004]. L'identité de ces facteurs inconnus nécessaire à la fonction d'AID commence à être déterminée [Chaudhuri et coll., 2004]. La protéine de réplication A (RPA) a été identifiée comme étant un cofacteur critique, qui agirait avec AID pour déaminer l'ADN *in vitro* en ciblant les motifs RGYW [Chaudhuri et coll., 2004 ; Kenter et Bhattacharya, 2004] (Figure 12). De plus, AID doit être présente dans le noyau des cellules pour affecter la commutation de classe (ou l'hypermutation somatique) alors qu'elle est trouvée de façon prédominante dans le cytoplasme [Rada et coll., 2002]. Les cofacteurs de AID comme la RPA pourraient également jouer un rôle dans la rétention d'AID dans le noyau.

La commutation de classe et l'hypermutation somatique peuvent être initiées indépendamment, en fonction des substrats respectifs ciblés par AID. Barreto et collaborateurs ont montré que des mutants délétés de 10 acides aminés dans la partie C-terminale conservent une activité cytidine déaminase mais ne présentent plus de commutation de classe [Barreto et coll., 2003]. Ta et collaborateurs ont montré que des sujets présentant un syndrome Hyper-IgM de type II, présentent des mutations de AID qui se traduisent par un raccourcissement ou l'élimination du domaine C-terminal. Ces individus présentent une sévère diminution de la commutation de classe mais une hypermutation normale [Ta et coll., 2003]. Ces résultats suggèrent que la région C-terminale de AID est nécessaire pour la commutation isotypique dans les cellules B [Barreto et coll., 2003 ; Ta et coll., 2003]. La

région C-terminale (8-17 acides aminés) d'AID est vitale pour la commutation de classe, alors que la région N-terminale est importante pour l'hypermutation somatique [Ta et coll., 2003 ; Shinkura et coll., 2004].

Si l'implication d'AID dans l'hypermutation somatique et dans la commutation isotypique est démontrée, son mode d'action, ses co-facteurs ou ses cibles précises ne sont pas encore définis avec certitude [Chaudhuri et Alt, 2004].

Deux modèles différents ont été proposés pour expliquer l'implication d'AID dans la commutation isotypique. Le premier soutient qu'AID interviendrait dans l'initiation de la commutation isotypique en générant des uraciles par la déamination des cytosines dans les régions S. Ces régions comportent plusieurs motifs GAGCT dans lequel G et C correspondent à des « hots spots » de déamination comparables à ceux de l'hypermutation somatique. La génération d'ADN simple brin au cours de la transcription des régions S semble impliquée dans le ciblage de l'action d'AID vers les régions riches en G [Chaudhuri et coll., 2003 ; Ramiro et coll., 2003 ; Yu et coll., 2003 ; Dudley et coll., 2005] (Figure 13).

Le second modèle soutenu par Honjo et collaborateurs (2004) démontrerait qu'AID n'interviendrait pas directement au niveau de l'ADN. Il semblerait qu'AID à l'aide de cofacteurs, interviendrait sur un ARNm encore non identifié, sur lequel elle induirait une déamination des cytosines en uraciles sur des positions spécifiques. Cet ARNm modifié coderait pour une endonucléase qui cliverait l'ADN au niveau des régions S [Honjo et coll., 2004]. Comme l'expression d'AID peut entraîner des cassures de l'ADN dans des cellules non lymphoïdes [Martin et coll., 2002 ; Okasaki et coll., 2002 ; Yoshikawa et coll., 2002], l'hypothèse de la modification d'un ARNm par AID postule que l'ARNm cible ainsi que les cofacteurs d'AID doivent être exprimés de façon plus ou moins ubiquitaire [Honjo et coll., 2004].

La commutation de classe semble, de manière plus évidente que dans l'hypermutation faire intervenir des cassures doubles brins [Wuerffel et coll., 1997]. Ces cassures double-brins sont probablement le résultat de cassures simple-brins au niveau d'un G ou d'un C sur les brins opposés. La cassure double brin entraîne la phosphorylation des histones H2AX, un processus qui est critique dans le recrutement de protéines réparatrices [Paull et coll., 2000]. La commutation de classe est substantiellement diminuée dans des souris déficientes en H2AX alors que l'hypermutation somatique n'est pas affectée [Reina-San-Martin et coll., 2003].

Les enzymes impliquées dans le mécanisme de NHEJ (DNA-PKcs, Ku70, Ku80) jouent un rôle important dans la commutation isotypique [Rolink et coll., 1996; Casellas et coll., 1998].

- Des cellules pro-B présentant un déficit en DNA-PKcs ne peuvent pas commuter vers l'isotype IgE [Rolink et coll., 1996]. La déficience en cette protéine entraîne une forte inhibition de la commutation de classe vers tous les isotypes, à l'exception de la commutation vers IgG1 qui est pratiquement normale [Manis et coll., 2002b]. Le fait que les cellules B déficientes en DNA-PKc switchent vers IgG1 et non vers les autres isotypes implique que la recombinaison entre S μ et S γ 1 fait appel à des mécanismes différents que ceux utilisés pour la commutation de classe entre S μ et les autres régions S. Cependant, des souris SCID présentant une mutation inactivant la fonction kinase des DNA-PKcs possèdent des taux à peu près normaux de CSR [Bosma et coll., 2002 ; Cook et coll., 2003]. Quelque soit le cas, il est clair que les DNA-PKcs possèdent des fonctions de réparation de l'ADN endommagé au cours de la commutation de classe, telle que la stabilisation des complexes de réparation, les synapses entre les extrémités d'ADN coupées ou le recrutement d'autres protéines.

- Des cellules B déficientes en enzyme Ku70 présentent une diminution de la commutation isotypique [Manis et coll., 1998]. Dans le sérum de ces souris Ku déficientes, le seul isotype détectable est IgM, et des splénocytes isolés de ces animaux et stimulés *in vitro* afin d'induire une CSR spécifique, ne permet pas l'obtention d'autre isotype qu'IgM [Casellas et coll., 1998 ; Manis et coll., 1998].

III.3.3.2. Polymérase mutagènes et commutation isotypique

Comme nous l'avons vu plus avant, le rôle des polymérase mutagènes sur l'hypermutation somatique a été démontré, cependant le rôle des polymérase n'a pas encore été clairement établi dans la commutation isotypique.

Des substitutions de bases, des délétions et des duplications sont observées au sein du locus des Ig, au niveau des séquences d'ADN intervenant dans la commutation de classe [Dunnick et coll., 1989]. Ces mutations sont dépendantes d'AID et présentent toutes les caractéristiques de celles observées au cours de l'hypermutation somatique. Ceci pourrait impliquer que ces mutations seraient générées par le même complexe mutationnel [Honjo et coll., 2002 ; Martin et coll., 2002]. Récemment, l'analyse de cellules B commutées issues de patients atteints de XP-V (xeroderma pigmentosum variant) montre que la polymérase η est un mutagène A/T pendant la commutation de classe, à la fois au niveau des séquences

répétées des régions S et en amont de ces dernières. La polymérase η intervenant dans l'hypermutation somatique serait également présente lors de la commutation de classe des Ig [Faili et coll., 2004].

Ces résultats suggèrent que les polymérases pourraient intervenir dans la commutation isotypique.

IV. La régulation des gènes d'Immunoglobulines

Il existe une corrélation entre les différents réarrangements au sein du locus des Ig et la transcription des gènes ou segments impliqués dans ces recombinaisons. En général, la transcription d'un segment précède son réarrangement. Il en résulte que les éléments *cis*-régulateurs qui contrôlent la transcription et la recombinaison sont pratiquement identiques. Plusieurs éléments régulateurs au sein du locus IgH sont impliqués dans ce processus. Dans le sens, 5'-3', on trouve le promoteur PV_H, l'enhancer intronique E _{μ} , ces deux éléments encadrant la région VDJ, les promoteurs germinaux et les activateurs qui les contrôlent, et en aval du locus IgH, la région de contrôle du locus (LCR) (Figure 14) dont la localisation chevauche celle des activateurs. Elle est définie opérationnellement comme une séquence capable, dans un système transgénique ou de transfection stable, de conférer au gène associé une expression restreinte et un taux transcriptionnel élevé, dépendant du nombre de copies mais indépendant du site d'intégration [Ernst et Smale, 1995].

Ces éléments interviennent de façon concertée pour assurer une expression des gènes d'Ig à la fois restreinte aux cellules B et dépendante du stade de développement de ces cellules. Ces éléments ont une structure modulaire : ils contiennent des sites multiples de fixation de facteurs transcriptionnels et de co-facteurs agissant *en trans* dont plusieurs sont communs à tous ces éléments. Ces (co-)facteurs peuvent être ubiquitaires ou spécifiques des cellules B, et peuvent avoir un effet activateur ou inhibiteur. La spécificité tissulaire et développementale est la résultante d'interactions complexes entre ces différents facteurs [Ernst et Smale, 1995]

IV.1. Les promoteurs

Les promoteurs des gènes de chaînes lourdes et légères d'Ig se situent en amont de chaque région V et assurent un niveau basal de transcription. Leur activité est comprise dans une région d'environ 250 pb en amont du site d'initiation de la transcription. L'ensemble des promoteurs des gènes d'Ig possèdent une séquence octamérique très conservée en amont de la TATA box, ATGCAAAT dans les promoteurs des gènes de chaînes lourdes (pVH) [Falkner et coll., 1984 ; Parslow et coll., 1984]. Des études de transfections stables [Mason et coll., 1985 ; Dreyfus et coll., 1987 ; Wirth et coll., 1987] et de transgénèse chez la souris [Jenuwein et Grosschedl, 1991] ont montré que la spécificité cellulaire de l'activité des promoteurs d'Ig pouvait en partie être expliquée par la présence de ces séquences "octamères". D'autres promoteurs de gènes spécifiques de cellules B tels que *B29* (Ig β), *CD20* et *CD21* (CR2) comportent également des sites octamères importants pour leur fonction [Hermanson et coll., 1989 ; Thevenin et coll., 1993 ; Christensen et coll., 1992].

Éléments essentiels des promoteurs des régions V, les sites octamères sont retrouvés également au niveau des activateurs transcriptionnels situés en 5' (E μ) et 3' (LCR) du locus IgH. Ces séquences sont entre autre reconnues par les facteurs Oct-1 et Oct-2 qui appartiennent à la famille des protéines POU. La forme en hélice-boucle-hélice du domaine de liaison à l'ADN permet une forte affinité de ces protéines pour l'ADN. Alors que Oct-1 est exprimée de façon ubiquitaire, l'expression de Oct-2 est prédominante dans les cellules B. Ces protéines sont capables d'activer fortement la transcription à partir d'un promoteur d'Ig [LeBowitz et coll., 1988 ; Pierani et coll., 1990 ; Pfisterer et coll., 1994]. L'importance de la séquence octamère a clairement été démontrée au sein de l'activateur E μ . Ainsi, pour un bon contrôle de la transcription dans des cellules pré-B stimulées par du LPS, ces sites doivent être présents aussi bien au niveau de E μ que du promoteur V_H. Des transgènes portant un site octamère muté au niveau de E μ présentent une forte réduction de l'effet activateur [Jenuwein et coll., 1991 ; Annweiler et coll., 1992].

Le facteur coactivateur OBF-1 (nommé également OCA-B ou Bob-1), dont l'expression est spécifique des cellules B, interagit avec les facteurs Oct-1 ou Oct-2 une fois ceux-ci fixés aux sites octamères. Le rôle des facteurs Oct-2 et OBF-1 sur le développement des cellules B a été pondéré par l'obtention d'animaux mutés : les souris doubles mutantes *Oct-2*^{-/-} *OBF-1*^{-/-} montrent que ce facteur de transcription B spécifique n'est pas indispensable pour le développement de lymphocytes B [Schubart et coll., 2001]. OBF-1 semble cependant utile à

la commutation de classe, à la formation de centres germinatifs et à la différenciation terminale conduisant à la sécrétion de certaines sous-classes d'Ig [Kim et coll., 1996 ; Schubart et coll., 1996 ; Schubart et coll., 2001]. La simple inactivation du gène *Oct-2* chez la souris entraîne un blocage de la prolifération des cellules B ainsi qu'un défaut dans la sécrétion d'Ig suite à une stimulation antigénique [Corcoran et coll., 1993 ; Corcoran et Karvelas, 1994]. Ces résultats suggèrent que Oct-2 est important dans les stades tardifs de la différenciation des lymphocytes B alors que l'activation transcriptionnelle semble pouvoir être initiée de façon égale par l'un ou l'autre des facteurs Oct [Pfisterer et coll., 1994 ; Schubart et coll., 2001].

En plus de l'octamère, les promoteurs V_H contiennent une séquence heptamérique. Cet heptamère est nécessaire pour assurer, en association avec l'octamère, une activation spécifique et optimale du promoteur [Ballard et coll., 1987 ; Eaton et coll., 1987]. L'octamère et l'heptamère lient *in vitro* les mêmes facteurs de transcription Oct et semblent avoir une interaction coopérative [Poellinger et coll., 1989 ; Kemler et coll., 1989]. D'autres éléments ont été localisés en amont de l'heptamère : une région riche en pyrimidines [Eaton et coll., 1987] de fonction inconnue, un motif reconnu par le facteur de transcription Ig/EBP-1 et un motif $\mu E3$ (Figure 15).

Des promoteurs ont également été décrits en amont de chaque gène des régions constantes des chaînes lourdes d'Ig, à l'exception de $C\delta$. Ce sont les sites d'initiation de la transcription germinale. Comme on l'a vu précédemment, l'action des cytokines s'exerce sur les promoteurs germinaux. Les activateurs situés en amont des promoteurs germinaux jouent également un rôle important dans la commutation isotypique. Le mieux caractérisé est celui de $I\gamma 1$. Une région de 150 bp située en amont de $I\gamma 1$ contient en effet un activateur inductible par l'IL-4. Dans cette région on note la présence de séquences consensus liant des facteurs de transcriptions tels que C/EBP [Xu et Stavnezer, 1992].

IV.2. L'activateur transcriptionnel intronique $E\mu$

L'activateur transcriptionnel $E\mu$ est localisé dans l'intron séparant les régions J des régions constantes [Banerji et coll., 1983]. Cet élément régule positivement de nombreux événements propres à la lignée lymphocytaire B comme les réarrangements V(D)J [Engler et coll., 1991 ; Chen et coll., 1993 ; Serwe et Sablitzky, 1993] et la transcription initiée au

niveau de multiples promoteurs du locus (promoteurs V_H , promoteurs germinaux,...). Il semble actif tout au long du développement B et sa localisation lui permet d'être préservé par les événements de recombinaisons survenant sur le locus (recombinaisons V(D)J ou commutation de classe).

L'activateur $E\mu$ possède une structure modulaire et chaque module lie des facteurs spécifiques impliqués dans la régulation de la transcription [Ernst et Smale, 1995] (Figure 16).

Le rôle de l'activateur $E\mu$ a été étudié dans des animaux KO (remplacement par le gène neo^R). Le core $E\mu$ semble nécessaire pour permettre les réarrangements V-DJ et il est à la fois nécessaire et suffisant pour la commutation de classe (même si une activité résiduelle persiste en son absence). En revanche, bien que diminués, les réarrangements D-J persistent même après délétion de la totalité de $E\mu$ [Serwe and Stablitzki, 1993 ; Sakai et coll., 1999].

Le remplacement du core $E\mu$ et de la région 3' flanquante entraîne une diminution modérée des réarrangements D-J et une forte diminution des réarrangements V-DJ, ainsi qu'un effet partiel sur la commutation de classe [Serwe and Stablitzki, 1993].

Une autre délétion de $E\mu$ englobant cette fois sa région 5' flanquante confère une inhibition très sévère des réarrangements, de la déméthylation et de la transcription germinale. Ces expériences *in vivo* confirment le rôle de $E\mu$, mais aussi des séquences situées en amont de ce dernier, dans l'accessibilité des régions permettant l'assemblage d'un exon VDJ de chaîne lourde [Chen J. et coll., 1993]. En revanche, elle bloque la transcription germinale de la région J_H ou des segments VDJ réarrangés. Ces résultats suggèrent que l'effet neo , dans ce modèle, implique une compétition entre promoteurs et, ils permettent de découpler deux effets différents de $E\mu$ sur la région J_H : l'induction de l'accessibilité pour les réarrangements V(D)J et l'induction de la transcription [Delpy et coll., 2002].

De part et d'autre de $E\mu$ se situent des séquences d'ancrage à la matrice nucléaire : les MARs (Matrix Associated Region).

Le rôle exact des régions MAR flanquant l'élément $E\mu$ reste encore controversé, une des fonctions supposée serait la régulation négative dans les cellules non-B [Kadesh et coll., 1986 ; Wasylyk et Wasylyk, 1986]. Ces régions agissent en synergie avec l'élément $E\mu$ et permettent à ce dernier d'agir à distance [Forrester et coll., 1994 ; Jenuwein et coll., 1997]. Elles semblent nécessaires à une bonne expression du locus car une délétion de ces MARs diminue considérablement l'expression d'un transgène de chaîne lourde (IgM) d'immunoglobuline dans un hybridome [Oancea et coll., 1997].

D'autres résultats tendent à minimiser le rôle des MARs sur la régulation du locus. En effet, des hybridomes réalisés à l'aide de cellules B d'animaux mutées dans la région de $E\mu$ et des MARs flanquantes montrent qu'en l'absence de ces régions régulatrices, la commutation de classe est diminuée mais n'est pas totalement abolie [Bottaro et coll., 1998]. La délétion des MARs associées à cet élément montre qu'une cellule B peut se dispenser de ces régions pour effectuer les commutations de classe [Sakai et coll., 1999a]. Le contraste entre le rôle important des MARs au sein de transgènes [Forrester et coll., 1994 ; Jenuwein et coll., 1997 ; Fernandez et coll., 2001] et le peu d'impact de leur délétion ciblée dans le locus [Bottaro et coll., 1998 ; Sakai et coll., 1999a et b] est une indication probable de leur rôle important mais redondant à celui d'autres éléments régulateurs.

IV.3. Le promoteur-activateur DQ52

DQ52 est l'un des douze segments de gènes D appartenant au locus IgH. Il présente plusieurs caractéristiques qui font de lui un segment de gène particulier :

- le segment DQ52 est préférentiellement utilisé lors des premiers réarrangements $D-J_H$ au cours de l'ontogénie [Bangs et coll., 1991 ; Tsukada et coll., 1990].
- DQ52 est le seul segment D_H à être transcrit bien avant la survenue des premiers réarrangements $V(D)J$ [Alessandrini et Desiderio, 1991 ; Li et coll., 1996]. Ces transcrits germinaux, appelés μ° , peuvent être considérés comme l'un des indicateurs les plus précoces de l'engagement vers la lignée B [Li et coll., 1996] et leur transcription pourrait être un préalable nécessaire à l'accessibilité de la région D-J à la recombinaison $V(D)J$ [Thompson et coll., 1995]. Ils sont initiés, aussi bien chez l'homme que chez la souris, au niveau d'une séquence située immédiatement en amont du segment DQ52 [Alessandrini et Desiderio, 1991 ; Thompson et coll., 1995]. Une analyse de la région située en 5' de DQ52, réalisée à partir de précurseurs B humains, révèle de nombreux sites potentiels de fixation pour des facteurs nucléaires comme E2A, Ets, NF- κ B et AP2 [Thompson et coll., 1995].

L'activateur situé en 5' de DQ52 a finalement été caractérisé par Kottmann et coll. (1994). Il constitue un promoteur-activateur synergique de $E\mu$. Les résultats obtenus après délétion de cet activateur chez la souris montrent une altération dans l'utilisation des segments J_H les plus éloignés de DQ52. La délétion de cet activateur chez la souris montre une altération du répertoire B chez ces animaux [Pelkonen et coll., 1997].

IV.4. La région 3' IgH

La transcription et la commutation sont également régulées par une région complexe située en aval du gène C α . L'implication potentielle de cette région dans la commutation isotypique a été suggérée par l'existence, dans des lignées cellulaires, de larges délétions de séquences en 3' du locus IgH ou de la persistance de la transcription des gènes d'Ig en l'absence de E μ [Khamlichi et coll., 2000]. De nombreuses études ont permis de préciser la structure de cette région et plusieurs sites HS (pour DNase I hypersensitive sites) ont été identifiés [Pettersson et coll., 1990; Giannini et coll., 1993; Madisen et Groudine, 1994; Michaelson et coll., 1995 ; Chauveau et Cogné, 1996]. Chez la souris on distingue, dans le sens 5'-3': HS3a, HS1-2, HS3b, et HS4 (HS3a et HS3b étant des séquences homologues inversées). Il a été montré que cette région jouait également un rôle de région de contrôle du locus ou LCR [Madisen and Groudine, 1994].

Plusieurs modèles de délétion génique *in vivo* ciblés vers différents éléments de cette région ont permis de mieux comprendre leur implication dans la commutation de classe. L'absence de phénotype suite à la délétion de HS1-2 et HS3a [Manis et coll., 1998] montre que ces deux éléments sont individuellement dispensables. La délétion de HS3b et HS4 conduit en revanche à une forte inhibition de la commutation de classe vers la majorité des différents isotypes, due à une diminution drastique de la transcription germinale des gènes correspondants [Pinaud et coll., 2001]. HS4 est un bon candidat pour jouer un rôle important dans l'action de cette région, mais l'intégrité de la LCR pourrait également être critique. Il est probable que les différents éléments de la LCR agissent dans leur configuration germinale en synergie, et que leur action soit optimisée par la présence de E μ [Chauveau et coll., 1998].

La LCR régulerait la commutation isotypique en agissant sur la transcription germinale de la plupart des promoteurs I. S'appuyant sur l'hypothèse de l'accessibilité du locus en tant que pré-requis à la commutation isotypique, un modèle a été proposé : chaque enhancer de la LCR pourrait interagir individuellement avec un promoteur I spécifique. Alternativement, les 4 enhancers pourraient agir en synergie avec les différents promoteurs, selon la nature du stimulus [Arulampalam et coll., 1997].

V. Effets dus à l'insertion du gène de résistance à la néomycine.

Le gène de résistance à la néomycine (néo^R) est un marqueur de sélection très largement employé lors de recombinaisons homologues dans les cellules souches embryonnaires.

Au cours des nombreuses expériences de recombinaison homologue réalisées au sein du locus des chaînes lourdes d'Ig, de multiples phénotypes dus à l'effet « néo » ont été observés [Manis et Alt, 2000] (Figure 17).

Dans le cas de la LCR 3' du locus IgH, Le gène de résistance à la néomycine (néo^R) a été utilisé pour étudier le contrôle des effets longue distance de la LCR sur les promoteurs germinaux.

La première approche par KO a consisté en un remplacement de l'élément HS1,2 par néo^R sous le contrôle du promoteur de la phosphoglycerate kinase (pgk-néo^R) [Cogné et coll., 1994]. Dans les cellules B mutantes, la stimulation des splénocytes (soit par le LPS, soit par le LPS combiné à l'IL4) montre que cette mutation diminue considérablement la transcription germinale des gènes constants $\gamma 3$, $\gamma 2b$, $\gamma 2a$ et ϵ et par conséquent la commutation de classe vers les isotypes IgG3, IgG2b, IgG2a et IgE.

Il est tentant de penser que les mécanismes de régulation par la LCR 3' IgH se rapprochent de ceux de la LCR de la β -globine [pour revue : Martin et coll., 1996]. De façon similaire au KO de l'élément HS1,2, le remplacement de l'élément 5' HS2 de la LCR de la β -globine par une cassette pgk-néo^R provoque de sévères anomalies qui disparaissent lorsque le gène de sélection est éliminé [Fiering et coll., 1995 ; Hug et coll., 1996].

Le phénotype observé lors du remplacement de HS3a du locus IgH par néo^R flanqué de deux sites *loxP* s'est avéré tout à fait similaire à celui du remplacement de HS1,2, avec le même défaut de commutation de classe [Manis et coll., 1998]. Comme dans le cadre de la LCR de la β -globine, la suppression des marqueurs de sélection ont permis la restauration d'un phénotype tout à fait normal [Manis et coll., 1998], assignant ainsi un rôle mineur et/ou redondant aux éléments proximaux de la LCR 3', HS3a et HS1,2.

Par contre, le remplacement par la cassette hsv-TK-néo des activateurs les plus distaux HS3b et HS4 affecte également la commutation de classe; néanmoins, le phénotype observé persiste cette fois après délétion complète de ces éléments par excision de la cassette néo^R [Pinaud et coll., 2001].

Finalement, l'insertion de la cassette néo^R en aval d'HS4 ne réduit pas la commutation de classe ou la production des transcrits germinaux, ce qui indique fortement que la fonction activatrice est localisée à l'intérieur des séquences HS3b ou HS4, ou peut-être dans les deux [Manis et coll., 2003].

Par quels moyens la mutation néo^R peut elle affecter la commutation de classe ?

- Un défaut d'accessibilité des régions S pourrait être lié à l'inhibition de la transcription germinale ou à une perturbation du remodelage de la chromatine. Les activateurs 3' agiraient grâce à la formation de boucles sur le locus, permettant une interaction physique directe entre un activateur et un promoteur rendu accessible selon les stimuli [Arulampalam et coll., 1997]. Ce modèle appelé « looping » a été également proposé pour l'expression des gènes du locus de la β -globine [pour revue : Bulger et Groudine, 1999].

- Des phénomènes de compétition entre promoteurs pourraient survenir très à distance. Les effets « néo » semblent liés à une compétition entre le promoteur du gène néo^R interposé entre les promoteurs de transcription germinale et la LCR [Cogné et coll., 1994 ; Manis et coll., 1998 ; Seidl et coll., 1999 ; Pinaud et coll., 2001]. L'insertion de néo^R et de son promoteur en amont de E μ diminue marginalement les réarrangements V(D)J ; En revanche, elle bloque complètement la transcription germinale de la région J_H ou des segments V(D)J réarrangés. L'effet « neo » dans ce modèle implique une compétition entre promoteurs et, il permet de découpler l'induction de l'accessibilité pour les réarrangements V(D)J et l'induction de la transcription par E μ [Delpy et coll., 2002].

- Le gène de résistance à la néomycine ou son promoteur, pourrait jouer un rôle d'isolateur et empêcher la propagation, le long du locus, d'influences activatrices provenant de la partie la plus en aval de la LCR 3'. Dans ce modèle d'activation par liaison directe, l'interposition d'isolateur pourrait perturber un remodelage chromatinien et/ou une activation transcriptionnelle progressant de 3' vers 5' le long du locus. Le remplacement du promoteur IgG2b ou des exons C ϵ par une cassette pgk-néo^R montre que la transcription germinale et la commutation vers C γ 3 sont bloquées dans le premier cas et que dans l'autre cas le blocage affecte C γ 3, C γ 2b et C γ 2a. Cependant, les recombinaisons vers C γ 1 et C α ne sont quasiment pas affectées. La compétition entre le promoteur pgk et les différents promoteurs germinaux n'affecterait ainsi que les gènes en amont, les gènes en aval de l'insertion pgk-néo^R pourraient, quant à eux, subir une activation par la région 3' [Seidl et coll., 1999].

Au sein du locus IgH la cassette pgk-néo^R semble inductible par le LPS lorsqu'elle est placée au sein du locus IgH [Manis et coll., 1998 ; Seidl et coll., 1998 ; pour revue Zhang et coll., 1995]. Si l'activation se propage de 3' vers 5', ceci suggère qu'il existe d'autres éléments en aval de HS1,2 capables d'induire la transcription germinale après stimulation par le LPS. Ainsi l'élément HS4, le plus distal de la LCR, pourrait être l'élément clé, puisqu'il n'a pas été décrit jusqu'alors d'autres éléments activateurs plus en 3'. Il n'est pas non plus exclu que la région 3' IgH soit, dans sa globalité, responsable de l'inductibilité par le LPS, si bien qu'un élément pris isolément puisse être inactivé sans qu'il en résulte de conséquence...

POSITION DU PROBLEME

PARTIE 1:

(A) Etude de l'effet néo^R sur l'expression des gènes d'Ig

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, le gène néo^R est couramment utilisé comme marqueur de sélection dans les expériences de recombinaison homologe. Mais il est également utilisé comme révélateur des mécanismes sous-jacents aux interactions de longue distance dans les loci complexes comme le locus IgH.

Dans ce contexte, mon travail de thèse a porté essentiellement sur les perturbations générées par le remplacement de séquences du locus IgH par le marqueur néo^R. Pour ce faire, nous avons généré les modèles murins ci-dessous :

• **Modèle de souris dans lequel le gène néo^R remplace les séquences S μ**

Initialement, nous avons cherché à générer des souris productrices d'IgM et IgD exclusivement, c'est à dire des souris incapables d'effectuer la commutation de classe. Une manière d'y parvenir était de déléter tous les motifs répétés de la séquence S μ qui est le site donneur initial de la commutation de classe. Une étude antérieure avait montré que la délétion du core S μ (la séquence de plus forte concentration en tandems) altérait la commutation de classe mais ne l'inhibait pas, à cause des motifs dispersés dans ce qui restait de l'intron I μ -C μ et qui suffisaient à assurer un niveau non négligeable de commutation isotypique [Luby et al., 2001]. Le fait d'étendre la délétion pour inclure tous les motifs restants, suggérait que nous avions de bonnes chances de bloquer la commutation isotypique.

Nous avons généré des souris mutantes dans lesquelles la quasi-totalité de l'intron I μ -C μ (mais laissant intactes les séquences nécessaires à un épissage correct des pré-messagers μ) a été délétée par recombinaison homologe. L'analyse de ces souris dépourvues de néo^R a montré qu'elles étaient toujours capables d'effectuer la commutation isotypique bien que fortement diminuée [Khamlichi et coll., 2004].

Nous nous sommes intéressés aux souris portant le marqueur néo^R pour voir (i) si l'insertion du gène néo^R affecte la transcription à partir du promoteur I μ , (ii) les effets sur la transcription germinale et la commutation de classe, (iii) éventuellement comment l'interaction longue distance avec la LCR pourrait être affectée et (iv) de voir si néo^R affecte les réarrangements V(D)J.

- **Modèle de souris comportant le gène néo^R en aval du promoteur germinale I γ 3.**

Une autre partie de mon travail de thèse a été une contribution à l'analyse de souris comportant le gène néo^R en aval du promoteur germinale I γ 3. Des études ont montré que l'isotype IgG3 était sévèrement affecté par la délétion conjointe de hs3b et hs4 chez la souris. Cette déplétion en IgG3 résultait d'une diminution drastique de la transcription germinale initiée à I γ 3, impliquant une interaction entre la LCR 3' et le promoteur I γ 3, distants de quelques 150 kb [Pinaud et coll., 2001]. De plus, l'insertion du gène néo^R, indépendamment de son orientation, à des sites spécifiques du locus IgH affecte la transcription germinale et la commutation isotypique vers les isotypes en amont mais pas en aval (à l'exception de C γ 1) [Seidl et coll., 1998]. Cependant, dans cette étude, le gène néo^R a été utilisé pour remplacer soit le promoteur I γ 2b soit le gène C ϵ .

Nous avons cherché à générer un modèle de souris comportant le gène néo^R en aval du promoteur germinale I γ 3, laissant intacts tous les éléments nécessaires à la transcription germinale du gène γ 3 (I γ 3, sites d'épissage et gène constant). Ceci afin de (i) voir si l'insertion du gène néo^R affecte l'initiation de la transcription à partir du promoteur I γ 3 et des promoteurs en aval, (ii) s'il y a certains effets sur l'expression du gène μ , puisque des promoteurs germinaux du locus constant, le promoteur I γ 3 est le plus proche de E μ et (iii) comment l'interaction longue-distance entre la LCR et I γ 3 pourrait être affectée.

(B) La polymérase Zéta.

Dans le cadre du Cancéropôle Grand Sud-Ouest, notre équipe participe à l'étude de la polymérase zéta (ζ). Cette polymérase est constituée de deux sous-unités : une sous-unité

catalytique codée par le gène Rev3 et une sous-unité codée par le gène Rev7 de fonction inconnue.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypermutation somatique et la commutation de classe sont deux processus essentiels de la maturation de la réponse et de la diversité immunitaires. Dans l'hypermutation somatique, la machinerie mutationnelle est ciblée vers la région variable des gènes d'Ig alors que dans la commutation isotypique, elle affecte des séquences spécifiques en amont des régions constantes. Dans une situation physiologique, ces deux processus introduisent des cassures simple et/ou double-brins, mais la machinerie mutationnelle peut également affecter, en dehors des sites physiologiques, des proto-oncogènes comme bcl-6 et c-myc dans certains lymphomes humains. Récemment, plusieurs polymérases mutagènes ont été identifiées dont la polymérase ζ qui joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité chromosomique et qui est probablement impliquée dans l'hypermutation somatique [Gibbs et coll., 1998 ; Zan et coll., 2001 ; Diaz et Casali, 2002]. Par contre son rôle dans la commutation isotypique et dans les processus tumorigéniques B n'a pas encore été établi.

Des études antérieures ont montré que l'inactivation du gène codant pour la sous-unité catalytique de la polymérase ζ était létale dès les stades précoces du développement embryonnaire [Bemark et coll., 2000 ; Esposito et coll., 2000 ; Wittschieben et coll., 2000]. Il était donc impossible d'étudier le rôle de cette dernière dans les stades ultérieurs de développement. Pour cela, nous avons recouru à des méthodes d'inactivation conditionnelle.

Une partie de mon travail de thèse a donc porté sur l'établissement de modèles murins de dérégulation conditionnelle de l'expression de la polymérase ζ , afin d'étudier les conséquences sur l'hypermutation somatique, la commutation de classe et les translocations chromosomiques.

Du fait que nous soyons encore aux étapes préliminaires de ce travail, cette partie sera exposée dans le chapitre « discussion et perspectives ».

PARTIE 2: Autre collaboration

Cette partie va traiter des recherches réalisées en collaboration avec le Docteur Reynaud sur le switch interchromosomique.

Les éléments régulateurs situés en 3' du locus IgH recrutent vraisemblablement une activité acetyl histone transférane afin d'induire un remodelage chromatinien au niveau des régions impliquées dans la commutation de classe (CSR). Un tel remodelage pourrait alors entraîner d'une part la transcription des régions S et d'autre part leur accessibilité par relâchement de la structure chromatinienne [Madisen et Groudine, 1994 ; Madisen et coll., 1998].

Cependant, peu d'études ont évalué si ce phénomène se produit sur un ou bien deux allèles, hormis une étude de notre laboratoire qui plaidait pour une transcription germinale symétrique et bi-allélique [Delpy et coll., 2003]. Le phénotype cellulaire ne dépendant *a priori* que de l'allèle possédant un réarrangement VDJ fonctionnel et donc positivement sélectionné, très peu de données sont connues quant au statut de l'allèle exclu. Il a récemment été démontré qu'il existait une accessibilité asymétrique des deux allèles, ce qui pourrait influencer des réarrangements VDJ monoalléliques [Mostoslavsky et coll., 2001 ; Liang et coll., 2004]. Cependant, cette asymétrie n'a été démontrée que pour les cellules pré-B et pour le locus κ et peut difficilement être transposée au locus IgH et aux cellules B matures soumises à la CSR dans la mesure où 75% des cellules qui commutent réalisent également des recombinaisons intrachromosomales sur l'allèle silencieux [Borzilio et coll., 1987]. De plus, la commutation de classe semble impliquer dans la majorité des cas le même gène de chaîne lourde sur les deux allèles [Rothman et coll., 1990]. Dans ce contexte, il devient très difficile d'affirmer que la commutation de classe est l'unique produit d'une recombinaison intrachromosomique plutôt que celui d'un échange réciproque de matériel entre les deux allèles.

Il semble en fait que tout soit réuni, dans les lymphocytes B stimulés, pour que puisse se produire une recombinaison interchromosomique entre deux régions S simultanément transcrites. Un tel phénomène n'a en fait été démontré précédemment que chez le lapin. Dans ce modèle, il semble que 3 à 7 % de la commutation de classe vers IgA est le produit d'une *trans*-recombinaison [Knight et coll., 1995 ; Kingzette et coll., 1998]. Cependant, ce phénomène pourrait être attribué à la singularité des gènes $C\alpha$ du lapin qui ont évolué par duplication successives jusqu'à 13 copies par locus. Nous avons donc voulu étudier dans le modèle beaucoup plus classique de la souris, la fréquence de *trans*-recombinaison durant la commutation de classe en comparaison du modèle canonique de délétion intrachromosomique.

- **Mise en évidence du phénomène de *trans*-recombinaison chez la souris.**

Dans un premier temps, nous avons utilisé un modèle de souris transgénique généré dans notre laboratoire pour lequel un allèle de chaîne lourde a été rendu non fonctionnel par l'insertion d'un exon de chaîne variable V κ entre JH4 et E μ (mutation fr-V κ). Cette insertion entraîne une incapacité de l'allèle à produire des ARNm VDJ-C μ fonctionnels. Cet allèle non fonctionnel a la particularité de posséder un allotype « a ». Les animaux homozygotes pour cette mutation sont dans l'incapacité de produire des IgM et sont totalement dépourvus de lymphocytes B matures. Afin de quantifier une *trans*-recombinaison, au cours de la commutation de classe, nous avons évalué la capacité d'animaux hétérozygotes (possédant un allèle sauvage d'allotype « b »), à produire des ARNm ou des anticorps d'allotype « a » alors que l'allèle muté (possédant cet allotype) est non fonctionnel.

- **La *trans*-recombinaison peut restaurer la commutation de classe vers tous les isotypes d'anticorps.**

Dans un second temps, nous avons utilisé un autre modèle de souris transgénique que nous avons généré par croisement de deux lignées de notre laboratoire. La première lignée est le modèle de souris précédemment cité (fr-V κ). Le second modèle concerne le modèle de souris décrit par Pinaud et collaborateurs (2001) : dans ce modèle, la délétion des activateurs HS3b et HS4 (mutation Δ) conduit à une forte inhibition de la commutation de classe vers la majorité des isotypes, due à une diminution drastique de la transcription germinale des gènes correspondants. Nous avons souhaité savoir, à l'aide d'animaux hétérozygotes Δ /fr-V κ , si l'allèle non fonctionnel (fr-V κ) peut, par *trans*-recombinaison entraîner une restauration de la commutation de classe, contrastant avec le défaut de switch observé dans les souris Δ/Δ .

RESULTATS

PARTIE 1:

• Manuscrit N°1 (en préparation):

Replacement of the S μ sequences by neomycine resistance gene impairs B cell development and μ gene expression.

Hei-lanne Dougier, Zeliha Oruc, Maha Samara, Ahmed Boumédiène and Ahmed Amine Khamlichi

• Manuscrit N°2 (soumis):

Germline transcription in mice bearing neo^r gene downstream of I γ 3 exon in the immunoglobulin heavy chain locus.

Maha Samara, Zeliha Oruc, Hei-lanne Dougier, Tamer Essawi, Michel Cogné and Ahmed Amine Khamlichi

PARTIE 2:

• Manuscrit N°3:

Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells.

Stéphane Reynaud, Laurent Delpy, Laurence Fleury, Hei-lanne Dougier, Christophe Sirac and Michel Cogné

• Manuscrit N°4 (soumis):

Interallelic class switch recombination can reverse allelic exclusion and allow *trans*-complementation of an IgH locus switching defect.

Stéphane Reynaud, Hei-lanne Dougier, Claire Carrion, Eric Pinaud, Laurent Delpy and Michel Cogné

MANUSCRIT N° 1

Replacement of S μ sequences by neomycine resistance gene impairs B cell development and μ gene expression

(En preparation)

Hei-lanne Dougier, Zeliha Oruc, Maha Samara, Ahmed Boumédiène and
Ahmed Amine Khamlichi

Dans cette étude, nous décrivons le phénotype de souris mutantes dans lesquelles l'intron I μ -C μ a été remplacé par le gène néo^R.

Nous avons trouvé que le compartiment B était profondément altéré avec un blocage dès les stades précoces du développement. En conséquence, une faible proportion de cellules B atteint les organes lymphoïdes secondaires. La transcription germinale initiée à partir du promoteur I μ est bloquée.

Les résultats sont discutés dans le contexte des interactions longue-distance avec des séquences régulatrices en aval et de la nécessité d'un épissage correct des transcrits germinaux.

MANUSCRIT N°2

Germline transcription in mice bearing neo^r gene downstream of I γ 3 exon in the immunoglobulin heavy chain locus

(soumise à International Immunology)

Maha Samara, Zeliha Oruc, Hei-lanne Dougier, Tamer Essawi, Michel Cogné and Ahmed Amine Khamlichi

Dans cette étude, nous avons généré des souris dans lesquelles le gène neo^R a été inséré en aval de l'exon I γ 3 en laissant intacts tous les éléments nécessaires pour la transcription germinale et l'épissage normal des transcrits γ .

Nous montrons que l'expression du gène neo^R interfère avec la transcription initiée à partir de I γ 3 et provoque une diminution de la commutation de classe vers IgG3. De plus, cette étude montre que le gène neo^R apporte tous les éléments nécessaires à l'épissage des transcrits germinaux par l'activation de deux nouveaux sites cryptiques d'épissage, l'un dans la région codante du gène neo^R et l'autre dans l'intron I γ 3-C γ 3.

MANUSCRIT N°3

Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells

(The Journal of Immunology)

Stéphane Reynaud, Laurent Delpy, Laurence Fleury, Hei-lanne Dougier, Christophe Sirac and Michel Cogné

Nous avons tout d'abord vérifié que notre modèle de souris fr-V κ n'exprimait pas de BCR d'allotype « a ». En effet, cet allèle n'étant pas fonctionnel, il est impossible que les souris expriment un anticorps de surface de cet allotype.

Pour la commutation vers IgA, l'analyse s'effectue par séquençage et digestion des produits de RT-PCR correspondant aux transcrits de la chaîne lourde α (A partir de LB issus des plaques de Peyer). Nous avons travaillé sur des animaux de génotype *a/b* dont l'allèle « a » est rendu non fonctionnel par la mutation fr-V κ . Dans le cas de réarrangements purement intrachromosomiques, tous les transcrits fonctionnels du locus IgH devraient donc correspondre à l'allotype « b ». Nous avons pu tirer parti des différences de séquences entre les transcrits α d'allotypes « a » et « b » (qui se manifestent en outre par la présence ou l'absence d'un site d'enzyme de restriction). Après avoir séquencé et digéré 120 clones provenant de 3 souris différentes nous trouvons une fréquence de recombinaison interchromosomique de 7 ± 2 %. Ce pourcentage est confirmé par séquençage des produits de RT-PCR totaux. Nous avons également démontré par dosage ELISA la présence d'IgA sériques d'allotype « a ». De plus en microscopie confocale, environ 6 % des plasmocytes présents dans les plaques de Peyer expriment des IgA membranaires d'allotype « a ».

Pour la commutation vers IgG3, nous avons pu observer une recombinaison interchromosomique à une fréquence encore plus élevée, de $17,95 \pm 1,15$ % dans des splénocytes stimulés au LPS pendant trois jours. Ces résultats sont confirmés par la digestion des produits de RT-PCR totaux qui présentent là-aussi un polymorphisme de restriction permettant de les assigner à l'allotypie *a* ou *b*.

MANUSCRIT N°4

Interallelic class switch recombination can reverse allelic exclusion and allow trans-complementation of an IgH locus switching defect

(Soumise à The Journal of Immunology)

Stéphane Reynaud*, Hei-lanne Dougier*, Claire Carrion, Eric Pinaud, Laurent Delpy and Michel Cogné

** these authors contributed equally to this manuscript*

Nous avons généré des souris provenant du croisement entre les souris précédemment citées (fr-V κ) et des souris décrites par Pinaud et collaborateurs (2001) pour lesquelles les activateurs HS3b et HS4 de la LCR 3' ont été délétés (mutation Δ), conduisant à une forte inhibition de la commutation de classe vers la majorité des isotypes, due à une diminution drastique de la transcription germinale des gènes correspondants. Nous avons travaillé sur des animaux hétérozygotes Δ /fr-V κ qui portent d'une part la mutation fr-V κ sur un allèle (lequel allèle, non fonctionnel pour l'expression de transcrits VDJ, devient par force l'allèle exclu), et d'autre part la mutation Δ /fr-V κ Hs3b/hs4, qui entraîne un défaut de switch du deuxième allèle IgH (qui constitue cependant par force dans les cellules B de ces animaux l'allèle productif). La mesure de l'ensemble des isotypes d'Ig sérique révèle une restauration partielle du défaut de commutation dans les souris Δ /fr-V κ comparativement aux souris Δ / Δ . Dans les surnageants de cultures de splénocytes stimulés par le LPS en combinaison ou non avec différentes cytokines, la mesure du taux d'Ig révèle encore une fois une restauration de la commutation de classe pour les souris Δ /fr-V κ comparativement aux souris Δ / Δ . Nous avons vérifié si la restauration du taux d'Ig était corrélée avec les transcrits correspondants par Northern blot à l'aide d'une sonde γ qui cross hybride avec tous les isotypes γ . Alors que les transcrits γ sont dramatiquement diminués dans les splénocytes issus de souris Δ / Δ stimulés par LPS, LPS+IL4 et LPS + IFN γ , la présence de l'allèle non fonctionnel restaure la production de ces transcrits dans les splénocytes issus de souris Δ /fr-V κ . Afin de déterminer si la sécrétion d'IgG3 et IgG2b par les splénocytes stimulés est à corrélérer avec la fréquence des

cellules ayant subi la commutation de classe ou avec le taux d'expression des gènes qui ont commuté, nous avons voulu apprécier le pourcentage de cellules ayant commuté vers ces isotypes par cytométrie en flux. La commutation de classe et l'expression à la membrane des IgG3 et IgG2b dans les splénocytes stimulés avec du LPS sont dramatiquement diminuées dans les souris Δ/Δ . Dans les souris $\Delta/\text{fr-V}\kappa$, la présence de l'allèle non fonctionnel lève partiellement le défaut de commutation observé dans les souris Δ/Δ . L'étude des transcrits germinaux révèle une restauration de la transcription germinale dans les souris $\Delta/\text{fr-V}\kappa$ comparativement aux souris Δ/Δ . Cette restauration provenant de l'allèle non fonctionnel est attendue puisqu'il a déjà été montré que l'allèle exclu effectuait une transcription germinale normale. En revanche, dans les souris $\Delta/\text{fr-V}\kappa$ on note une restauration de la quantité de transcrits hybrides $I\mu\text{-C}\alpha$ révélant une *trans*-recombinaison pour la totalité des isotypes.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

PARTIE 1:

En dehors de son utilisation comme marqueur de sélection, le gène néo^R est utilisé pour comprendre les interactions pouvant se produire au sein d'un locus complexe. Bien que d'autres marqueurs de sélection soient également utilisés [Lorenz et coll., 1995 ; Harrimann et coll., 1996 ; Seidl et coll., 1998 ; Hein et coll., 1998 ; Qiu et coll., 1999], nous parlerons ici d'effet « néo » car c'est probablement le promoteur associé au gène de résistance qui joue un effet plutôt que le marqueur de sélection.

Au sein du locus IgH, il est aujourd'hui connu que l'effet « néo » ne dépend ni du sens de transcription du gène de résistance ni du promoteur utilisé que ce soit pgk ou tk. Au sein de ce locus, il a été montré que l'effet « néo » inhibait l'influence de la LCR 3' sur les promoteurs I situés en amont mais pas en aval du site d'insertion du gène néo^R (exception faite de I γ 1) [Manis et coll., 1998 ; Harriman et coll., 1999 ; Qiu et coll., 1999 ; Seidl et coll., 1999 ; Kusin et coll., 2000 ; Cogné et coll., 1994 ; Khamlichi et coll. 2000 ; Pinaud et coll., 2001 ; Manis et coll., 2002a], suggérant que le gène néo^R peut perturber les interactions entre la LCR 3' et les promoteurs I à une distance supérieure à 100 kb.

L'ensemble des études réalisées au sein du locus IgH ont eu pour but de remplacer certains éléments critiques pour la transcription germinale (promoteurs I, exons I ou C) ce qui ne permet pas de savoir si l'effet observé est dû à l'altération de ces structures, à l'effet « néo » ou au deux. Il est donc intéressant d'analyser l'effet « néo » en laissant intacts tous les éléments nécessaires à la transcription germinale et à la commutation de classe. Les souris présentées dans les manuscrits n°1 et n°2 répondent à cette exigence.

Dans le manuscrit n°1, le remplacement de l'intron I μ -C μ conduit à un sévère blocage du développement B (mais pas à son arrêt total) lors de la transition du stade pro-B au stade pré-B. Cet effet est la conséquence directe de l'insertion du gène néo^R dans la mesure où la délétion de ce gène conduit à un nombre de cellules pro-B normal et à une augmentation de deux à trois fois du nombre de cellules pré-B [Kamlichi et coll., 2004]. Cependant, bien qu'il soit clair que l'effet « néo » puisse expliquer l'accumulation des cellules au stade pro-B, la

diminution du nombre des cellules au stade pré-B doit provenir à la fois de l'absence de l'intron I μ -C μ et de l'insertion du gène néo^R. L'analyse des taux d'anticorps sériques montre une diminution importante dans les souris N/N en relation avec la faible quantité de cellules B matures pouvant atteindre la rate. Les études *in vivo* révèlent que les cellules B sont très sensibles à la mortalité induite par le LPS. Une co-stimulation des splénocytes à l'IL4 et à l'anti-CD40 conduit à une amélioration de la viabilité des cellules.

L'étude de la transcription germinale révèle une absence totale de transcrits I μ -C μ dans les souris N/N alors que des transcrits Néο-C μ et Néο-C δ sont détectés. L'analyse des séquences des transcrits I μ -C μ n'a pas mis en évidence l'activation d'un site cryptique dans le gène néο^R contrairement à ce que nous avons observé dans le manuscrit n°2.

Pourquoi n'y a-t-il pas de site cryptique activé ? Une possibilité est que la sensibilité de la RT-PCR ne peut détecter de rares transcrits Néο-C μ épissés. Il se peut également que l'insertion particulière du gène néο^R puisse empêcher l'épissage sur C μ . Dans les souris mutantes présentées dans le manuscrit 2, l'insertion du gène néο^R en aval de I γ 3 laisse un large intron (~4Kb) entre la cassette et le site accepteur de C γ 3. Dans les souris I μ -C μ mutantes, seulement 75 pb séparent la cassette du site accepteur sur C μ . L'épissage est normal dans les souris délétées du gène néο^R, ce qui suggère que les éléments nécessaires à un épissage normal des transcrits μ sont présents [Khamlichi et coll., 2004]. Il semble ainsi que des contraintes structurales imposées au pré messagers Néο-C μ empêche leur détection.

Plusieurs possibilités peuvent expliquer le blocage entre le stade pro et pré-B. La première est que le site de polyadénylation du gène néο^R puisse bloquer la transcription précoce de C μ . La seconde possibilité est que l'insertion du gène néο^R puisse bloquer les réarrangements V(D)J dans les souris N/N. Des études sont en cours pour clarifier cette hypothèse.

De nombreuses études ont montré que le gène néο^R était inductible par le LPS. Dans cette étude nous avons démontré qu'il était également inductible par l'anti-CD40 + IL4, cependant nous ne savons pas si la réponse à la combinaison anti-CD40 + IL4 est similaire à celle du LPS.

Cependant, partant de l'idée que l'inductibilité du gène néο^R nécessite les activateurs du locus IgH, la question qui se pose est comment le promoteur du gène néο^R interagit avec ces derniers et quelles sont leurs identités ? Un candidat potentiel est la LCR 3' qui a été montrée comme contrôlant la transcription germinale à partir de promoteurs I incluant I μ [Pinaud et coll., 2000]. Un autre candidat pourrait être des éléments de régulation

se trouvant en aval du gène C δ car des travaux récents suggèrent fortement l'existence d'éléments régulateurs, non encore clairement identifiés et localisés en aval du gène C δ humain [Palomo et coll., 1999 ; Mundt et coll., 2000]. Ces études laissent penser que des éléments régulateurs de la transcription, situés en 3' du gène δ chez la souris, pourraient interagir avec le gène néo^R. Dans le but d'élucider cette hypothèse, nous nous sommes proposés d'isoler leurs équivalents murins et de les caractériser aussi bien d'un point de vue structural que fonctionnel. L'étude de la séquence du gène δ murin nous a permis d'identifier deux domaines caractérisés par une forte concentration de sites de fixation de facteurs agissant en *trans*. Plusieurs de ces motifs sont communs aux promoteurs et activateurs des gènes d'Ig [Ernst et Smale, 1995]. Si ce résultat est en soi encourageant, il ne constitue pas pour autant une preuve formelle de l'existence d'éléments de régulation, ni que les sites en question soient fonctionnels.

Dans ce scénario, le gène néo^R pourrait interférer avec l'effet polarisé de la LCR 3' ou avec des activateurs situés en 3' du gène C δ sur I μ , ce qui aboutirait à l'abrogation de la transcription germinale à partir de I μ .

Dans le manuscrit n°2, nous avons démontré que néo^R, inducible par le LPS, inhibe spécifiquement la transcription germinale à partir de I γ 3 mais pas à partir de I γ 2b situé en aval, ce qui est en accord avec des études antérieures [Seidl et coll., 1999]. Il a été montré que la transcription germinale, à elle seule, n'est pas suffisante pour la commutation de classe et que la maturation des transcrits germinaux joue également un rôle clé [Lorenz et coll., 1995 ; Hein et coll., 1998 ; Qiu et coll., 1999 ; Kusin et coll., 2000]. Nos résultats semblent confirmer ces hypothèses dans la mesure où, en l'absence du site donneur d'épissage de I γ 3, deux autres sites cryptiques sont activés dont l'un au sein du gène néo^R aboutissant à la formation d'une protéine de fusion néo-C γ 3. Le fait que cette protéine puisse jouer un rôle dans la commutation de classe vers IgG3 demeure inconnu. Bien que le gène néo^R puisse se substituer à I γ 3 pour initier la transcription germinale, le niveau de commutation de classe observé dans les souris N/N est très faible comparativement aux souris N/+ et +/+. L'explication la plus plausible est que l'essentiel de la transcription s'arrête au niveau du site de polyA du gène néo^R ne permettant ainsi pas à la région S γ 3 d'être transcrite et de former des boucles R nécessaires à la commutation.

Les mécanismes par lesquels la LCR 3' et les promoteurs I interagissent et comment un gène néo^R inductible par le LPS peut interférer avec ce phénomène ne sont à ce jour toujours pas élucidés. Le fait que néo^R puisse localement altérer la structure chromatinienne ou bien entrer en compétition avec des promoteurs situés en amont requiert encore de nombreuses études. Il est maintenant démontré que la structure de la chromatine est un élément essentiel de la machinerie de régulation transcriptionnelle. Alors même que les mécanismes moléculaires gouvernant l'ouverture de la chromatine compactée et l'accessibilité des promoteurs et des activateurs aux facteurs agissant en *trans* sont encore débattus, il est clair que les changements de la structure chromatinienne proches des gènes transcrits nécessite une coopération entre les facteurs de transcription, les histones et d'autres cofacteurs afin de remodeler et de déplacer les nucléosomes. La LCR 3' est capable d'établir et de maintenir un état transcriptionnel activé dans des régions entières de la chromatine probablement en recrutant des histone acétyltransférases (HAT) contenant des cofacteurs qui pourraient induire une acétylation locale des histones se propageant le long de la chromatine sous l'influence de la LCR 3' [Madisen et coll., 1998].

L'insertion du gène néo^R peut inhiber l'initiation de la transcription à partir de promoteurs situés en amont en bloquant la propagation de signaux émanant de la LCR 3' vers les promoteurs en amont (mais pas ceux localisés en aval de l'insertion) : c'est le modèle linking. Alternativement, le promoteur du gène néo^R pourrait interagir physiquement avec la LCR 3' : c'est le modèle looping.

Cependant, il semble tout à fait improbable que le promoteur de néo^R puisse avoir une affinité beaucoup plus forte pour la LCR 3' car si c'était le cas nous devrions observer une altération de la transcription germinale à partir des promoteurs I situés en amont et en aval de l'insertion du gène néo^R . Il semblerait qu'au cours d'un modèle strict de looping [Bulger et Groudine., 1999], les effets de la LCR 3' sur les promoteurs I situés en amont de l'insertion du gène de résistance puisse être bloqués par un effet isolateur de néo^R activé.

L'utilisation du gène néo^R comme outil pour comprendre les loci complexes a été d'une grande aide pour appréhender les mécanismes de base permettant les fonctions des régions régulatrices éloignées, et pour élaborer des approches complémentaires afin d'élucider les mécanismes régissant les interactions à distance.

Polymérase zéta :

Dans une situation physiologique, l'hypermutation somatique et la commutation de classe introduisent des cassures double-brins, mais la machinerie mutationnelle peut également affecter, en dehors des sites physiologiques, des proto-oncogènes comme *bcl-6* et *c-myc* dans certains lymphomes humains. La polymérase Zéta (ζ) jouerait un rôle important dans le maintien de l'intégrité chromosomique et elle est impliquée dans l'hypermutation somatique [Gibbs et coll., 1998 ; Zan et coll., 2001 ; Diaz et Casali, 2002].

Nous sommes entrain d'établir des modèles murins de dérégulation conditionnelle de l'expression de la polymérase ζ , afin d'étudier les conséquences sur l'hypermutation somatique, la commutation de classe et les translocations chromosomiques.

Le premier modèle repose sur la surexpression de la polymérase ζ spécifique aux cellules B, par insertion du gène *néo^R* et de l'activateur intronique *E μ* (Figure 18). Nous venons d'obtenir des souris chimériques à partir d'un clone ES recombinant. Leur analyse est en cours et il nous faut obtenir une transmission germinale de la mutation. Si cette dernière se confirme par la suite, nous envisageons de croiser ces souris avec des souris transgéniques *Cre* pour déléter *in vivo* le gène *néo^R*.

Le second modèle est une inactivation conditionnelle de la polymérase ζ , car il a été montré que l'inactivation du gène codant pour la sous-unité catalytique de la polymérase ζ était létale dès les stades précoces du développement embryonnaire. Il était donc impossible d'étudier le rôle de cette dernière dans les stades ultérieurs de développement. La figure 19 présente le schéma de la construction réalisée : l'insertion du gène *néo^R* avec cette fois la localisation des sites *loxP* qui permettra après croisement des ces souris avec des souris transgéniques *Cre* la délétion gène *néo^R* mais également d'un exon du gène de la polymérase zéta.

Ces modèles nous permettront d'étudier les conséquences sur l'hypermutation somatique, les translocations chromosomiques ainsi que le rôle de la polymérase ζ sur la commutation isotypique et dans les processus tumorigéniques B qui n'est pas encore établi.

PARTIE 2:

La grande majorité des recombinaisons de commutations de classe observées dans les cellules B sont classiquement considérées comme provenant d'une association d'un gène V_H avec un gène C_H par *cis*-recombinaison. Ce modèle repose sur l'association de deux régions S localisées sur le même chromosome par délétion en boucle de la région génique située entre le point de fusion des deux régions S [Dudley et coll., 2005]. Un échange réciproque de matériel génétique entre deux chromatides-sœurs a également été proposé conduisant à une cellule fille commutée et à une autre cellule fille possédant une duplication des régions constantes. Ce phénomène est très rare, s'il existe [Harriman et coll., 1993]. Un troisième modèle fait intervenir le *trans*-splicing répandu chez les nématodes et les trypanosomes. Ce phénomène permettrait d'expliquer l'expression de multiples isotypes d'Ig par un même lymphocyte B mais n'a pas été prouvé de façon convaincante [Shimizu et Honjo, 1993 ; Gerstein et coll., 1990].

Finalement malgré le dogme de la *cis*-recombinaison lors de la commutation de classe, le phénomène de *trans*-recombinaison a été démontré chez le lapin comme participant significativement à la commutation de classe vers la classe IgA [Knight et coll., 1995 ; Kingzette et coll., 1998]. Cependant ces études ont été considérées comme marginales par la communauté scientifique et plus ou moins spécifique au lapin qui a la particularité de posséder des duplications multiples des gènes $C\alpha$ au bout du locus IgH (point chaud de recombinaison ou de conversion génique ?), ce qui pourrait favoriser ce type de phénomène.

En utilisant un modèle de souris hétérozygote pour l'allotypie « *a* / *b* » au niveau du locus IgH et pour lequel le locus d'allotype « *a* » a été rendu non fonctionnel, nous avons montré que ce phénomène de *trans*-recombinaison n'est pas spécifique au lapin et qu'il participe de façon active à la commutation de classe vers IgA et IgG3. En effet nous avons pu montrer que 7% pour IgA et 17% pour IgG3 des anticorps produits par ces souris possédaient l'allotype « *a* ». Cette fréquence de *trans*-recombinaison supérieure pour IgG3 comparativement à IgA est tout à fait surprenante compte tenu de la faible distance génique séparant les gènes J des gènes $C\gamma3$. Comme l'espérance d'une recombinaison homologue interallélique est très faible pour des gènes espacés de moins de 300 kb ce phénomène de *trans*-commutation doit faire intervenir une recombinaison interchromosomique entre les deux régions S ainsi que l'ensemble de la machinerie de la commutation de classe. Nous avons ainsi pu proposer deux modèles pouvant intervenir lors de la commutation de classe : un modèle majeur faisant intervenir une recombinaison intrachromosomique et un modèle alternatif faisant intervenir une recombinaison interchromosomique (Figure 20).

Afin d'étudier si le phénomène de *trans*-recombinaison peut se produire lors de la commutation de classe vers tous les isotypes d'anticorps nous avons utilisé un deuxième modèle de souris portant des mutations ciblées du locus IgH. Ces animaux possèdent un allèle IgH rendu non fonctionnel par l'insertion d'un exon non traductible (mutation « *fr-Vκ* ») et l'autre allèle pour lequel la commutation est quasi abolie par délétion de deux activateurs 3' du locus IgH, HS3b et HS4 (mutation dite « Δ ») [Pinaud et coll., 2001]. Dans les lymphocytes B issus d'animaux hétérozygotes, l'allèle *fr-Vκ* sera exclu (bien qu'il porte tous les éléments *cis* régulateurs du locus) tandis que l'allèle Δ sera productif mais déficient en éléments activant la transcription germinale et la commutation de classe. Dans un modèle où ne surviendraient que des réarrangements inta-chromosomiques, ces animaux hétérozygotes devraient donc présenter un défaut de switch supérieur à celui des souris Δ/Δ puisqu'ils ont le handicap supplémentaire de ne disposer que d'un allèle exprimable par cellule B. Ce modèle nous a en fait permis de montrer que l'allèle exclu, durant les premiers stades du développement B, peut restaurer la déficience sévère de commutation de classe vers tous les isotypes d'Ig imposée par la délétion de HS3b et HS4 dans les LB matures. Ce phénomène est rendu possible par le fait que bien que l'allèle *fr-Vκ* soit non exprimé, il peut tout de même être le substrat pour les phénomènes de recombinaison. Sur cet allèle, comme la LCR 3' IgH est maintenue intacte, la transcription germinale survient normalement et des coupures double brin peuvent survenir au niveau des régions S [Delpy et coll., 2003]. Dans le cas de la délétion de HS3b et HS4, la transcription germinale depuis $I\mu$ n'est pas affectée. Cet allèle fonctionnel est donc capable, dans les LB activés, de présenter des exons VDJ fonctionnels et des coupures double brin au niveau de $S\mu$, fournissant là-aussi un partenaire pour la *trans*-recombinaison (Figure 21).

Il apparaît ainsi qu'un allèle « exclu » (car non fonctionnel dans notre modèle) peut lever par *trans*-recombinaison *in vivo* et *in vitro* le défaut sévère de commutation de classe lié à un défaut de l'allèle « productif ». Le phénomène de *trans*-recombinaison précédemment observé lors de la commutation de classe vers IgA et IgG3, se manifeste ici et peut être aisément mis en évidence pour la commutation de classe vers l'ensemble des isotypes d'anticorps. De plus dans le modèle de souris $\Delta/\textit{fr-V}\kappa$ la fréquence de *trans*-recombinaison semble plus importante que celle mesurée dans les souris *wt/fr-Vκ* suggérant que lorsque la *cis*-recombinaison est non fonctionnelle, le phénomène de *trans*-recombinaison est stimulé.

En général, les échanges interchromosomiques dans les cellules somatiques sont rares mais sont le fruit de coupures double brin. Cependant, bien que ces coupures apparaissent au cours des réarrangements VDJ, le phénomène de *trans*-recombinaison ne se produit pas à ce stade du développement B [Knight et coll., 1995 ; Kingzette et coll., 1998 ; Delpy et coll., 2002]. Dans le cas de la commutation de classe une localisation nucléaire identique pour les deux allèles autoriserait ce genre de recombinaison. Dans ce sens il a été montré une localisation asymétrique des allèles lors des réarrangements VDJ alors que les deux allèles sont symétriquement localisés dans l'euchromatine dans les LB mature et les LB activés jusqu'au jour 1,5 après l'activation [Skok et coll., 2001]. Cette localisation nucléaire identique pourrait permettre à AID et à la machinerie de commutation de classe de concentrer leur action sur les régions switch des deux allèles permettant par la suite de résoudre les coupures double brin générées dans ces régions par *cis* (modèle majeur) ou *trans*-recombinaison (modèle alternatif).

L'ensemble de cette étude a permis de bousculer le dogme de l'immunologie moléculaire selon lequel, au cours de la commutation de classe, la recombinaison ne se produirait qu'au sein d'un même allèle. Nous avons ainsi pu, dans un premier temps, déterminer que cette *trans*-recombinaison peut concerner jusqu'à 17 % des recombinaisons effectuées lors de la commutation de classe vers IgG3. Ce phénomène est d'ailleurs plus important pour IgG3 que pour IgA et ceci malgré la plus faible distance entre JH et C γ 3 comparativement à JH et C α . Dans un second temps, nous avons pu étendre ce phénomène de *trans*-recombinaison à l'ensemble des isotypes. Cette grande fréquence de recombinaison peut contribuer à expliquer la forte incidence des myélomes, lymphomes et plasmocytomes mettant en jeu des translocation liant une région S du locus IgH avec certains oncogènes comme *c-myc*, *bcl-2*... Cette étude confirme également l'hypothèse selon laquelle la machinerie de commutation de classe peut recruter dans un compartiment nucléaire spécialisé plusieurs gènes transcrits et non pas seulement ceux qui sont liés à l'allèle productif.

A l'issue de ce travail, plusieurs perspectives peuvent être envisagées. Dans un premier temps, il serait intéressant de quantifier précisément, par la génération d'hybridomes, le pourcentage de *trans*-recombinaison pour chaque isotype. Cette étude devrait également permettre de confirmer que cette *trans*-recombinaison se produit lors de la commutation de classe et non pas lors des réarrangements VDJ. Nous souhaitons également déterminer si la recombinaison interchromosomique met en jeu les mêmes phénomènes que la recombinaison intrachromosomique par séquençage des régions switch. Enfin nous avons également entamé

une étude chez l'homme afin de déterminer si le phénomène de *trans*-recombinaison existe également lors de la commutation de classe.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Albrecht, B.**, Peiritsch, S. and Woisetschlager, M. 1994. A bifunctional control element in the human IgE germline promoter involved in repression and IL-4 activation. *Int. Immunol.* 6: 1143-1151.
- Alessandrini, A.** and Desiderio, S. 1991. Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol. Cell. Biol.* 11: 2096-2107.
- Annweiler, A.**, Mulle, U. and Wirth, T. 1992. Functional analysis of defined mutations in the immunoglobulin heavy-chain enhancer in transgenic mice. *Nucleic. Acids. Res.* 20: 1503-1509.
- Arulampalam, V.**, Eckhard, L. and Pettersson S. 1997. The enhancer shift: a model to explain the developmental control of IgH gene expression in B-lineage cells. *Immunol. Today* 18: 549-554.
- Bachl, J.** and Wabl, M. 1996. An immunoglobulin mutator that targets G.C pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 851-855.
- Bachl, J.**, Olsson, C., Chitkara, N. and Wabl, M. 1998. The Ig mutator is dependent on the presence, position, and orientation of the large intron enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 2396-2399.
- Bachl, J.**, Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M. and Olsson, C. 2001. Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J. Immunol.* 166: 5015-5017.
- Ballard, D.W.** and Bothwell, A. 1987. Mutational analysis of the immunoglobulin heavy chain promoter region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9626-9630.
- Banerji, J.**, Olson, L. and Schaffner W. 1983. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy-chain genes. *Cell.* 33: 729-740.
- Bemark, M.**, Kamlichi, A.A., Davies, S.L. and Neuberger, M.S. 2000. Disruption of mouse polymerase zeta (Rev3) leads to embryonic lethality and impairs blastocyst development in vitro. *Curr. Biol.* 10: 1213-1216.
- Bangs, L.A.**, Sanz, I.E. and Teale, J.M. 1991. Comparison of D, JH, and junctional diversity in the fetal, adult and aged B cell repertoires. *J. Immunol.* 146: 1996-2004.
- Barreto, V.**, Reina-San-Martin, B, Ramiro, A.R. and McBride, M. 2003. C-terminal deletion of AID uncouples class switch recombination from somatic hypermutation and gene conversion. *Mol. Cell.* 12: 501-508.
- Bergstedt-Lindqvist, S.**, Sidera, P., Macdonald, H. R. and Severinson, E. 1984. Regulation of Ig class secretion by soluble products of certain T-cell lines. *Immunol. Rev.* 78: 25-50.
- Bassing, C.H.**, Swat, W. and Alt, F.W. 2002. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell.* 109: (Suppl. S45-S55).

- Berek, C., Berger, A. and Apel, M.** 1991. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell*. 67: 1121-1129.
- Bertocci, B., De Smet, A., Berek, C., Weill, J.C. and Reynaud, C.A.** 2003. Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity*. 19: 203-211.
- Berton, M.T., Uhr, J. W. and Vitetta, E.** 1989. Synthesis of germline γ 1 immunoglobulin heavy-chain transcripts in resting B cells : Induction by interleukin 4 and inhibition by interferon γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 2829-2833.
- Berton, M.T. and Vitetta, E. S.** 1990. Interleukin 4 induces changes in the chromatin structure of the γ 1 switch region in resting B cells before switch recombination. *J. Exp. Med.* 172: 375-378.
- Betz, A. G., Rada, C., Pannell, R., Milstein, C. and Neuberger, M. S.** 1993. Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity and specific hot spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 2385-2388.
- Betz, A. G., Milstein, C., Gonzalez-Fernandez, A., Pannell, R., Larson, T. and Neuberger, M. S.** 1994. Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin κ gene : critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell*. 77: 239-248.
- Borzillo, G.V., Cooper, M.D., Kubagawa, H., Landay, A. and Burrows, P.D.** 1987. Isotype switching in human B lymphocyte malignancies occurs by DNA deletion: evidence for nonspecific switch recombination. *J. Immunol.* 139: 1326-1335.
- Bosma, G. C., Kim, J., Urich, T., Fath, D. M., Coticelli, M. G., Ruetsch, N. R., Radic, M. Z. and Bosma, M. J.** 2002. DNA-dependent protein kinase activity is not required for immunoglobulin class switching. *J. Exp. Med.* 11: 1483-1495.
- Bottaro, A., Lansford, R., Xu, L., Zhang, J., Rothman, P. and Alt, F.W.** 1994. I region transcription (per se) promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *EMBO J.* 13: 665-674.
- Bottaro, A., Young, F., Chen, J., Serwe, M., Stablitzky, F. and Alt F.W.** 1998. Deletion of the IgH intronic enhancer of associated matrix-attachment regions decreases, but does not abolish, class switching at the mu locus. *Int. Immunol.* 10: 799-806.
- Boulton, S.J. and Jackson S.P.** 1996. *Saccharomyces cerevisiae* Ku70 potentiates illegitimate DNA double-strand break repair and serves as a barrier to error-prone DNA repair pathways. *EMBO J.* 15: 5093-5103.
- Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M. D. and Goodman, M. F.** 2003. Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100: 4102-4107.
- Bulger, M. and Groudine, M.** 1999. Looping versus linking : toward a model for a long distance gene activation. *Gene Dev.* 13 : 2465-2477.

- Cary, R. B., Peterson, S. R., Wang, J., Bear, D. G., Bradbury, E. M. and Chen, D. J.** 1997. DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(9): 4267-4272.
- Casellas, R., Nussenzweig, A., Wuerffel, R., Pelanda, R., Reichlin, A., Suh, H., Qin, X. F., Besmer, E., Kenter, A., Rajewsky, K. and Nussenzweig, M. C.** 1998. Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J.* 17: 2404-2411.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E. and Alt, F. W.** 2003. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature.* 422: 726-730.
- Chaudhuri, J. and Alt, F.** 2004. Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* 4(7): 541-552.
- Chauveau, C., and Cogné M.** 1996. Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat. Genet.* 14: 15-16.
- Chauveau, C., Pinaud, E. and Cogné, M.** 1998. Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur. J. Immunol.* 28: 3048-3056.
- Chen, J., Young F., Bottaro, A., Stewart, V., Smith, R.K. and Alt F.W.** 1993. Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *EMBO. J.* 12: 4635-4645.
- Chen, X., Kiroshita, K. and Honjo, T.** 2001. Variable deletion and duplication at recombination junction ends : implication for staggered double-strand cleavage in class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 13860-13865.
- Christensen, S.M., Martin, B.K., Tan, S.S. and Weis J.H.** 1992. Identification of sites for distinct DNA binding proteins including Oct-1 and Oct-2 in the Cr2 gene. *J. Immunol.* 148: 3610-3617.
- Chun, J.J., Schatz, D.J., Oettinger, M.A., Jaenisch, R. and Baltimore, D.** 1991. The recombination activating gene-1 (RAG-1) transcript is present in the murine central nervous system. *Cell.* 64: 189-200.
- Cocco, M.J., Hanakahi., Huber, M.D. and Maizels, N.** 2003. Specific interactions of distamycin with G-quadruplex DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 31: 2944-2951.
- Coffman, R. L. and Carty, J.** 1986. A T-cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon- γ . *J. Immunol.* 136: 949-956.
- Coffman, R. L., Lebman, D. A. and Shrader, B.** 1989. Transforming growth factor- β specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170: 1039-1044.
- Cogné, M., Lansford, R., Bottaro, A., Zhang, J., Gorman, J., Young, F., Cheng, H-L. and Alt F.W.** 1994. A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell.* 77: 737-747.

- Coico, R. F., Bhogal, B. S. and Thorbecke, G. J.** 1983. The relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *J. Immunol.* 131: 2254-2257.
- Collins, J. T. and Dunnick, W. A.** 1993. Germline transcripts of the murine immunoglobulin γ 2a gene : structure and induction by IFN- γ . *Int. Immunol.* 5: 885-891.
- Cook, A. J., Oganessian, L., Harumal, P., Basten, A., Brink, R. and Jolly, C. J.** 2003. Reduced switching in SCID B cells is associated with altered somatic mutation of recombined S regions. *J. Immunol.* 171: 6556-6564.
- 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.
- Corcoran, L.M. and Karvelas, M.** 1994. Oct-2 is required early in T cell-independent B cell activation for G1 progression and for proliferation. *Immunity.* 1: 635-645.
- 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.
- Daniels, G.A. and Lieber, M.A.** 1995. RNA:DANN complex formation upon transcription of immunoglobulin switch regions: implications for the mechanism and regulation of class switch recombination. *Nucleic. Acids. Res.* 23: 5006-5011.
- Delphin, S. A. and Stavnezer, J.** 1995. Characterization of an IL-4 responsive region in the immunoglobulin heavy chain ϵ promoter : Regulation by NF-IL4, a C/EBP family member and NF- κ B/p50. *J. Exp. Med.* 181: 181-192.
- Delpy, L., Decourt, C., Le Bert, M. and Cogne, M.** 2002. B cell development arrest upon insertion of a neo gene between JH and Emu: promoter competition results in transcriptional silencing of germline JH and complete VDJ rearrangements. *J. Immunol.* 169(12): 6875-6882.
- Delpy, L., Le Bert, M., Cogne, M. and Khamlichi, A.A.** 2003. Germ-line transcription occurs on both functional and non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes. *Eur. J. Immunol.*, 33(8): 2108-2113.
- Dempsey, L.A., Sun, H., Hanakahi, L.A. and Maizels, N.** 1999. G4 DNA binding by LR1 and its subunits, nucleolin and hnRNP D, role for G-C pairing in immunoglobulin switch recombination. *J. Biol. Chem.* 274: 1066-1071.
- Denépoux, S., Razanajaona, D., Blanchard, D., Meffre, G., Capra, J. D., Banchereau, J. and Lebecque, S.** 1997. Induction of somatic mutation in a human B cell line in vitro. *Immunity.* 6 : 35-46.

- Denépoux, S.** Fournier N., Peronne C., Banchereau, J. and Lebecque S. 2000. T cells can induce somatic mutation in B cell receptor-engaged B12 Burkitt's lymphoma cells independently of CD40-CD40 ligand interactions. *J. Immunol.* 164: 1306-13.
- Diaz, M.,** Verkoczy, L.K., Flajnik, M.F. Klinman, N.R. 2001. decreased frequency of somatic hypermutation and impaired affinity maturation but intact germinal center formation in mice expressing antisense RNA to DNA polymerase zeta. *J. Immunol.* 167: 327-35.
- Diaz, M.** and Casali, P. 2002. Somatic immunoglobulin hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 14(2) : 235-240.
- Dickerson, S.K.,** Market, E., Besmer, E. and Papavasiliou, F.N. 2003. AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J.Exp.med.* 197: 1291-1296.
- Dreyfus, M.,** Doyen, N. and Rougeon F. 1987. The conserved decanucleotide from the immunoglobulin heavy chain promoter induces a very high transcriptional activity in B-cells when introduced into an heterologous promoter. *EMBO. J.* 6: 1685-1690.
- Dudley, D.D.,** Chaudhuri, J., Bassing, C.H. and Alt, F.W. 2005. mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv .Immunol.* 86: 43-112.
- Dunnick, W.,** Hertz, G. Z., Scappino, L. and Gritzmacher, C. 1993. DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic. Acids Res.* 21: 365-372.
- Eastman, Q. M.,** Leu, T. M. and Schatz, D. G. 1996. Initiation of V(D)J recombination in vitro obeying the 12/23 rule. *Nature.* 380: 85-88.
- Eaton, S.** and Calam, K. 1987. Multiple DNA sequence elements are necessary for the function of an immunoglobulin heavy chain promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7634-7638.
- Engler, P.,** Roth, P., Kim, J.Y. and Storb U. 1991. Factors affecting the rearrangement efficiency of an Ig test gene. *J. Immunol.* 146: 2826-2835.
- Ernst, P.** and Smale, S. T. 1995. Combinatorial regulation of transcription II : the immunoglobulin μ heavy chain gene. *Immunity.* 2: 427-438.
- Esposito, G.,** Godindagger, I., Klein, U., Yaspo, M.L., Cumano, A. and Rajewsky K. 2000. Disruption of the Rev31-encoded catalytic subunit of polymerase zeta in mice results in early embryonic lethality. *Curr Biol.* 10(19):1221-1224.
- Faili, A.,** Aoufouchi S., Flatter E., Gueranger Q., Reynaud C.A. and Weil J.C. 2002. Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature.* 419: 944-947.
- Faili, A.,** Aoufouchi, S., Weller, S., Vuillier, F., Sary, A., Sarasin, A., Reynaud, C. A. and Weill, J. C. 2004. DNA polymerase eta is involved in hypermutation occurring during immunoglobulin class switch recombination. *J. Exp. Med.* 199(2): 265-70.

- Falkner**, F.G. and Zachau, H.G. 1984. Correct transcription of an immunoglobulin κ gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature*. 310: 71-74.
- Fernandez**, L.A., Winkler, M. and Grosschedl, R. 2001. Matrix attachment region-dependent function of the immunoglobulin μ enhancer involves histone acetylation at a distance without changes in enhancer occupancy. *Mol. Cell. Biol.* 21: 196-208.
- Fiering**, S., Epner, E., Robinson, K., Zhuang, Y., Telling, A., Hu, M., Martin, D. I. K., Enver, T., Ley, T. J. and Groudine, M. 1995. Targeted deletion of 5' HS2 of the murine β -globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the β -globin locus. *Genes. Dev.* 9 : 2203-2213.
- Forrester**, W.C., van Genderen, C., Jenuwein, T. and Grosschedl, R. 1994. Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin mu gene of nuclear matrix attachment regions. *Science*. 265: 1221-1225.
- Fukita**, Y., Jacobs, H. and Rajewsky, K. 1998. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity*. 9: 105-114.
- Gerstein**, R. M., Frankel, W. N., Hsieh, C. L., Durdik, J. M., Rath, S., Coffin, J. M., Nisonoff, A. and Selsing, E. 1990. Isotype switching of an immunoglobulin heavy chain transgene occurs by DNA recombination between different chromosomes. *Cell*. 63: 537-548.
- Getts**, R. C. and Stamato, T. D. 1994. Absence of a Ku-like DNA end binding activity in the xrs double-strand DNA repair-deficient mutant. *J. Biol. Chem.* 269: 15981-15984.
- Giannini**, S. L., Singh, M., Calvo, C. F., Ding, G. F. and Birshtein, B. K. 1993. DNA regions flanking the mouse Ig 3' α enhancer are differentially methylated and DNase hypersensitive during B cell differentiation. *J. Immunol.* 150: 1772-1780.
- Gibbs**, P. E., McGregor, W. G., Maher, V. M., Nisson, P. and Lawrence, C. W. 1998. A human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* REV3 gene, which encodes the catalytic subunit of DNA polymerase Zeta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 6876-6880.
- Glaudet**, F., Denis, V., Cogne, M. and Khamlichi, A.A. 2004. Induction of somatic hypermutation by antigen-specific B cell receptors in the human BL2 cell line. *Eur. J. Immunol.* 34: 1637-1645.
- Gong**, S. and Nussenzweig, M. C. 1996. Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig β . *Science*. 272: 411-414.
- Goodman**, D. J., Gaff, C. and Gerondakis, S. 1993. The IL-4 induced increase in the frequency of resting murine splenic B cells expressing germline Ig heavy chain gamma 1 transcripts correlates with subsequent switching to IgG1. *Int. Immunol.* 5: 199-208.
- Gordon**, M. S., Kanegai, C. M., Doerr, J. R. and Wall, R. 2003. Somatic hypermutation of the B cell receptor genes B29 (Ig β , CD79b) and mb1 (Ig α , CD79a). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 4126-4131.

- Goyenechea, B., Klix, N., Yelamos, J., Williams, G. T., Riddell, A., Neuberger, M. S. and Milstein, C.** 1997. Cells strongly expressing Ig(Kappa) transgenes show clonal recruitment of hypermutation : a role for both MAR and the enhancers. *EMBO J.* 16: 3987-3994.
- Green, N. S., Rabinowitz, J.L., Zhu, M., Kobrin, B.J. and Scharff, M.D.** 1995. Immunoglobulin variable region hypermutation in hybrids derived from a pre-B and a myeloma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6304-6308.
- Grossmann, K.F., Ward, A.M. and Moses, R.E.** 2000. *Saccharomyces cerevisiae* lacking Snm1, Rev3 or Rad51 have a normal S-phase but arrest permanently in G2 after cisplatin treatment. *Mutat. Res.* 461: 1-13.
- Gu, H., Zou, Y.R. and Rajewsky, K.** 1993. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-*loxP*-mediated gene targeting. *Cell.* 73: 1155-1164.
- Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D. and Hayakawa, K.** 1991. Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* 173: 1213-1225.
- Harriman, W., Volk, H., Defranoux, N. and Wabl, M.** 1993. Immunoglobulin class switch recombination. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 361-384.
- Harriman, G.R., Bradley, A., Das, S., Rogers-Fani, P. and Davis, A.C.** 1996. IgA class switch in α exon-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 97: 477-485.
- Harriman, G. R., Bogue, M., Rogers, P., Finegold, M., Pacheco, S., Bradley, A., Zhang, Y. and Mbawuike, I. N.** 1999. Targeted deletion of the IgA constant region in mice leads to IgA deficiency with alterations in expression of other Ig isotypes. *J. Immunol.* 162: 2521-2529.
- Hein, K., Lorenz, M. G. O., Siebenkotten, G., Petry, K., Christine, R. and Radbruch, A.** 1998. Processing of switch transcripts is required for targeting of antibody class switch recombination. *J. Exp. Med.* 188: 2369-2374.
- Hengstschläger, M., Williams, M. and Maizels, N.** 1994. A λ 1 transgene under the control of the heavy chain promoter and enhancer does not undergo somatic hypermutation. *Eur. J. Immunol.* 24: 1649-1656.
- Hermanson, G.G., Briskin, M., Sigman, D. and Wall R.** 1989. Immunoglobulin enhancer and promoter motifs 5' of the B29 B-cell-specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 7341-7345.
- 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.
- Hesslein, D.G. and Schatz, D.G.** 2001. Factors and forces controlling V(D)J recombinations. *Adv. Immunol.* 78: 169-232.

- Holder**, M. J., Knox, K. and Gordon, J. 1992. Factors modifying survival pathways of germinal center B cells. Glucocorticoids and transforming growth factor β but not cyclosporin A or anti CD19, block surface immunoglobulin-mediated rescue from apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 22: 2725-2728.
- Holder**, M. J., Wang, H., Milner, A.E., Casamayor, M., Armitage, R., Spriggs, M. K., Fanslow, W.C., MacLennan, I. C. M., Gregory, C. D. and Gordon, J. 1993. Suppression of apoptosis in normal and neoplastic human B lymphocytes by CD40 ligand. *Eur. J. Immunol.* 23: 2368-2371.
- Hollowood**, K. and Macartney, J. 1992. Cell kinetics of the germinal center reaction-a stathmokinetic study. *Eur. J. Immunol.* 21: 261-266.
- Honjo**, T., Kinoshita, K. and Muramatsu, M. 2002. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 165-196.
- Honjo**, T., Muramatsu, M. and Fagarasan, S. 2004. AID: how does it aid antibody diversity. *Immunity.* 20(6) : 659-668.
- Hug**, B., Wesselschmidt, R. L., Fiering, S., Bender, M. A., Groudine, M. and Ley, T. J. 1996. Analysis of mice containing a targeted deletion of β -globin locus control region 5' hypersensitive site 3. *Mol. Cell. Biol.* 16: 2906-2912.
- Ichiki**, T., Takahashi, W. and Watanabe, T. 1993. Regulation of the expression of human C ϵ germline transcript : Identification of a novel IL-4 responsive element. *J. Immunol.* 158: 4769-4779.
- Iwasato**, T., Shimizu, A., Honjo, T. and Yamagishi, H. 1990. Circular DNA is excised by immunoglobulin class switch recombination. *Cell.* 62: 143-149.
- Jacob**, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. and Weiss, U. 1991a. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centers. *Nature.* 354: 389-392.
- Jacob**, J., Kassir, R. and Kelsoe G. 1991b. 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.
- Jenuwein**, T. and Grosschedl R. 1991. Complex pattern of immunoglobulin μ gene expression in normal and transgenic mice: nonoverlapping regulatory sequences govern distinct tissue specificities. *Genes. Dev.* 5: 932-943.
- Jenuwein**, T., Forrester, W.C., Fernandez-Herrero, L.A., Laible, G., Dul, M. and Grosschedl, R. 1997. Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature.* 385: 269-272.
- Jung**, S., Rajewsky, K. and Radbruch, A. 1993. Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science.* 259: 984-987.
- Jung**, D., Bassing, C. H., Fugmann, S. D., Cheng, H. L., Schatz, D. G. and Alt, F. W. 2003. Extrachromosomal recombination substrates recapitulate beyond 12/23 restricted VDJ recombination in nonlymphoid cells. *Immunity.* 18: 65-74.

- Kadesch, T., Zervos, P. and Ruezinsky, D.** 1986. Functional analysis of the murine IgH enhancer: evidence for negative control of cell-type specificity. *Nucl. Acids. Res.* 14, 8209-8221.
- Kallberg, E., Gray, D. and Leanderson, T.** 1993. Analysis of somatic mutation activity in multiple Vk genes involved in the response to 2-phenyl-5-oxazalone. *Int. Immunol.* 5: 573-582.
- Kallberg, E., Jainandunsing, S., Gray, D. and Leanderson, T.** 1996. Somatic mutation of immunoglobulin V genes in vitro. *Science.* 271: 1285-1289.
- Kaminski, D.A. and Stavnezer, J.** 2004. Antibody class switching: uncoupling S region accessibility from transcription. *Trends. Genet.* 20(8): 337-340.
- Khamlichi, A. A., Pinaud, E., Decourt, C., Chauveau, C. and Cogné, M.** 2000. The 3'IgH regulatory region : a complex structure in a search for a function. *Adv. Immunol.* 75: 317-345.
- Khamlichi, A.A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Le Bert, M. and Cogné, M.** 2004. Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S μ tandem repeat. *Blood.* 103: 3828-3836.
- Kemler, I., Schreiber, E., Muller, MM., 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.
- Kenter, A. L.** 2003. Class-switch recombination : after the dawn of AID. *Curr. Opin. Immunol.* 15: 190-198.
- Kenter, A.L., Wuerffel, R., Dominguez, C., Shanmugam, A. and Zhang, H.** 2004. Mapping of a functional recombination motif that defines isotype specificity for $\mu \rightarrow \gamma 3$ switch recombination implicates NF-kappaB p50 as the isotype-specific switching factor. *J. Exp. Med.* 199: 617-627.
- Kenter, A.L. and Bhattacharya, P.** 2004. AID: A very old motif newly recognized. *Nat. Immunol.* 5: 1203-1204.
- Kingzette, M., Spieker-Polet, H., Yam, P.C., Zhai, S.K. and Knight, K.L.** 1998. Trans-chromosomal recombination within the Ig heavy chain switch region in B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 95: 11840-11845.
- Kim, U., Qin, X.F., Gong, S., Stevens, S., Luo, Y., Nussenzweig, M. and Roeder, R.G.** 1996. The B-cell specific transcription factor OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. *Nature.* 383: 542-547.
- Klaus, G. G. B., Humphrey, J. H., Kunkle, A. and Dongworth, D. W.** 1980. The follicular dendritic cell : its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunol. Rev.* 53: 3-28.
- Klix, N., Jolly, C. J., Davies, S. L., Bruggemann, M., Williams, G. T. and Neuberger, M. S.** 1998. Multiple sequences from downstream of the J kappa cluster can combine to recruit somatic hypermutation to a heterologous, upstream mutation domain. *Eur. J. Immunol.* 28: 317-326.
- Knight, K.L., Kingzette, M., Crane, M.A. and Zhai, S.K.** 1995. Transchromosomally derived Ig heavy chains. *J. Immunol.* 155: 684-691.

- Koopman**, G., Parmentier, H. K., Schuurman, H. J., Newman, W., Meijer, C. J. and Pals, S. 1991. Adhesion of human B cells to follicular dendritic cells involves both the lymphocyte function associated antigen intracellular adhesion molecule pathways. *J. Exp. Med.* 173: 1297-1304.
- Koralov**, S.B., Novobrantseva, T.I., Hochedlinger, K., Jaenish, R. and Rajewsky, K. 2005. Direct in vivo VH to DJ rearrangement violating the 12/23 rule. *J. Exp. Med.* 201: 341-348.
- Kosco**, M.H., Burton, G. F., Kapasi, Z.F., Szakal, A.K. and Tew, J.G. 1989. Antibody forming cell induction during an early phase of germinal center development and its delay with aging. *Immunology.* 68: 312-318.
- Kottmann**, A.H., Zevnik, B., Welte, M., Nielsen, P.J. and Kohler G. 1994. A second promoter and enhancer element within the immunoglobulin heavy chain locus. *Eur. J. Immunol.* 24: 817-821.
- Kroese**, F. G. M., Wubenna, A. S., Seijen, H. G. and Nieuwenhuis, P. 1987. Germinal centers develop oligoclonally. *Eur. J. Immunol.* 17: 1069-1072.
- Kunkel**, T. A., Pavlov, Y. I. and Bebenek, K. 2003. Function of human DNA polymerases η , κ and ι suggested by their properties, including fidelity with undamaged DNA templates. *DNA. Repair.* 2: 135-149.
- Kuzin**, I.I., Ugine, G.D., Wu, D., Young, F., Chen, J. and Bottaro, A. 2000. Normal isotype switching in B cells lacking the I μ exon splice donor site: evidence for multiple I μ -like germline transcripts. *J. Immunol.* 164: 1451-1457.
- LeBowitz**, J.H., Kobayashi, T., Staudt, L., Baltimore, D. and Sharp P.A. 1988. Octamer-binding proteins from B or HeLa cells stimulates transcription of the immunoglobulin heavy-chain promoter. *In Vitro. Gene.s Dev.* 2: 1227-1237.
- Le Morvan**, C., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A. and Cogné, M. 2003. The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood.* 102: 1421-1427.
- Li**, Y.S., Wasserman R., Hayakawa K. and Hardy, R.R. 1996. Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity.* 5: 527-535.
- Liang**, H.E., Hsu, L.Y., Cado, D. and Schlissel, M.S. 2004. Variegated transcriptional activation of the immunoglobulin kappa locus in pre-B cells contributes to the allelic exclusion of light-chain expression. *Cell.* 118: 19-29.
- Lin** Y.C.A. and Stavnezer, J. 1992. Régulation of transcription of the germline Ig α constant region gene by an ATF element and by novel transforming growth factor β 1 responsive elements. *J. Immunol.* 149: 2914-2925.
- 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 secondart responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur. J. Immunol.* 21: 2951-62.

- Lorenz, M., Jung, S. and Radbruch, A.** 1995. Switch transcripts in immunoglobulin class switching. *Science*. 267: 1825-1828.
- Lozano, F., Rada, C., Jarvis, J. M. and Milstein, C.** 1993. Affinity maturation leads to differential expression of multiple copies of a κ light-chain transgene. *Nature*. 363: 271-273.
- Luby, T. M., Schrader, C. E., Stavnezer, J. and Selsing E.** 2001. The μ Switch Region Tandem Repeats Are Important, but Not Required, for Antibody Class Switch Recombination. *J. Exp. Med.* 193: 159-168.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., Lieber, M. R.** 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*. 108: 781-794.
- MacDonald, J.P., Frank, E.G., Plosky, B.S., Rogozin, I.B., Masutani, C., Hanaoka, F., Woodgate, R. and Gearhart, P. J.** 2003. 129-derived strains of mice are deficient in DNA polymerase iota and have normal immunoglobulin hypermutation. *J. Exp. Med.* 198: 635-643.
- MacLennan, I.C.** 1994. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 117-139.
- Madisen, L. and Groudine, M.** 1994. Identification of a locus control region in the immunoglobulin heavy chain locus that deregulates e-myc expression in plasmacytoma and Burkitt's lymphoma cells. *Genes. Dev.* 8: 2212-2226.
- Madisen L., Krumm, A., Hebbes, T. R. and Groudine, M.** 1998. The immunoglobulin heavy chain locus control region increases histone acetylation along linked c-myc genes. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6281-6292.
- 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.
- Manis, J. P., Tian, M. and Alt, F. W.** 2002a. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends. Immunol.* 23: 31-39.
- Manis J.P., Dudley, D., Kaylor, L. and Alt, F.W.** 2002b. IgH class switching recombination to IgG1 in DNA-PKcs-deficient B cells. *Immunity*. 16: 607-617.
- Manis, J.P., Michaelson, J.S., Birshstein, B.K. and Alt, F.W.** 2003. Elucidation of a downstream boundary of the 3' IgH regulatory region. *Mol. Immunol.* 39: 753-760
- Martin, D. I., Fiering, S. and Groudine, M.** 1996. Regulation of β -globin gene expression : straightening out the locus. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6 : 488-495.
- Martin, A. and Scharff, M. D.** 2002. Somatic hypermutation of the AID transgene in B and non-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 :12304-12308.
- Mason, J.O., Williams, G.T. and Neuberger, M.S.** 1985. Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell*. 41: 479-487.

- Matsuda**, T., Bebenek, K., Masutani, C., Hanaoka, F. and Kunkel, T. A.. 2000. Low fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase η . *Nature*. 404: 1011-1013.
- Meek**, K.D., Haseman, 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. *Nature. Immunol.* 1: 379-385.
- Melchers**, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B. and Rolink A. 1993. The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol. Today*. 14: 60-68.
- Michaelson**, J. S., Giannini, S. L. and Birshstein, B. K. 1995. Identification of 3' α -hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic. Acids. Res.* 23: 975-981.
- Migliazza**, A., Martinotti, S., Chen, W., Fusco, C., Ye, B. H., Knowles, D. M., Offit, K., Chaganti, R. S. and Dalla-Favera, R. 1995. Frequent somatic hypermutation of the 5' non coding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 12520-12524.
- Mizuta**, R., Iwai, K., Shigeno, M., Mizuta, M., Uemura, T., Ushiki, T. and Kitamura, D. 2003. Molecular visualization of immunoglobulin switch region RNA/DNA complex by atomic force microscope. *J. Biol. Chem.* 278(7) 4431-4434.
- Monbaerts**, P., Lacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S. and Papaioannou, V.E. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. 68: 869-877.
- 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.
- Muramatsu**, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O. and Honjo, T. 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274: 18470-18476.
- Muramatsu**, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. and Honjo, T. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 102: 553-563.
- Murakumo**, Y., Roth, T., Ishii, H., Rasio, D., Numata, S., Croce, C. M. and Fishel, R. 2000. A human REV7 homolog that interacts with the polymerase zeta catalytic subunit hREV3 and the spindle assembly checkpoint protein hMAD2. *J. Biol. Chem.* 275: 4391-4397.
- Nadel**, B., Tang, A., Escuro, G., Lugo, G. and Feeny, A.J. 1998. Sequence of the spacer in the recombination signal sequence affects V(D)J rearrangement frequency and correlates with nonrandom V κ usage *in vivo*. *J. Exp. med.* 187: 1495-1503.
- Nagaoka**, H., Yu, A. and Nussenzweig, M.C. 2000. Regulation of RAG expression in developing lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 187-190.

- Nagata, K., Nakamura, T., Kitamura, F., Kuramochi, S., Taki, S., Campbell, K.S. and Karasuyama H.** 1997. The Ig α /Ig β heterodimer on μ -negative pro-B cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity*. 7: 559-570.
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y. and Shimizu, A.** 2003. Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science*. 302: 2137-2140.
- Neuberger, S. M. and Milstein, C.** 1995. Somatic hypermutation. *Curr. Opin. Immunol.* 7: 248-254.
- Nieuwenhuis, P. and Ford, W. L.** 1976. Comparative migration of T and B cells in the rat spleen and lymph nodes. *Cell. Immunol.* 23: 254-267.
- Nilsson, L. and Sideras, P.** 1993. The human I α 1 and I α 2 germline promoter elements : proximal positive and distal negative elements may regulate the tissue specific expression of C α 1 and C α 2 germline transcripts. *Int. Immunol.* 5: 271-282.
- Nutt, S.L., Thevenin, C. and Busslinger, M.** 1997. Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology*. 198: 227-235.
- Oancea, A.E, Berru, M. and Shulman, M.J.** 1997. Expression of the (recombinant) endogenous immunoglobulin heavy-chain locus requires the intronic matrix attachment regions. *Mol. Cell. Biol.* 17: 2658-2668.
- O'Brien, R. L., Brinster, R. L. and Storb, U.** 1987. Somatic hypermutation of an immunoglobulin transgene in κ transgenic mice. *Nature*. 326: 405-409.
- 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.
- Oettgen, H. C., Martin, T. R., Wynshaw-Berris, A., Deng, C., Drazen, J. M. and Leder, P.** 1994. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature*. 370: 367-370.
- Okazaki, I. M., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Yoshikawa, K. and Honjo, T.** 2002. The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature*. 416(6878): 340-345.
- Okazaki, I. M., Hiai, H., Kakazu, N., Yamada, S., Muramatsu, M., Kinoshita, K. and Honjo, T.** 2003. Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J. Exp. Med.* 197: 1173-1181.
- Papavasiliou, F. N. and Schatz, D. G.** 2000. Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature*. 408: 216-221.
- Parslow, T.G., Blair, D.L., Murphy, W.J. and Granner, D.K.** 1984. Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 81: 2650-2654.
- Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R.S.K., Klein, U., Küpper, R., Rajewsky, K. and Dalla-Favera, R.** 1998. BCL6 mutations in normal germinal

center B cells : evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 11816-11821.

Pasqualucci, L., Neumeister, P. Goosens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., Kuppers, R. and Dalla-Favera, R. 2001. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*. 412: 341-346.

Paull, T. T., Rogakou, E. P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C. U., Gellert, M. and Bonner, W. M. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol*. 10: 886-895.

Pelkonen, J., Kestler, J., Pelkonen, S. and Nitschke, L. 1997. Selective alteration in the antibody repertoire in DHQ52 deficient mice. *Immunol. letters*. 56: 10-11.

Peters, A. and Storb, U. 1996. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity*. 4: 57-65.

Petersen-Mahrt, S. K., Harris, R. S. and Neuberger, M. S. 2002. AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature*. 418: 99-104.

Pettersson, S., Cook, G.P., Brüggemann, M., Williams, G.T. and Neuberger, M.S. 1990. A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature*. 344: 165-168.

Pfisterer, P., Annweiler, A., Ullmer, C., Corcoran, L.M. and Wirth T. 1994. Differential transactivation potential of Oct-1 and Oct-2 is determined by additional B cell-specific activities. *EMBO. J*. 13: 1654-1663.

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

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

Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Le Bert, M. and Cogné M. 2001. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity*. 15: 187-199.

Poellinger, L., Yoza, B.K. and Roeder, R.G. 1989. Functionnal cooperativity between protein molecules bound at distinct sequence elements of the immunoglobulin heavy chain promoter. *Nature*. 337: 573-576.

Pulendran, B., Van Driel, R. and Nossal, G.J.V. 1997. Immunological tolerance in germinal centers. *Immunology Today*. 18: 27-32.

- Qiu, G.,** Harriman, G.R. and Stavnezer, J. 1999. I α exon-replacement mice synthesize a spliced HPRT-C α transcript which may explain their ability to switch to IgA. Inhibition of switching to IgG in these mice. *Int. Immunol.* 11: 37-46.
- Rada, C.,** Williams, G. T., Nilsen, H., Barnes, D. E., Lindahl, T. and Neuberger, M. S. 2002. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr. Biol.* 12: 1748-1755.
- Ramiro, A. R.,** Stavropoulos, P., Jankovic, M. and Nussenzweig, M. C. 2003. Transcription enhances AID-mediated cytidine deamination by exposing single stranded DNA on the non template strand. *Nat. Immunol.* 4: 452-456.
- Ramsden, D. A.** and Gellert, M. 1998. Ku protein stimulates DNA end joining by mammalian DNA ligases: a direct role for Ku in repair of DNA double-strand breaks. *EMBO. J.* 17: 609-614.
- Reaban, M.E.** and Griffin, J.A. 1990. Induction of RNA-stabilized DNA conformers by transcription of an immunoglobulin switch region. *Nature.* 348: 342-344.
- Reaban, M.E.,** Lebowitz, J. and Griffin, J.A. 1994. Transcription induced the formation of a stable RNA. DNA hybrid in the immunoglobulin α switch region. *J. Biol. Chem.* 269: 21850-21857.
- Reina-San-Martin, B.,** Difilippantonio, S., Hanitsch, L., Masilamani, R. F., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M. C. 2003. H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* 197: 1767-1778.
- Révy, P.,** Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A. G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L. D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A. and Durandy, A. 2000. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell.* 102: 565-575.
- Reynaud, C.A.,** Aoufouchi, S., Faili, A. and Weill, J.C. 2003. What role for AID: mutator, or assembler of the immunoglobulin mutasome? *Nat. Immunol.* 4: 631-638.
- Reynaud, S.,** Delpy, L., Fleury, L., Dougier, H. L., Sirac, C. and Cogne, M. 2005. Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol.* 174 (10) : 6176-6183.
- Rolink, A.,** Grawunder, U., Winkler, T.H., Karasuyama H. and Melchers F. 1994. IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int. Immunol.* 6/ 1257-1264.
- Rolink, A.,** Melchers, F. and Andersson, J. 1996. The SCID but not the RAG-2 gene product is required for S μ -S ϵ heavy chain class switching. *Immunity.* 5: 319-330.

- Rolink, A., ten Boekel, E., Melchers, F., Fearon, D.T., Krop, I. and Andersson, J.** 1996a. A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J. Exp. Med.* 183: 187-94.
- Rooney, S., Sekiguchi, J., Zhu, C., Cheng, H. L., Manis, J., Whitlow, S., DeVido, J., Foy, D., Chaudhuri, J., Lombard, D. and Alt, F. W.** 2002. Leaky Scid phenotype associated with defective V(D)J coding end processing in Artemis-deficient mice. *Mol. Cell.* 10: 1379-1390.
- Rothman, P., Chen, Y.Y., Lutzker, S., Li, S.C., Stewart, V., Coffman, R. and Alt, F.W.** 1990. Structure and expression of germ line immunoglobulin heavy-chain epsilon transcripts: interleukin-4 plus lipopolysaccharide-directed switching to C epsilon. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1672-1679.
- Rothman, P., Li, S. C., Gorham, B., Glimcher, L., Alt, F. W. and Boothby, M.** 1991. Identification of a conserved LPS/IL-4 responsive element located at the promoter of germline ϵ transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 11: 5551-5561.
- Ruiz, J.F., Dominguez, O., Lain de Lera, T., Garcia-Diaz, M. Bernad, A. and Blanco, L.** 2001. DNA polymerase mu, a candidate hypermutase?. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 356: 99-109.
- Ruiz, J.F., Lucas, D., Palomero, E.G., Saez, A.I., Gonzales, M.A., Piris, M.A. and Bernad, A. Blanco, L.** 2004. Overexpression of human DNA polymerase μ (Pol μ) in a Burkitt's lymphoma cell line affects the somatic hypermutation rate. *Nucl. Acids. Research.* 19:5861-5873.
- Sakai, E., Bottaro, A., Davidson, L., Sleckman, B.P. and Alt, F.W.** 1999a. 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.
- Sakai, E., Bottaro, A. and Alt, F.W.** 1999b. The Ig heavy chain intronic enhancer core region is necessary and sufficient to promote efficient class switch recombination. *Int. Immunol.* 11: 1709-1713.
- Sakano, H., Kurosawa, Y., Weigert, M. and Tonegawa, S.** 1981. Identification and nucleotide sequence of a diversity DNA segment (D) of immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature.* 290: 562-565.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A. and Baltimore, D.** 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell.* 59: 1035-1048.
- Schlissel, M.S., Corcoran, L.M. and Baltimore D.** 1991a. Virus transformed pre-B cells show ordered activation but not inactivation of immunoglobulin gene rearrangement and transcription. *J. Exp. Med.* 173, 711-720.
- Schmitz, J. and Radbruch, A.** 1989. An interleukin 4 induced DNase hypersensitive site indicates opening of the $\gamma 1$ switch region prior to switch recombination. *Int. Immunol.* 1: 570-575.

Schubart, D.B., Rolink A., Kosco-Vilbois M.H., Botteri F. and Matthias, P. 1996. B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature*. 383: 538-542.

Schubart, K., Massa, S., Schubart, D., Corcoran, L.M., Rolink A.G. and Matthias, P. 2001. B cell development and immunoglobulin gene transcription in the absence of Oct-2 and OBF-1 *Nature Immunol.* 2: 69-74.

Seidl, K. J., Bottaro, A., Vo, A., Zhang, J., Davidson, L. and Alt, F. W. 1998. An expressed *neo^r* cassette provides required functions of the I γ 2b exon for class switching. *Int. Immunol.* 10: 1683-1692.

Seidl, K. J., Manis, J. P., Bottaro, A., Zhang, J., Davidson, L., Kisselgof, A., Oettgen, H. and Alt, F. W. 1999. Position-dependent inhibition of class-switch recombination by PGK-*neo^r* cassettes inserted into the immunoglobulin heavy chain constant region locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 3000-3005.

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.

Shanmugan, A., Shi, M.J., Yauch, L., Stavnezer, J. and Kenter, A.L. 2000. Evidence for class-specific factors in immunoglobulin isotype switching. *J. Exp. Med.* 191: 1365-1380.

Shapiro, D. A., Threadgill, D. S., Copfer, M. J., Corey, D. A., McCool, T. L., McCormick, L. L., Magnuson, T. R., Greenspan, N. S. and Schreiber, J. R. 1998. γ 3 gene-disrupted mice selectively deficient in the dominant IgG subclass made to bacterial polysaccharides undergo normal isotype switching after immunization with polysaccharide-protein conjugate vaccines. *J. Immunol.* 161: 3393-3399.

Sharpe, M. J., Milstein, C., Jarvis, J. M. and Neuberger, M. S. 1991. Somatic hypermutation of immunoglobulin κ may depend on sequences 3' of C κ and occurs on passenger transgenes. *EMBO. J.* 10: 2139-2145.

Shimizu, A. and Honjo, T. 1993. Synthesis and regulation of trans-mRNA encoding the immunoglobulin epsilon heavy chain. *FASEB. J.* 7: 149-154.

Sawchuk, D., Weis-Garcia, F., Malik, S., Besmer, E., Bustin, M., Nussenzweig, M. and Cortes, P. 1997. V(D)J recombination: modulation of RAG1 and RAG2 cleavage activity on 12/23 substrates by whole cell extract and DNA-bending proteins. *J. Exp. Med.* 185: 2025-2032.

Shimizu, A. and Honjo, T. 1993. Synthesis and regulation of trans-mRNA encoding the immunoglobulin epsilon heavy chain. *Faseb J.* 7: 149-154.

Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M. and Alt, F.W. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell.* 68: 855-867.

Shinkura, R., Ito, S., Begum, N. A., Nagaoka, H., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Sakakibara, Y., Hijikata, H. and Honjo, T. 2004. Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 5: 707-712.

Shparago, N., Zelazowski, P., Jim, L., McIntyre, T. M., Stuber, E. Pecanha, L. M. T., Kerhy, M. R., Monod, J., Max, E. E. and Snapper, C. M. 1996. IL-10 selectively regulates murine isotype switching. *Int. Immunol.* 8: 781-790.

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.

Snapper, C. M. and Finkelman, F. D. 1993. Immunoglobulin class switching. *Fundamental. Immunol.* 3: 837-864.

Sonoda, E., Hitoshi, Y., Yamaguchi, N., Ishii, T., Tominaga, A., Araki, S. and Takatsu, K. 1992. Differential regulation of IgA production by TGF β and IL-5: TGF β induces IgA-positive cells bearing IL-5 receptor, whereas IL-5 promotes their survival and maturation into IgA- secreting cells. *Cell. Immunol.* 140: 158-172.

Ta, V.T., Nagaoka, H., Catalan, N., Durandy, A., Fischer, A., Imai, K., Nonoyama, S., Tashiro, J., Ikegawa, M., Ito, S., Kinoshita, K., Muramatsu, M. and Honjo, T. 2003. AID mutant analyses indicate requirement for class switch specific cofactors. *Nature. Immunol.* 4: 843-848.

Stavnezer-Nordgren, J. and Sirlin, S. 1986. Specificity of immunoglobulin heavy chain switch correlates with activity of germline heavy chain genes prior to switching. *EMBO. J.* 5: 95-102.

Stavnezer, J. 1996. Antibody Class Switching. *Adv. Immunol.* 61: 79-146.

Stavnezer, J. 2000. Molecular processes that regulate class switching. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 245: 127-168.

Tashiro, J., Kinoshita, K. and Honjo, T. 2001. Palindromic but not G-rich sequences are targets of class switch recombination. *Int. Immunol.* 13: 495-505.

Taylor, M. D., Carmack, C. E., Huszar, D., Higgins, K. M., Mashayekh, R., Sequer, G., Schramm, S. R., Kuo, C-C., O'Donnell, S. L. and Kay, R. M. . 1994. Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *Int. Immunol.* 6: 579-591.

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.

Tew, J. G., DiLosa, R. M., Burton, G. F., Kosco, M. H., Kupp, L. I., Masuda, A. and Szakal, A. K. 1992. Germinal centers and antibody production in bone marrow. *Immunol. Rev.* 126: 99-112.

Thevenin, C., Lucas, B.P., Kozlow, E.J. and Kehrl J. 1993. Cell type- and stage-specific expression of the CD20/B1 antigen correlates with the activity of a diverged octamer DNA motif present in its promoter. *J. Biol. Chem.* 268: 5949-5956.

- Thompson, A., Timmers, E., Schuurman, R.K. and Hendriks R.W.** 1995. Immunoglobulin heavy chain germ-line JH-C mu transcription in human precursor B lymphocytes initiates in a unique region upstream of DQ52. *Eur. J. Immunol.* 25: 257-261.
- Tian, M. and Alt, F.** 2000. Transcription-induced cleavage of immunoglobulin switch regions by nucleotide excision repair nucleases in vitro. *J. Biol. Chem.* 275(31) :24163-24172.
- Tissier, A., McDonald, J. P., Frank, E. G. and Woodgate, R.** 2000. Pol τ , a remarkably error-prone human DNA polymerase. *Genes. Dev.* 14: 1642-1650.
- Tonegawa, S.** 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature.* 302: 575-581.
- Tsukada, S., Sugiyama, H., Oka Y. and Kishimoto, S.** 1990. Estimation of D segment usage in initial D to Jh joining in a murine immature B cell line. *J. Immunol.* 144: 4053-4059.
- van Gent, D.C., Ramsden, D.A. and Gellert, M.** 1996. The RAG1 and RAG2 proteins establish the 12/23 rule in V(D)J recombination. *Cell.* 85: 107-113.
- van Gent, D.C., Hiom, K., Paull, T.T. and Gellert, M.** 1997. Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. *EMBO. J.* 16: 2665-2670.
- Wagner, S., Popov, A. V., Davies, S. L., Xian, J., Neuberger, M. S. and Brüggenmann, M.** 1994. The diversity of antigen-specific monoclonal antibodies from transgenic mice bearing human immunoglobulin miniloci. *Eur. J. Immunol.* 24: 2672-2681.
- Warren, W. D. and Berton, M. T.** 1995. Induction of germline $\gamma 1$ and ϵ Ig gene expression in murine B cells : interleukin 4 and the CD40 ligand-CD40 interaction provide distinct but synergistic signals. *J. Immunol.* 155: 5637-5646.
- Wasylyk, C. and Wasylyk, B.** 1986. The immunoglobulin heavy-chain B-lymphocyte enhancer efficiently stimulates transcription in non-lymphoid cells. *EMBO. J.* 5: 553-560.
- 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.
- West, R. B. and Lieber, M. R.** 1998. The RAG-HMG1 complex enforces the 12/23 rule of V(D)J recombination specifically at the double-hairpin formation step. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6408-6415.
- Winter, D. B., Sattar, N. and Gearhart, P. J.** 1998. The rôle of promoter-intron interactions in directing hypermutation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 229: 1-10.
- Wirth, T., Staudt, L. and Baltimore D.** 1987. An octamer oligonucleotide up-stream of a TATA motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity. *Nature.* 329: 174-178.
- Wittschieben, J., Shivji, M.K., Lalani, E., Jacobs, M.A., Marini, F., Gearhart, P.J., Rosenwell, I., Stamp, G. and Wood, R.D.** 2000. Disruption of the developmentally regulated Rev31 gene causes embryonic lethality. *Curr. Biol.* 10: 1217-20.

- Wuerffel**, R. A., Du, J., Thompson, R. J. and Kenter, A. L. 1997. Ig S γ 3 DANN-specific double strand breaks are induced in mitogen-activated B cells and are implicated in switch recombination. *J. Immunol.* 159: 4139-4144.
- Xu**, M. and Stavnezer, J. 1992. Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line γ 1 RNA : analysis of the promoter/enhancer. *EMBO J.* 11: 145-155.
- Yancopolous**, G.D. and Alt, F.W. 1985. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell.* 40: 271-281.
- Yancopolous**, G., De Pinho, R., Zimmerman, K., Lutzker, S., Rosenberg, N. and Alt, F. W. 1986. Secondary rearrangement events in pre B cells : V_HDJ_H replacement by LINE-1 sequence and directed class switching. *EMBO J.* 5: 3259-3266.
- Yoshikawa**, K., Okazaki, I. M., Eto, T., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H. and Honjo, T. 2002. AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science.* 296: 2033-2036.
- Yu**, K., Chedin, F., Hsieh, C.L., Wilson, T. E. and Lieber, M. R. 2003. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nature. Immunol.* 4: 442-451.
- Yu**, K., Chedin, F., Hsieh, C. L., Wilson, T. E. and Lieber, M. R. 2004. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *J. Biol. Chem.* 279: 6496-6500.
- Yu**, K., Roy, D., Bayramyan, M., Haworth, I.S. and Leber, R. 2005. Fine-structure analysis of activation-induced deaminase accessibility to class switch region R-loops. *Mol. Cell. Biol.* 25: 1730-1736.
- Zan**, H., Cerutti, A., Dramitinos, P., Schaffer, A., Li, Z. and Casali, P. 1999. induction of Ig somatic hypermutation and class switching in a human monoclonal IgM⁺ IgD⁺ cell line in vitro: definition of the requirements and the modalities of hypermutation. *J. Immunol.* 162: 3437-3447.
- Zan**, H., Li, Z., Yamaji, K., Dramitinos, P., Cerutti, A. and Casali, P. 2000. BCR engagement and T cell contact induce *bcl-6* hypermutation in human B cells: association with initiation of transcription and identity with hypermutation. *J. Immunol.* 165: 830-839.
- Zan**, H., Komori, A., Li, Z., Cerutti, A., Schaffer, A., Flajnik, M. F., Diaz, M. and Casali, P. 2001. The translesion DNA polymerase ξ plays a major role in Ig and *bcl-6* somatic hypermutation. *Immunity.* 14: 643-653.
- Zander**, L. and Bemark, M. 2004. Immortalized mouse cell lines that lack a functional Rev3 gene are hypersensitive to UV irradiation and cisplatin treatment. *DNA. Repair.* 3: 743-52.
- Zeng**, X., Winter, D.B., Kasmer, C., Kraemer, K.H., Lehmann, A.R. and Gearhari, P.J. 2001. DNA polymerase eta is an A-T mutator in somatic hypermutation of immunoglobulin variable genes. *Nat. Immunol.* 2: 537-41.

- Zhang, J.** and Bottaro, A., Li, S., Stewart, V. and Alt, F. W. 1993. A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I γ 2b promoter and exon. *EMBO. J.* 12: 3529-3537.
- Zhang, J.**, Alt, F. W. and Honjo, T. (1995). Regulation of class switch recombination of the immunoglobulin heavy chain genes. in *The immunoglobulin genes*, F. W. Alt and T. Honjo. eds. (San Diego, CA : Academic Press), 2nd edition, pp. 235-265.
- Zhu, M.**, Rabinowitz, J. L., Green, N. S., Kobrin, B. J. and Scharff, M. D. 1995. A well-differentiated B-cell line is permissive for somatic mutation of a transfected immunoglobulin heavy-chain gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 2810-2814.
- Zhu, M.**, Green, N. S., Rabinowitz, J. L. and Scharff, M. D. 1996. Differential V region mutation of two transfected Ig genes and their interaction in cultured B cell lines. *EMBO. J.* 15: 2738-2747.