

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

ÉCOLE DOCTORALE Science - Technologie - Santé

Faculté des Sciences et Techniques

UMR CNRS 6101 – Laboratoire d’Immunologie

N° : 35 - 2006

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L’UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

Zéliha ORUC-RATINAUD

Le 10 Juillet 2006

Interactions de longue distance et commutation de classe
dans le locus des chaînes lourdes d’immunoglobulines

Directeur de Thèse : Dr. Ahmed Amine Khamlichi

Soutenue devant le jury composé de :

- Président :** Michel Cogné – Professeur, Université de Limoges
- Rapporteurs :** Michèle Goodhardt – Directrice de recherche CNRS, Paris
Pierre Ferrier – Directeur de recherche INSERM, Marseille
- Examineurs :** Chantal Vaury – Directrice de recherche CNRS, Clermont-Ferrand
Marie-Odile Jauberteau – Professeur, Université de Limoges
A. Amine Khamlichi – Chargé de recherche CNRS, Toulouse

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	2
1. Structure et organisation des gènes d'Immunoglobulines.....	3
1.1. Chaînes légères.....	3
1.2. Chaînes lourdes.....	4
1.3. Les réarrangements dans les loci IgH, κ et λ	5
2. Recombinaison V(D)J.....	11
3. Maturation de la réponse immunitaire.....	13
3.1. Maturation de l'affinité-hypermutation somatique.....	14
3.1.1. Sélection clonale.....	14
3.1.2. Modèles <i>in vivo</i> pour l'étude de l'hypermutation somatique.....	17
3.1.3. Le rôle de AID.....	19
3.2. Commutation de classe.....	27
3.2.1. Les différents isotypes.....	27
3.2.2. Rôle des cytokines et de CD40.....	29

4. Mécanismes de la commutation de classe.....	31
4.1. Protéines associées aux séquences S.....	32
4.2. Transcription germinale.....	33
4.2.1. Induction et suppression de la transcription germinale.....	36
4.2.2. Maturation des transcrits germinaux.....	39
4.3. Lésions d'ADN associées à la recombinaison.....	43
5. Eléments <i>cis</i> -régulateurs du locus IgH.....	47
5.1. L'enhancer intronique E μ	47
5.2. Le promoteur/enhancer DQ52.....	51
5.3. Contrôle de l'accessibilité.....	52
5.4. La région régulatrice en 3' du locus.....	56
5.4.1. Activité de la 3'RR au cours du développement B.....	57
5.4.2. Protéines se liant à la 3'RR.....	58
5.4.2.1. Protéines se fixant à hs3.....	59
5.4.2.2. Protéines se fixant à hs1,2.....	59
5.4.2.3. Protéines se fixant à hs4.....	62
5.4.3. Fonctions attribuées à la 3'RR.....	63
5.4.3.1. Réplication.....	63
5.4.3.2. Hypermutation somatique.....	64
5.4.3.3. Transcription germinale et CSR.....	64
5.4.3.4. Expression du locus IgH.....	68
5.4.3.5. Structure de la chromatine.....	69
6. Insulateurs.....	72

POSITION DU PROBLEME	78
-----------------------------------	----

RESULTATS	81
------------------------	----

Manuscrit n°1 : Replacement of I γ 3 germline promoter by I γ 1 inhibits class switch recombination to IgG3 : the 3' regulatory region as a switch recombination enhancer

Manuscrit n°2 : Elongation of μ and γ 3 germline transcripts is differentially regulated suggesting different abilities of Immunoglobulin enhancers to regulate transcriptional elongation in vivo

Manuscrit n°3 : Insulation of the 3' regulatory region from the immunoglobulin heavy chain locus impairs class switch recombination to all isotypes

Article n°4 : Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S μ tandem repeat

Article n°5 : Germline transcription in mice bearing neo^r gene downstream of Ig3 exon in the Ig heavy chain locus

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	88
---	----

REFERENCES	97
-------------------------	----

ABREVIATIONS

Ac : anticorps	MAR : région d'ancrage à la matrice
ADN : acide désoxyribonucléique	MARE : site de liaison des protéines Maf
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire	MMR : « Mismatch repair »
Ag : antigène	neo' : gène de résistance à la néomycine
AID : cytidine désaminase induite après activation	NHEJ : jonctions d'extrémités non homologues
ARN : acide ribonucléique	nt : nucléotide
ARNm : acide ribonucléique messenger	pb : paire de bases
B : lymphocyte B	PCR : réaction de polymérisation en chaîne
BCR : récepteur des cellules B	RAG : gènes activant la recombinaison V(D)J
BSAP : "B-cell specific activation protein"	3'RR : région de régulation en 3'
CD40-L : ligand de CD40	RSS : séquence signal de recombinaison
CDR : régions déterminant la complémentarité	S : région « switch »
CG : centre germinatif	SHM : hypermutation somatique
C_H : région constante de chaîne lourde d'immunoglobuline	TD : T-dépendant
cHS4Ins : insulateur HS4 de poulet	TI : T-indépendant
CSR : commutation de classe d'immunoglobuline	Th : lymphocyte T auxiliaire
D : segment de diversité	TNF : "tumor necrosis factor"
DNase I : désoxyribonucléase I	TGF : "transforming growth factor"
ES : cellule souche embryonnaire	V : région variable
GL : transcript(ion) germinal(e)	
H ou HC : chaîne lourde d'immunoglobuline	
HAT : histone acétyltransférase	
HS ou hs : site hypersensible à la DNase I	
IFN : interféron	
Ig : immunoglobuline	
IgH : chaîne lourde d'immunoglobuline	
IL : interleukine	
J : segment de jonction	
kb : kilobase	
KO : « knock out » : mutation de gène par recombinaison homologue	
LC : chaîne légère d'immunoglobuline	
LCR : région de contrôle du locus	
LPS : lipopolysaccharide bactérien	

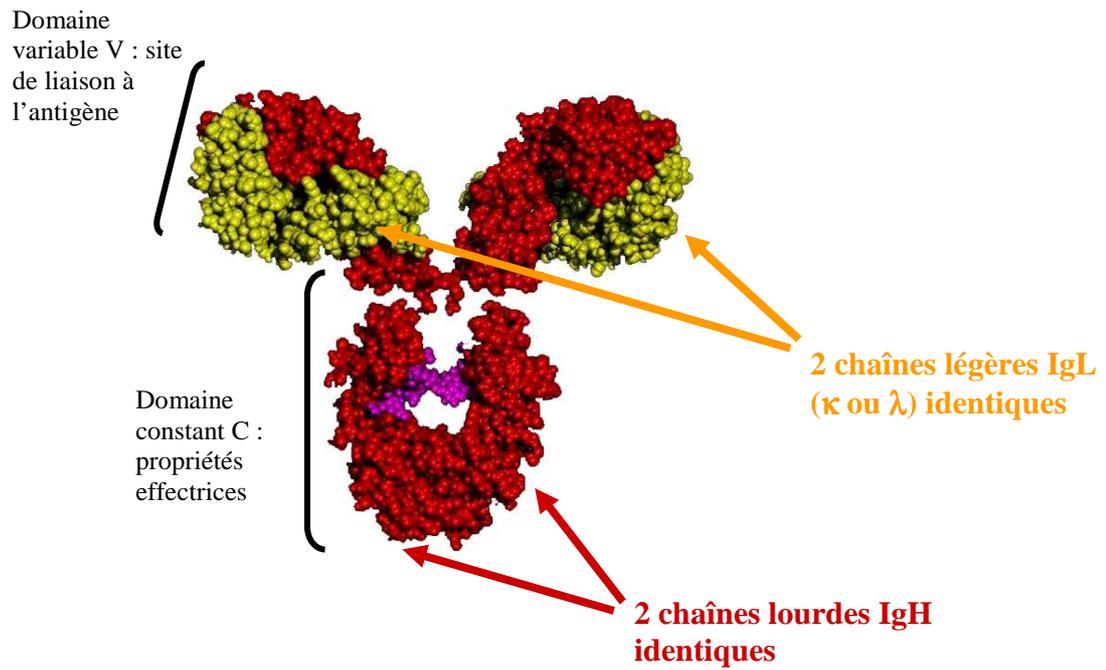


Figure 1 : Représentation tri-dimensionnelle d'une immunoglobuline.
Les chaînes lourdes sont colorées en rouge, les chaînes légères en jaune, les glycosylations sont indiquées en violet.

INTRODUCTION

Les immunoglobulines (Ig) sont les acteurs principaux de la réponse immunitaire humorale. Elles sont constituées de deux chaînes lourdes identiques (H) et de deux chaînes légères identiques (L) reliées entre elles par des ponts di-sulfures. Chaque chaîne est composée d'une partie constante (C) et d'une partie variable (V) (**Fig. 1**). La partie constante permet de distinguer deux types de chaînes légères, κ et λ , et différents isotypes de chaînes lourdes : μ , δ , $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, $\gamma 3$, ϵ et α chez la souris et μ , δ , $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, ϵ , $\alpha 1$ et $\alpha 2$ chez l'Homme. Les régions constantes des chaînes lourdes confèrent les propriétés effectrices à l'Ig (fixation de certains composants du complément, interaction avec des récepteurs spécifiques à la surface d'autres types cellulaires...). Les régions variables des chaînes lourdes et légères constituent le site de fixation de l'antigène déterminant ainsi la spécificité de l'Ig.

Dans la mesure où mon travail a porté sur le locus IgH murin, l'introduction bibliographique sera essentiellement focalisée sur les processus qui affectent ce locus. Les loci κ et λ seront mentionnés de façon très concise.

1. STRUCTURE ET ORGANISATION DES GENES D'IMMUNOGLOBULINES

1.1. Chaînes légères

Les gènes des LC κ sont situés sur le chromosome 6 de la souris. Dans sa configuration germinale, le locus κ murin comprend entre 100 et 300 segments $V\kappa$ et 5 segments $J\kappa$ qui codent la région V de la LC, et un seul segment $C\kappa$.

Les gènes des LC λ sont situés 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 $V\lambda$, 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 $C\lambda_4$ sont défectifs (**Fig. 2**).

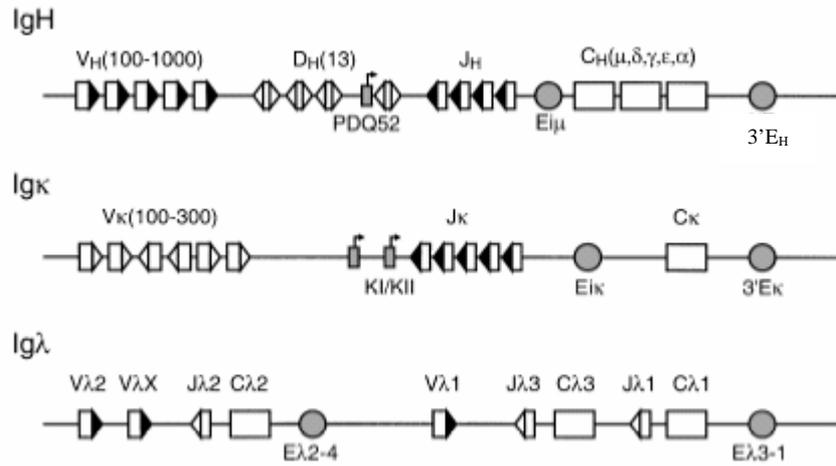


Figure 2 : Représentation schématique des loci des Ig.

Les segments de gènes sont représentés par des rectangles blancs, les activateurs et promoteurs par des cercles et des rectangles gris respectivement, les RSS par des triangles blancs (12-RSS) ou noirs (23-RSS). Les différents exons des régions constantes ne sont pas détaillés (D'après Hesslein et Schatz, 2001).

1.2. Chaînes lourdes

Le locus des HC est situé sur le chromosome 12 de la souris et comprend des centaines de segments V_H , une douzaine de segments D_H (spécifiques du locus IgH) et quatre segments J_H . On trouve ensuite huit gènes codant des régions C des huit classes et sous-classes d'Ig, répartis dans le sens: 5'- μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2b$, $\gamma 2a$, ϵ et α -3' (**Fig. 3**). Chaque gène constant est composé de multiples exons codant les domaines structuraux propres à chaque HC.

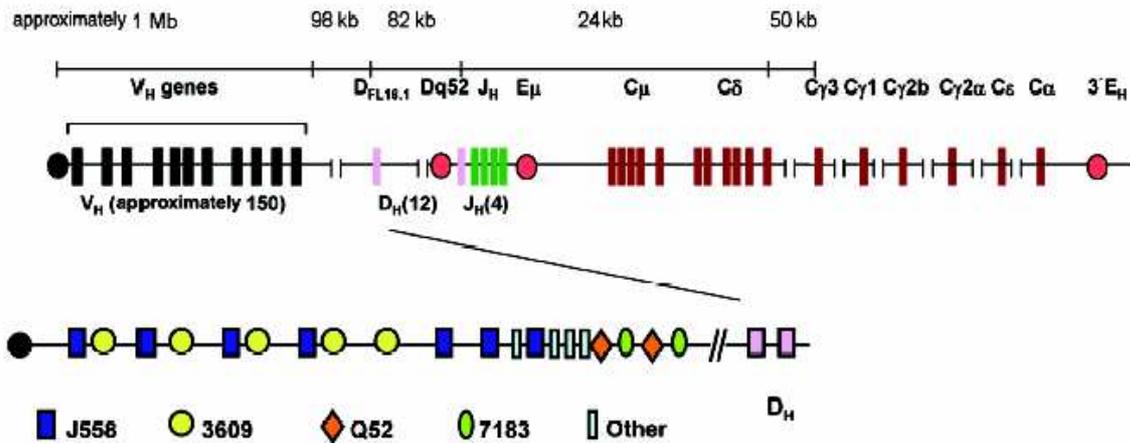


Figure 3 : Organisation du locus des HC d'immunoglobulines (IgH).

Représentation schématique du locus IgH murin, les distances approximatives entre les segments de gènes sont indiquées sur la partie supérieure. Plusieurs gènes V_H , le segment de gène D_H le plus en amont ($D_{FL16.1}$), les segments de gènes D_H les plus en aval ($Dq52$) et les 4 segments de gènes J_H sont représentés en amont des différents gènes constants (C_μ , C_δ , $C_\gamma3$, $C_\gamma1$, $C_\gamma2b$, $C_\gamma2a$, C_ϵ et C_α). Le nombre de gènes de chaque famille, V_H , D_H ou J_H , est indiqué entre parenthèses. Les 3 éléments connus de *cis*-régulation, l'activateur intronique E_μ , le promoteur/activateur $DQ52$ et la région 3' de contrôle du locus ou LCR ($3'E_H$) sont représentés par des ovales rouges. La partie inférieure détaille le locus V_H avec la localisation relative des segments de gènes appartenant aux familles J558, 3609, Q52 et 7183. Les cercles noirs représentent les télomères (D'après Chowdhury et Sen, 2004).

1.3. Les réarrangements dans les loci IgH, κ et λ

La configuration germinale des trois loci est celle retrouvée dans tous les types cellulaires. Dans cette configuration, les gènes des HC et LC ne sont pas fonctionnels. En effet, l'expression de ces gènes est exclusivement restreinte à la lignée lymphocytaire B. Pour devenir fonctionnels, ces gènes doivent d'abord subir, d'une façon ordonnée, une série de réarrangements intra-géniques qui commencent aux stades précoces du développement de la lignée B (**Fig. 4**).

- stade pro-B

Les premiers réarrangements sont généralement détectés dans le locus IgH, au stade pro-B entre un segment D_H et un segment J_H sur les deux chromosomes, aboutissant à un segment D_HJ_H . Ce réarrangement peut également être détecté dans le locus IgH des cellules T (pour revue : Jung et al., 2006).

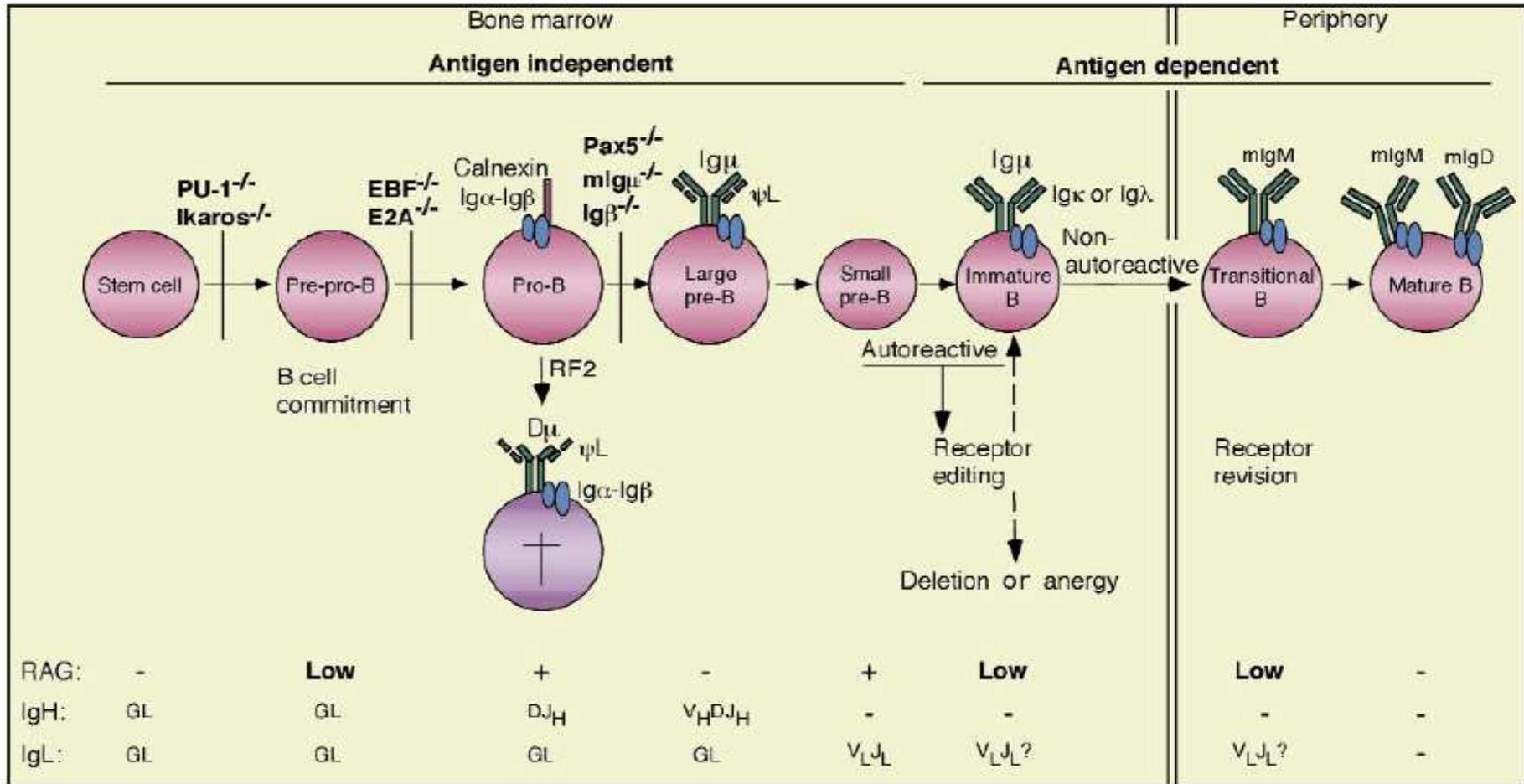


Figure 4: Stades de développement de la lignée B.

L'expression de RAG, les réarrangements des loci de chaîne lourde (IgH) et de chaîne légère (IgL) sont indiqués.

GL signifie que le locus est dans sa configuration germinale.

L'expression des différents récepteurs à la surface des cellules pro-B (Calnexine et Igα-Igβ), pré-B (Igμ, ΨL et Igα-Igβ) ou B (Igμ, Igκ ou Igλ et Igα-Igβ) est représentée.

Le développement de la lignée B peut être bloqué (trait vertical) à différents stades par l'inactivation ou l'absence d'expression de facteurs de transcription (PU-1^{-/-}, Ikaros^{-/-}, EBF^{-/-}, E2A^{-/-}, Pax^{-/-}) ou de récepteurs (mIgμ^{-/-}, Igβ^{-/-}) (D'après Meffre et al., 2000).

Au cours des réarrangements D_HJ_H , une forme tronquée de la protéine μ (appelée $D\mu$, dépourvue de région variable V_H) est parfois produite dans le cadre de lecture RF2. Lorsque cette protéine $D\mu$ est formée, le développement B est bloqué (Gong et Nussenzweig, 1996) par un signal négatif transduit par l'hétérodimère $Ig-\alpha/Ig-\beta$ qui assure la transduction grâce à un motif ITAM (Immune receptor Tyrosine-based Activation Motif) dans le domaine cytoplasmique des protéines $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ (Meffre et al., 2000).

Dans les cellules pro-B, l'hétérodimère $Ig-\alpha/Ig-\beta$ peut être détecté à la surface en association avec la calnexine. Une signalisation peut-être induite par ce complexe permettant le recrutement de tyrosines kinases et il a été montré que dans des souris $RAG2^{-/-}$, cette signalisation permettait l'acquisition de certains marqueurs du stade pré-B (Nagata et al., 1997).

- **stade pré-B**

Un deuxième réarrangement sur un allèle entre un segment V_H et le segment D_HJ_H formera un segment $V_HD_HJ_H$ codant la partie V de la HC (pour revue : Jung et al., 2006). Ce réarrangement requiert une accessibilité induite par l'action de Pax5 et de l'IL7 en particulier des segments les plus proximaux (Nutt et al., 1997 ; Corcoran et al., 1998 ; Hesslein et al., 2003). Si ce réarrangement est productif, l'ARNm est fonctionnel (=dans la bonne phase de lecture) et la chaîne lourde μ est produite et sera alors transportée vers la membrane de la cellule sous forme de « pré-BCR » (pre-B cell receptor) (**Fig. 4**).

Le pré-BCR est composé de la HC μ en association avec deux « pseudo-chaînes légères », codées par les gènes $V_{pré-B}$ et $\lambda 5$, et l'hétérodimère $Ig-\alpha/Ig-\beta$ (Meffre et al., 2000). C'est au stade pré-B que s'effectue l'exclusion allélique, un processus important qui assure la monospécificité du BCR. C'est également à ce stade que les réarrangements entre les régions V et DJ ont lieu. Pour certaines cellules, les deux allèles de la chaîne lourde se présentent sous la forme réarrangée VDJ, alors que pour d'autres, un allèle se présente sous la forme VDJ, et l'autre sous la forme DJ. Dans les « cellules VDJ/DJ », l'allèle recombiné VDJ est fonctionnel et code pour la HC μ du pré-BCR. Le pré-BCR issu de cette association va inhiber le réarrangement entre V et DJ de l'autre allèle, c'est l'exclusion allélique. Pour les cellules « VDJ/VDJ », seul un des deux allèles est fonctionnel (**Fig. 5**).

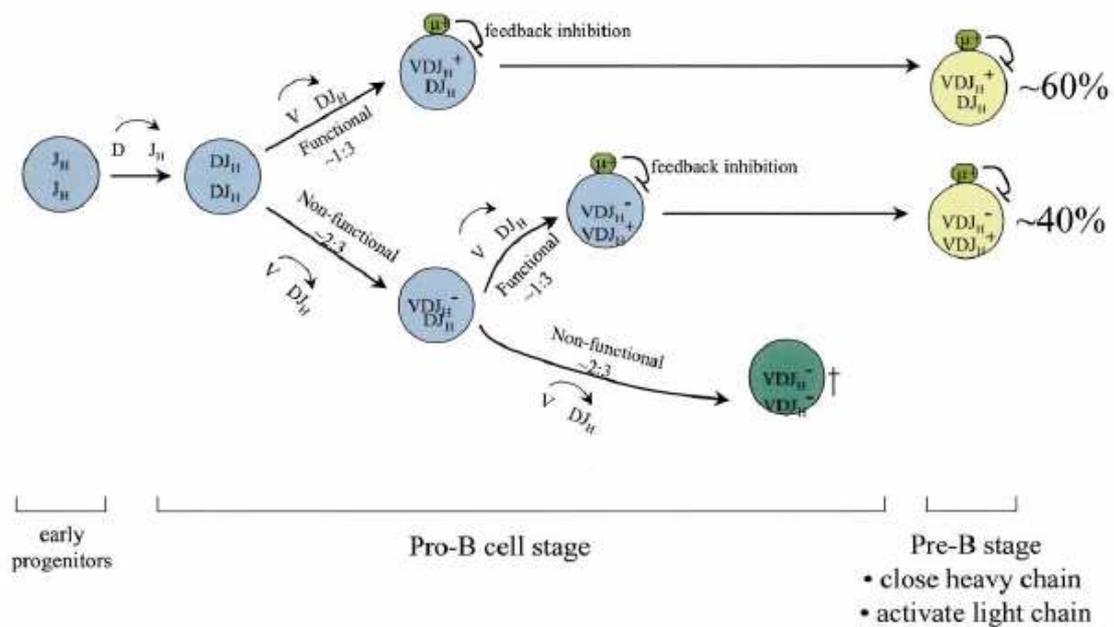


Figure 5 : Réarrangements des gènes de HC et exclusion allélique.

L'état des réarrangements des gènes variables est indiqué au sein des cellules (cercles) sur les 2 allèles, ainsi que leur caractère fonctionnel ou non et les évènements qui en découlent (D'après Mostoslavsky et al., 2004).

La délétion de la partie transmembranaire de μ cause non seulement une absence de signalisation nécessaire à la prolifération, mais également un défaut d'exclusion allélique (Kitamura et Rajewsky, 1992). De plus, la présence chez des souris du transgène μ membranaire (et non sécrété) induit l'exclusion allélique des gènes endogènes (Nussenzweig et al., 1987). Des inhibiteurs de la transcription, tels que l'hétérochromatine ou encore la présence du facteur transcriptionnel Ikaros, sont retrouvés sur l'allèle exclu de cellules B activées. Le second allèle se trouverait sous une forme transcriptionnellement silencieuse, en périphérie du noyau et ne pourrait pas subir de réarrangement (Skok et al., 2001).

“Le modèle régulé” permet d'expliquer mieux ce phénomène d'exclusion : le produit protéique d'un réarrangement productif V-DJ sur un allèle inhibe le réarrangement V-DJ sur l'autre allèle grâce à un signal transmis par $Ig\alpha$ et $Ig\beta$ du pré-BCR. D'autre part, le pré-BCR transduit un signal positif entraînant un réarrangement VJ sur le locus de LC κ . La cellule pré-B devient alors une cellule B immature qui remplace les pseudo-chaînes légères par des LC classiques, ce qui aboutit à l'expression d'une IgM de surface (Fig. 4, 5).

Il faut néanmoins signaler que si ce modèle régulé est le plus populaire, des travaux récents tendent à le remettre en cause (Liang et al., 2004 ; et pour une discussion des modèles régulé et stochastique, Mostoslavsky et al., 2004).

- **stade immature**

L'expression du pré-BCR permet à la cellule pré-B de passer au stade suivant où les réarrangements V_L - J_L se déclenchent d'abord dans le locus κ , puis λ si les réarrangements κ ne sont pas productifs, on parle d'exclusion isotypique. Dans les deux loci, le phénomène d'exclusion allélique bloque les réarrangements dès l'expression d'un allèle réarrangé fonctionnel (Fig. 6). Ce phénomène permet à la cellule B de n'exprimer à sa membrane qu'un seul type de BCR composé d'IgM (H_2 - L_2) associée à l'hétérodimère Ig- α /Ig- β , c'est le stade B immature.

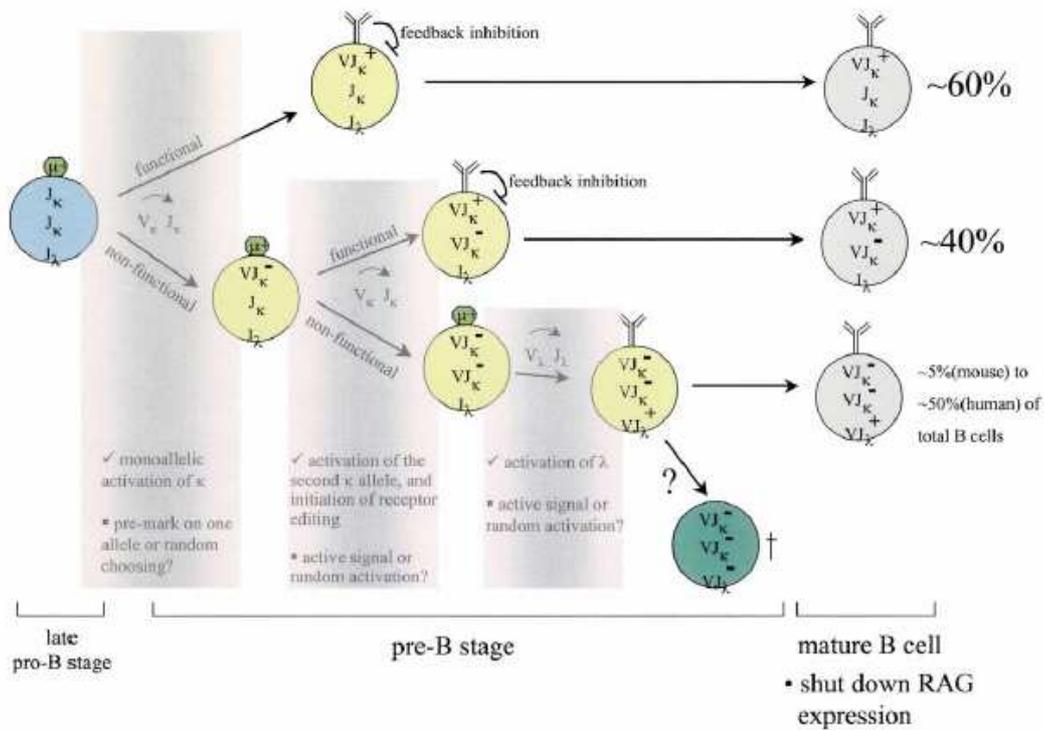


Figure 6 : Réarrangements, exclusion isotypique et exclusion allélique dans les loci des LC. Chronologie des différents réarrangements des gènes de chaînes légères au niveau des loci $Ig\kappa$ et $Ig\lambda$, caractère fonctionnel ou pas de ces réarrangements et événements qui en découlent (D'après Mostoslavsky et al., 2004).

Il est important de signaler deux caractéristiques des réarrangements géniques : 1) les réarrangements sont ordonnés. En général, ils se font selon la chronologie suivante : locus IgH » locus κ » locus λ . 2) ces réarrangements ont lieu avant que la cellule ait rencontré un Ag. Cette phase « indépendante de l'Ag » a lieu dans le foie fœtal et la moëlle osseuse de l'adulte (**Fig. 4**).

Les cellules B immatures quittent la moëlle osseuse vers les organes lymphoïdes périphériques (rate, ganglions...). L'expression à la surface de ces cellules d'une IgM spécifique leur permet de reconnaître un Ag. Les cellules ainsi activées se différencient en cellules B matures exprimant IgM et/ou IgD de même région V mais de régions C différentes. La co-expression d'IgM et IgD est régulée au niveau post-transcriptionnel grâce à un épissage alternatif et au mode de sélection du site de polyadénylation du long transcrit $\mu\delta$ (**Fig. 7**).

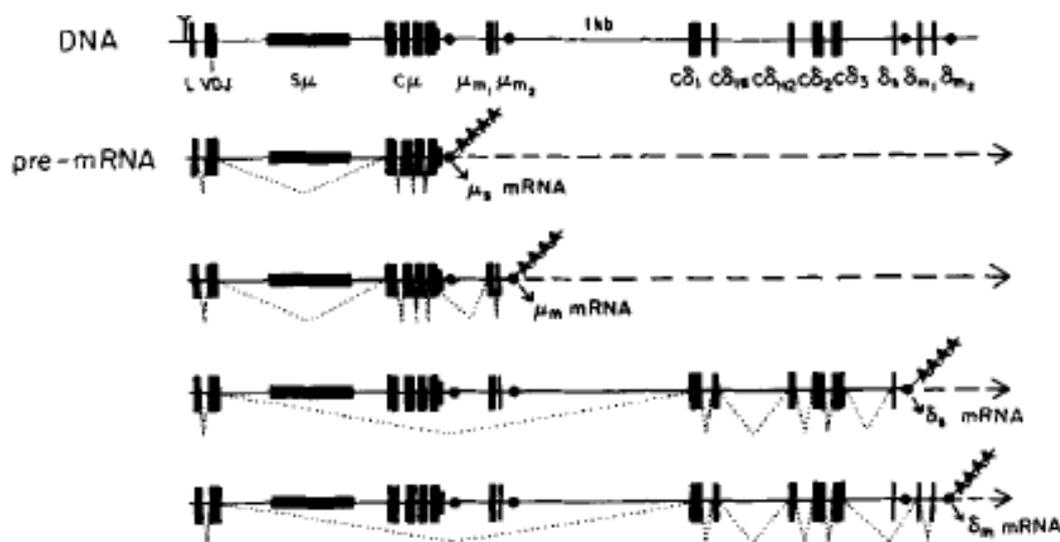


Figure 7 : Régulation de l'expression de IgM ou IgD.

La première ligne représente le locus IgH avec un réarrangement VDJ où les gènes Cμ et Cδ sont détaillés. Les exons et les introns sont représentés respectivement par des rectangles noirs et des lignes. Les cercles noirs représentent les différents sites de poly-adénylation (poly-A). Les 4 lignes inférieures schématisent l'ARN pré-messager $\mu\delta$ (ou long transcrit $\mu\delta$) qui donnera naissance aux différents ARN messagers (μ_s , μ_m , δ_s et δ_m) grâce à un épissage alternatif et selon le choix du site de polyadénylation. Le processus d'épissage est schématisé par des lignes en pointillés (D'après Kerr et al., 1991).

2. RECOMBINAISON V(D)J

Les recombinaisons entre les segments V, (D) et J nécessitent la présence de sites spécifiques nommés RSS (séquence signal de recombinaison) constitués de deux motifs consensus de sept (heptamère CACAGTG) et de neuf nucléotides (nonamère de séquence consensus ACAAAAACC), très conservés, espacés par des régions de 12 ou de 23 nucléotides aléatoires (pour revue : Tonegawa, 1983) (**Fig. 8**).

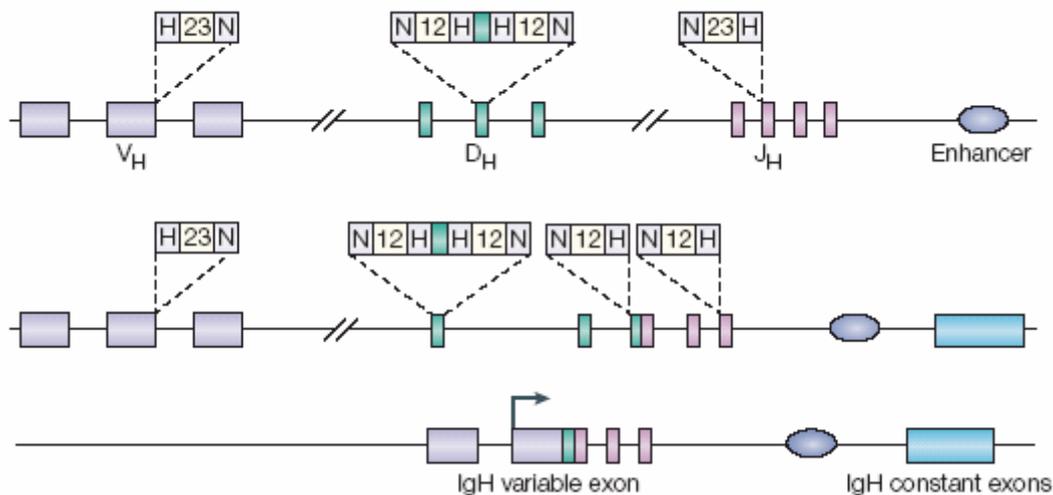


Figure 8 : Schéma du locus IgH murin montrant les positions des segments de gènes V_H , D_H et J_H et l'enhancer intronique E_{μ} .

En haut est représenté le locus sous sa configuration germinale, au milieu un allèle ayant partiellement réarrangé D à J et en bas, est représenté un réarrangement complet et fonctionnel V(D)J codant l'exon V de chaîne lourde (la flèche indique le promoteur V_H). Les positions des séquences signal de recombinaison (RSS) sont indiquées, ainsi que leur composition : les heptamères (H) immédiatement adjacents aux séquences codantes et les nonamères. La longueur des séparateurs (12 ou 23 nucléotides) est également indiquée (D'après Schlissel, 2003).

La recombinaison s'effectue entre un RSS comportant un séparateur de 12 nucléotides et un autre RSS contenant un séparateur de 23 nucléotides. La disposition des RSS adjacents aux segments est telle que les recombinaisons ne peuvent se faire qu'entre segments d'espaces différents (« règle 12/23 »). Cependant, il a été récemment rapporté que dans de rares cas, un réarrangement V_H - J_H pouvait se produire mais avec une efficacité moindre qu'un réarrangement classique V_H - $DHJH$ (Koralov et al., 2005).

Les produits des gènes RAG-1 et RAG-2 (gènes activant la recombinaison), exprimés dans les lymphocytes B et T (Schatz et al., 1989 ; Oettinger et al., 1990), forment la RAG recombinase qui introduit une coupure endonucléolytique précisément à l'extrémité de l'heptamère (**Fig. 9**). Les protéines HMG1 (High Mobility Group 1) activent cette réaction du moins *in vitro*. La coupure par la recombinase RAG génère quatre extrémités libres intermédiaires : deux extrémités « codantes » en épingle à cheveux et deux extrémités « signal » phosphorylées en 5' (**Fig. 10**). Le « processing » des extrémités fait appel à la voie NHEJ (Non homologous end joining) comportant plusieurs facteurs incluant Ku70/Ku80, DNA-PKcs, XRCC4, DNA ligase IV, Artemis et Cernunnos/XLF. Les deux extrémités « signal » sont liguées par la DNA ligase IV alors que les extrémités codantes sont d'abord reconnues par Ku70 qui interagit avec Ku80. Ku80 recrute la kinase DNA-PKcs qui va activer Artemis, ce dernier clive les épingles et processe les extrémités libres avant qu'elles soient liguées par la DNA ligase IV en complexe avec XRCC4 et peut-être avec Cernunnos/XLF, un nouveau facteur qui semble activer l'étape de ligation. La jonction codante est imprécise et peut comporter de courtes délétions, l'addition de duplications palindromiques (appelées éléments P), ou de courtes insertions de nucléotides appelés N ajoutés par la terminal désoxynucleotidyltransférase (TdT) avant la ligation des extrémités. Cette cascade de réactions aboutit à la juxtaposition des segments recombinants avec une importante flexibilité jonctionnelle (pour revue, Schlissel, 2003 ; Sekiguchi et Ferguson, 2006).

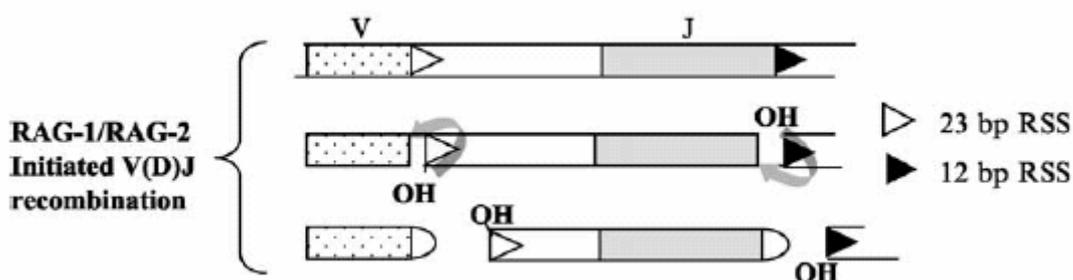


Figure 9 : Mécanisme biochimique de la RAG recombinase.

La RAG recombinase agit en introduisant des coupures endonucléotidique au niveau des RSS (D'après Dudley et al., 2005).

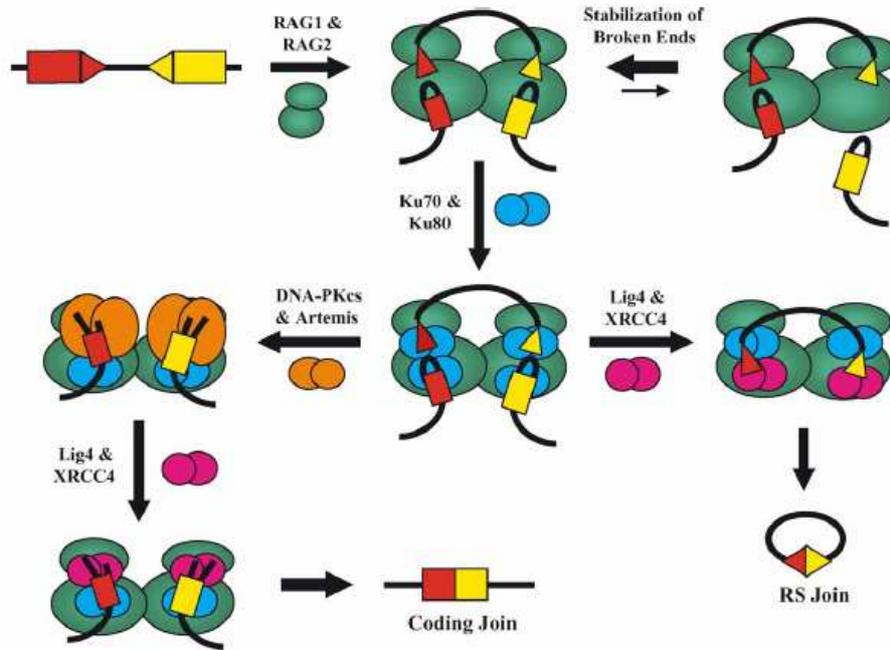


Figure 10 : Réaction de recombinaison V(D)J.

Les protéines RAG se fixent aux séquences RSS et introduisent des cassures double-brin entre les segments V, D ou J, ce qui génère des extrémités “codantes” en épingle à cheveux et des extrémités “signal”. Les protéines RAG maintiennent ainsi l’ensemble dans des complexes synaptiques stables et recrutent les facteurs de la voie NHEJ. La jonction des extrémités “codantes” et la jonction des extrémités “signal” nécessitent l’intervention de Ku70, Ku80 et XRCC4/Lig4 alors que la formation des jonctions codantes requiert en plus l’activité des DNA-PKcs et de Artemis (D’après Dudley et al., 2005).

3. MATURATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE

La maturation de la réponse immunitaire comporte deux volets essentiels : la maturation de l’affinité et la commutation isotypique. La maturation de l’affinité implique la sélection d’Ac de plus forte affinité pour l’Ag. La base de la maturation de l’affinité est un processus complexe appelé hypermutation somatique (SHM) qui opère dans les loci des Ig.

Le deuxième aspect de la maturation de la réponse immunitaire concerne l'existence de plusieurs classes de HC possédant des régions C et des fonctions effectrices différentes. La génération de cette diversité des régions constantes fait appel à un type particulier de recombinaison au sein du locus IgH appelé commutation de classe ou commutation isotypique (CSR). Celle-ci permet à une cellule B mature exprimant IgM et/ou IgD de commuter, dans certaines conditions, en une cellule exprimant IgA, IgE ou une des quatre sous-classes d'IgG.

3.1. Maturation de l'affinité – Hypermutation somatique

L'extrême souplesse dans les mécanismes de recombinaison V(D)J est une source primordiale de la grande diversité du répertoire B. La SHM permet d'amplifier cette diversité en augmentant la fréquence des mutations somatiques suite à une stimulation antigénique. Ce processus est essentiellement ciblé vers la région V des gènes d'Ig des cellules B activées. Les mutations introduites permettent éventuellement d'augmenter l'affinité de l'Ac pour l'Ag spécifique et la sélection des cellules B exprimant cet Ac (Neuberger et Milstein, 1995).

3.1.1. Sélection clonale

La rencontre avec un Ag étranger qui entraîne une réponse T-dépendante déclenche la formation de structures particulières appelées centres germinatifs (CG) où l'on détecte un pool oligoclonal de cellules B activées (pour revue : MacLennan, 1994) (**Fig. 11**).

Les CG apparaissent quelques jours après l'exposition à l'Ag et persistent pendant quelques jours à quelques semaines. Ils sont associés à l'expansion clonale des cellules B, à la SHM des gènes de la région V des gènes d'Ig, à la sélection des cellules B exprimant l'Ac de forte affinité, à la CSR et à l'induction de la différenciation en cellules B mémoires ou plasmatiques. Dans les CG, on distingue deux zones principales dites zone sombre et zone claire. Les centroblastes sont localisés dans la zone sombre, siège d'une prolifération massive, et sont la cible de la SHM alors que les centrocytes sont localisés dans la zone claire et sont la cible de la CSR (pour revue : Rajewsky, 1996).

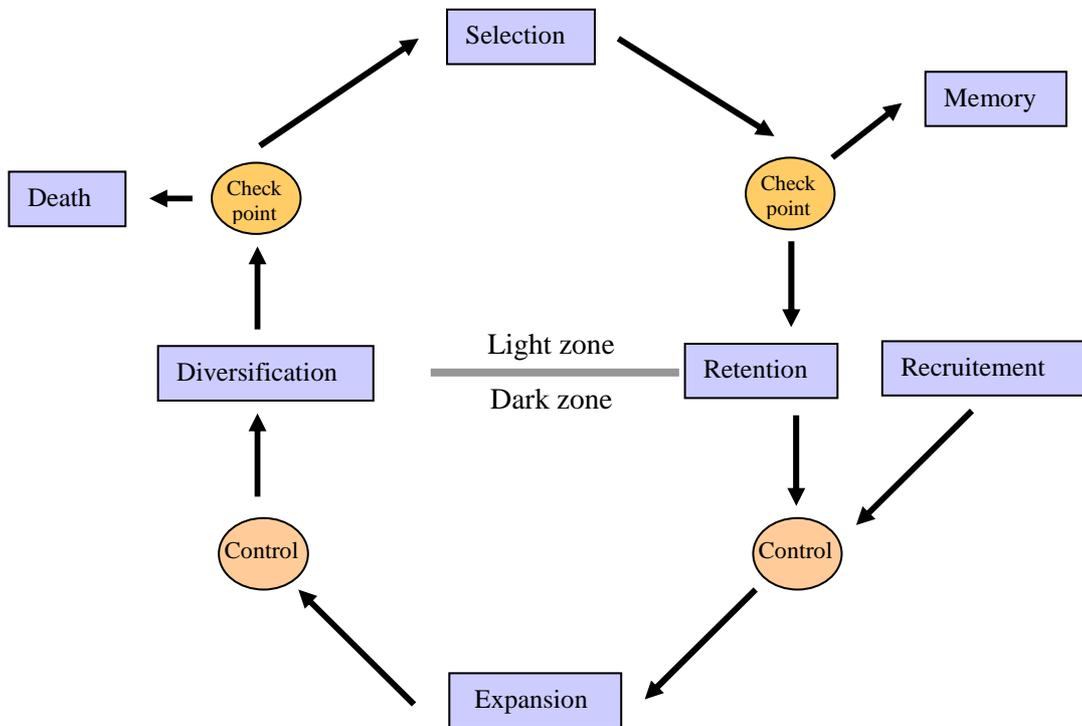
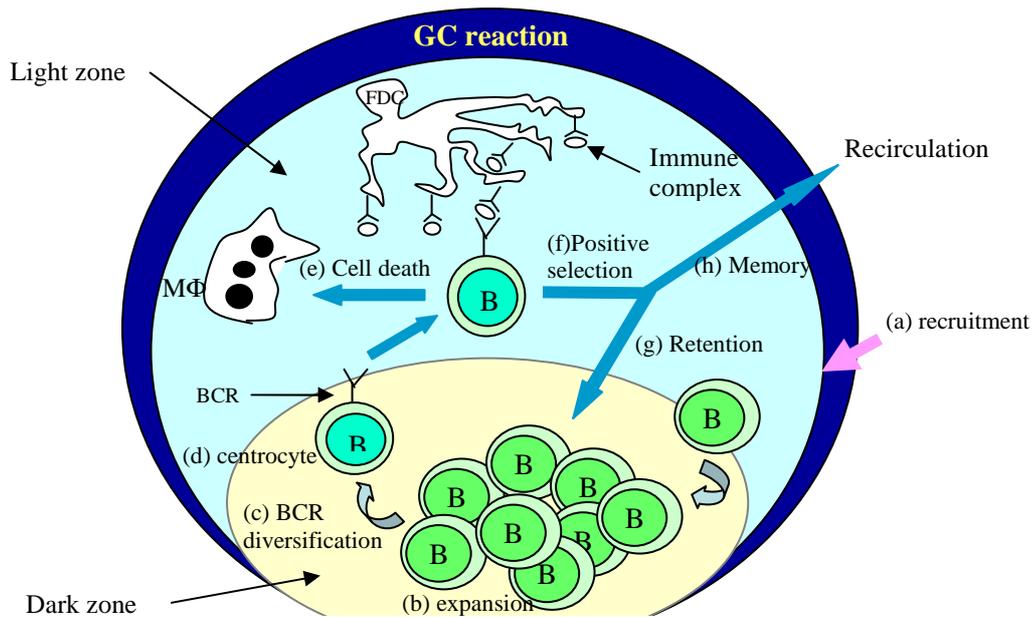


Figure 11 : Cheminement des cellules B dans le centre germinatif (D'après McHeyzer-Williams et Ahmed, 1999). Les différentes zones du centre germinatif sont indiquées sur le schéma du haut, le schéma du bas résume les étapes de multiplication et de sélection des cellules B. Les abréviations sont : B pour lymphocyte B, FDC pour cellules folliculaires dendritiques et MΦ pour macrophage.

Les mécanismes de sélection des cellules exprimant des Ac de haute affinité semblent particulièrement stringents et font intervenir des interactions spécifiques avec les cellules T reconnaissant le même Ag. Les cellules B en prolifération dans les CG semblent être destinées à mourir si elles n'interagissent pas avec d'autres types cellulaires en particulier les cellules T auxiliaires (Th) et les cellules dendritiques, qui leur délivrent des signaux de survie et de maturation par des récepteurs accessoires tels que CD40, BCMA, etc...(pour revue : MacLennan, 1994).

Après quelques semaines, le CG régresse et finit par disparaître, les cellules B sélectionnées expriment plus fortement le gène Bcl-2 dont le produit a des fonctions anti-apoptotiques, et deviennent des cellules B résiduelles (Pascual et al., 1994 ; Schitteck et Rajewsky, 1990), ces cellules expriment des Ig de haute affinité pour l'Ag et constituent le répertoire immunologique « mémoire ». Les cellules B mémoires constituent un groupe minoritaire de cellules à durée de vie très longue qui peut atteindre des mois à des années, ces cellules peuvent exprimer IgM ou d'autres classes d'anticorps. Elles sont préférentiellement localisées au niveau des muqueuses (Liu et al., 1995) où elles peuvent rapidement répondre à des pathogènes externes. Ces cellules peuvent présenter rapidement et efficacement l'Ag aux lymphocytes T. Ce processus peut avoir lieu en dehors d'un CG et ne donne pas lieu à d'autres hypermutations (Siekevitz et al., 1987 ; Liu et al, 1991). Cependant une cellule mémoire peut, en formant un nouveau CG, subir de nouveaux cycles de mutations et de sélections qui optimiseront la mémoire immunitaire de l'individu (Berek et Milstein, 1988).

Après la réponse immunitaire, certains plasmocytes se localisent au niveau de la zone marginale des manchons périartériolaires spléniques et au niveau de la moelle osseuse. Ils y exercent une fonction de sécrétion d'anticorps qui diffusent dans l'ensemble de l'organisme. La durée de vie des plasmocytes est controversée, les plasmocytes pourraient avoir une durée de vie longue (Slifka et al., 1998) ou ils seraient issus de la transformation rapide d'une cellule B mémoire (à longue durée de vie) suite à une stimulation antigénique (Ochsenbein et al., 2000).

3.1.2. Modèles *in vivo* pour l'étude de l'hypermutation somatique

Au cours de la SHM, des mutations ponctuelles, et parfois des insertions ou délétions, sont introduites dans la région V, le plus souvent dans les CDRs, régions hypervariables, et qui forment le site de fixation de l'Ag. En revanche, ces mutations sont sous-représentées dans les FRs qui constituent le « châssis » de cette région (Neuberger et Milstein, 1995). Alors que l'on pensait au départ que la SHM était restreinte aux gènes d'Ig, plusieurs cas de gènes subissant la SHM ont été décrits comme les gènes *mb1* chez la souris ou *Bcl6* chez l'homme, mais la fréquence des mutations est 10 à 100 fois moindre et le profil des mutations n'est pas toujours comparable à celui des gènes d'Ig (pour revue : Weill et al., 2002).

La démonstration qu'un transgène d'Ig peut être le substrat de la SHM (O'Brien et al., 1987) a permis de développer un système intéressant pour l'analyse de ce mécanisme, en particulier pour décrire le profil des mutations et pour identifier le rôle des éléments de contrôle transcriptionnel.

Des modèles transgéniques ont ainsi permis de localiser une concentration importante des mutations dans des « hot spots » se situant essentiellement au niveau des CDR, de motif RGYW (R = A ou G ; Y = C ou T ; W = A ou T) (Sharpe et al., 1991 ; Lozano et al., 1993 ; Betz et al., 1993 ; Betz et al., 1994). Pour l'implication des éléments *cis*-régulateurs, ceux du locus κ ont été les plus étudiés. Ces études ont abouti aux résultats suivants : **1**) l'enhancer intronique E_{κ} , la MAR flanquant E_{κ} et l'enhancer 3' κ sont requis pour une SHM optimale de la région V_{κ} (Betz et al., 1994 ; Goyenechea et al., 1997). Mais l'implication de l'enhancer 3' κ n'a pas été confirmée dans des souris dépourvues de cet enhancer (van der Stoep et al., 1998), **2**) la transcription en soi est nécessaire mais la nature du promoteur ou de la région V n'est pas importante (Betz et al., 1994 ; Yelamos et al., 1995 ; Fukita et al., 1998), **3**) il existe une corrélation entre le taux d'expression et le taux de mutation (Goyenechea et al., 1997 ; Fukita et al., 1998), **4**) le processus de SHM se limite aux ~2 kb en aval du promoteur (Manser et al., 1998).

Toujours dans le but d'identifier les régions régulatrices de la SHM, un intéressant modèle a été décrit par l'équipe de Storb : le promoteur normalement localisé en amont de la région V κ a été dupliqué en amont de la région C κ au sein d'un transgène. Non seulement les régions VJ étaient mutées, mais la région C κ l'était également, alors qu'elle est normalement épargnée. La fréquence de mutation était identique entre les deux régions. Ce résultat a amené à proposer un modèle de mutation associée à la transcription où le facteur mutateur serait associé à la machinerie transcriptionnelle et déposé sur l'ADN lors de pauses de l'ARN polymérase II pour y introduire des mutations (Peters et Storb, 1996).

Les transgènes λ ont été moins étudiés. Dans un modèle, le transgène λ était sous le contrôle de l'enhancer intronique E μ et d'un promoteur de HC. 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 V du transgène n'ont pu être observées (Hengstschläger, et al., 1994).

Dans d'autres systèmes étudiant le locus IgH, des mini-loci VDJ ont été la cible de mutations en l'absence d'enhancers en 3' du locus IgH (voir plus loin), mais le taux était réduit (Taylor et al., 1994 ; Wagner et al., 1994). Une autre étude a révélé un taux normal de SHM en l'absence des deux enhancers hs3b et hs4 (voir plus loin) (Morvan et al., 2003).

Il n'est pas clair si les mutations dépendantes des enhancers sont position-dépendantes (Bachl et al., 1998 ; Winter et al., 1998) ou indépendantes (Klix et al., 1998 ; Papavasiliou et Schatz, 2000). Il est possible qu'une distance optimale soit nécessaire pour obtenir une communication efficace entre promoteurs et enhancers. Il se pourrait aussi que la combinaison enhancer-promoteur soit plus critique que pour la transcription. 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).

En conclusion, même si la transcription joue un rôle-clé dans la SHM, la nature des séquences responsables du ciblage des mutations est toujours incertaine.

3.1.3. Le rôle de AID

Une avancée majeure dans l'étude de la SHM et de la CSR a été l'identification de la protéine AID (Activation-Induced cytidine Deaminase), exprimée par les cellules B du CG (Muramatsu et al., 1999), et la démonstration qu'elle était absolument requise pour la SHM et la CSR (Muramatsu et al., 2000 ; Revy et al., 2000). Chez les souris AID^{-/-}, le développement des cellules B est normal et IgM et IgD sont normalement exprimés. Par contre, les souris sont déficientes dans les autres isotypes malgré une transcription germinale (voir plus loin) (Muramatsu et al., 2000). Chez des patients atteints du syndrome d'hyper IgM de type II, qui se manifeste par un défaut de CSR et la présence de CG géants, des corrélations de marqueurs génétiques (microsatellites) chez 12 familles a permis de localiser le gène AID sur le chromosome 12. Chez 18 patients, 10 mutations différentes (apparition de codons stop ou faux sens) dans le gène AID ont été décrites (Revy et al., 2000).

AID est un membre de la famille APOBEC 1, une famille de désaminases éditrices d'ARN (pour revue : Honjo et al., 2005). AID est essentiellement localisée dans le cytoplasme des cellules B probablement pour limiter son effet mutagène. Après activation des cellules B, elle est transloquée dans le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire dans sa partie N-terminale et est exportée du noyau grâce à un signal d'export dans sa partie C-terminale (Ito et al., 2004 ; McBride et al., 2004) (**Fig. 12**). Il est à noter que le taux d'AID augmente à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme après activation de la cellule pour la CSR (Shinkura et al., 2004). Le mécanisme qui régule le ratio nucléaire/cytoplasmique est inconnu, mais certaines données suggèrent une corrélation avec la phosphorylation de AID par la protéine kinase A dépendante de l'AMP-c (Basu et al., 2005).

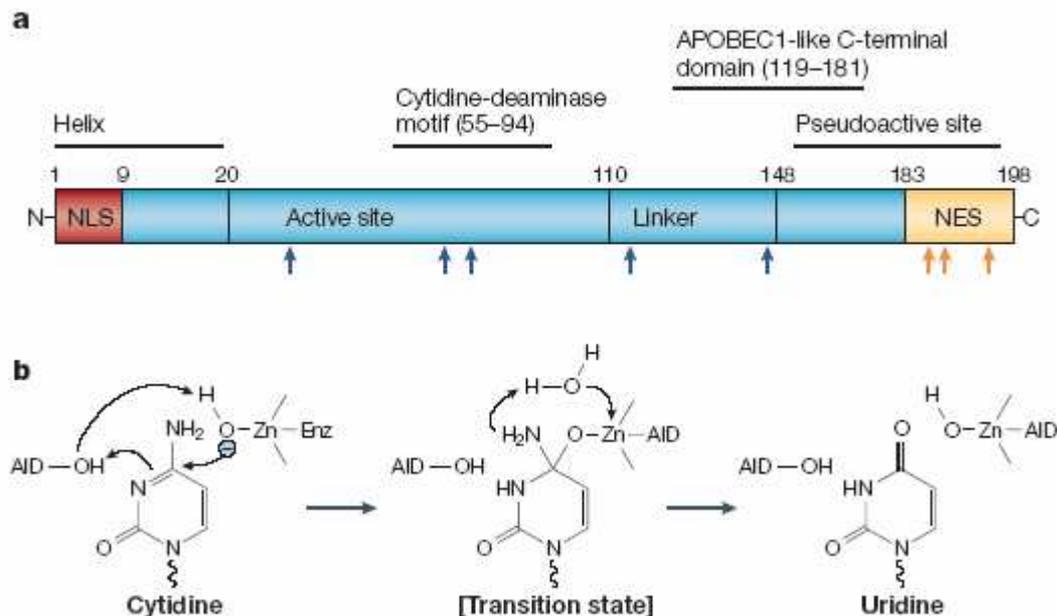


Figure 12 : AID et la désamination.

a) La structure primaire de AID montrant le signal de localisation nucléaire (NLS), le signal d'export (NES) et d'autres domaines de la protéine. Certaines mutations affectant la fonction de AID sont représentées : les mutations dans le site actif et la région linker (flèches bleues) diminuent à la fois la CSR et la SHM alors que les mutations à l'extrémité C-terminale (flèches oranges) ou la délétion de 10 acides aminés C-terminaux (non indiquée) diminuent la CSR sans affecter la SHM.

b) Mécanisme réactionnel de la cytosine-désamination (D'après Chaudhuri et Alt, 2004).

L'analyse mutationnelle de AID a révélé que la protéine avait une structure bipartite au regard de son activité mutagénique. Les mutations affectant sa partie N-terminale bloquent la SHM mais pas la CSR. Inversement, les mutations affectant sa partie C-terminale bloquent la CSR mais pas la SHM suggérant fortement l'existence de co-facteurs distincts pour la SHM et la CSR. Mais l'identité de ces co-facteurs est encore inconnue (Shinkura et al., 2004).

Dans des cellules B activées, l'expression du gène de AID est régulée par différents signaux. Par exemple, l'activation *via* CD40 va déclencher la voie TRAF et permettre la translocation de NF- κ B au noyau. De manière synergique, l'IL4 *via* son récepteur va déclencher la voie JAK/STAT et permettre la phosphorylation du facteur STAT6. Les facteurs NF- κ B et STAT6 phosphorylé vont se lier à leurs sites spécifiques en amont du promoteur du gène AID et activer sa transcription (Dedeoglu et al., 2004) (voir aussi **Fig. 20**). L'expression

du gène peut aussi être régulée négativement par Id3 (de la famille helix loop helix) qui se lie à son site dans un élément de régulation transcriptionnel conservé dans le premier intron, et bloque la transcription *in vivo* et *in vitro* (Sayegh et al., 2003). Deux autres sites dans cet élément de régulation intronique sont liés par Id2 et Pax5 dont les effets sont antagonistes. Id2 inhibe l'expression du gène AID, mais son effet peut être supprimé par Pax5 (Gonda et al., 2003) (sur les différents facteurs, voir plus loin).

Aux mécanismes de régulation transcriptionnelle et de localisation intracellulaire, s'ajoutent probablement d'autres niveaux de régulation de l'expression de AID pour limiter ou supprimer ses effets mutagéniques. En effet, il a été montré dans un système transgénique que la surexpression ubiquitaire de AID provoquait des lymphomes T (Okazaki et al., 2003). Curieusement, le compartiment B n'était pas touché. La surexpression B-spécifique d'un transgène de AID dans un fonds sauvage ou AID^{-/-} n'a pas révélé d'anomalie dans le développement B, ni d'effet activateur sur la SHM ou la CSR malgré l'abondance de la protéine AID suggérant fortement que l'accès de AID vers ses cibles est étroitement contrôlé dans les cellules B (Muto et al., 2006).

AID est clairement associée aux clivages d'ADN dans la SHM et la CSR. Mais le mécanisme en jeu a été l'objet d'un débat vif entre deux écoles : 1) le modèle d'édition, défendu par Honjo stipule que AID désamine une cytosine en uracile dans un (ou plus) ARNm (non encore identifié(s)), l'ARNm ainsi édité coderait une endonucléase qui cliverait l'ADN. 2) le modèle de désamination de l'ADN, proposé initialement par Neuberger, stipule que AID désaminerait la cytosine en uracile directement sur l'ADN (pour revue : Neuberger et al., 2003 ; Honjo et al., 2005).

Dans la mesure où AID est impliquée dans la SHM et la CSR, les données résumées ci-dessous s'appliquent *grosso modo* aux deux processus et le rôle de AID dans la CSR ne sera repris que brièvement dans la section sur la CSR présentée plus loin.

Les principaux arguments du modèle d'édition reposent sur l'appartenance de AID à la famille très conservée APOBEC 1 éditrice d'ARN et sur la nécessité d'une synthèse protéique pour le déclenchement de la SHM et la CSR (Muramatsu et al., 2000; Doi et al., 2003; Begum et al., 2004; Nagaoka et al., 2005). Les arguments du modèle de désamination de l'ADN reposent sur de nombreuses données biochimiques et génétiques (Petersen-Mahrt et al., 2002 ;

Rada et al., 2002 ; Bransteitter et al., 2003 ; Chaudhuri et al., 2003 ; Dickerson et al., 2003 ; Pham et al., 2003 ; Ramiro et al., 2003). Il est généralement admis que le modèle de désamination rend mieux compte des événements qui déclenchent la SHM et la CSR, en particulier le ciblage de l'ADN simple-brin. Il faut cependant souligner que plusieurs résultats de ce modèle ont été contestés (pour revue : Honjo et al., 2005).

Dans le modèle de désamination, AID initie la SHM et la CSR en reconnaissant et en modifiant la cytosine du « hot spot » en uracile dans l'ADN. Mais, l'uracile n'est pas un composant naturel de l'ADN et doit donc être réparé. Le modèle propose que cette réparation peut être mutagénique, tout dépendra de la manière dont l'uracile sera « traitée » (**Fig. 13**) :

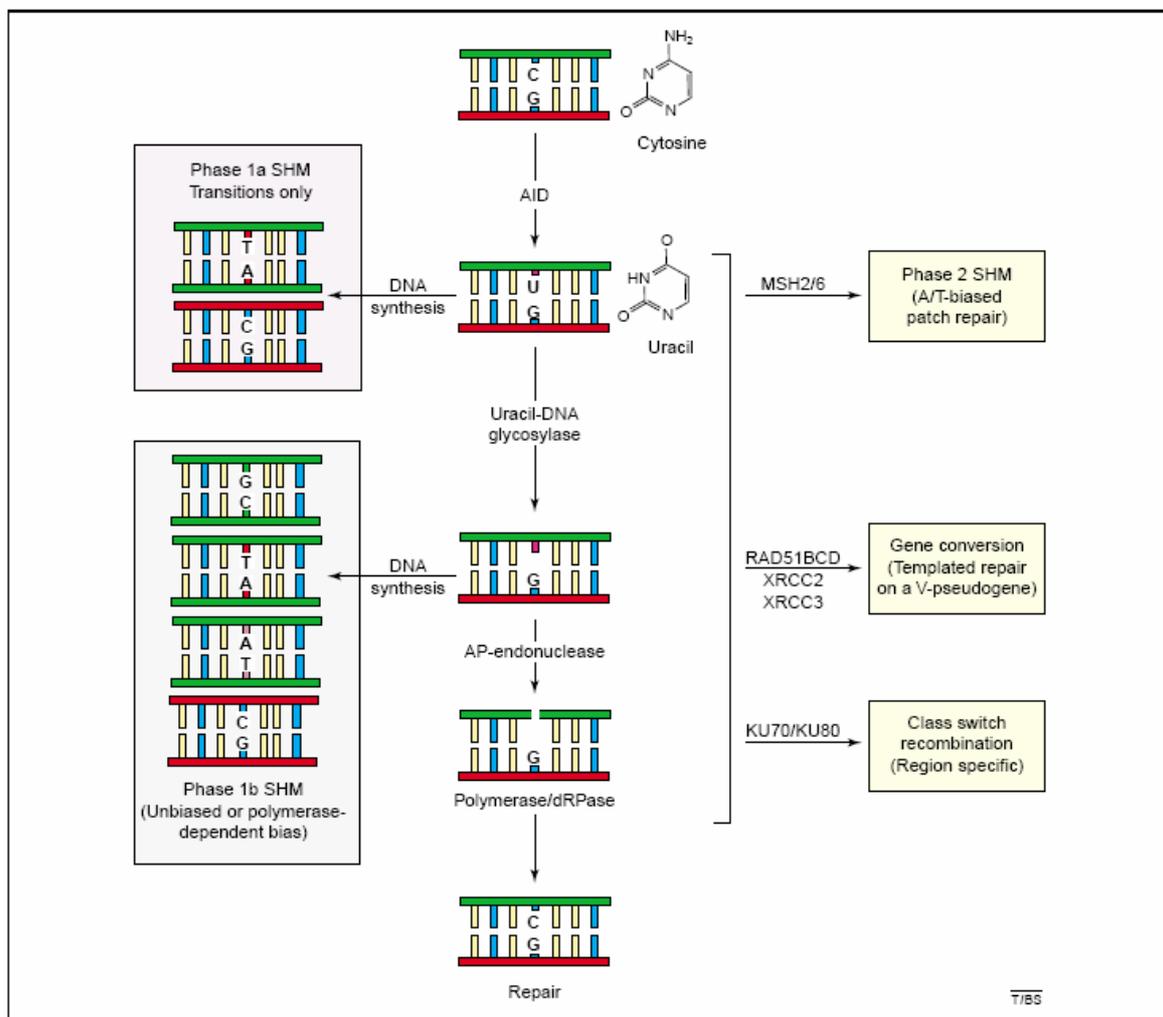


Figure 13 : Modèle de désamination et diversification des Ac (D'après Neuberger et al., 2003).

1) elle peut être « ignorée » et considérée comme une thymine par les ADN polymérase répliquatives aboutissant à une transition C>T après réplication (phase 1a),

2) elle peut être éliminée par l'uracile glycosylase UNG créant ainsi un site abasique qui peut alors générer une transition ou une transversion,

3) le site abasique peut être la cible d'une endonucléase APE1, l'endonucléase majeure de la voie BER (Base Excision Repair), qui clive l'ADN, les ADN polymérase translésionnelles pourraient alors insérer un des quatre nucléotides en fonction de leur spécificité, aboutissant à une transition, une transversion ou à la reconstitution de la cytosine initiale (phase 1b).

4) la phase 2 rend compte de la survenue de mutations dans les positions adjacentes à la cytosine du « hot spot » et essentiellement au niveau de la paire dA/dT. Elle fait intervenir le système MMR (Mismatch repair) et des ADN polymérase translésionnelles qui agiraient de concert pour une resynthèse mutagénique sur une étendue d'ADN plus ou moins longue (pour revue : Neuberger et al., 2003).

Récemment, il a été montré que le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) intervenait après la cascade AID/UNG pour cliver l'ADN simple brin des régions V au cours de la SHM. Le complexe MRN joue un rôle essentiel dans la réparation de l'ADN. La liaison du complexe à l'ADN est assurée par Rad50, alors que Mre11 confère les activités exo- et endonucléotidiques au complexe. La sous-unité Nbs1 joue un rôle régulateur de la localisation nucléaire du complexe et de sa réponse aux signaux de détection des lésions d'ADN (Larson et al., 2005).

Une lésion d'ADN (par exemple un site abasique) provoque l'arrêt de la réplication par les polymérase répliquatives. Cet arrêt peut mener à la mort cellulaire si la réplication n'est pas relancée. Certains membres de la famille des polymérase connues sous le nom de polymérase translésionnelles (ou mutagéniques ou adaptatives) peuvent intervenir pour insérer de façon potentiellement mutagénique (ne respectant pas forcément la complémentarité C::G et A::T) un nucléotide face au site abasique en fonction de leur spécificité (par exemple Rev1 insère préférentiellement une cytidine) (**Fig. 14**). D'autres membres de la même famille peuvent étendre la polymérisation sur quelques nucléotides en aval du nucléotide inséré (Pol théta et Pol zéta), et là aussi de manière peu fidèle et potentiellement mutagénique, permettant finalement aux polymérase répliquatives de

continuer la synthèse du brin d'ADN. Ces polymérases translésionnelles agissent souvent en concert : une assurant l'insertion et une autre l'extension (**Fig. 15**). A ce jour, seule Pol théta a été décrite comme pourvue des deux activités : insertion et extension. Plusieurs modèles KO ou transgéniques de ces polymérases translésionnelles ont été générés et ont confirmé l'implication de plusieurs membres de cette famille dans la SHM et la CSR (pour revue : Seki et al., 2005).

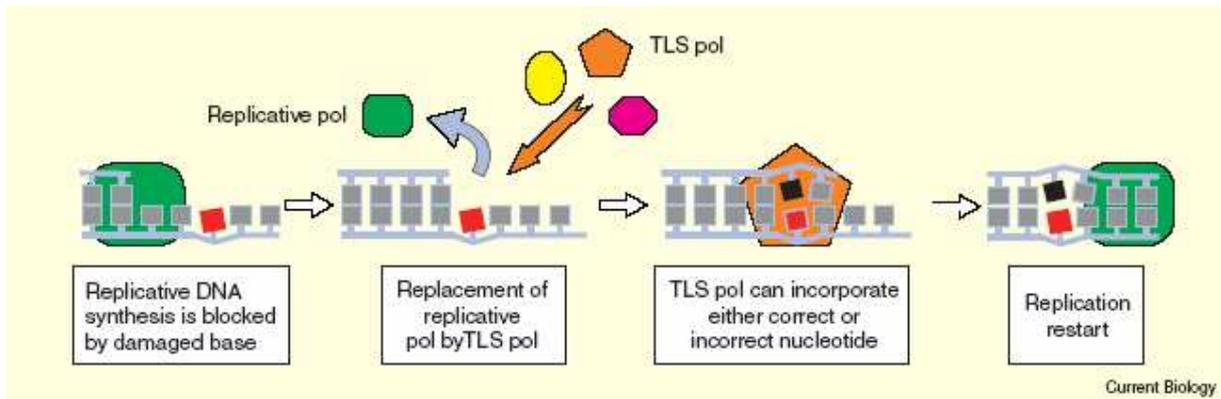
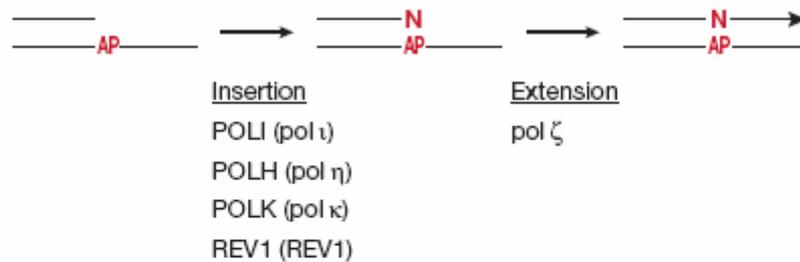


Figure 14 : Mécanisme des polymérases translésionnelles.

Lorsque la réplication est bloquée par une lésion d'ADN, la polymérase répliquative est remplacée par une polymérase translésionnelle (TLS pol) qui va introduire un nucléotide correcte ou incorrecte, et la réplication pourra alors reprendre normalement (D'après Lehmann, 2003).

A Two-polymerase model for insertion and extension at an AP site



B POLQ insertion and extension at an AP site

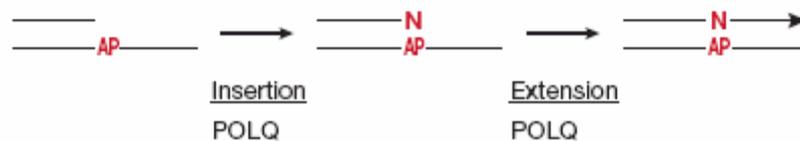


Figure 15 : Modèles d'insertion et d'extension par les polymérase translésionnelles.

A) Plusieurs familles de polymérase sont capables d'insérer un nucléotide au niveau du site abasique (AP) : POLI, POLH, POLK, REV1 ; cependant ces polymérase sont incapables d'assurer l'extension au-delà du site AP et c'est une autre polymérase, telle que pol ζ, qui permet l'extension après insertion.

B) POLQ est capable d'assurer à la fois l'insertion puis l'extension.
(D'après Seki et al., 2005).

Dans le cadre du modèle de désamination, AID initierait la cascade des réactions aboutissant au clivage d'ADN essentiellement sur un seul brin au cours de la SHM. Dans le cas de la CSR, AID désaminerait des cytosines adjacentes sur les deux brins, les sites abasiques pourraient donc être générés par UNG, et seraient clivés par une endonucléase APE1 aboutissant ainsi à des cassures double-brins (pour revue : Neuberger et al., 2003 ; Chaudhuri et al., 2004).

Des résultats obtenus avec des souris déficientes en UNG et/ou MSH2 (Rada et al., 2002 ; Rada et al., 2004) valident ce modèle, du moins en partie (pour revue : Honjo et al., 2005).

De nombreuses questions restent cependant en suspens : 1) le rôle précis des ADN polymérases translésionnelles, 2) la relation avec la réplication et le cycle cellulaire, 3) le rôle précis des différentes voies de réparation de l'ADN, 4) la nature précise et l'étendue du « patch repair » (phase 2)...etc.

Une autre question cruciale reste pour le moment sans réponse : c'est le ciblage spécifique de AID vers les régions V et les séquences S (pour switch)(voir plus loin). Dans la mesure où l'ARNm intermédiaire et les cofacteurs potentiels n'ont pas encore été identifiés, il est difficile d'évaluer le modèle d'édition. Les données biochimiques montrent que AID en association avec la protéine RPA (qui se lie à l'ADN simple-brin) reconnaît le motif RGWY des simples brins *in vitro* suggérant que RPA pourrait être le facteur qui cible AID vers ce motif. Cette interaction pourrait être régulée par la phosphorylation B-spécifique de AID (Chaudhuri et al., 2004 ; Basu et al., 2005). Cependant, le motif RGWY est retrouvé dans tout le génome de la cellule B, comment expliquer alors la spécificité du ciblage vers les régions V et S ?

Rappelons que les modèles transgéniques concordent tous sur l'importance de la transcription, il se pourrait donc que des éléments de contrôle transcriptionnels soient impliqués dans le ciblage de AID, mais aucune démonstration n'a à ce jour été faite. Une étude récente suggère que le facteur de transcription E2A qui lie le motif CAGGTG, présent dans les enhancers Ig, pourrait être le facteur recherché (Michael et al., 2003). Mais là aussi, ce motif est fréquemment retrouvé dans le génome (en moyenne tous les 4 kb) y compris dans des régions codantes qui ne sont pas la cible de la SHM.

La focalisation préférentielle des mutations sur les « hot spots » des CDR de la région V pose aussi le problème de savoir pourquoi d'un côté les promoteurs des gènes d'Ig ou les séquences juste en leur aval (~100 nucléotides), et de l'autre côté les séquences distales de ~1,5 à 2 kb, ne sont pas la cible de mutations. L'analyse d'un gène λ endogène et d'un transgène κ dans un fonds sauvage ou UNG^{-/-} a montré l'absence de transitions de C et G (signature de AID en l'absence de UNG) dans les deux fonds génétiques suggérant que AID (et non des événements postérieurs à son intervention) n'a pas accès aux séquences épargnées (Longerich et al., 2005). Mais le mécanisme reste inconnu.

L'analyse de la chromatine des gènes d'Ig n'a pas révélé de corrélation entre la SHM et l'acétylation des histones dans tous les loci. L'analyse des gènes $Ig\lambda$ et IgH de cellules B des CG a montré une distribution normale des mutations dans les régions VH et $V\lambda$ et pas dans les régions C. L'acétylation des histones H3 et H4 et la méthylation de H3 (H3K4) étaient plus prononcées dans VH que dans $C\mu$. Par contre, aucune différence n'a pu être observée entre $V\lambda$ et $C\lambda$. De plus, ces profils d'acétylation et de méthylation étaient similaires entre cellules B naïves et cellules B activées des CG. Par contre, une corrélation existe entre l'activation des cellules B et la phosphorylation de la sérine 14 de l'histone H2B ($H2B^{ser14P}$). Cette modification est absente chez des souris AID^{-/-} suggérant que la modification $H2B^{ser14P}$ est consécutive à l'action de AID (Odegard et al., 2005).

3.2. Commutation de classe

Les réponses Ac à une stimulation antigénique sont pour la plupart dépendantes de la présence des cellules auxiliaires Th. La coopération entre les cellules B et les cellules Th est nécessaire à la réponse B, on parle d'Ag « T-dépendants » (TD) et de réponse immune TD. La majorité des CSR vers les classes IgG, IgA et IgE sont TD. Les interactions entre ces cellules font intervenir, en plus des contacts inter-cellulaires, de nombreuses cytokines synthétisées par les Th et d'autres types cellulaires, qui orientent la CSR vers tel ou tel isotype. Chez la souris, des combinaisons Anti-CD40+IL4 ou LPS+IL4 sont souvent utilisées pour mimer la CSR dans une réponse TD *in vitro*. Cependant, certains Ag ou mitogènes (le plus souvent multivalents) peuvent induire la CSR d'une cellule B sans l'aide de cellules Th, il s'agit alors d'Ag T-indépendants (TI). Les Ag TI induisent la CSR préférentiellement vers l'isotype IgG3 et peuvent être mimés *in vitro* en activant les splénocytes murins par du LPS (pour revue : Stavnezer, 2000).

3.2.1. Les différents isotypes

Au cours de la CSR, c'est le même gène réarrangé VDJ qui sera éventuellement exprimé par la nouvelle classe d'Ig. La seule chose qui soit modifiée, hormis la SHM de sa région V, est la région C de la HC, et par conséquent ses fonctions effectrices.

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.

L'IgG est l'isotype prédominant dans le sang et la lymphe. Les différentes sous-classes d'IgG ont des fonctions différentes dues à leurs capacités variables 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 l'inactivation du gène, se traduit par une altération de la réponse TI (Shapiro et al., 1998).

IgG2a est dominant dans les réponses anti-virales. 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 TD, 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 la phagocytose efficacement.

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. 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 ou encore la production de cytokines, sont normaux (Harriman et al., 1999).

IgE est impliquée dans la défense parasitaire, mais peut également médier les réactions d'hypersensibilité. Les mastocytes et basophiles expriment des récepteurs de 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 al., 1994).

3.2.2. Rôle des cytokines et de CD40

Différents modèles d'étude ont clairement mis en évidence le rôle majeur des cytokines dans le contrôle de la production des différents isotypes (pour revue : Coffman et al., 1993).

L'IL-4 fut la première cytokine décrite comme régulant l'expression de différents isotypes d'Ig. Elle induit la production d'IgG1 et IgE et semble inhiber celle d'IgG3 et IgG2b (Bergstedt-Lindqvist et al., 1984 ; Layton et al., 1984 ; Coffman et Carty, 1986). Chez les souris où le gène de l'IL4 a été inactivé, IgE est totalement absente, même après infection par des helminthes. Il n'en est pas de même pour IgG1 dont la quantité produite est fortement mais incomplètement inhibée dans un contexte TD indiquant l'existence d'autres signaux capables d'activer la CSR vers IgG1 (Kuhn et al., 1991). L'hypothèse que la CSR vers IgE passe tout d'abord par un stade IgG1 a été avancée par plusieurs équipes, l'analyse des clones sécréteurs d'IgE (provenant de souris infectées par des helminthes) montre que ceux-ci sont issus de clones IgG1 (Yoshida et al., 1990). D'autres expériences de mise en culture de splénocytes exprimant IgG1 et IgE montrent que ces derniers se différencient en plasmocytes sécréteurs d'IgE (Snapper et al., 1988 ; Mandler et al., 1993). Ces résultats suggèrent que dans certains cas, les événements de CSR induits par l'IL4 peuvent être séquentiels. Cependant des souris où la région I γ 1 a été délétée (Jung et al., 1993) (et qui sont donc bloquées dans la CSR vers IgG1, voir plus loin) sont tout à fait capables de synthétiser des IgE après infection par des parasites remettant en cause la généralité de la CSR séquentielle.

L'IL-4 et l'IFN- γ sont des antagonistes (Coffman et Carty, 1986). L'addition d'IFN- γ réduit la CSR vers IgG1 et IgE dans les cellules B de souris stimulées par le LPS et l'IL-4 (Berton et al., 1989). L'addition d'IFN- γ à des cellules activées par le LPS induit la commutation vers IgG2a (Collins et al., 1993). De plus, l'IFN- γ inhibe les sécrétions d'IgG3 dans des cellules B stimulées par le LPS (Coffman et al., 1986). Chez des souris déficientes pour le récepteur de l'IFN- γ , on remarque une réduction des réponses Ac spécifiques IgG2a et IgG3 contre le virus de la vaccine (Huang et al., 1993).

Le TGF- β (Transforming growth factor- β) favorise la CSR vers IgA, surtout quand il agit en synergie avec IL2 et IL5 (Coffman et al., 1989). Un isoforme, le TGF- β 1 est également impliqué dans la CSR vers IgG2b (McIntyre et al., 1993). 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. En présence d'Ac anti-D couplés à du dextran, l'IL5 et l'IFN- γ stimulent la CSR vers IgG3 alors que l'IFN- γ la réprime (Snapper et al., 1992).

L'IL-10 est capable d'augmenter la commutation de classe vers IgG3 des cellules B stimulées par le LPS (Shparago et al., 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 .

In vivo, il est clair que le jeu de toutes les cytokines est rendu plus complexe par l'association de leurs effets directs et indirects, notamment par le rétro-contrôle des cytokines de type 1 (IL2, IFN γ ...), par les cytokines de type 2 (IL4, IL10, IL13...) et inversement.

En plus des cytokines, les signaux issus des contacts entre cellules T et B sont impliqués dans la CSR. L'élément le plus important dans ces contacts est CD40-L (ligand de CD40) exprimé sur les cellules T activées (pour revue Banchereau et al., 1994). L'implication de cette voie d'activation dans la CSR est confirmée par l'existence de déficits immunitaires rares, liés à l'absence de la molécule CD40-L, avec hyperproduction d'IgM chez l'homme (HIGM1) et un déficit de tous les autres isotypes, les individus atteints ne forment pas de CG et n'ont pas de cellules B mémoires (Allen et al., 1993 ; Aruffo et al., 1993 ; DiSanto et al., 1993 ; Fuleihan et al., 1993 ; Korthauer et al., 1993). Un déficit similaire est observé chez les souris déficientes pour CD40 ou CD40-L (Castigli et al., 1994 ; Kawabe et al., 1994 ; Renshaw et al., 1994, Xu et al., 1994). Chez ces souris on peut cependant remarquer une réponse Ac normale aux antigènes TI, avec production normale d'Ig spécifiques IgG1, IgG2b, IgG3 et IgA. Le sérum des souris CD40-L^{-/-} âgées de trois mois contient des quantités normales d'IgM, réduites d'un facteur 2 à 3 pour IgG2b et IgG3, d'un facteur 10 à 100 pour IgG1 et IgA et aucune trace d'IgE (Xu et al., 1994), ce qui laisse supposer que la CSR vers cet isotype est totalement dépendante de la voie d'activation CD40. Ces résultats montrent la

nécessité du signal CD40 pour la CSR induite par la coopération T/B. La molécule CD40-L soluble induit en synergie avec l'IL-4 la prolifération des cellules B et la CSR vers IgG1 et IgE (pour revue : Stavnezer, 2000).

Cette activation *via* la voie CD40 peut être inhibée spécifiquement, en absence d'Ag, par l'interaction de la molécule CD30 (exprimée par le lymphocyte B activé) avec son ligand CD30-L (exprimé par le lymphocyte T activé) ; en outre, l'activation de la CSR par des cytokines est indépendante de la voie d'inactivation CD30 (Cerrutti et al., 1998).

4. MECANISMES DE LA COMMUTATION DE CLASSE

La CSR met en jeu un type particulier de recombinaison sur le locus IgH. Elle est médiée par des séquences particulières, dites régions switch (ou S) composées de motifs répétés riches en G/C. Elles sont situées en amont de toutes les régions C fonctionnelles à l'exception de C δ (par exemple S μ , S α ...) (**Fig. 16**).

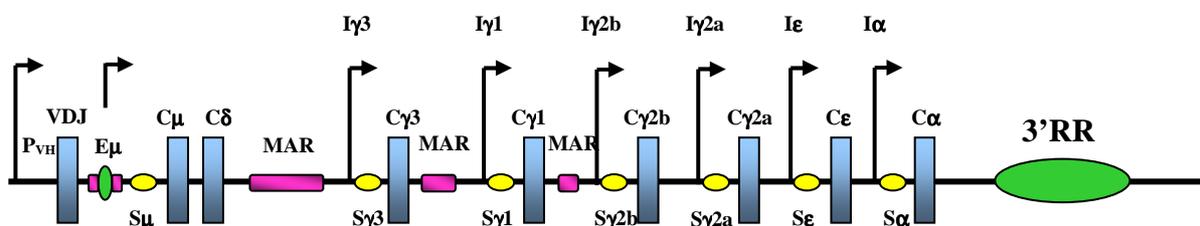


Figure 16 : Structure d'un gène μ réarrangé dans le locus IgH murin.

Les gènes constants sont représentés par des rectangles bleus, les activateurs par des ellipses vertes, les ellipses jaunes représentent les séquences de commutation S, les rectangles violets les régions d'ancrage à la matrice (MAR) et les promoteurs germinaux sont signalés par les flèches cassées (adapté d'après Khamlichi et al., 2000).

Contrairement aux recombinaisons V(D)J, les recombinaisons de CSR ne s'effectuent pas en un site précis de la région S recombinante (Dunnick et al., 1993). La taille des régions S varie de 1kb (S ϵ) à 10 kb (S γ 1). Il existe une corrélation entre la taille de la séquence S et l'efficacité de recombinaison (Zarrin et al., 2005). S μ a plus d'homologie avec S ϵ et S α qu'avec S γ . Plus on s'éloigne de C μ et plus la divergence de séquence entre la région

S μ et les régions S γ est prononcée. On trouve 70% d'identité entre les régions S γ , ces dernières diffèrent encore plus avec S ϵ et S α (Stanton et Marcu, 1982). Dans les régions S μ , S ϵ et S α de souris, on trouve des motifs pentamériques répétés [GGGGT, GAGCT, GGGCT] organisés en unités elles-mêmes répétées d'une longueur d'environ 20 pb pour S μ , 40 pb pour S ϵ et 80 pb pour S α . Les régions S γ contiennent également ces motifs simples et d'autres [TGGGG, GCAGC, ACCAG] mais diffèrent des trois premières par la taille des unités répétées : 49 ou 52 pb (pour revue : Stavnezer, 1996).

4.1. Protéines associées aux séquences S

De nombreux facteurs protéiques se fixent sur toutes les séquences S. Certains de ces facteurs se fixent également sur les enhancers I g (voir plus loin).

La protéine NF- κ B p50 se fixe à S γ 3, S γ 2b et S γ 1. Kenter a identifié dans S γ 3 un motif de 49 bp nommé SNAP qui pourrait lier les facteurs E12 et E47 et un motif nommé SNIP qui fixe NF- κ B p50 (Kenter et al., 1993 ; Wuerffel et al., 1992 ; Kenter and Hu, 1996). Kenter a récemment proposé que le facteur NF- κ B p50 était le facteur isotype-spécifique de la CSR $\mu > \gamma$ qui permettrait le recrutement de composants de la voie du MMR (MSH2) et d'autres facteurs impliqués dans la recombinaison (Kenter et al., 2004). Dans S μ , il a été montré qu'une protéine, S μ bp-2 qui aurait une activité hélicase, se liait à un motif de 10 nt riche en G après activation par le LPS (Fukita et al., 1993 ; Mizuta et al., 1993). Une protéine, NF-S μ (renommée SNUP) se fixe à un motif de 15 pb de la région S μ après stimulation par le LPS et le sulfate de dextran (Wuerffel et al., 1990).

Le groupe de Maizels a montré que le facteur LR1, induit par le LPS, peut se fixer sur S γ 3 et S γ 1 (Williams and Maizels, 1991 ; Williams et al., 1993). La distribution du facteur BSAP (produit du gène Pax5) a une distribution assez ubiquitaire, il a été détecté dans toutes les séquences S à l'exception peut-être de S γ 3 et S γ 2b (Liao et al., 1992 ; Waters et al., 1989 ; Xu et al., 1992).

Cependant, aucun rôle précis n'a été attribué à ces facteurs et la signification physiologique de ces liaisons n'est pas claire.

4.2. Transcription germinale

La transcription germinale (GL) est induite par l'action de signaux extracellulaires incluant les cytokines, CD40-L et autres facteurs régulateurs. La liaison des mitogènes, des cytokines et du CD40-L à leurs récepteurs respectifs induit des voies de signalisation spécifiques (pour revue Banchereau et al., 1994 ; Leonard and O'Shea, 1998 ; Akira et al., 2001 ; Bishop, 2004). Leur action s'exerce essentiellement au niveau des promoteurs I en induisant des facteurs (décrits plus loin) qui se fixent sur leurs motifs spécifiques (Rothman et al., 1991 ; Lin et Stavnezer, 1992 ; Xu et Stavnezer, 1992 ; Nilsson et Sidéras, 1993 ; Albrecht et al., 1994 ; Delphin et Stavnezer, 1995 ; Warren et Berton, 1995) (**Fig. 17**).

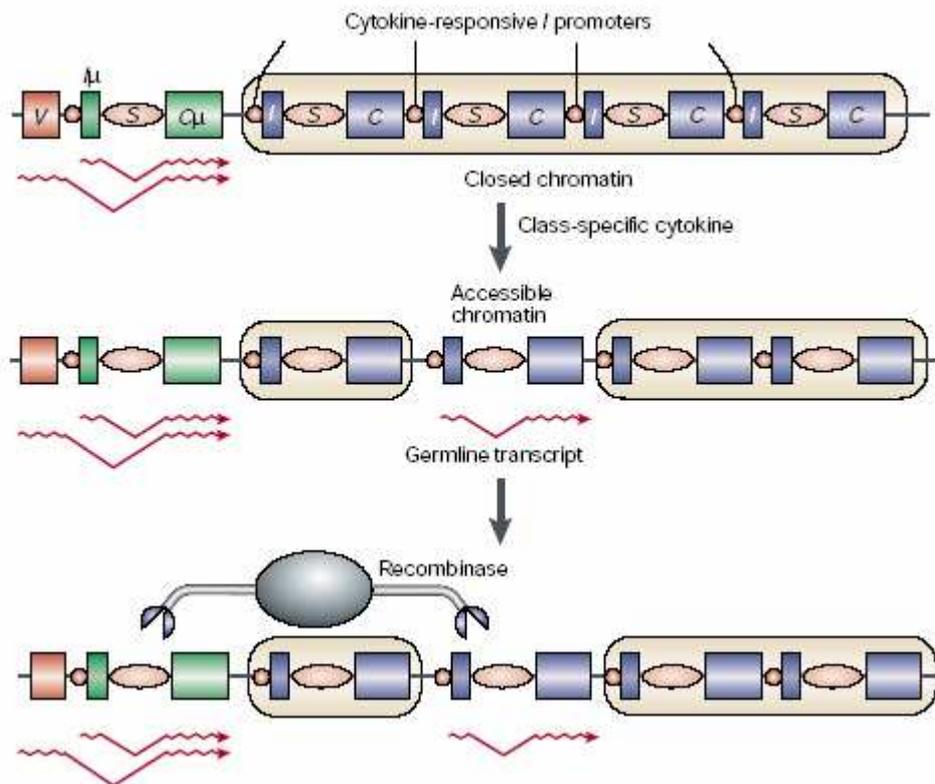


Figure 17 : Modèle de l'accessibilité de la chromatine et commutation de classe.

Dans les cellules B au repos, l'ARNm μ codant les régions V et C μ est transcrit au niveau du locus IgH. De plus, des transcrits germinaux sont synthétisés à partir du promoteur germinale I μ situé en amont de S μ . L'exon I μ est épissé aux exons C μ pour former les transcrits germinaux matures, ne codant aucune protéine. Les régions S et C en aval englobées dans un large ovale rose sont constituées de chromatine transcriptionnellement inactive. La stimulation par des cytokines active la transcription initiée à partir d'un promoteur I spécifique et induit l'ouverture de la chromatine, ce qui est représenté par une interruption de la zone rosée. Les régions S transcriptionnellement actives sont alors considérées comme accessibles aux recombinaisons. Les lignes rouges ondulées et fléchées représentent les séquences exoniques des transcrits et les lignes en forme de V les reliant indiquent l'épissage. (D'après Kinoshita et Honjo, 2001).

La corrélation entre la transcription GL et la CSR a été établie depuis longtemps (Stavnezer-Nordgren and Sirin, 1986 ; Yancopoulos et al., 1986 ; Lutzker and Alt, 1988 ; Rothman et al., 1990) (**Fig. 17**). L'accessibilité des séquences S aux recombinaisons est précédée de leur transcription sous forme d'ARN particuliers, dits transcrits germinaux, prenant origine au niveau des régions I (promoteurs germinaux ou I) qui précèdent chaque séquence S et se prolongent jusqu'aux signaux polyA en aval des régions C respectives. Le pré-messager subit un épissage juxtaposant l'exon I à la région C (forme Ix-Cx).

Après CSR, un autre transcrit GL est détecté, dit transcrit « post-switch », sous la forme I μ -Cx et qui est initié dans le promoteur I μ imbriqué dans l'enhancer E μ (Li et al., 1994). Sa fonction physiologique est inconnue mais son abondance est un bon marqueur de l'efficacité de la CSR.

Les transcrits germinaux sont dits aussi transcrits stériles car ils contiennent des codons stop dans les trois cadres de lecture et ne codent pas de protéine connue. Certaines phases de lecture coderaient au mieux un peptide d'une trentaine d'acides aminés (Goodman et al., 1993 ; Radcliffe et al., 1990) (**Fig. 18**).

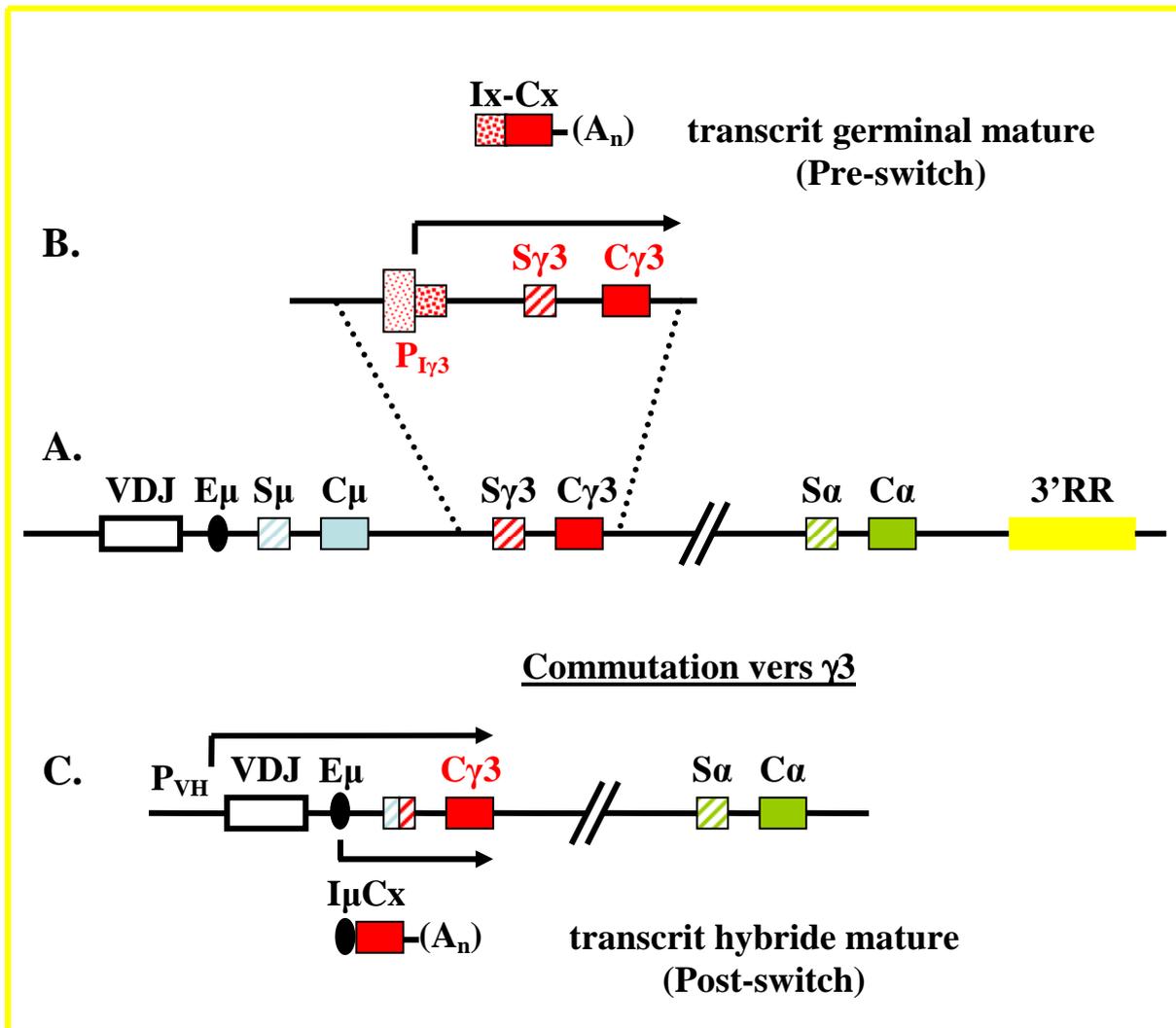


Figure 18 : Commutation de classe vers IgG3.

(A) Schéma du locus IgH.

(B) **Bas.** Représentation schématique du gène C γ 3 avant commutation, montrant le promoteur germinal I γ 3 (P $I\gamma$ 3), l'exon I γ 3 et le transcrit primaire (flèche cassée).

Haut. Transcrit germinal γ 3. Le transcrit primaire subit une maturation en épissant l'exon I γ 3 sur C γ 3, aboutissant à un ARNm mature I γ 3C γ 3 non traductible.

(C) Commutation isotypique vers γ 3. La recombinaison est médiée par les séquences S μ et S γ 3. La transcription est initiée au sein du promoteur P VH . Le transcrit primaire γ 3 (flèche cassée) subit une maturation en épissant VDJ sur C γ 3, aboutissant à un ARNm mature VDJC γ 3 qui sera traduit en chaîne lourde γ 3. Le transcrit hybride I μ -C γ 3 est également montré.

4.2.1. Induction et suppression de la transcription germinale

Les promoteurs I sont généralement bien conservés entre espèces (Mills et al., 1990). Des homologies de séquences ont été trouvées entre $I\gamma 3$ et $I\gamma 2b$ (Rothman et al., 1990), ainsi qu'entre $I\epsilon$ et $I\alpha$ (Rothman et al., 1990 ; Gerondakis, 1991 ; Lebman et al., 1990). La structure du promoteur $I\epsilon$ est représentée schématiquement (**Fig. 19**, d'après Oettgen, 2000).

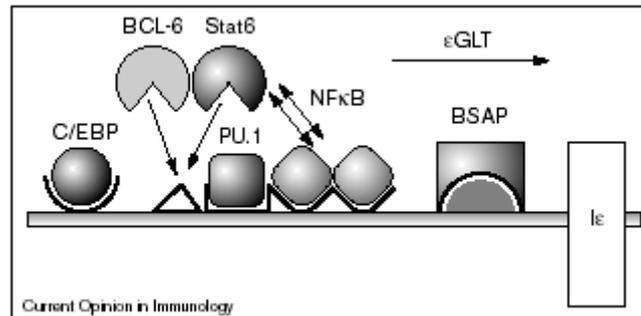
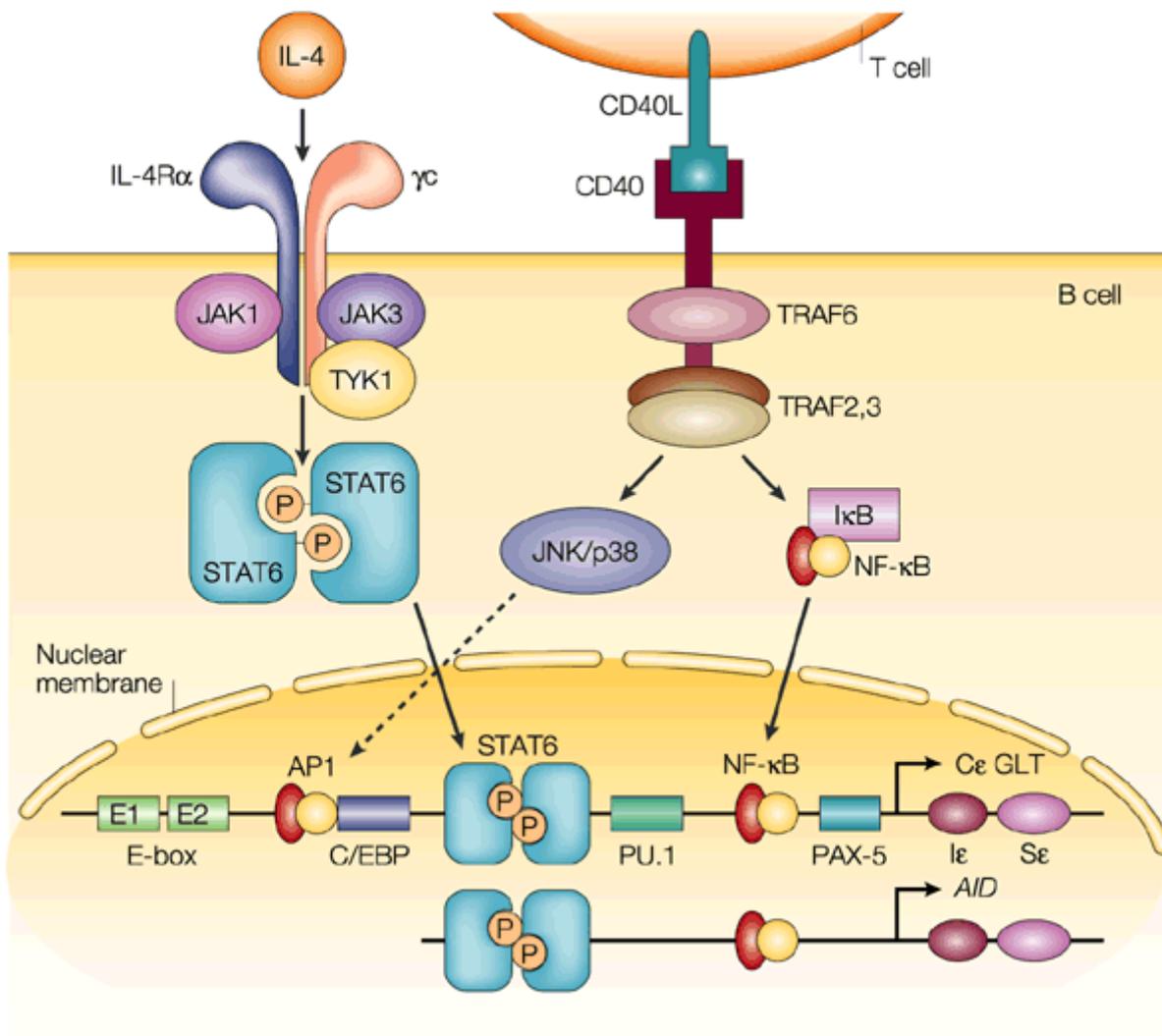


Figure 19 : Structure du promoteur germinale $I\epsilon$.

La CSR vers IgE est précédée de la transcription germinale initiée à partir du promoteur germinale $I\epsilon$ répondant à IL4. Le promoteur contient des sites de fixation pour C/EBP, Stat6, PU.1, NFκB (2 sites) et BSAP (Pax5). En plus de leur fixation à des éléments adjacents du promoteur, Stat6 et NFκB interagissent physiquement et affectent la transcription de façon synergique. Le répresseur BCL-6 rentre en compétition avec Stat6 pour la fixation au promoteur et peut atténuer la transcription (D'après Oettgen, 2000).

L'activation de cellules B *in vitro* par du LPS induit la transcription GL de $\gamma 3$ et $\gamma 2b$ en recrutant le facteur de transcription NF-κB (pour revue : Stavnezer, 1996). Le LPS et l'IL-4 ainsi que le CD40-L et IL4 induisent la transcription GL de $\gamma 1$ et ϵ (**Fig. 20**) (Bergstedt-Lindqvist et al., 1984 ; Coffman et Carty, 1986 ; Lutzker et al., 1988 ; Rothman et al., 1990 ; Severinson et al., 1990). Seule, l'IL-4 induit la transcription de $\gamma 1$ à de faibles taux et ne permet pas d'obtenir de transcrits ϵ dans les cellules B (Bergstedt-Lindqvist et al., 1984). L'addition d'IFN- γ à des cellules activées par le LPS induit la transcription de $\gamma 2a$ (Collins et al., 1993). Le TGF- β induit les transcrits GL de α (Coffman et al., 1989).



Nature Reviews | Immunology

Figure 20 : Les signaux d'activation par IL4 et CD40 conduisent à la transcription germinale de ϵ et AID.

La fixation de l'IL4 à son récepteur (IL4-R) permet le recrutement et l'activation des tyrosines kinases JAK1, JAK3 et TYK1, qui activent à leur tour STAT6. L'interaction des cellules T exprimant le ligand de CD40 (CD40L) avec les cellules B exprimant CD40 permet le recrutement et l'activation des facteurs TRAF ainsi que la translocation nucléaire des facteurs NF κ B et l'activation de la protéine activatrice AP1. La stimulation de IL4-R et CD40 permet ainsi l'activation synergique de la transcription germinale de ϵ et celle de AID (D'après Geha et al., 2003).

Des combinaisons différentes entre mitogènes et/ou cytokines peuvent stimuler ou inhiber la transcription GL d'un isotype donné (et par conséquent la CSR à cet isotype) par des voies de signalisation différentes.

Le CD40-L et IL4 inhibent fortement voire suppriment les transcrits GL $\gamma 2b$ et $\gamma 3$ (Rothman et al., 1990 ; Severinson et al., 1990). Le TGF β qui induit les transcrits α , inhibe la transcription GL ϵ mais beaucoup moins $\gamma 1$ induite par CD40-L et IL4 (Sugai et al., 2003 ; pour revue : Geha et al., 2003)(**Fig. 20**). Dans l'exemple de I ϵ , le CD40-L et IL4 induisent les facteurs E2A, C/EBP, Pax5, NF- κ B et STAT6, qui se fixent sur leurs sites respectifs permettant l'activation de la transcription. Notamment, STAT6 phosphorylée par le signal induit par le récepteur de IL4 *via* la voie JAK/STAT, antagonise avec BCL6 qui réprime la transcription de I ϵ . L'addition de TGF β va activer l'expression de Id2 qui va séquestrer E2A empêchant sa fixation sur son site et inhibant ainsi la transcription GL ϵ (**Fig. 21**). Les souris STAT-6^{-/-} sont déficientes en IgG1 et IgE (Kaplan et al., 1996), et les transcrits GL $\gamma 1$ sont absents après stimulation de splénocytes STAT-6^{-/-} par anti-CD40 + IL4 (Linehan et al., 1998).

L'exemple de la régulation de la transcription GL ϵ illustre bien la complexité des régulations mises en jeu pour contrôler la CSR.

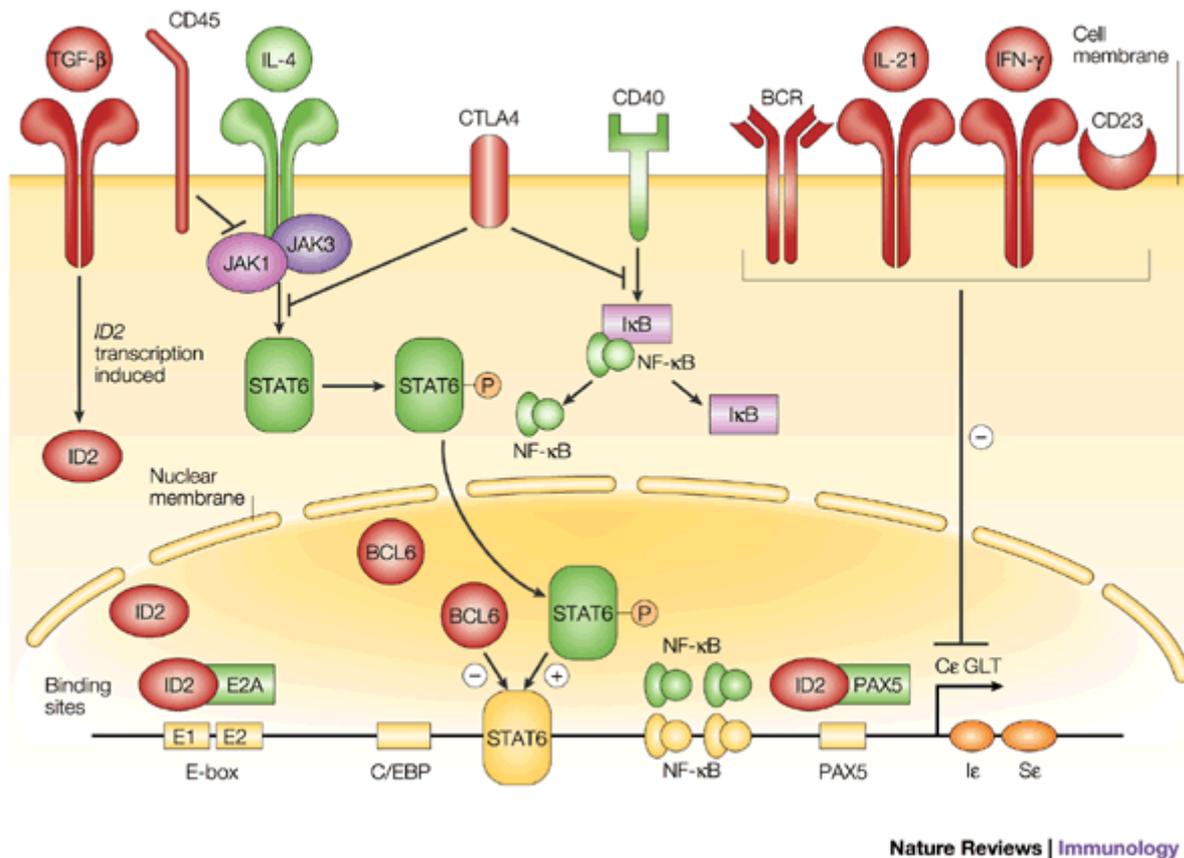


Figure 21 : Régulations complexes de la CSR vers IgE.

Les sites de fixation pour les facteurs de transcription qui sont impliqués dans l'activation du promoteur I ϵ sont représentés en jaunes. Les molécules qui induisent la CSR vers IgE (régulateurs positifs) sont représentés en vert, et celles qui l'inhibent (régulateurs négatifs) en rouge (D'après Geha et al., 2003).

4.2.2. Maturation des transcrits germinaux

Deux cibles ont essentiellement fait l'objet d'études par KO chez la souris : les promoteurs GL et le site donneur d'épissage. Les modèles KO relatifs aux promoteurs I seront décrits plus tard, une fois que la région 3'RR qui contrôle en *cis* la transcription GL et les modèles proposés pour son mode d'action auront été présentés.

La mutation du site donneur d'épissage de l'exon I γ 1 diminue sévèrement la CSR à IgG1 malgré une transcription GL abondante (Lorenz et al., 2005). Ceci indique que la transcription toute seule n'est pas suffisante et que la maturation des pré-messagers est

importante. Ceci est également démontré par la restauration du phénotype sauvage quand le promoteur $I\gamma 1$ est remplacé par le promoteur de la métallothionéine pourvu du site donneur d'épissage de l'exon $I\gamma 1$ en son aval (Hein et al., 1998).

Le remplacement de $I\alpha$ (incluant son site donneur d'épissage) par le gène de l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (HPRT) montre une CSR normale vers IgA (Harriman et al., 1996). L'analyse des transcrits a révélé la présence de transcrits $S\alpha$ - $C\alpha$ suggérant que la transcription a continué au delà du signal polyA du gène HPRT. L'épissage du transcrit du gène HPRT lui-même se déroule normalement, et un épissage d'exons du gène HPRT sur $C\alpha$ a été démontré (Qiu et al., 1999).

De façon surprenante, la mutation du site donneur d'épissage de $I\mu$ n'altère pas le phénotype. L'analyse des transcrits μ a montré que des sites cryptiques d'épissage étaient activés dans l'intron par la mutation du site canonique de $I\mu$ (Kuzin et al., 2000).

Si ces travaux révèlent l'importance de la maturation des transcrits GL pour une CSR efficace, les mécanismes sous-jacents sont complètement inconnus.

La démonstration de l'existence d'hybrides stables ARN/ADN *in vivo* au cours de la transcription GL (Yu et al., 2003), aboutissant à la formation d'une boucle R simple-brin qui serait le substrat de AID, suggère que la stabilité du duplex ARN/ADN pourrait être destabilisée par l'épissage et rendrait le brin transcrit accessible à AID pour introduire des cassures double-brins (Yu et al., 2003).

Cependant, il est probable que la situation soit plus complexe que la simple maturation des transcrits le suggère. En effet, dans un modèle où la séquence $S\gamma 1$ a été inversée ou remplacée par une plus courte séquence synthétique riche en G, formant la boucle R *in vitro*, mais ne contenant pas les motifs répétés de $S\gamma 1$, la CSR vers IgG1 est diminuée malgré une transcription et une maturation de transcrits normales (Shinkura et al., 2003).

Quelque soit le rôle de la maturation des transcrits dans le processus de recombinaison, il est clair qu'une fonction essentielle de la transcription GL est de promouvoir l'accessibilité des séquences S et de favoriser la genèse de structures qui seraient

la cible de AID pour initier le clivage d'ADN et déclencher la CSR (pour revue : Chaudhuri and Alt, 2004). Quatre modèles de structures ont été proposés : les quartets G (Dempsey et al., 1999), les stem-loops (Tashiro et al., 2001), la boucle R (Yu et al., 2003) et la bulle stabilisée par RPA (Chaudhuri et al., 2004) (**Fig. 22**). Des quatre structures, seule le modèle de la boucle R a été démontré *in vivo* (Yu et al., 2003), mais ces modèles ne sont pas forcément exclusifs : la taille de la boucle R simple-brin a été décrite comme pouvant dépasser 1 kb, on ne peut pas exclure que les autres microstructures puissent se former sur la boucle. De même, le remplacement de Sy1 (riche en GC) par une séquence S de xénope (riche en AT) qui ne forme pas de boucle R mais qui contient le motif AGCT (« hot spot » de la SHM), diminue mais ne bloque pas la CSR suggérant l'existence d'une voie indépendante de la boucle R pour l'accès à l'ADN (Zarrin et al., 2004).

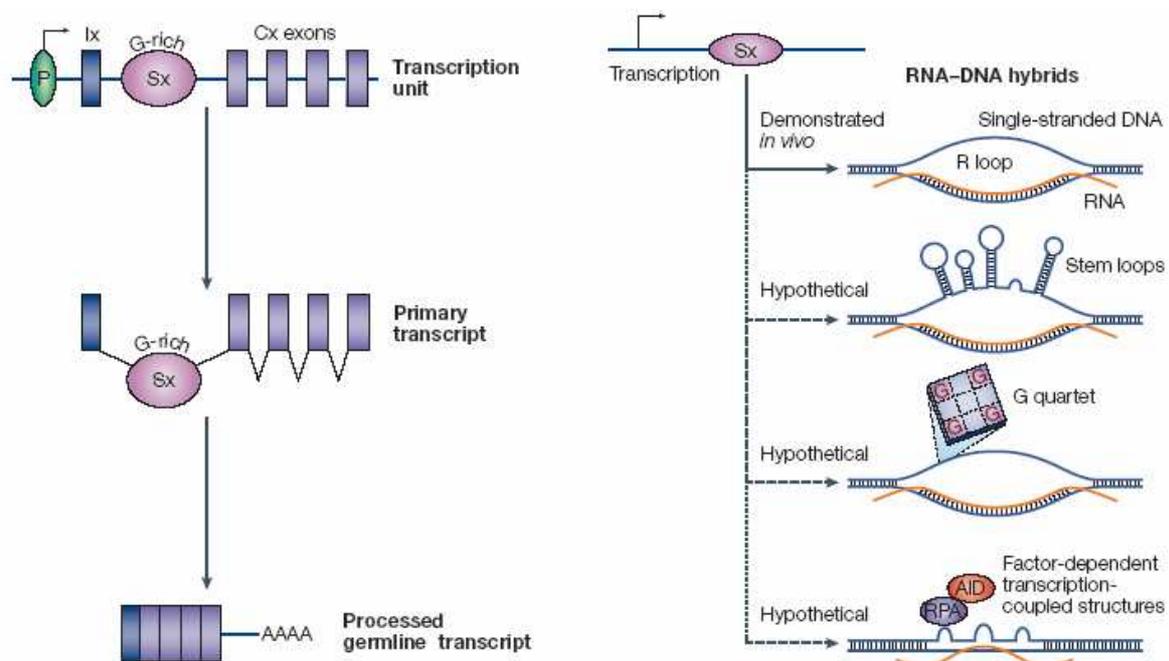


Figure 22 : Transcription germinale et structures générées par la transcription au cours de la CSR.

(A gauche) Les gènes codant les régions constantes des chaînes lourdes constituent des unités transcriptionnelles, dans lesquelles la transcription est initiée à partir des promoteurs germinaux (P) en amont des exons (I) et continue à travers les régions S jusqu'aux exons C_H. Le transcript primaire est ensuite épissé pour générer un transcript germinale mature qui ne code pas de protéine connue.

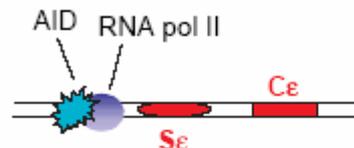
(A droite) Les transcrits des régions S peuvent s'associer de façon stable au brin d'ADN matrice pour former des hybrides ARN-ADN, dans lesquels le brin non-matrice peut théoriquement adopter différentes structures (quartets G, stem loops ou bulles) ou peut rester simple brin (R-loop). RPA : protéine de réplication A.

(D'après Chaudhuri et Alt, 2004).

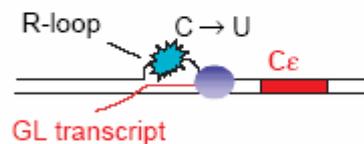
Le rôle de la transcription GL dans le recrutement de AID, bien qu'assumé depuis la découverte d'AID, n'a été démontré que récemment. En effet, AID a pu être co-immunoprécipitée avec l'ARN polymérase II au cours de la transcription GL de I ϵ (Nambu et al., 2003), ce qui renforce le modèle proposé par Storb associant le facteur mutateur avec la machinerie transcriptionnelle (Peters et Storb, 1996 ; pour revue : Kaminski et Stavnezer, 2004) (**Fig. 23**).

Model for AID recruitment by germline (GL) transcription

(i) RNA pol II recruits AID to promoter 5' of S ϵ



(ii) ssDNA is created by transcription and R loop formation; AID deaminates dC



(iii) Uracil DNA glycosylase (UNG) excises dU bases; AP endonuclease nicks DNA at abasic sites



Figure 23 : Un modèle pour le rôle de la transcription germinale dans la CSR.

(i) Suite à l'activation des cellules B par le LPS et IL4, la transcription germinale de ϵ est induite. La transcription germinale recrute AID au niveau des régions S *via* l'ARN-polymérase II et (ii) conduit à la formation d'une boucle R et donc d'un simple brin d'ADN stable (ssDNA), substrat pour AID. AID convertit alors les résidus dC en dU, ce qui génère des cibles pour l'uracil-DNA glycosylase (UNG). (iii) Les sites abasiques créés par UNG sont les cibles des endonucléases apyrimidiques/apuriques (AP), bien que le rôle de ces dernières dans la CSR n'ait pas encore été démontré (D'après Kaminski et stavnezer, 2004).

La chromatine des séquences S a été très peu étudiée. Dans l'étude citée ci-dessus (Nambu et al., 2003), il a été montré que le LPS et IL4 induisaient l'acétylation de l'histone H3 dans I γ 1, S γ 1, I ϵ et S ϵ . L'addition de TGF- β bloque la CSR à IgE, la transcription GL I ϵ et l'acétylation de H3 associée à I ϵ et S ϵ . Par contre aucun effet n'a été observé sur γ 1. Ils ont également montré que AID ne s'associait pas à S ϵ non transcrite même si ses H3 étaient hyperacétylées, suggérant que l'acétylation de H3 en l'absence de transcription GL n'est pas suffisante pour lier AID.

Une analyse plus récente a montré une corrélation entre la transcription GL des gènes γ et l'acétylation de H3 : une forte concentration des H3 acétylées a été détectée préférentiellement dans les I γ et S γ après activation avec du LPS, par contre l'acétylation de H4 semblait corrélée avec l'expression de AID. Dans des splénocytes AID $^{-/-}$ activés, l'acétylation de H3 et H4 est réduite et celle de H4 est plus diminuée, ce qui amène ce groupe à proposer que l'acétylation de H4 pourrait être un marqueur des cassures d'ADN associées à la CSR (Wang et al., 2006).

4.3. Lésions d'ADN associées à la recombinaison

Après activation des cellules pour la CSR, des lésions d'ADN sont détectées dans S μ . Deux types de lésions ont été décrits : des mutations ponctuelles et des délétions internes (intra-S μ). Ces lésions sont induites par AID (Petersen et al., 2001; Dudley et al., 2002; Nagaoka et al., 2002). Ces lésions sont détectées avant recombinaison entre séquences S partenaires, mais leur signification n'est pas claire. En particulier, on ne sait pas si ces lésions sont liées au processus de la CSR proprement dite ou si c'est un effet secondaire de leur proximité de E μ ou de la région VDJ, cible de la SHM. Curieusement, ces mutations et délétions ne sont pas détectées dans S γ après activation (Schrader et al., 2003). Par contre, si S μ est délétée, des lésions sont alors trouvées dans les séquences S γ (Gu et al., 1993 ; Schrader et al., 2003 ; pour revue : Chaudhuri et Alt, 2004)(**Fig. 24**).

L'analyse mutationnelle de AID a révélé deux domaines, le domaine N-terminal responsable de la SHM et le domaine C-terminal responsable de la CSR. Les mutations qui bloquent la SHM n'affectent pas les mutations et les délétions intra- $S\mu$ (Shinkura et al., 2004), suggérant que ces lésions sont probablement liées à la CSR. Une possibilité serait que ces lésions intra- $S\mu$ soient des tentatives de CSR avortées à cause de l'absence d'une séquence S partenaire.

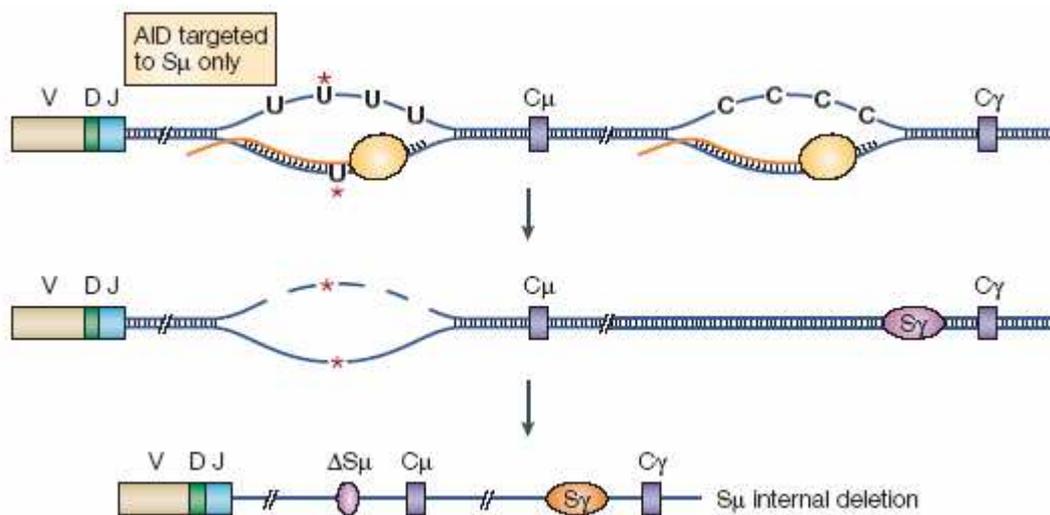


Figure 24 : Délétions internes dans la séquence $S\mu$ au cours de la CSR.

Lors d'une CSR abortive, la région $S\mu$ peut subir à taux élevé des délétions internes ($\Delta S\mu$) lorsque cette région est ciblée par AID, contrairement aux régions S situées en aval (D'après Chaudhuri et Alt, 2004).

Dans le cas classique d'une CSR productive, la transcription GL des deux séquences S partenaires génère les simple-brins et les structures cibles de AID. La détection d'épisomes formés de séquences intermédiaires entre deux séquences S partenaires a suggéré depuis longtemps que la CSR impliquait des cassures double-brins dans les deux séquences S partenaires.

Ainsi, le modèle en vogue actuellement (**Fig. 25**) implique AID dans l'initiation de la CSR en désaminant une cytosine en uracile dans l'ADN simple-brin exposé (boucle R ou autres structures) par la transcription GL dans les deux séquences partenaires. Cette uracile

serait éliminée par UNG créant un site abasique. Une endonucléase APE1 cliverait l'ADN au niveau de ce site. Mais des données récentes impliquent plutôt le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) dans le clivage du simple-brin consécutif à l'intervention de AID et UNG (Larson et al., 2005).

Quoi qu'il en soit, pour qu'il y ait cassure double-brin, il faut qu'AID accède au brin transcrit qui forme un duplex stable avec le transcrit GL. Les modalités d'accès de AID à ce brin ne sont pas claires et pourraient impliquer l'épissage du transcrit ou la reconnaissance et l'attaque du duplex par la RNase H (Yu et al., 2003). Quelque soit le mécanisme précis, le modèle stipule qu'AID a accès à certaines cytosines du brin transcrit déclenchant la même cascade que sur la boucle.

Une implication de ce modèle est que les cassures double-brins dans les séquences S ne sont pas dans un premier temps des cassures à extrémités franches, mais plutôt des clivages simple-brins distribués sur une distance plus ou moins longue sur les deux brins des séquences S. Les mécanismes qui gouvernent la production d'extrémités franches et l'étape précise à laquelle ces extrémités sont produites, ne sont pas clairs. De nombreuses données *in vivo* suggèrent qu'une action concertée de nucléases, de polymérase translésionnelles et de la voie du MMR aboutirait à la genèse d'extrémités franches (Faili et al., 2004 ; Ehrenstein et Neuberger, 1999 ; Schrader et al., 1999 ; Schrader et al., 2002). L'action concertée de ces éléments dans la synthèse ou la dégradation d'ADN entre deux clivages adjacents mais sur des brins différents, avec ou sans réparation expliquerait les mutations, insertions et délétions fréquemment retrouvées au niveau des jonctions S après accomplissement de la CSR (Dunnick et al., 1993).

Les cassures double-brins sont très vite détectées par les « senseurs » des lésions d'ADN tels que le complexe MRN et la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). Ces cassures induisent une phosphorylation rapide de l'histone H2AX (un variant de H2A) par ATM dans la chromatine adjacente à la cassure. La forme phosphorylée de H2AX, appelée γ -H2AX, est alors détectée dans des foci autour des cassures (pour revues : Bassing and Alt, 2004). Ces foci semblent contenir d'autres facteurs impliqués dans la réponse aux lésions double-brins tels que 53BP1 (p53-binding protein). Tous les KO de ces facteurs affectent la CSR mais ne l'inhibent pas (pour revue : Chaudhury and Alt, 2004).

Chez les souris déficientes en H2AX, la CSR est diminuée. Par contre, les lésions intra-S μ sont intactes, la transcription GL est également intacte. Les auteurs proposent que H2AX (et les facteurs associés) jouerait un rôle dans la synapse entre les deux séquences S partenaires (Reina-San-Martin et al., 2003) (**Fig. 25**). Un rôle de MSH2 et MSH6, composants de la voie du MMR, dans la synapse a également été suggéré (Larson et al., 2005 ; Li et al., 2006).

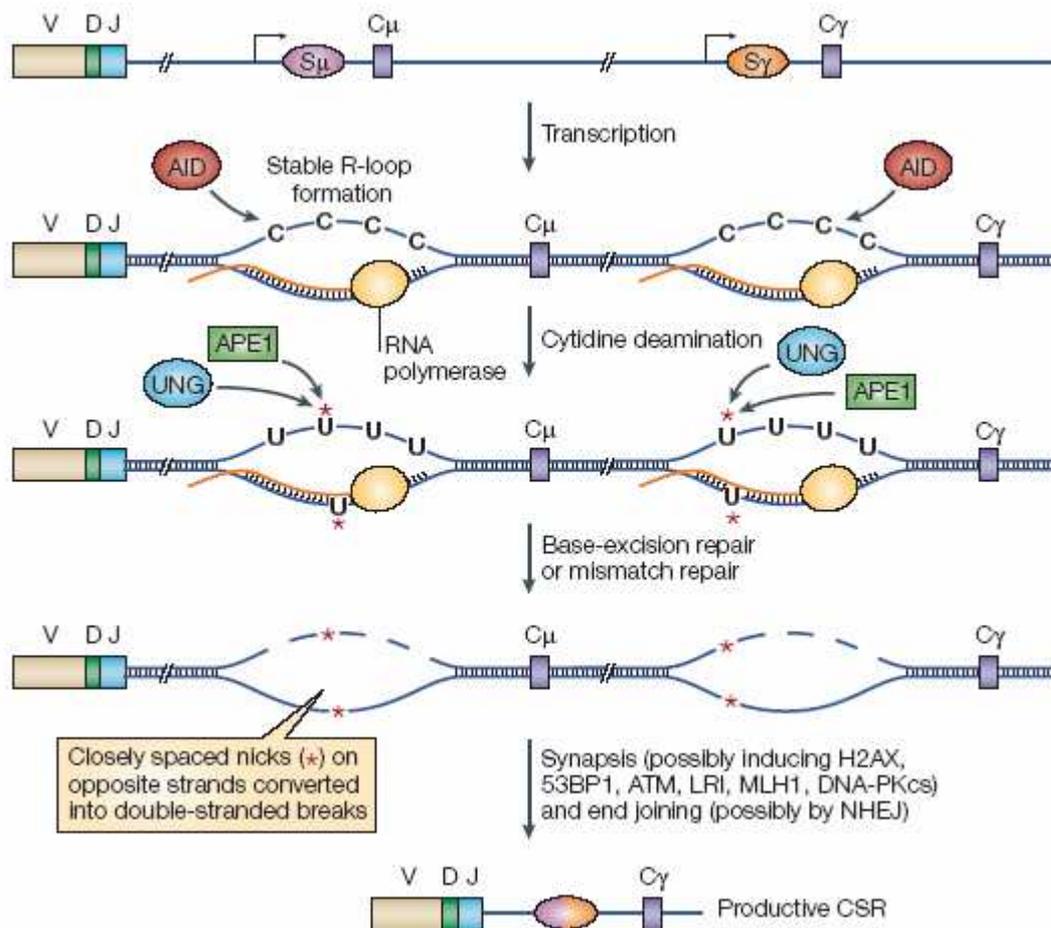


Figure 25 : Modèle courant pour la CSR.

La transcription à travers les 2 régions S impliquées dans la CSR génère des boucles R (ou autres structures non montrées), à l'origine de la formation de substrats ADN simple-brin pour AID. Les activités UNG (uracile-DNA glycosylase) et APE1 (apurique/aprimidique endonucléase) peuvent alors introduire de nombreux clivages sur le brin non-matrice. Ceci, combiné à des clivages très proches sur le brin matrice (*), peut provoquer des cassures double-brin dans les régions S. La synapse des cassures peut alors se faire grâce à un certain nombre de protéines telles que H2AX, 53BP1, LRI, ATM, MLH1, DNA-PKcs. La CSR sera complète par la fusion des 2 régions S, probablement grâce à la jonction des extrémités non homologues NHEJ (D'après Chaudhuri et Alt, 2004).

En l'absence d'homologie entre les deux séquences S partenaires, c'est la voie NHEJ qui intervient dans la jonction entre les deux extrémités d'ADN. L'implication de cette voie est fortement suggérée par le phénotype des souris déficientes en Ku70 et Ku80 (reconstituées par des transgènes IgH et IgL) qui montrent une sévère altération de la CSR (Casellas et al., 1998 ; Manis et al., 1998), cependant, les cellules B de ces souris ne prolifèrent pas normalement et il n'est pas formellement prouvé que ces deux protéines interviennent dans la CSR. L'implication de DNA-PKcs dans la CSR s'est révélée plus complexe, les souris complètement déficientes en cette protéine sont inhibées dans la CSR vers tous les isotypes à l'exception de IgG1 (Manis et al., 2002). Curieusement, les souris homozygotes pour la mutation SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency), une mutation qui n'affecte que le domaine kinase de la DNA-PKcs mais laisse le reste de la protéine intact, sont peu altérées dans la CSR (Bosma et al., 2002 ; Cook et al., 2003). Pour expliquer ces différences, il a été proposé que le rôle de la DNA-PKcs dans la CSR serait distinct de son rôle dans la voie NHEJ, en particulier elle pourrait jouer un rôle, indépendant de sa fonction kinase, dans la synapse des séquences S (pour revue : Chaudhuri and Alt, 2004).

L'étape de jonction/ligation entre deux séquences S impliquerait XRCC4 et la DNA ligase IV, mais à cette étape aussi, de nombreux aspects restent à élucider. En particulier, l'intervention des systèmes de réparation de l'ADN juste avant ligation et son articulation avec la voie NHEJ, le rôle des polymérases translésionnelles, la hiérarchie des événements entre la détection de cassures double-brins, leur processing jusqu'à l'obtention d'extrémités franches, à supposer qu'il faille absolument des extrémités franches pour l'accomplissement de la CSR.

En conclusion, de grands progrès ont été réalisés dans la mécanistique de la CSR, sur le rôle d'AID et des nombreux facteurs impliqués, mais de nombreuses zones d'ombre subsistent.

5. ELEMENTS CIS-REGULATEURS DU LOCUS IgH

5.1. L'enhancer intronique E μ

Au vu de l'abondance de la littérature sur E μ , j'ai choisi de me focaliser sur les études qui ont abordé sa fonction *in vivo* par KO.

L'enhancer E_{μ} est situé dans l'intron entre les segments J_H et C_{μ} . Le core de l'enhancer (cE_{μ}) est entouré de deux MAR. Sa localisation en amont de S_{μ} le préserve dans tous les événements de CSR normaux. E_{μ} sert également de promoteur GL, I_{μ} .

E_{μ} joue un rôle important dans les réarrangements V(D)J et dans la régulation transcriptionnelle initiée à partir de plusieurs promoteurs : PV_H en amont des segments V, I_{μ} , DQ52 en amont du segment D le plus distal, et peut être d'autres promoteurs (pour revue : Jung et al., 2006) (**Fig. 26**).

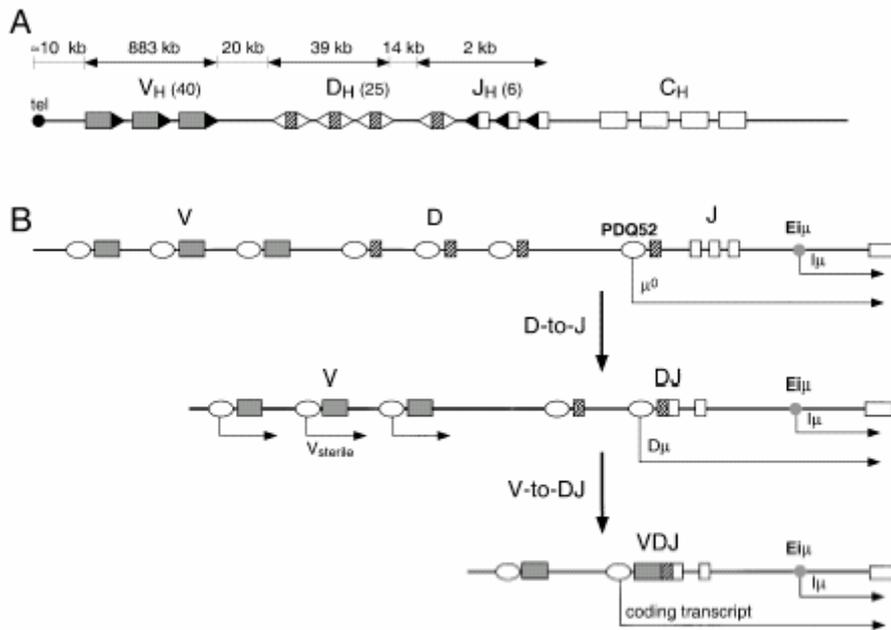


Figure 26 : Les transcrits initiés grâce à E_{μ} .

A) La région variable du locus IgH humain sous forme germinale est détaillée, la taille des groupes de gènes et les distances intermédiaires sont indiquées au dessus. Les segments de gènes sont représentés par des rectangles, les RSS par des triangles blancs (12-RSS) ou noirs (23-RSS).

B) Représentation schématique d'un réarrangement VDJ et des transcrits stériles dans le locus IgH murin. Les promoteurs sont représentés par des ovales blancs, l'activateur intronique E_{μ} par un cercle gris et les transcrits stériles par des flèches cassées (D'après Hesslein et Schatz, 2001)

E_{μ} fixe de nombreux facteurs (pour revue : Ernst et Smale, 1995 ; **Fig. 27**). Parmi ces protéines *trans*-activatrices : Oct-1 et Oct-2. Oct-1 est une protéine ubiquitaire alors que Oct-2 est B-spécifique. Un coactivateur nommé OCA-B, strictement B-spécifique interagit

avec Oct-1 et Oct-2 pour assurer une expression B-spécifique optimale. De façon surprenante, les souris déficientes en Oct-2 et OCA-B ont un développement B précoce normal (Schubart et al., 2001), par contre elles jouent un rôle critique dans la CSR et la différenciation terminale (Schubart et al., 1996 ; Kim et al., 1996 ; Schubart et al., 2001). Le core de E μ (cE μ) contient plusieurs sites qui fixent des protéines activatrices de la famille helix-loop-helix dont les produits du gène E2A. Le gène E2A produit trois protéines par épissage alternatif, E12, E47 et E5-2. Les souris E2A^{-/-} sont bloquées à un stade très précoce du développement B (Zhuang et al., 1994 ; Bain et al., 1994). La liaison des produits du gène E2A à l'ADN peut être inhibée par des régulateurs négatifs tels que Id1, Id2 et Id3 (pour revue : Murre, 2005). Les protéines ZEB sont ubiquitaires et pourraient réprimer E μ dans les cellules non-B. L'activation de la transcription par PU.1 dépendrait de la fixation des protéines adjacentes Ets-1 et TFE3 sur les sites respectifs adjacents μ A et μ E3 (pour revue : Ernst et Smale, 1995).

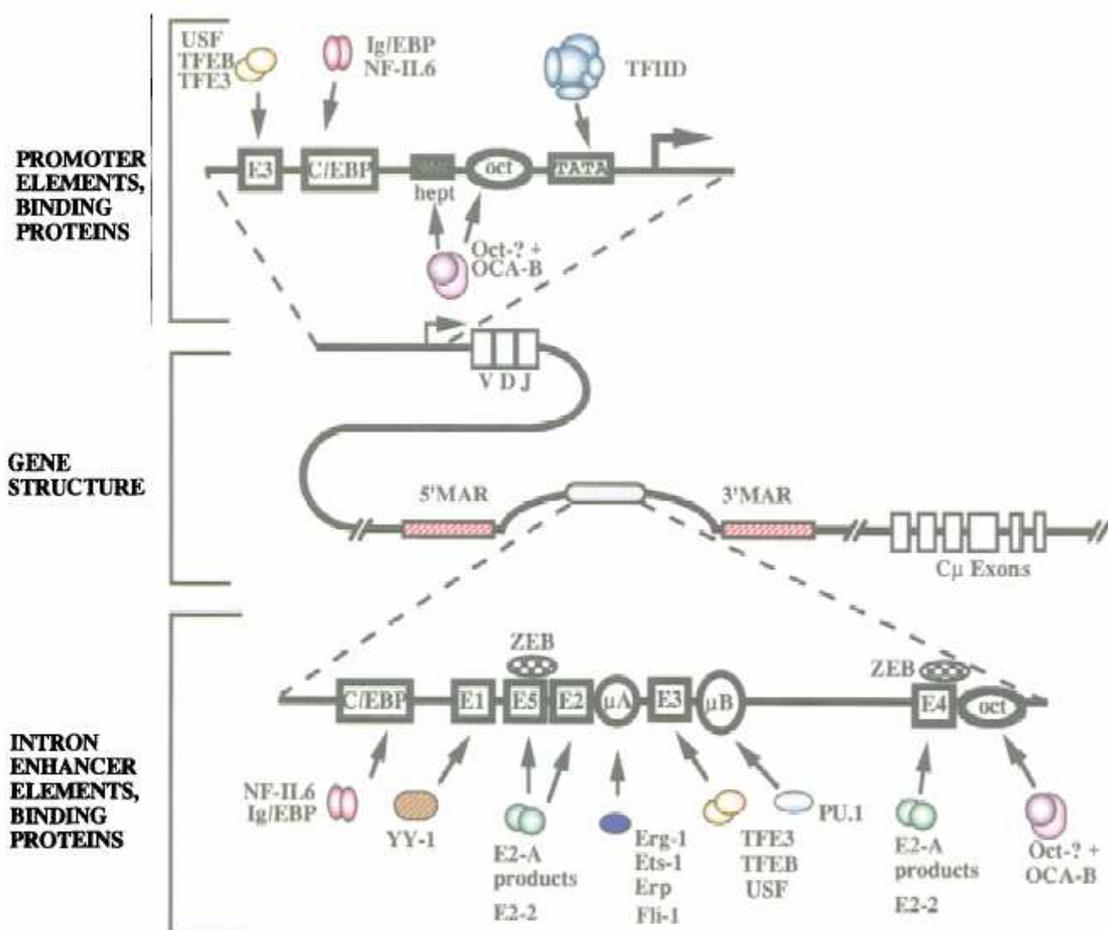


Figure 27 : Sites de fixation et facteurs *trans*-activateurs au niveau du promoteur P_{VH} et de l'activateur intronique E μ (Ernst et Smale, 1995).

Plusieurs KO ont ciblé le cE μ , les MAR adjacentes ou tout E μ (cE μ + MARs). Le remplacement de E μ par un oligonucléotide diminue mais ne bloque pas les réarrangements V(D)J, ce qui a amené les auteurs à suggérer l'existence d'autres éléments de contrôle des réarrangements distincts de E μ (Serwe and Stablitzki, 1993). Le remplacement des 700 pb en aval de cE μ incluant une partie de la MAR 3' et l'exon I μ par le gène *neo^r* n'a pas d'effet détectable sur les réarrangements. Par contre, le remplacement de E μ par le gène *neo^r* provoque une sévère diminution des réarrangements, une inhibition de la déméthylation du locus JH et de la transcription GL du locus. Un phénotype similaire est obtenu quand le gène *neo^r* est inséré ~100 nt en amont de E μ sauf que la déméthylation ne semble pas affectée suggérant une dissociation entre la déméthylation du locus et sa recombino-génicité (Chen et al., 1993). Curieusement, l'insertion du gène *neo^r* ~450 nt en amont de E μ n'a pas d'effet majeur sur les réarrangements V(D)J, par contre elle inhibe la transcription GL ainsi que la transcription initiée à partir de P_{VH}. Ces résultats suggèrent un effet polarisé de E μ (de 3' vers 5') et ont été interprétés en terme de compétition entre promoteurs (Delpy et al., 2002). Ces études révèlent la complexité des phénotypes associés à l'insertion du gène *neo^r* en remplacement ou à proximité d'éléments de contrôle transcriptionnels et suggèrent la plus grande prudence dans l'interprétation de ces phénotypes (l'effet « *neo* » est discuté plus loin).

La délétion propre de cE μ (avec suppression du gène *neo^r*) par l'utilisation de blastocystes RAG-2^{-/-} a montré que cE μ était l'élément central dans le contrôle des réarrangements V-DJ, qui sont sévèrement inhibés, mais pas des réarrangements D-J qui ne sont que partiellement affectés, ce qui suggère l'existence d'autres éléments de contrôle. De façon surprenante, la délétion des MAR, individuellement ou conjointement, n'a pas révélé d'effet détectable sur les réarrangements ou la transcription (Sakai et al., 1999). Le même phénotype a été confirmé chez des souris où la mutation a été transmise par la lignée germinale (Perlot et al., 2005).

La corrélation entre transcription GL et réarrangements V(D)J est mise en évidence par ces phénotypes. Deux transcrits GL sont détectés dans le locus IgH avant tout réarrangement, μ^0 initié du promoteur DQ52 et I μ : le remplacement de E μ par le gène *neo^r* bloque la transcription μ^0 tout comme les réarrangements V(D)J. La délétion propre de E μ inhibe fortement les réarrangements V-DJ mais n'a qu'un effet modéré sur les réarrangements D-J, et corrélativement sur les transcrits μ^0 . Ce phénotype confirme le rôle central de E μ dans la régulation de l'accessibilité du locus et de la transcription GL mais suggère fortement que

d'autres éléments de contrôle des réarrangements D-J et de la transcription GL existent dans le locus IgH (Sakai et al., 1999 ; Perlot et al., 2005). Une autre possibilité serait qu'une fraction des réarrangements D-J, indépendante de E μ produise de faibles taux de recombinaison D-J dans les précurseurs lymphoïdes communs permettant un certain niveau d'ouverture du locus avant activation de E μ dans les cellules pro-B qui activerait alors les réarrangements D-J (pour revue : Sen and Oltz, 2006).

Au regard de la CSR, la délétion de E μ diminue mais ne bloque pas la CSR dans des hybridomes dérivés de souris hétérozygotes pour la mutation. Par contre le remplacement de E μ par le gène *neo'* restaure des taux quasi-normaux de la CSR (Bottaro et al., 1998). Chez les souris, la délétion propre de cE μ diminue modérément la CSR. Par contre les MAR ne semblent pas avoir d'effet sur la CSR (Sakai et al., 1999 ; Perlot et al., 2005). Quant à la SHM, la délétion propre de cE μ n'a pas révélé d'effet détectable sur la SHM (Perlot et al., 2005).

5.2. Le promoteur/enhancer DQ52

Cet élément est situé en amont du segment DQ52, le plus proche de la région JH. De nombreux sites potentiels de fixation de facteurs nucléaires comme E2A, Ets, NF- κ B et AP2 ont été décrits dans cet élément et il a été suggéré que la transcription de ce segment serait le préalable nécessaire à l'accessibilité de la région D-J à la recombinaison V(D)J (Thompson et al., 1995). Cet élément a été considéré comme agissant en synergie avec E μ , impliqué dans l'activation des réarrangements D-J (Kottmann et al., 1994). La délétion de cet élément avec le segment DQ52 n'inhibe pas le réarrangement D-J et corrélativement ne bloque pas la transcription μ^0 , par contre une diminution des réarrangements impliquant JH3 et JH4 a été observée (Nitschke et al., 2001). La délétion conjointe de cet élément avec E μ a révélé que le promoteur/enhancer DQ52 n'était pas requis pour le réarrangement D-J et pour la transcription μ^0 (Afshar et al., 2006). Ceci suggère l'existence d'autres éléments de contrôle non encore identifiés dans le locus IgH qui régulent le réarrangement D-J et la transcription μ^0 .

5.3. Contrôle de l'accessibilité

Le réarrangement V(D)J est étroitement contrôlé à la fois au niveau de la spécificité tissulaire et au niveau du stade de développement. Des mécanismes doivent exister qui permettent le ciblage spécifique de la recombinase RAG vers les séquences RSS. Le contrôle du réarrangement V(D)J est ainsi corrélé au contrôle de l'accessibilité de la chromatine des RSS (pour revue : Schlissel, 2003). La corrélation soulignée précédemment entre la transcription GL et les réarrangements suggère que la chromatine des RSS est permissive à la fois pour l'ARN polymérase II (transcription) et pour RAG (recombinaison). De cette manière, les éléments de contrôle transcriptionnel réguleraient également les réarrangements (pour revue : Dudley et al., 2005) (**Fig. 28**).

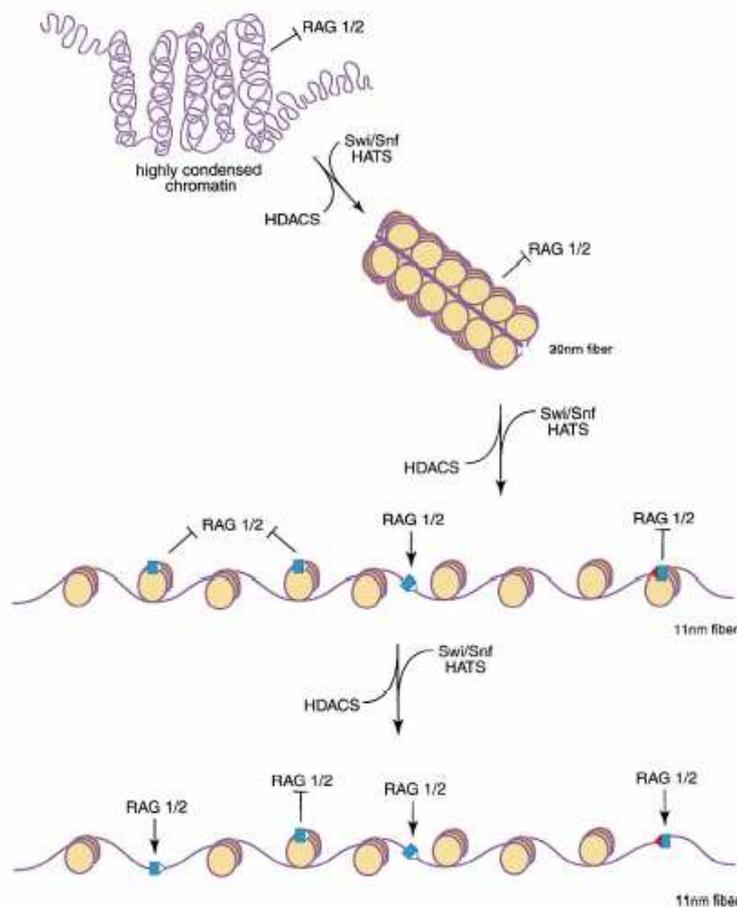


Figure 28 : Remodelage de la chromatine et réarrangement VDJ.

La chromatine hautement condensée empêche l'accès des séquences RSS aux protéines RAG. Les activités ATP-dépendantes de remodelage de la chromatine telles que Swi/Snf et les activités modifiant la structure des histones telles que HAT provoquent le déroulement progressif de la chromatine, permettant ainsi l'accès des séquences RSS (triangles blancs ou rouges adjacents aux carrés bleus représentant des gènes V, D ou J) aux RAG (D'après Roth et Roth, 2000).

La découverte récente de l'interaction entre RAG2 et les histones, et l'importance de cette interaction pour le réarrangement V(D)J (West et al., 2005) montre la complexité du phénomène et souligne l'importance de la structure chromatinienne dans ce processus.

L'analyse de la chromatine du locus D-J a révélé des domaines distincts caractérisés par des marques épigénétiques caractéristiques. Dans les cellules pro-B, les histones H3 des segments JH sont fortement acétylées sur leur lysine 9 (H3K9ac) et diméthylées sur leur lysine 4 (H3K4me₂), marque d'une chromatine active. Des niveaux plus faibles de ces modifications se retrouvent en aval jusqu'à Cδ. Dans la région DH, on retrouve les modifications H3K9ac et H3K4me₂ au niveau des segments DFL16.1 (le plus en amont de la région) et DQ52 (le plus en aval) (Chowdhury et Sen, 2001). Cette observation est en accord avec des études antérieures sur l'usage préférentiel des segments DFL16.1 et DQ52 dans les réarrangements (Tsukada et al., 1990 ; Chang et al., 1992 ; Nitschke et al., 2001). De façon surprenante, les histones des segments DH intermédiaires sont di-méthylées sur leur lysine 9 (H3K9me₂), marque d'une chromatine compacte (Chowdhury et Sen, 2001). Dans ce cadre, l'accessibilité des RSS des segments DH intermédiaires à la recombinase RAG est difficile à concevoir, et le mécanisme en jeu est encore obscur. Alternativement, il se pourrait que d'autres modifications épigénétiques interviennent.

La recombinase RAG cible les segments VH après le réarrangement D-J et le problème de l'accessibilité des RSS des segments VH se pose de nouveau. Les marques épigénétiques d'une chromatine active sont retrouvées dans les segments VH (Chowdhury et Sen, 2001 ; Maès et al., 2001 ; Chowdhury et Sen, 2003 ; Johnson et al., 2003). Le facteur Pax5 jouerait un rôle crucial dans ce processus par suppression de la méthylation d'histone H3K9, marque d'une chromatine inactive. Le mécanisme reste obscur mais semble mettre en jeu un échange d'histones (Johnson et al., 2004). Le mécanisme est davantage compliqué par le fait qu'en l'absence de Pax5, une transcription GL des segments VH non réarrangés a été détectée (Hesslein et al., 2003).

Cette chromatine ouverte est corrélée avec une transcription GL initiée aux promoteurs PVH. Cependant, cette transcription subsiste même en l'absence de Eμ et DQ52 (Perlot et al., 2005 ; Afshar et al., 2006). La nature des éléments qui contrôlent l'accessibilité des segments VH est encore inconnue. Alternativement, il se pourrait que les enhancers facilitent l'accessibilité des RSS à la recombinase RAG en recrutant des facteurs de

remodelage de la chromatine qui déplaceraient les nucléosomes dont le rôle inhibiteur des réarrangements V(D)J a été fortement suggéré (pour revue : Roth and Roth, 2000). Mais la découverte récente de transcrits anti-sens (Bolland et al., 2004)(**Fig. 29**), produits après réarrangement D-J et qui disparaissent après un réarrangement V-DJ, suggère des niveaux de régulation plus complexe de l'accessibilité des RSS.

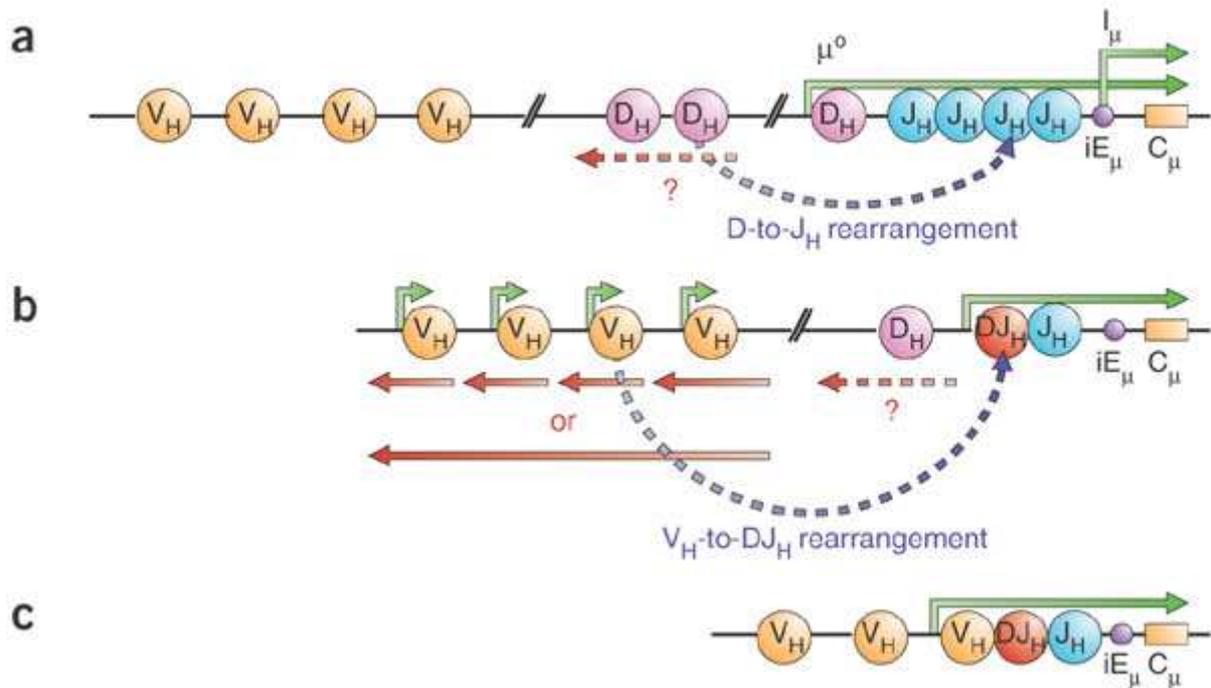


Figure 29 : Réarrangements et transcription au sein du locus IgH au cours du développement. **(a)** Au stade pro-B précoce, des transcrits germinaux (flèches vertes) sont présents dans la région des gènes D-J-C en même temps que se fait la recombinaison D-J (flèche bleue discontinue). Les transcrits μ^0 sont initiés à partir d'un promoteur situé juste en amont du segment D_H le plus en aval alors que les transcrits I_μ sont initiés à partir du promoteur/activateur iE_μ. Il n'y a pas de transcrits germinaux au niveau des segments D_H plus en amont et des segments V_H. A ce stade, on ne sait pas s'il existe des transcrits germinaux anti-sens au niveau des segments D_H (flèches rouges discontinues). **(b)** Dans les pro-B tardifs, en même temps que le réarrangement V à DJ_H (flèche bleue discontinue), les segments V_H et le complexe DJ_H réarrangé sont transcrits (flèches vertes), mais pas les segments D_H en amont. A ce stade, des transcrits germinaux anti-sens (flèches rouges continues) sont initiés à partir des promoteurs en aval de chaque segment V_H et s'étendent le long de ces segments. **(c)** Aux stades pré-B et B mature, les exons VDJ_H assemblés sont transcrits à partir du promoteur V_H (flèche verte), mais aucun transcrit sens ou anti-sens n'est présent au niveau des segments V_H en amont. (D'après Giallourakis et al., 2004).

Un autre niveau de complexité apparaît quand on essaie de corrélérer la structure chromatinienne avec la dynamique du locus au cours du développement. En effet, il a été montré que le locus IgH était localisé en périphérie du noyau dans les progéniteurs hématopoïétiques et les cellules non-B. Cette localisation est généralement corrélée avec l'hétérochromatine. Au stade pro-B, le locus migre vers le centre du noyau où l'environnement serait plus favorable à la transcription et à la recombinaison. Ainsi, des boucles se formeraient avec l'aspect d'une structure compacte rapprochant les segments VH de la région DH et JH (Kosak et al., 2002 ; Roldan et al., 2005 ; Sayegh et al., 2005). Ces structures compactes sont absentes dans les cellules pro-B Pax5^{-/-} suggérant un rôle du produit de ce gène dans la compaction du locus IgH (Fuxa et al., 2004). La dynamique des loci IgH et Igκ a également été corrélée avec l'exclusion allélique : l'allèle exclu serait relocalisé vers la périphérie du noyau (Goldmit et al., 2005 ; Roldan et al., 2005).

Un modèle qui essaie de rendre compte de tous ces phénomènes a été proposé par R. Sen (pour revue : Sen, 2005) et est récapitulé dans la **figure 30**.

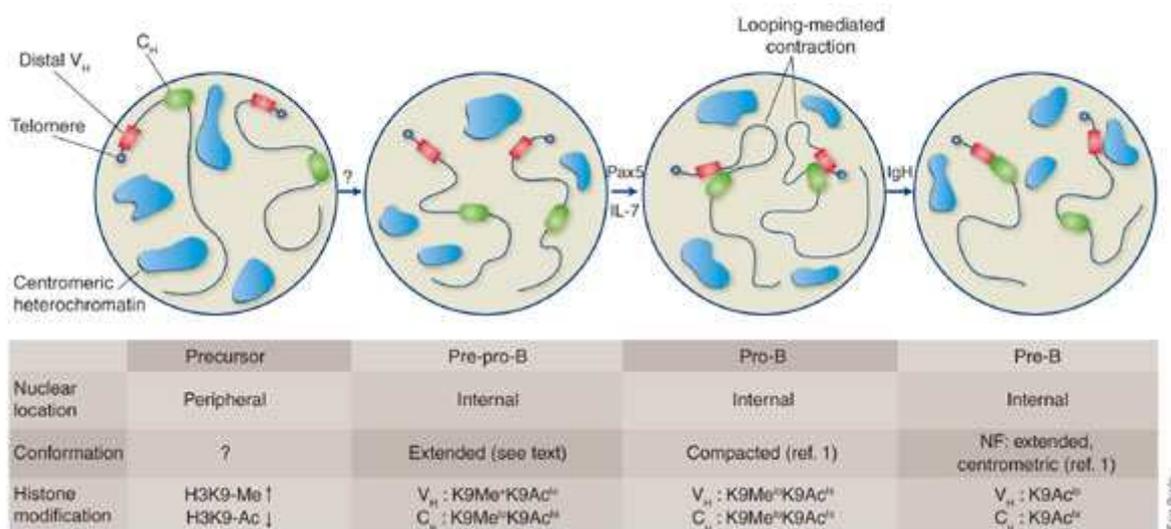


Figure 30 : Localisation nucléaire et structure de la chromatine au cours de l'ontogénie B.

Au stade des précurseurs des cellules B, les segments V_H en position distale sont localisés en périphérie du noyau et sont constitués d'histones inactives. Le passage au stade pré-pro-B est accompagné d'un déplacement vers le centre du noyau, de modifications des histones activant C_H et partiellement les gènes V_H. Ce stade, où a lieu la recombinaison D_H à J_H ne nécessite pas Pax5. La progression au stade pro-B, où se produisent la plupart des réarrangements V_H, nécessite Pax5 et IL7. Ces 2 facteurs combinés conduisent à la perte des histones méthylées H3K9me₂ et l'augmentation de l'acétylation des histones H3 et H4 ; le locus se compacte (les régions V_H et C_H se rapprochent en formant une boucle). Ces cellules qui produisent une IgH se différencient en pré-B où l'acétylation des histones des gènes V_H est réduite. L'allèle non fonctionnel est dans une conformation étendue et à proximité de l'hétérochromatine centromérique (en bleu) (D'après Sen, 2005).

5.4. La région régulatrice en 3' du locus

$E\mu$ fut le premier élément *cis*-activateur du locus IgH à être identifié et fut longtemps considéré comme l'élément majeur du locus. Cependant, plusieurs données suggéraient qu'il pouvait exister d'autres éléments capables d'activer l'expression du locus. Certaines lignées cellulaires B ayant perdu l'élément $E\mu$ sont capables d'exprimer leurs gènes d'Ig (Klein et al., 1984 ; Wabl and Burrows, 1984 ; Aguilera et al., 1985 ; Eckhardt and Birshstein, 1985). De même, certaines translocations de l'oncogène *c-myc* au locus IgH permettent la surexpression de l'oncogène même lorsque la translocation cause la disparition de $E\mu$ (Neuberger and Calabi, 1983). Une large délétion de la région située en aval du gène α (l'élément $E\mu$ étant conservé), associée à une diminution de la transcription du gène α , faisait de cette région une candidate pour contenir des éléments *cis*-modulateurs (Gregor and Morrison, 1986).

Chez le rat, un élément activateur B-spécifique fut identifié ~25 kb en 3' de $C\alpha$ et appelé IgH 3' α E (Pettersson et al., 1990) ; son équivalent chez la souris se trouve ~16 kb en 3' de $C\alpha$ (Davariach et al., 1991 ; Lieberson et al., 1991) et orienté en sens inverse, mais contient des séquences très homologues au « core enhancer » de l'activateur de rat. De plus, des séquences en orientation inversée bordent cet élément chez les deux espèces. Ultérieurement, un activateur plus faible appelé $C\alpha$ 3'E fut localisé à 2 kb en 3' de l'exon de membrane α (Matthias and Baltimore, 1993). L'exploration de la région 3' α murine par la recherche de zones d'hypersensibilité à la DNase I a permis de superposer ces régions hs à des éléments décrits comme *cis*-activateurs. Ainsi l'élément IgH 3' α E a pu être confondu avec les sites hs1 et 2 situés eux aussi 16 kb en 3' du gène α (Gianini et al., 1993 ; Madisen and Groudine, 1994 ; Michaelson et al., 1995), deux autres activateurs hs3 et hs4 furent de la même façon identifiés respectivement ~29 et ~33 kb en 3' de $C\alpha$.

Le séquençage plus large des régions 3'IgH a plus tard révélé une structure globalement palindromique contenant de longues séquences en répétitions inversées qui flanquent l'élément 3' α E (hs1 et 2), centre de cet immense palindrome, le plus grand jamais décrit chez les mammifères (Chauveau and Cogné, 1996). L'élément proximal $C\alpha$ 3'E (Mathias and Baltimore, 1993) se trouve être l'homologue inverse de l'élément hs3. Pour plus de clarté, la terminologie suivante (Saleque et al., 1997) sera adoptée pour les enhancers de la région 3' α de souris (de 5' vers 3') : $C\alpha$ 3'E : hs3a ; IgH 3'E : hs1,2 ; hs3 : hs3b et hs4, et

pour la région englobant les quatre enhancers : 3'RR. Récemment, trois nouveaux sites hs, hs5, hs6 et hs7, sans activité enhancer, ont été décrits en aval de hs4 (Garrett et al., 2005) (**Fig. 31**).

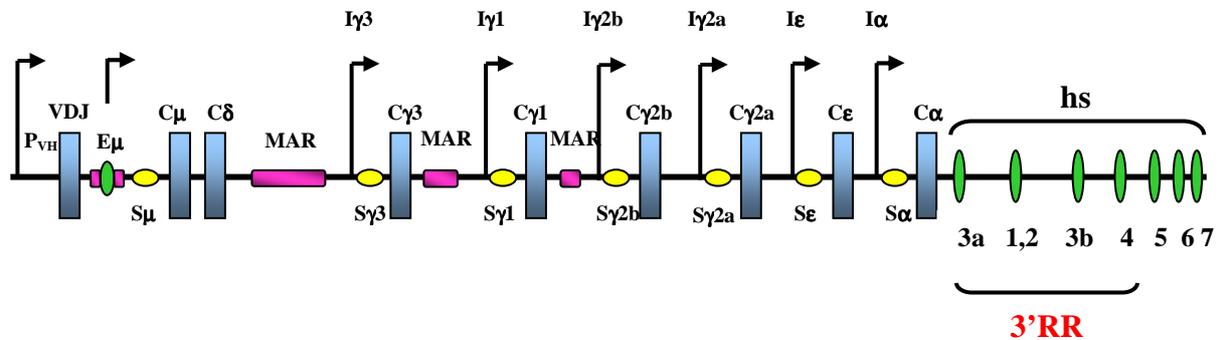


Figure 31 : Localisation des sites hypersensibles (hs) à la DNaseI en 3' du locus IgH. 7 sites hs ont été identifiés en 3' du locus IgH dont 4 (les plus en amont) ont des propriétés activatrices (hs3a ; hs1,2 ; hs3b et hs4) et forment la 3'RR. Il n'a pas encore été démontré de propriété activatrice pour hs5, hs6 et hs7.

5.4.1. Activité de la 3'RR au cours du développement B

L'activité de cette région a été abordée par transfection de lignées cellulaires B, par des modèles transgéniques et par KO. Les modèles KO seront décrits plus loin.

L'enhancer hs1,2 de rat fut décrit comme actif aux stades B tardifs, jusqu'au plasmocyte où son activité est maximale (Pettersson et al., 1990). L'élément hs1,2 de souris ne semble également actif qu'aux stades tardifs mais avec une activité moindre au stade plasmocyte. (Davariach et al., 1991 ; Lieberon et al., 1991).

Des souris transgéniques contenant un gène rapporteur sous la dépendance de hs1,2 de souris montrent une expression importante dans les cellules B activées. Cependant la spécificité B de cet élément pris isolément n'est pas complète, puisqu'une expression aberrante faible a été constatée dans d'autres tissus comme le thymus, le cœur et le rein (Arulampalam et al., 1994 ; Andersson et al., 1999).

Les éléments hs3a et hs3b sont des enhancers plus faibles en expression transitoire (5 à 15% de l'activité de E_μ), leur activité n'est détectée qu'au stade B mature et plasmocyte (Matthias and Baltimore, 1993 ; Madisen and Groudine, 1994).

Le dernier élément de la 3'RR, hs4, est également considéré comme assez faible mais son activité se retrouve tout au long du développement B, depuis le stade pro-B jusqu'au plasmocyte (Madisen and Groudine, 1994 ; Michaelson et al., 1995).

5.4.2. Protéines se liant à la 3'RR

La 3'RR du locus IgH est la cible de nombreux facteurs *trans*-modulateurs. La fixation de ces facteurs *trans* sur des régions d'ADN plus ou moins conservées (selon les facteurs) a fait l'objet de nombreuses études fonctionnelles. Notons également que 3'RR contient un grand nombre de séquences consensuelles correspondant à des sites potentiels de fixation de facteurs agissant en *trans* (Fig. 32).



Figure 32 : Schéma des sites de fixation identifiés dans les régions Eμ et 3'RR du locus IgH. Les symboles noirs correspondent aux sites de fixation qui ont été caractérisés biochimiquement et fonctionnellement, les symboles blancs représentent les sites fixant des facteurs *trans* d'après une homologie de séquence. IR signale les séquences répétées et inversées qui encadrent le core de l'activateur hs1,2 chez le rat et la souris (D'après Khamlichi et al., 2000).

5.4.2.1. Protéines se fixant à hs3

Deux octamères imparfaits ont été décrits comme liant avec une assez faible affinité les facteurs de transcription Oct-1 et Oct-2 (Matthias and Baltimore, 1993), aucune coopération entre les facteurs Oct n'a pu être montrée.

Les éléments hs3a et hs3b (qui sont à 97 % identiques mais orientés de façon inverse) sont la cible, au niveau de sites MARE, de facteurs de la famille Maf. Les protéines de la famille Maf constituent d'importants régulateurs de la différenciation cellulaire. Ces protéines contenant un domaine riche en leucine (« basic leucine zipper » ou bZip) sont capables de fixer d'autres protéines mais aussi de se fixer à l'ADN. Les petites protéines de la famille Maf telles que MafF, MafG et MafK ne possèdent que le domaine bZip (elles n'ont pas le domaine transactivateur canonique N-terminal que seules les grandes protéines de la famille Maf possèdent). Les protéines Maf peuvent se combiner à d'autres protéines et se fixer aux sites MARE *in vitro* (pour revue : Blank et Andrews, 1997).

Quelques protéines sont connues pour former des hétérodimères avec les petites protéines Maf et sont également capables de se fixer aux MARE *in vitro* ; parmi ces protéines on trouve le facteur de transcription Bach2 dont l'expression est restreinte à la lignée B et au cerveau. Dans les cellules B, Bach2 est exprimé aux stades précoces de la différenciation B, son expression diminue progressivement pendant la maturation et semble totalement éteinte au stade plasmocyte (Muto et al., 1998). La production de souris déficientes en Bach2 a montré un rôle majeur joué par cette protéine dans la SHM et la CSR et confirmé qu'il n'était pas indispensable à la différenciation plasmocytaire (Muto et al., 2004).

5.4.2.2. Protéines se fixant à hs1,2

L'enhancer hs1,2 a fait l'objet de nombreuses investigations quand à son occupation par des protéines liant l'ADN au cours de l'ontogénie B. L'élément hs1,2 du rat a été divisé en trois parties A, B et C (**Fig. 32**), les activités ont été recherchées dans un système utilisant le gène rapporteur de la β -globine (Grant et al., 1992). L'activité des domaines A et B est restreinte à la lignée lymphoïde B. La délétion du site Oct du domaine A ou de l'activateur complet n'abolit pas l'activité de hs1,2. Le domaine B contient trois motifs $\mu 1$, μA et un motif

proche du motif μB ($\psi\mu B$), la délétion de $\mu 1$ supprime l'activité du domaine B, alors que la suppression des domaines μA ou $\psi\mu B$ a des effets moindres (Grant et al., 1992). Le domaine C contient un motif $\mu E3$ mais son activité n'est pas spécifique de la lignée lymphoïde. Les motifs $\psi\mu B$ et μA ont été supposés fixer des protéines de la famille Ets. Cette étude montre que *hs1,2* fixe à la fois des facteurs *trans*-activateurs ubiquitaires et des facteurs B-spécifiques, se liant notamment aux motifs Oct, μA et $\psi\mu B$ (Grant et al., 1992). L'importance des facteurs Oct, et notamment le facteur Oct-2, a été démontrée pour l'activité de l'élément *hs1,2* mais aussi pour l'activité de la 3'RR dans sa globalité (Tang et al., 1999).

Dans l'élément *hs1,2* de souris, un motif $\mu E5$ a été identifié jouxtant l'élément $\mu E1$. Ce site $\mu E5$ semble jouer un rôle important puisque sa mutation diminue l'effet activateur de *hs1,2* et il est capable, lorsqu'il est placé en copies multiples devant un gène rapporteur, d'induire l'expression dans une lignée plasmocytaire (Meyer et al., 1995). Cet élément fixe les protéines E12 et E47, membres de la famille bHLH qui sont soumises à une régulation par les répresseurs de la famille Id, comme Id3 qui n'est exprimé qu'aux stades pré-B et B. Les auteurs proposent un rôle inhibiteur de la protéine Id3 aux stades précoces de l'ontogénie B, empêchant la fixation du complexe E12/E47 au motif $\mu E5$ (Meyer et al., 1995).

Dans le domaine B de l'élément *hs1,2* de souris ont été identifiés des sites de fixation du facteur NF- κB (protéine de la famille Rel) et, jouxtant celui-ci, un site fixant le facteur NFE (protéine de la famille Ets, homologue du facteur se fixant sur l'élément μB de l'activateur de rat) (Michaelson et al., 1996 ; Linderson et al., 1997). La mutation de l'un ou de l'autre de ces sites diminue très nettement l'activité de *hs1,2* sur un gène rapporteur, dans des lignées plasmocytaires (Michaelson et al., 1996 ; Linderson et al., 1997) alors que l'effet inverse est observé pour la mutation du site κB dans des lignées B matures, suggérant un rôle répresseur du site κB aux stades précoces, puis activateur au stade plasmocyte (Michaelson et al., 1996). Les facteurs nucléaires se fixant au site κB ont été identifiés : p50, p65 et c-Rel (Michaelson et al., 1996 ; Linderson et al., 1997). Au stade plasmocytaire, le facteur NFE fixé à proximité aurait un effet synergique aux facteurs p50 et c-Rel fixés au site κB (Linderson et al., 1997).

Parmi tous les facteurs se fixant la 3'RR, les facteurs BSAP (pour « B-cell specific activation protein », produits du gène *Pax-5*), ont probablement été les plus étudiés. L'analyse détaillée de l'expression du gène *Pax5* a montré que ce dernier pouvait présenter, par le biais d'épissages alternatifs, quatre types de messagers différents (*Pax5a*, *Pax5b*, *Pax5d* et *Pax5e*). Le messager *Pax-5a* est exprimé aux stades précoces de la différenciation B mais non au stade plasmocyte; l'isotype *Pax-5b* serait quand à lui restreint aux cellules B matures, les conséquences de l'expression des différents messagers de *Pax5* n'ont toutefois pas encore été définies (Zwollo et al., 1997).

Les souris KO pour le gène *Pax-5* sont incapables de survivre au delà de trois semaines, elles présentent un blocage complet du développement B à la transition pré-BI→ pré-BII (Urbánek et al., 1994). La recombinaison V_HDJ_H semble dramatiquement diminuée (Urbánek et al., 1994 ; Nutt et al., 1997), ces cellules pré-BI ont de plus les caractéristiques remarquables de pouvoir se renouveler et de se différencier vers des lignées non-B (T ou macrophagique) (pour revue : Rolink et al., 2000). Ces résultats mettent en évidence le rôle important de BSAP pour l'ontogenèse cellulaire B (dans le foie fœtal et la moelle osseuse) et l'engagement irréversible vers la voie de différenciation B (Rolink et al., 2000).

Ces protéines semblent fonctionner soit en activant soit en réprimant des gènes : elles régulent positivement les gènes *mb-1*, *CD19*, *N-myc* et *LEF-1* et répriment la protéine de surface *PD-I* et la chaîne *J* (Fitzsimmons et al., 1996 ; Rinkenberger et al., 1996 ; Nutt et al., 1998). De nombreux gènes restreints à la lignée lymphoïde B possèdent des sites de fixation pour BSAP dans leurs promoteurs (*CD19*, $\lambda 5$, *Vpré-B* et *Blk*, etc...) ; cependant, à l'exception de *CD19*, l'expression de ces gènes semble tout à fait normale dans les animaux déficients pour BSAP (Nutt et al., 1997).

Après leur mise en évidence dans des régions S, des sites de fixation de BSAP ont donc été démontrés dans la 3'RR. Une région capable de fixer BSAP fut tout d'abord identifiée en 5' de *hs1,2* mais son importance fonctionnelle n'a jamais été étudiée (Liao et al., 1992). Par la suite, deux équipes ont montré que le domaine A de l'activateur de souris contenait deux sites capables de fixer BSAP avec des affinités différentes (Singh and Birshstein, 1993 ; Neurath et al., 1994). Plusieurs auteurs ont montré que l'expression de BSAP était restreinte aux stades précoces de l'ontogénie B, et que le rôle de BSAP pourrait être la répression de *hs1,2* à ces stades précoces.

Dans des essais utilisant des gènes rapporteurs sous le contrôle de *hs1,2*, la mutation du site de fixation pour BSAP entraîne une augmentation de l'effet activateur dans des lignées B, alors que cette mutation est sans effet dans des lignées plasmocytaires (Singh et Birshstein, 1993). De la même façon, une étude dans la lignée plasmocytaire MOPC-15 (qui n'exprime pas BSAP) montre, dans des expériences de co-transfection, que l'expression de BSAP régule négativement l'activateur *hs1,2* (Neurath et al., 1994).

Si l'activité de *hs1,2* semble globalement réprimée par les facteurs BSAP, des constructions utilisant les sites a et b montrent que ces sites BSAP ne suffisent pas à eux seuls à expliquer la répression. Des régions flanquant les sites BSAP a et b sont capables de fixer les facteurs Oct (pour la région en 5' du site a) et NF- κ B et en 3' du site b, une protéine liant un motif riche en G (Singh et Birshstein, 1996 ; Michaelson et al., 1996). La mutation de l'un ou l'autre de ces motifs entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle dans les lignées B (Singh et Birshstein, 1996 ; Michaelson et al., 1996). Des mutations combinées des sites flanquants démontrent cependant que les sites BSAP sont nécessaires à la répression. Après que la fixation des facteurs Oct-1 et Oct-2 ait été démontrée au site Octamère, les auteurs ont proposé l'existence d'une interaction entre la protéine BSAP et le domaine POU des facteurs Oct-1 et Oct-2 (Singh and Birshstein, 1996).

Les protéines BSAP exerceraient un rôle répresseur sur l'élément *hs1,2* *via* des interactions avec d'autres facteurs modulateurs fixés à proximité, ou en empêchant, par compétition, la fixation d'autres facteurs aux stades cellulaires B précoces.

5.4.2.3. Protéines se fixant à *hs4*

A l'inverse de *hs3* ou de *hs1,2*, l'élément *hs4* est détecté comme actif depuis les stades précoces (pré-B) jusqu'au plasmocyte. Dans cet élément, on trouve plusieurs sites BSAP, deux sites Oct et un site κ B dans une configuration groupée (Michaelson et al., 1996). La fixation des facteurs BSAP à *hs4* a pu être détectée aux stades précoces (pré-B et B) mais pas au stade plasmocytaire ; le facteur Oct-1 semble se fixer au site octamère aux stades pré-B et B seulement (et non le facteur Oct-2 qui lui, se fixe sur *hs1,2*) ; un complexe similaire au

complexe NF- κ B (fixé au site κ B) est détecté quand à lui du stade pré-B jusqu'au plasmocyte (Michaelson et al., 1996).

Dans des systèmes utilisant des gènes rapporteurs en expression transitoire, des mutations dans les sites BSAP, Oct ou κ B diminuent l'activité de hs4 dans les lignées B (Michaelson et al., 1996). Dans une lignée pré-B, alors que les mutations effectuées dans les sites κ B et Oct diminuent très significativement l'activité de hs4 (κ B semble être un site essentiel pour l'activation de hs4), une mutation du site BSAP conduit à un doublement de l'activité transcriptionnelle (Michaelson et al., 1996). Le rôle des facteurs BSAP semble donc double, répresseur au stade pré-B puis activateur au stade B mature.

5.4.3. Fonctions attribuées à la 3'RR

Bien que la 3'RR soit actuellement le sujet d'étude de plusieurs équipes, sa fonction n'est pas encore clairement établie et un certain nombre de questions restent en suspens. Cette région peut-elle interagir avec d'autres éléments situés plus en amont sur le locus ? Si ces interactions existent, comment peuvent-elles affecter les processus physiologiques tels que les recombinaisons V(D)J, la transcription, la SHM ou la CSR ? Dans ce chapitre seront résumés les modèles développés pour tenter de répondre à ces questions.

5.4.3.1. Réplication

La description de la région contenant E_{μ} comme étant une origine de réplication (Ariizumi et al., 1993) laissait envisager qu'il en soit de même pour la 3'RR : il a été suggéré que le locus IgH faisait partie d'un unique réplicon ayant pour point de départ la région située en 3' de C_{α} , la réplication se poursuivant vers les gènes en amont. Dans les cellules non-B, C_{α} semble en effet se répliquer très précocement alors que les autres régions C_H se répliquent progressivement dans le temps (Brown et al., 1987 ; Ermakova et al., 1999). Au contraire, dans les cellules B, tous les gènes C_H se répliquent très précocement, au tout début de la phase S. Des études sur la réplication dans une lignée B de souris suggèrent que des séquences en aval du gène C_{α} sont impliquées dans la régulation de ce processus, au tout début de la phase S (Brown et al., 1987 ; Ermakova et al., 1999). Cependant, le maintien d'une même

chronologie de la réplication constaté dans la lignée murine, LP1-2, portant une délétion pour la 3'RR, exclut un rôle de cette région dans le contrôle de la réplication (Michaelson et al., 1997). Pour l'instant aucun argument ne prouve l'implication de la 3'RR dans la régulation de la réplication de l'ADN, et il semble que l'initiation précoce de la réplication débute au niveau de régions situées en aval de la 3'RR, et que des changements dans l'initiation de la réplication se produisent au cours du développement B sur les deux allèles (Michaelson et al., 1997 ; Ermakova et al., 1999 ; Norio et al., 2005).

5.4.3.2. Hypermutation somatique

L'association de E μ et de hs1,2 n'induit pas de SHM d'un transgène IgH dans plusieurs lignées cellulaires ou *in vivo* chez l'animal (Thumas-Brundage et al., 1997), les résultats d'autres auteurs (Lin et al., 1998) obtenus par transfection de cellules B cultivées semblent confirmer cette hypothèse. Chez les souris délétées de hs3b/hs4 (Pinaud et al., 2001), la SHM n'est pas altérée (Morvan et al., 2003) excluant un rôle majeur de cette région dans ce processus.

5.4.3.3. Transcription GL et CSR

Le premier KO a consisté en un remplacement de hs1,2 par un gène *neo^r* (Cogné et al., 1994). A l'état homozygote, la stimulation des splénocytes *in vitro* montre que cette mutation diminue considérablement la transcription GL des gènes $\gamma 3$, $\gamma 2b$, $\gamma 2a$ et ϵ et par conséquent la CSR vers les isotypes IgG3, IgG2b, IgG2a et IgE. *In vivo*, on constate une diminution des IgG3 et IgG2b sériques alors que les IgG2a et IgA sont normalement présentes, indiquant que seules certaines voies de stimulation de la CSR sont perturbées (notamment celles déclenchées par le LPS). Chez ces animaux, les isotypes IgM et IgG1 ne sont pas affectés aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Cogné et al., 1994).

L'élément hs1,2 est maintenant connu pour fixer des protéines de la famille NF- κ B ; la recherche de cette fixation a été faite à cause de l'analogie entre le phénotype des animaux portant un remplacement de hs1,2 et ceux déficients pour les différentes protéines de cette famille (pou revue : Gosh et al., 1998). Dans les souris déficientes pour la protéine p50, on observe une diminution des isotypes sériques IgG1, IgE et IgA (Sha et al., 1995) alors qu'*in vitro* les cellules B de ces souris sont capables de commuter normalement vers IgG1 mais de

façon diminuée vers IgG3, IgE et IgA. Les défauts de transcription GL vont dans le sens du défaut de CSR, à l'exception d'IgA pour lequel les transcrits GL C α sont subnormaux (Snapper et al., 1996).

Les lymphocytes B provenant de souris KO pour le facteur RelB ne montrent aucun défaut de CSR (Snapper et al., 1996), par contre on observe *in vivo* une diminution sévère des IgG1 et IgG2a (Köntgen et al., 1995). Une mutation plus ciblée, dans le domaine de transactivation C-terminal, de la protéine c-Rel provoque l'incapacité des cellules B à commuter vers IgG1, IgG3 et IgE ; on note également que dans ce cas, le défaut de CSR vers IgE ne s'accompagne pas de la diminution des transcrits C ϵ (Zelazowski et al., 1997, pour revue : Snapper et al., 1997). Pour RelA (appelée aussi p65), une autre protéine de la famille NF- κ B, la suppression provoque une diminution des IgG3 et IgA sériques (Doi et al., 1997) et un défaut de CSR vers IgG3 *in vitro* associé à une diminution des transcrits GL γ 3 (Horwitz et al., 1999).

La suppression des différentes protéines de la famille NF- κ B semble affecter l'expression des Ig différemment selon le facteur ciblé mais ces diminutions de CSR ne s'accompagnent pas systématiquement d'un défaut de transcription GL. La présence de sites capables de fixer NF- κ B dans hs1,2 et hs4 fait de ce facteur un régulateur global et essentiel de 3'RR, impliqué dans les processus de CSR et de transcription GL. Cependant, outre l'action directe, il est probable que l'action pléiotrope exercée par NF- κ B (par exemple en régulant négativement la synthèse de certaines cytokines ou autres molécules) lui permette d'agir indirectement sur la CSR.

Il faut noter qu'en l'absence de transcription GL, il n'y a pas de CSR. Par contre, la présence d'une transcription GL n'est pas suffisante pour une CSR optimale (Bottaro et al., 1994). Cependant, dans cette étude, la région I ϵ (promoteur et exon) a été remplacée par une cassette *neo^r*-E μ -P_{VH} déléant du même coup le site donneur d'épissage.

Il est tentant de penser que les mécanismes de régulation par la 3'RR se rapprochent de ceux, très étudiés, de la LCR de la β -globine (pour revue : Martin et al., 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 un gène *neo^r* provoque de sévères anomalies qui disparaissent totalement lorsque

le gène de sélection est éliminé (Fiering et al., 1995 ; Hug et al., 1996). Il était donc important de savoir si un effet similaire pouvait être obtenu après la délétion « propre » d'éléments 3' IgH. Les remplacements respectifs de hs1,2 et de hs3a par le gène *neo^r* flanqué de deux sites *loxP* ont été réalisés, le phénotype observé pour le remplacement de hs3a par *neo^r* s'est avéré tout à fait similaire à celui du remplacement de hs1,2, avec le même défaut de CSR (Cogné et al., 1994 ; Manis et al., 1998a). La suppression du marqueur de sélection a, comme pour la LCR de la β -globine, permis la restauration d'un phénotype tout à fait normal (Manis et al., 1998a), assignant ainsi un rôle mineur et/ou redondant des éléments proximaux de la 3'RR dans la CSR.

Comment la mutation de hs1,2 affecte-t-elle la CSR ? La première hypothèse proposée est un défaut de l'accessibilité des régions S, pouvant être lié à l'inhibition de la transcription GL ou à une perturbation du remodelage de la chromatine qui précède normalement la CSR. Des phénomènes de compétition entre promoteurs pourraient notamment survenir à distance ; ainsi le promoteur du gène *neo^r* inséré dans le locus pourrait priver certains promoteurs GL de facteurs de transcription (Cogné et al., 1994). Alternativement, le gène *neo^r* ou son promoteur, pourrait jouer un rôle d'insulateur et empêcher la propagation, de proche en proche le long du locus, d'influences activatrices provenant de la partie la plus en aval de la 3'RR.

L'hypothèse d'un effet polarisé de la 3'RR est née après les expériences de KO insérant le gène *neo^r* en remplacement du promoteur *I γ 2b* ou des exons *C ϵ* (Seidl et al., 1999). Dans le premier cas la transcription GL et la CSR vers γ 3 sont bloquées et dans les autres cas le blocage affecte *C γ 3*, *C γ 2b* et *C γ 2a* ; dans tous les cas, les recombinaisons vers *C γ 1* et *C α* ne sont quasiment pas affectées. Ces résultats peuvent être interprétés comme un blocage, par le gène *neo^r* de l'activation à distance de la transcription GL par la 3'RR. La compétition entre le promoteur du gène *neo^r* et les différents promoteurs GL n'affecterait ainsi que les gènes en amont du site d'insertion, les gènes en aval de l'insertion pourraient, quant à eux, subir une activation par la 3'RR (Seidl et al., 1999).

Toujours dans l'hypothèse de l'accessibilité des régions C, un rôle défini de chacun des différents enhanceurs 3' a été proposé. Dans ce modèle, les enhanceurs 3' agiraient alternativement grâce à la formation de boucles sur le locus, permettant une interaction physique directe entre un enhanceur et tel ou tel promoteur rendu accessible selon les stimuli

(Arulampalam et al., 1997). Un tel modèle « looping » a été également proposé pour l'expression des gènes du locus de la β -globine (pour revue : Bulger and Groudine, 1999). La recombinaison pourrait être facilitée par l'existence de ces boucles d'ADN dont la formation serait favorisée par l'amarrage du locus au niveau de ses régions MAR (Cockerill et al., 1990) ; cependant aucune MAR n'a encore été identifiée dans la 3'RR ou en aval de celle-ci.

A propos de l'effet polarisé, on note toutefois que l'effet inhibiteur d'un gène *neo^r* sur les isotypes en amont n'est pas toujours aussi manifeste, en particulier lorsque *neo^r* est sous le contrôle de l'association enhancer du polyoma virus-promoteur de la thymidine kinase (Jung et al., 1993 ; Zhang et al., 1993) ou la combinaison E μ -promoteur V_H (Bottaro et al., 1994). L'effet du promoteur du gène *neo^r* semble être un fait constant : des auteurs ayant utilisé ce promoteur associé au gène de l'HPRT en remplacement du promoteur I α ont observé un défaut de CSR aux IgG (Harriman et al., 1996 ; Qiu et al., 1999). Une délétion plus large remplaçant I α , S α et la partie 5' de C α par une cassette *neo^r* montre, dans le sérum des souris, une augmentation des IgG1 et IgG2b et une diminution des IgG3 et pas de variation pour IgG2a, mais aucune donnée de stimulation *in vitro* n'a été rapportée dans cette étude (Harriman et al., 1999).

Un autre point mérite d'être noté à propos des remplacements par le gène *neo^r* au sein du locus IgH. Curieusement, le gène *neo^r* semble inductible par le LPS lorsqu'il est placé au sein du locus IgH (Manis et al., 1998a ; Seidl et al., 1998). 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 GL après stimulation par le LPS. Les candidats potentiels peuvent être les éléments hs3b et hs4. Il est peu probable que hs3b joue à lui seul un rôle déterminant, cet enhancer faible est un homologue à 97% mais en position inversée de hs3a (Chauveau and Cogné, 1996) dont la délétion ne donne aucun phénotype (Manis et al., 1998a). De plus le locus humain ne comprend pas d'élément hs3b et voit ses gènes de HC parfaitement bien exprimés. Ainsi hs4, le plus distal de la 3'RR, pourrait être l'élément clé, puisqu'il n'a pas été décrit jusqu'alors d'enhancers plus en 3'.

De fait, la délétion conjointe de hs3b/hs4 aboutit à une diminution de la CSR à tous les isotypes sauf IgG1 dont la diminution est moins marquée. Cet effet sur la CSR s'accompagne d'une diminution de la transcription GL des isotypes affectés. Là aussi, le remplacement de

hs3b/hs4 par *neo^r*, inductible par le LPS, a un effet plus drastique que la délétion propre (Pinaud et al., 2001). Ces résultats montrent que la partie distale de la 3'RR est requise pour la transcription GL et la CSR vers la plupart des isotypes avec peut-être un rôle primordial pour hs4. Cependant, deux données suggèrent que la situation pourrait être plus complexe. 1) dans le cadre du modèle de l'effet polarisé, l'effet prononcé de la mutation de remplacement est difficile à expliquer à moins de supposer que d'autres enhancers existent en aval de hs4, 2) l'insertion d'un gène *neo^r* en aval de hs4 n'a aucun effet sur la CSR ou sur la transcription GL, pourtant ce gène est toujours inductible par le LPS (Manis et al., 2003).

Il se pourrait donc que l'inductibilité de *neo^r* par le LPS n'ait rien à voir avec la 3'RR. Par ailleurs, l'effet modéré de la délétion propre hs3b/hs4 pourrait suggérer un effet synergique des enhancers de la 3'RR de sorte qu'une délétion plus large ou de la totalité de la 3'RR ait un effet plus prononcé. Une indication dans ce sens vient du phénotype de souris transgéniques avec le locus IgH inséré dans des chromosomes artificiels de levure (YAC). Dans deux lignées de souris où le locus est délété de la totalité de la 3'RR, on trouve une diminution drastique de la transcription GL de tous les isotypes (Dunnick et al., 2004). Corrélativement, la délétion d'un élément pris isolément n'aurait pas de conséquence à cause de la redondance de ces éléments.

5.4.3.4. Expression du locus IgH

Dans une lignée plasmocytaire portant une délétion de E μ , le remplacement de hs1,2 par le gène *neo^r* sur l'allèle productif abolit complètement la synthèse de l'Ig ; ce résultat suggère que hs1,2 est indispensable à l'expression de la HC aux stades tardifs du développement B (Liebersohn et al., 1995). Cependant, en l'absence de E μ , une autre explication pour expliquer l'abolition de l'expression de cet allèle pourrait être le blocage de l'effet polarisé des éléments les plus distaux par le gène *neo^r*. Dans les souris hs1,2 KO ayant conservé E μ , la transcription des gènes μ , $\gamma 1$ et α est normale, seule la transcription GL de certains gènes C est affectée (Cogné et al., 1994). Un remplacement avec suppression du gène *neo^r* dans la lignée plasmocytaire permettrait, là aussi, d'affirmer ou d'infirmer le rôle de hs1,2 sur l'expression de la HC.

Dans la lignée pré-B 70Z/3, une large délétion d'environ 30 kb a éliminé une région incluant hs3a et hs1,2 (Saleque et al., 1999) ; malgré l'absence de ces deux éléments, aucune

diminution de l'expression de la chaîne μ n'a pu être constatée. Après fusion au myélome NSO, une augmentation de l'expression de la chaîne μ a été observée, signifiant que ni hs3a, ni hs1,2 ne sont nécessaires à l'expression au stade plasmocytaire. La seule présence de $E\mu$ et des deux éléments distaux hs3b et hs4 suffit à induire une forte expression de HC à ce stade. De plus, l'hybridome 70Z/3-NSO est capable spontanément de CSR vers C γ 1 (Saleque et al., 1999), suggérant que les deux premiers éléments de 3'RR ne sont pas, individuellement, nécessaires à la CSR vers IgG1, en accord avec les résultats chez les souris mutantes (Cogné et al., 1994 ; Manis et al., 1998a).

Ces observations peuvent être rapportées aux résultats obtenus avec la lignée LP1-2 dont le locus IgH présente une large délétion incluant cette fois toute la 3'RR (mais conserve là aussi $E\mu$). Dans cette lignée, on observe une diminution d'un facteur sept de la transcription du gène α en comparaison avec la lignée parentale sans délétion (Gregor and Morisson, 1986). On peut donc penser que la 3'RR, dans sa globalité, régule la transcription des gènes de HC réarrangés par le biais de coopérations entre éléments multiples et redondants. Bien que la délétion ne soit pas la même que dans la lignée 70Z/3, on peut aussi se demander si la transcription de certains gènes constants (tel α) ne dépendrait pas de la 3'RR tandis que d'autres (tel μ) en seraient indépendants.

5.4.3.5. Structure de la chromatine

La structure de la chromatine est un élément clé de la régulation de l'expression des gènes, permettant l'accessibilité des régions *cis*-modulatrices aux facteurs de transcription. Si à l'heure actuelle les éléments permettant la décondensation des structures chromatiniennes de domaines entiers ne sont pas encore totalement connus, on suppose que l'activation d'une unité transcriptionnelle implique une modification des histones (acétylation, méthylation, phosphorylation, ubiquitination, poly-ADP-ribosylation), sous l'influence des facteurs de transcription et d'autres cofacteurs (pour revue : Felsenfeld et Groudine, 2003). Un rôle des régions *cis*-activatrices dans la décondensation chromatinienne semble ainsi passer par le recrutement des histone-acétyltransferases (HAT) dans les complexes contenant les facteurs de transcription, l'acétylation des histones étant généralement liée aux gènes transcriptionnellement actifs. Certains chercheurs ont donc logiquement cherché un effet de la 3'RR et de l'acétylation des histones sur la structure chromatinienne.

Le groupe de Groudine a décrit l'association hs123b4 comme une LCR (Madisen et Groudine, 1994), il a montré que cette combinaison pouvait déréguler l'oncogène *c-myc* par le changement d'utilisation du promoteur (de P2 à P1) (Madisen et Groudine, 1994). De façon plus curieuse, cette même combinaison est capable à elle seule de conférer une forte expression de *c-myc* sans nécessairement changer de promoteur (avec un gène *c-myc* transfecté ne possédant pas le promoteur P1) (Madisen et al., 1998). Dans ce cas, l'hypersensibilité de la région à la DNase I, le degré de méthylation et la position des nucléosomes demeurent inchangés mais une immuno-précipitation de la chromatine (ChIP) montre une augmentation de l'acétylation des histones localisées sur tout le vecteur épisomal contenant hs123b4 (et pas seulement des histones associés à *c-myc*) (Madisen et al., 1998).

Après traitement par un inhibiteur des histone-désacetylases (favorisant le maintien des histones sous une forme acétylée), l'activation du promoteur P1 par hs123b4 est abolie mais le promoteur P2 reste actif. Il a été proposé que la LCR pouvait contribuer aux mécanismes de maintien d'une région dans un état transcriptionnellement actif en recrutant des facteurs et des HAT, initiant une acétylation qui se propage par la suite à toute la région environnante (Madisen et al., 1998).

Trois nouveaux hs ont été décrits en aval de hs4 : hs5, hs6 et hs7 sans activité enhancer, du moins pour hs5 et hs6 (Garrett et al., 2005). Une analyse extensive par ChIP de toute la région (de hs3a à hs 7) a révélé une ouverture progressive de la chromatine en fonction du stade de développement mais pas de la stimulation par le LPS qui est sans effet sur les modifications épigénétiques étudiées. Ainsi, hs5, hs6 et hs7 seraient les premières régions dont la chromatine est ouverte, et ce dès le stade pro-B, suivies de hs4. L'ouverture de la chromatine de hs3a, hs1,2 et hs3b est détectée à partir du stade B.

Cette ouverture de la chromatine est en fait associée à des modifications des histones. Quatre modifications épigénétiques ont été étudiées : AcH3, AcH4, H3K4me₂ (chromatine active) et H3K9me₂ (chromatine inactive). Ainsi, au stade pro-B, les trois modifications associées à une chromatine active sont détectées dans hs5, hs6 et hs7. Par contre, AcH3 n'est détectée dans hs4 qu'à partir du stade pré-B. Enfin, les transitions dans ces modifications des histones de la région hs3a, hs1,2 et hs3b sont détectées à partir du stade B. Ces modifications n'ont pas été retrouvées dans une lignée non-B (MEL : une lignée érythroleucémique murine).

Les transitions décrites sont résumées dans le tableau ci-dessous (Garrett et al., 2005)

(**Tabl. 1**) :

Histone modification	hs3A, hs1,2, and hs3B*				hs4				hs5, hs6, and hs7			
	Pro	Pre	Mat	Plas	Pro	Pre	Mat	Plas	Pro	Pre	Mat	Plas
AcH4	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H3 di-me K4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AcH3	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

* Pro, pro-B cells; Pre, pre-B cells; Mat, mature B cells; Plas, plasma cells. +, significant enhancement of the relevant modification; -, no association was detected in ChIP assays.

Tableau 1 : Modifications des histones au sein des hs en 3' du locus IgH au cours du développement B (D'après Garrett et al., 2005).

La modification H3K9me₂, associée à une chromatine inactive, a été détectée en amont de hs3a et en aval de hs7 suggérant que toute cette région forme un domaine chromatinien actif flanqué localement de chromatine inactive (Garrett et al., 2005). Cependant, cette modification n'a été étudiée qu'au stade B.

La région en aval de hs4 contient de multiples sites CTCF (voir section suivante) dont plusieurs coïncident avec hs5, hs6 et surtout hs7. Si ces trois hs ne semblent pas avoir d'activité enhancer, ils ont par contre une activité insulatrice (curieusement étudiée dans une lignée T) médiée par le facteur CTCF dont la fixation aux sites présents dans les trois hs a été démontrée (Garrett et al., 2005). Cette configuration suggère que cette région serait la frontière du locus IgH.

6. INSULATEURS

Parmi les éléments de régulation transcriptionnelle découverts récemment, on trouve des séquences d'ADN appelées insulateurs (ou isolateurs). Ces éléments ont en commun une propriété générale : leur capacité à protéger un gène (ou un groupe de gènes) des signaux émanant des séquences adjacentes. Fonctionnellement, cette protection se fait selon au moins deux modalités :

- 1) ils bloquent les interactions enhancer-promoteur *si et seulement s'ils sont situés entre ces deux éléments*, on parle de fonction de blocage (**Fig. 33**),
- 2) ils protègent les gènes contre les effets répressifs de la chromatine adjacente. Dans ce cas, on parle d'une fonction de barrière chromatinienne (Pour revue : West et al., 2002 ; Brasset and Vaury, 2005).

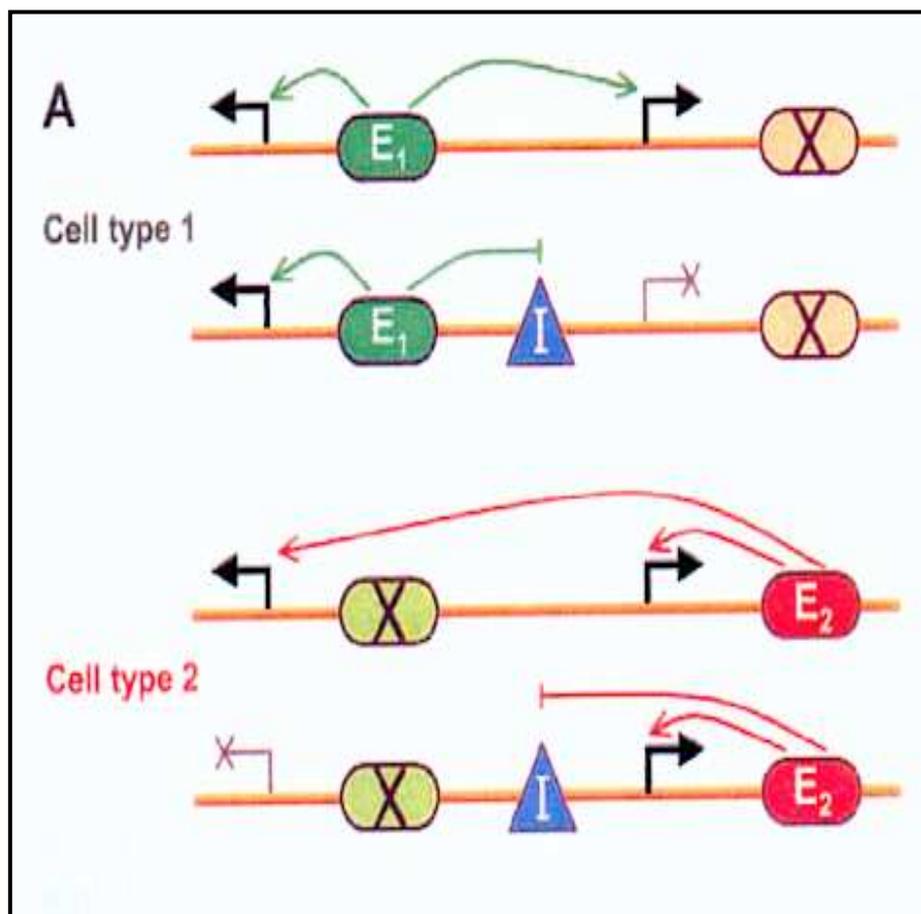


Figure 33 : Caractéristiques du blocage d'un activateur par un insulateur.

Le schéma montre deux promoteurs (flèches cassées) sous le contrôle d'activateurs spécifiques des types cellulaires 1 et 2 (E₁ et E₂ respectivement). L'isolateur (I) bloque la communication activateur-promoteur uniquement lorsqu'il est situé entre ces deux éléments (D'après West et al., 2002).

Découverts à l'origine chez la drosophile (Udvardy et al., 1985), les insulateurs ont par la suite été identifiés dans d'autres organismes, depuis la levure jusqu'à l'Homme. Ces éléments ont été localisés dans les séquences régulatrices de gènes complexes, entre deux loci adjacents ou aux limites entre la chromatine active et la chromatine inactive. Dans certains cas, ils sont co-localisés avec les MAR (Nabirochkin et al., 1998).

Au sein des séquences insulatrices, se trouvent un ou plusieurs sites hypersensibles à la DNase I, ainsi que des sites de fixation pour des protéines particulières (par exemple, la protéine *Su(Hw)* pour l'isolateur *gypsy* chez la drosophile). Ces dernières sont nécessaires au fonctionnement de ces insulateurs et possèdent des motifs en doigts de zinc.

D'autres insulateurs ont été identifiés chez les vertébrés : par exemple, au sein de la Région de Contrôle de l'Empreinte (ICR, pour Imprinting Control Region) du locus des gènes *Igf2/H19* chez la souris (Szabo et al., 2000) ou dans le locus des récepteurs des cellules T, TCR α/δ chez l'Homme (Zhong et Krangel, 1997).

Mais l'isolateur le mieux caractérisé chez les vertébrés est celui localisé à l'extrémité 5' du locus de la β -globine chez le poulet (**Fig. 34A**). Il est fonctionnel non seulement chez le poulet, mais aussi chez la drosophile, dans des lignées cellulaires humaines (Chung et al., 1993) ainsi que chez la souris (Szabo et al., 2002).

Initialement, il a été caractérisé par sa capacité à interférer avec l'activation de la transcription d'un gène rapporteur par la LCR du locus de la β -globine de poulet. Cet élément contient un site hypersensible à la DNase I appelé HS4 (Chung et al., 1993). Dans le génome, il marque une limite entre la chromatine ouverte, acétylée et sensible à la DNase I du locus de la β -globine et l'hétérochromatine plus condensée, hypoacétylée et résistante à la DNase I située en amont de la LCR (**Fig. 34A**).

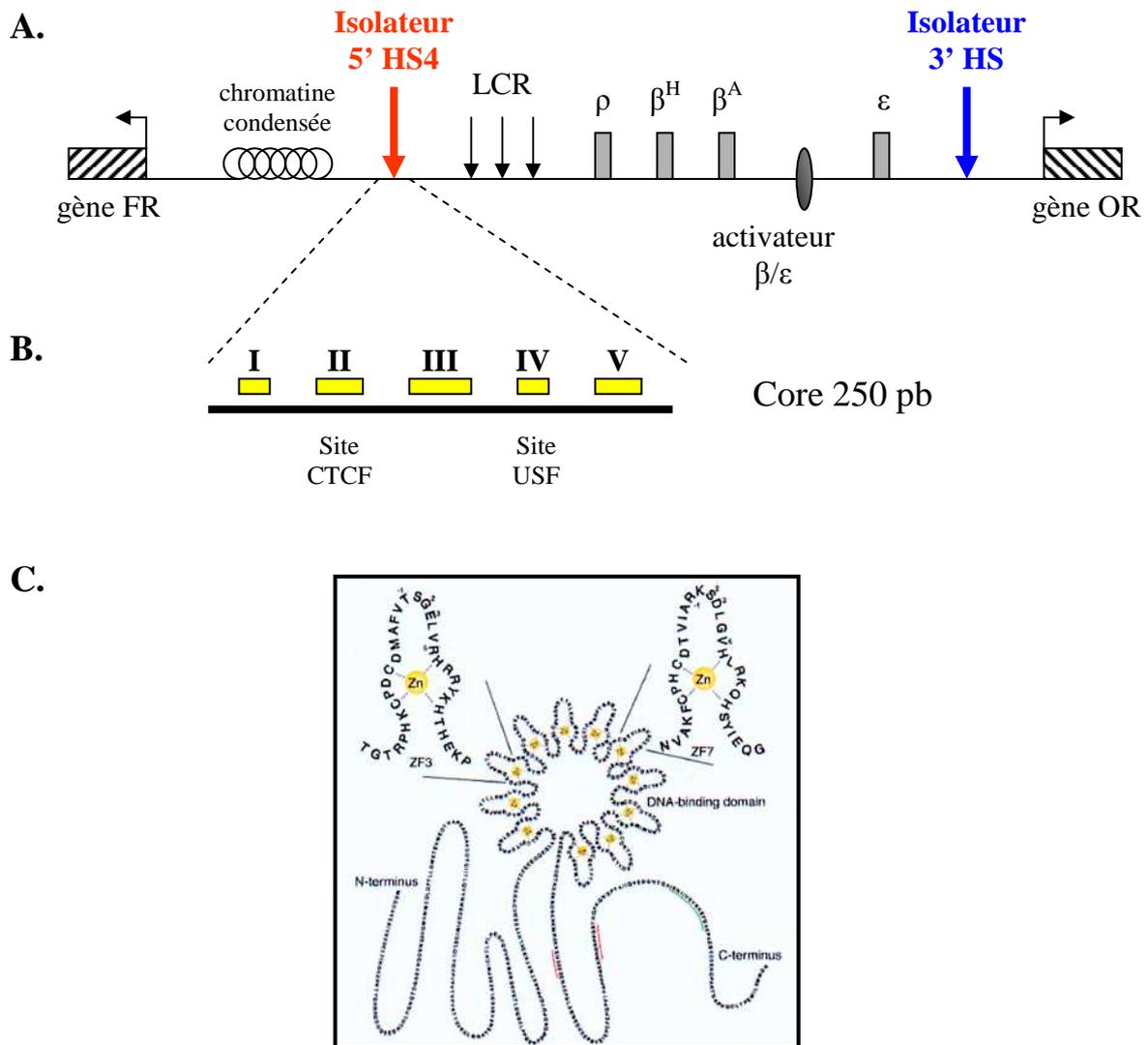


Figure 34 : Localisation et structure de l'isolateur 5' HS4 de poulet.

(A) Schéma du locus de la β -globine de poulet. Les gènes de la globine sont représentés par des rectangles gris, l'activateur β/ϵ par une ellipse grise. La LCR est localisée en amont des gènes de la β -globine. Le locus est encadré par deux isolateurs, 5' HS4 et 3' HS, il est flanqué du côté 5' d'une région de chromatine condensée et d'un gène codant un récepteur au folate (FR), et du côté 3' d'un gène d'un récepteur odorant (OR).

(B) Structure du core de l'isolateur 5' HS4 montrant le site (II) de fixation à CTCF et le site IV de fixation à USF.

(C) Représentation schématique de CTCF. Ce facteur est responsable de la fonction de blocage par l'isolateur. Le schéma montre les 11 domaines en doigts de zinc permettant la liaison de ce facteur à des sites spécifiques de l'ADN.

L'insulateur 5' de la β -globine (HS4) ne possède en soi ni activité promotrice ni activité inhibitrice ou activatrice. Il a été testé pour sa capacité à protéger un gène rapporteur contre les effets de position : lorsque ce gène est encadré par deux HS4, son expression est alors presque uniforme au sein des différentes lignées transformées. Certaines données ont associé ces effets de position à une perte de l'acétylation des histones : la présence des insulateurs empêcherait la déacétylation des histones H3 et H4. Cet insulateur agirait donc comme barrière chromatinienne soit en permettant l'acétylation des régions protégées, soit en inhibant l'action des histones-déacétylases et des méthylases (Pikaart et al., 1998 ; Lutz et al., 2000).

L'activité insulatrice a été localisée sur un fragment d'ADN de 250 pb riche en G+C contenant cinq sites de fixation de facteurs nucléaires dont le facteur CTCF qui se lie au site II (Chung et al., 1997) (**Fig. 34B**). Par la suite, des expériences ont révélé qu'un seul site de fixation pour la protéine CTCF (site II) était suffisant pour assurer le blocage d'un enhancer par cet insulateur (Bell et al., 1999).

CTCF est une "DNA-binding protein" de 82 kDa avec 11 domaines en doigts de zinc (**Fig. 34C**), elle est très conservée et ubiquitaire : l'effet isolateur conféré par CTCF est commun aux autres insulateurs de vertébrés (Ohlsson et al., 2001) et dépend de son état de poly(ADP-ribosylation) (Yu et al., 2004). Des études récentes ont montré que la protéine CTCF interagissait indirectement avec une phosphoprotéine de 38 kDa, la nucléophosmine, présente à la surface nucléolaire. L'insulateur serait donc conduit à la surface nucléolaire grâce à cette interaction, aboutissant à la formation de domaines distincts en forme de boucle. On peut alors envisager 2 possibilités : 1) un enhancer situé sur une boucle ne peut pas interagir avec un promoteur situé sur une autre boucle, ou 2) le complexe CTCF-nucléophosmine ainsi localisé empêche la propagation du signal d'activation depuis un enhancer jusqu'au promoteur (Yusufzai et al., 2004).

L'insulateur HS4 assure donc les deux fonctions : celle de blocage de l'interaction promoteur-enhancer et celle de protection contre les effets répressifs de la chromatine. Ces deux fonctions, sont-elles assurées par les mêmes motifs au sein de HS4 ?

La dissection de cet insulateur par une combinaison de techniques moléculaires, génétiques et biochimiques a démontré que les deux fonctions étaient dissociables : en particulier, alors que la fixation de CTCF à son motif spécifique est absolument requise pour la fonction de blocage par HS4, elle est dispensable pour la fonction de barrière chromatinienne (Recillas-Targa et al., 2002). Cette dernière nécessite quant à elle la fixation de la protéine USF au site IV. Les protéines USF font partie d'une famille de protéines ubiquitaires largement impliquées dans l'activation transcriptionnelle. L'activité de barrière serait alors due au recrutement d'enzymes modifiant l'état d'acétylation et de méthylation des histones à proximité de l'insulateur de façon à empêcher la propagation de la chromatine condensée adjacente. La fixation de la protéine USF à son site spécifique est nécessaire mais pas suffisante pour assurer la fonction de barrière chromatinienne. Les 3 autres sites de fixation (I, III et V) sont également nécessaires pour cette activité. (West et al., 2004).

Un deuxième insulateur, également hypersensible à la DNase I, a été localisé en 3' du locus de la β -globine de poulet (**Fig. 34A**) (mais aussi chez l'Homme et la souris). L'encadrement du locus β -globine par ces deux insulateurs suggère que ces deux éléments délimitent un domaine ouvert et fonctionnel, protégé des effets répressifs de l'hétérochromatine adjacente ou des mécanismes de régulation propres aux loci avoisinants (Bulger et al., 1999 ; Saitoh et al., 2000 ; Litt et al., 2001 ; Farrell et al., 2002).

Dans certaines conditions, un insulateur peut être contourné de façon à ce que l'activité de blocage soit neutralisée et que la communication enhancer-promoteur soit établie. Ceci a été observé lorsque deux copies de l'insulateur *gypsy* ont été placées entre un enhancer et un promoteur. La perte d'activité insulatrice serait alors due à l'appariement des deux insulateurs permettant à la chromatine de se replier et ainsi de rapprocher l'enhancer du promoteur (Cai and Shen, 2001 ; Muravyova et al., 2001).

L'étude des fonctions de blocage transcriptionnel ou de barrière chromatinienne des insulateurs devrait permettre de mieux comprendre, d'une part, les mécanismes par lesquels les enhancers stimulent la transcription chez les eucaryotes, et d'autre part, le rôle des différents niveaux d'organisation de la chromatine dans le contrôle de l'expression génique. L'activation transcriptionnelle chez les eucaryotes implique des modifications de la structure chromatinienne ; celles-ci sont probablement un préalable assurant les interactions entre les facteurs transcriptionnels fixés à l'enhancer et le complexe transcriptionnel présent sur le promoteur. Ces changements structuraux mettent en jeu des modifications dans la structure/organisation des nucléosomes telles que des acétylations/déacétylations d'histones ou d'autres mécanismes de remodelage de la chromatine (Pour revue : Felsenfeld et Groudine, 2003).

Il est important de noter que, chez la plupart des eucaryotes, les enhancers sont localisés à des dizaines voire des centaines de kb des promoteurs cibles. Comment les enhancers eucaryotes peuvent-ils donc stimuler la transcription sur de si longues distances ? Etant donné que les insulateurs bloquent de telles interactions, l'étude des mécanismes d'action des insulateurs devrait contribuer à élucider ces effets à longue distance.

POSITION DU PROBLEME

D'importants travaux réalisés sur le locus de la β -globine ont permis de proposer deux modèles d'activation d'un promoteur distant par une LCR (Bulger et Groudine, 1999). Tout d'abord, le modèle en boucle ("looping") suggère la formation d'une boucle permettant des interactions directes et stables entre facteurs transcriptionnels fixés à la LCR et ceux fixés à proximité des promoteurs. Le deuxième schéma d'activation implique une chaîne de complexes protéiques ancrés à la fibre chromatinienne se propageant depuis l'activateur jusqu'au promoteur. C'est le modèle "linking" mettant en jeu des protéines à homéodomaies (**Fig. 35**). Un troisième modèle, intermédiaire a été proposé (Blackwood et Kadonaga, 1998) ; il stipule que la promoteur et l'enhancer fixent d'abord leurs facteurs indépendamment l'un de l'autre, puis le complexe enhancer avec ses facteurs glisserait le long de la fibre chromatinienne jusqu'à atteindre le promoteur cible, c'est le modèle « scanning/tracking » (**Fig. 36**). Enfin, dans le modèle de repositionnement nucléaire, la LCR servirait plutôt à diriger le promoteur vers des compartiments subnucléaires riches en ARN polymérase II et facteurs nécessaires à l'activation de la transcription (Francastel et al., 2000).

Pour ma part, je me suis intéressée aux interactions promoteurs-enhancers au sein du locus IgH murin. Différentes études ont clairement révélé des communications à distance entre des promoteurs et différents enhancers au sein de ce locus (Khamlichi et al., 2000). Récemment, il a été montré, par la délétion conjointe de hs3b et hs4, que ces enhancers étaient impliqués dans la transcription GL de la plupart des isotypes dont les promoteurs GL sont très éloignés de la LCR (par exemple I γ 3 est à ~150 kb de la 3'RR), impliquant des interactions régulatrices à longue distance (Pinaud et al., 2001).

Mon travail de thèse a consisté en l'établissement et l'analyse de modèles murins par recombinaison homologue pour essayer de comprendre des processus impliquant ces interactions à distance : 1) la régulation de la transcription GL, 2) la régulation de la CSR et 3) la régulation de l'élongation transcriptionnelle.

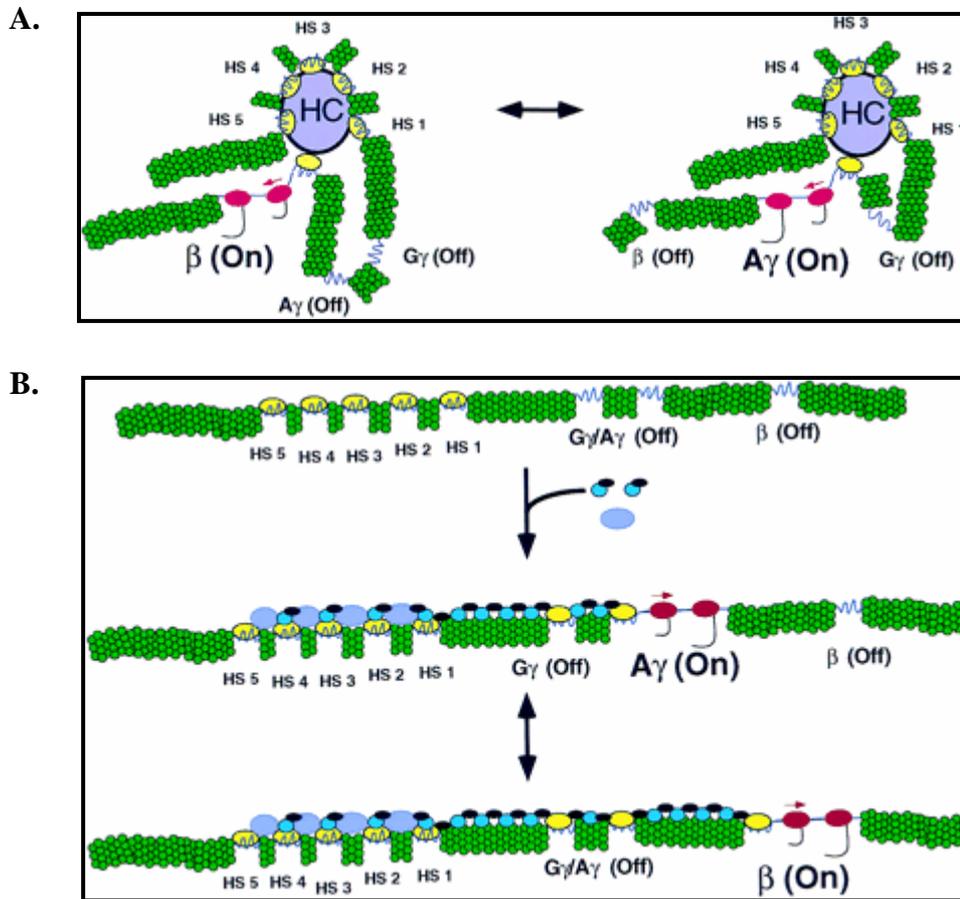


Figure 35 : Modèles d'activation d'un locus par une LCR (D'après Bulger et Groudine, 1999).

(A) Modèle d'interaction en boucle (“looping”) entre les éléments activateurs (HS), en amont du locus de la β -globine humaine (HS6 n'est pas représenté), et les promoteurs des gènes. Les activateurs et promoteurs fixant les facteurs nucléaires sont représentés en jaune. L'ARN polymérase est représentée par des ellipses rouges. La chromatine non hypersensible à la DNase I est représentée en vert. Les (co-)facteurs se liant à chaque HS contribuent à la formation d'un “holocomplexe” (HC, représenté en violet) qui va interagir, *via* une boucle, avec le complexe transcriptionnel d'un promoteur activant ainsi la transcription du gène cible.

(B) Modèle “linking”. Au cours de la différenciation, un complexe protéique (ovales bleus et noirs) se lie à la fibre chromatinienne au niveau de la LCR grâce à des interactions avec des facteurs transcriptionnels à homéodomains ou d'autres protéines (ovales bleu-clairs). La chaîne qui se constitue se propage le long de la fibre chromatinienne entre la LCR et le gène à transcrire.

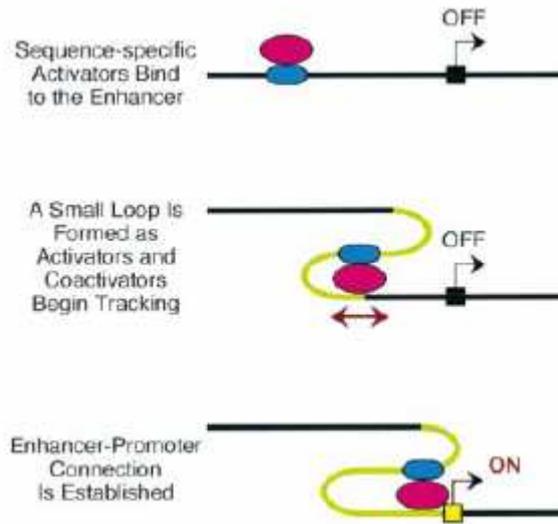


Figure 36 : Modèle “scanning/tracking” d’activation d’un promoteur (D’après Blackwood et Kadonaga, 1998).

Des facteurs spécifiques (ovale fuschia) se fixent à l’enhancer (ovale bleu). Ces facteurs fixés glisseraient le long de la fibre chromatinienne, entraînant l’enhancer et la chromatine intermédiaire qui forme alors une boucle, et ceci jusqu’à la rencontre du promoteur cible (carré jaune).

RESULTATS

➤ **Manuscrit n°1 (soumis) :**

Replacement of I γ 3 germline promoter by I γ 1 inhibits class switch recombination to IgG3 : the 3' regulatory region as a switch recombination enhancer

Zeliha Oruc, Ahmed Boumédiène, Marc Le Bert and Ahmed Amine Khamlichi

➤ **Manuscrit n°2 (en préparation) :**

Elongation of μ and γ 3 germline transcripts is differentially regulated suggesting different abilities of Immunoglobulin enhancers to regulate transcriptional elongation in vivo

Zeliha Oruc, Ahmed Boumédiène, Claire Carrion, Marc Le Bert and Ahmed Amine Khamlichi

➤ **Manuscrit n°3 (en préparation) :**

Insulation of the 3' regulatory region from the immunoglobulin heavy chain locus impairs class switch recombination to all isotypes

Zeliha Oruc, Claire Carrion, Marc Le Bert and Ahmed Amine Khamlichi

➤ **Article n°4 :**

Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S μ tandem repeat

Ahmed Amine Khamlichi, Florence Glaudet*, Zeliha Oruc*, Vincent Denis, Marc Le Bert and Michel Cogné

Blood, 15 May 2004, Volume 103, Number 10, 3828-3836.

* contribution égale

➤ **Article n°5 :**

Germline transcription in mice bearing neo^r gene downstream of Ig3 exon in the Ig heavy chain locus

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

International Immunology, Volume 18, Number 4, 581-589.

MANUSCRIT n° 1 :

Replacement of $I\gamma 3$ germline promoter by $I\gamma 1$ inhibits class switch recombination to IgG3 : the 3' regulatory region as a switch recombination enhancer

Zeliha Oruc, Ahmed Boumédiène, Marc Le Bert and Ahmed Amine Khamlichi

La commutation de classe qui nécessite l'enzyme AID (Cytidine désaminase induite après activation) et la transcription germinale initiée à partir des promoteurs situés en amont de chaque séquence switch (S) est régulée par la région de régulation en 3' du locus IgH (3'RR).

Dans un tel contexte, le travail effectué dans cette étude a consisté à générer une lignée de souris dans laquelle le promoteur germlinal $I\gamma 3$ est remplacé par le promoteur germlinal $I\gamma 1$. Nous avons montré que la commutation de classe vers IgG3 est abolie malgré une transcription germinale induite à partir du promoteur inséré $I\gamma 1$. Ceci laisse penser que le recrutement de AID, nécessaire à la commutation de classe, ne se fait pas de façon passive. Ces résultats suggèrent que le promoteur endogène $I\gamma 1$ isole $I\gamma 1$ inséré de l'activation à longue distance par la 3'RR, dont la fonction pourrait dépasser la simple régulation de la transcription germinale. Nous proposons que cette région régulatrice agit comme activateur de la recombinaison switch. De plus, ces résultats suggèrent la possibilité que la 3'RR pourrait être responsable du ciblage de facteurs isotype-spécifiques sur les séquences S transcrites.

MANUSCRIT n° 2 :

Elongation of μ and $\gamma 3$ germline transcripts is differentially regulated suggesting different abilities of Immunoglobulin enhancers to regulate transcriptional elongation in vivo

Zeliha Oruc, Ahmed Boumédiène, Claire Carrion, Marc Le Bert and Ahmed Amine Khamlichi

Il a été montré que des activateurs sont impliqués dans la régulation de l'élongation au cours de la transcription. Par le travail effectué ici, nous avons voulu étudier le rôle des activateurs du locus IgH dans l'élongation au cours de la transcription germinale (GL). Pour cela, nous avons généré deux lignées de souris dans lesquelles un site de polyadénylation et de pause transcriptionnelle a été inséré entre les séquences I μ et S μ ou entre I $\gamma 3$ et S $\gamma 3$.

Nous montrons que la transcription germinale de $\gamma 3$ est complètement abolie malgré une transcription active initiée à partir de I $\gamma 3$, excluant le rôle majeur de la 3'RR dans l'élongation de la transcription. De façon surprenante, la transcription germinale du gène μ , bien que diminuée, est facilement détectable, ce qui suggère que le complexe d'élongation de la transcription est capable d'atténuer le blocage du gène μ .

Ces données suggèrent que les activateurs du locus IgH pourraient réguler de différentes façons l'étape d'élongation de la transcription germinale. Nous proposons que le contrôle de l'élongation de la transcription pourrait être un des mécanismes par lequel les activateurs μ contrôlent l'accessibilité du locus. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus au sein du locus de la β -globine.

MANUSCRIT n° 3 :

Insulation of the 3' regulatory region from the immunoglobulin heavy chain locus impairs class switch recombination to all isotypes

Zeliha Oruc, Claire Carrion, Marc Le Bert and Ahmed Amine Khamlichi

Le phénomène de commutation de classe (CSR) permet à une cellule B exprimant IgM de commuter en une cellule produisant des IgG, IgE ou IgA. La CSR est, d'une part, précédée de la transcription germinale initiée à partir des promoteurs germinaux situés en amont des séquences switch et, d'autre part, sous le contrôle en grande partie de la région régulatrice en 3' du locus IgH (3'RR). Comment une telle 3'RR peut-elle agir sur de si longues distances ? Les mécanismes de cette action sont encore inconnus. Dans ce contexte-là, nous avons généré une lignée de souris dans laquelle le core de l'isolateur HS4 de poulet (cHS4Ins) a été inséré entre la 3'RR et le locus IgH. Nous montrons que la transcription germinale et la CSR pour tous les isotypes sont diminuées. Nous discutons ces résultats dans le contexte des modèles d'activation à distance proposés jusqu'ici.

ARTICLE n° 4 :

Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S μ tandem repeat

Ahmed Amine Khamlichi, Florence Glaudet*, Zeliha Oruc*, Vincent Denis, Marc Le Bert and Michel Cogné

* contribution égale

Blood, 15 May 2004, Volume 103, Number 10, 3828-3836.

La commutation de classe (CSR) a lieu entre les séquences switch hautement répétitives et localisées en amont des segments de gène constant. Le rôle de ces séquences n'est cependant pas très clair. Des souris mutantes ont été générées dans lesquelles la majorité de l'intron I μ -C μ incluant toutes les séquences répétées a été délétée.

Il a été montré que le développement tardif des cellules B était caractérisé par une sévère diminution de la CSR vers tous les isotypes malgré une transcription germinale normale. L'analyse des séquences de l'intron I μ -C μ dans des splénocytes mutants activés *in vitro* ne révèle pas d'augmentation des mutations somatiques induites par AID. L'analyse des jonctions switch a montré qu'en l'absence des séquences répétées l'exon I μ est utilisé comme substrat pour la CSR. Les séquences en aval des jonctions switch sont largement plus touchées par des mutations que les séquences en amont. Ces données suggèrent que le core de l'activateur E μ pourrait être la frontière pour les mutations somatiques associées à la CSR. Il est proposé que le core E μ jouerait un rôle central dans la dissociation temporelle entre l'hypermutation somatique et la CSR.

ARTICLE n° 5 :

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

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

International Immunology, Volume 18, Number 4, 581-589.

La commutation de classe (CSR) est précédée de la transcription germinale (GL) qui s'initie à partir des promoteurs situés en amont des séquences switch(S) et se termine en aval des gènes constants associés. Des études antérieures ont montré que les transcrits germinaux et leur épissage étaient nécessaires à la CSR et que la GL était régulée en grande partie par la région régulatrice en 3' du locus IgH (3'RR). Cette action polarisée à longue distance de la 3'RR est perturbée par l'insertion du gène de résistance à la néomycine (*neo^r*). Afin de mieux comprendre une telle régulation à distance, des souris ont été générées dans lesquelles le gène *neo^r* a été inséré en aval de l'exon I γ 3, tout en laissant intacts tous les éléments nécessaires à la transcription germinale et à l'épissage.

Cette étude montre que l'expression du gène *neo^r* interfère avec l'initiation de la transcription à partir de I γ 3 et qu'elle diminue, sans la bloquer complètement, la recombinaison S à C γ 3. De plus, on montre pour la première fois que le gène *neo^r* fournit, d'après la présence des transcrits chimères *neo^r*-C γ 3, les éléments nécessaires à l'épissage des transcrits germinaux par l'activation de deux 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.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux effets de longue distance de la 3'RR sur la transcription GL et sur la CSR. Nous avons généré des modèles murins qui nous ont permis d'aborder des questions fondamentales concernant les mécanismes qui opèrent dans le locus IgH. La discussion qui va suivre ne concernera que les résultats des manuscrits non encore publiés et ne reprendra pas, dans la mesure du possible, les questions discutées en détail dans ces manuscrits.

Nous avons essayé d'évaluer les principaux modèles qui rendent compte des interactions de longue distance entre promoteurs et enhanceurs. Pour cela, nous avons exploité la propriété d'un insulateur de bloquer la communication entre un promoteur et un enhanceur quand il est situé entre ces deux éléments. Nous avons choisi d'utiliser le core de l'insulateur HS4 (cHS4Ins) du locus de la β -globine de poulet parce que c'est l'insulateur le mieux caractérisé chez les vertébrés et parce que les études antérieures ont montré qu'il était fonctionnel aussi bien dans des lignées cellulaires que dans des souris mutantes (Chung et al., 1993 ; Szabo et al., 2002). Enfin ces études n'ont pas révélé de spécificité tissulaire lors de l'insertion ectopique de cet insulateur. Le caractère ubiquitaire de la fonction de cet insulateur est un point critique parce qu'on pouvait craindre que son efficacité soit moindre ou carrément nulle dans un locus à expression restreinte comme le locus IgH.

Nous avons inséré l'insulateur entre le locus IgH et la 3'RR et montré que la transcription germinale et la CSR à tous les isotypes était affectée. Une surprise est venue du fait que cette altération affectait IgG1 alors que cet isotype est généralement le moins touché par les nombreuses mutations ciblant le locus constant ou la 3'RR. L'explication généralement admise est que le gène $\gamma 1$ possède d'autres séquences régulatrices qui lui permettent de se dispenser de la présence de la 3'RR. Nos résultats ne remettent pas en cause cette explication, ils montrent juste que la 3'RR contribue effectivement à la transcription de $\gamma 1$. Il se pourrait que l'effet de la 3'RR sur $\gamma 1$ ne soit détectable *in vivo* qu'en l'absence totale ou majeure de la 3'RR du locus endogène. Corrélativement, le fait que cette altération soit détectable dans nos souris mutantes indique une fonctionnalité « optimale » de l'insulateur. Néanmoins, nous ne pouvons exclure la possibilité qu'en utilisant juste le core de l'insulateur (250 pb au lieu du fragment de 1,2 kb initialement décrit), nous ayons laissé de côté d'autres

séquences importantes pour une fonction optimale de cet insulateur. Cependant, au regard des problèmes liés au remodelage de la chromatine, l'utilisation du core (sa taille est l'équivalent de l'ADN de moins de deux nucléosomes) offre l'avantage potentiel d'éviter des altérations majeures de la chromatine au niveau de son site d'insertion. Le phénotype observé serait alors le résultat de la fonction insulatrice authentique et pas de réarrangements chromatinien majeurs liés à l'insertion.

La dissection de cHS4Ins a révélé une structure complexe consistant en au moins cinq sites. Le site II lie CTCF alors que le site IV lie USF, les facteurs qui se lient aux autres sites ne sont pas encore clairement identifiés. Le point important est que le facteur CTCF est requis pour la fonction de blocage mais pas pour la fonction de barrière. Cette dernière nécessite le site IV et requiert apparemment le recrutement de méthylases et acétylases d'histones pour bloquer l'effet répressif de l'hétérochromatine adjacente (West et al., 2004). Nous nous sommes demandés si le phénotype observé chez nos souris était exclusivement CTCF-dépendant (fonction de blocage de l'activité enhancer) et quel serait le phénotype avec un insulateur uniquement doté de la fonction de barrière. Pour cela, nous avons généré une lignée de souris où le cHS4Ins délété de son site CTCF a été inséré entre le locus IgH et la 3'RR et l'analyse des souris est en cours. Il serait en particulier intéressant de voir de quelle façon se combine le recrutement de méthylases et acétylases d'histones proposé pour le site IV du cHS4Ins et le recrutement éventuel de telles activités par la 3'RR, un effet stimulateur de la transcription GL chez ces souris n'est pas à exclure.

Pour ce qui est du mécanisme d'action de la 3'RR, la seule donnée disponible actuellement, basée sur l'utilisation d'un vecteur épisomal comportant le gène *c-myc* sous le contrôle de la 3'RR, indique une augmentation générale d'acétylation des histones (H2A, H2B, H3 et H4) tout le long de l'épisome (Madisen et al., 1998). Quoique critiquable, cette étude soulève de nombreuses questions importantes et pertinentes aux modèles prévalents des interactions de longue distance : 1) est-ce que l'acétylation des histones est effectivement un des mécanismes utilisés par la 3'RR pour contrôler la transcription GL *in vivo*?, 2) est-ce que cette acétylation est exclusivement orientée vers le locus IgH en accord avec les modèles proposés d'un effet polarisé de la 3'RR (Cogné et al., 1994 ; Manis et al., 1998, Seidl et al., 1999) ou s'agit-il d'une propagation bidirectionnelle ? 3) dans la dernière hypothèse, quelle serait la signification biologique de la propagation d'un tel signal et en quoi peut-il être pertinent aux modèles prévalents des interactions de longue distance ?

L'insertion d'un gène *neo^r* en aval de la 3'RR n'a pas d'effet détectable sur la transcription GL ou la CSR bien qu'il soit inductible par le LPS (Manis et al., 2003). Une possibilité serait que le gène *neo^r* soit toujours sous l'influence de la 3'RR, mécanisme admis pour rendre compte de l'inhibition de la CSR en amont mais pas en aval du site d'insertion du gène *neo^r* dans le locus constant, auquel cas il faudrait envisager un effet bipolaire de la 3'RR ou l'existence d'éléments régulateurs non encore identifiés qui réguleraient l'expression du gène *neo^r* mais pas la transcription GL ou la CSR. Une autre possibilité serait que l'expression et l'induction de ce gène *neo^r* résulterait plutôt de changements chromatiniens locaux indépendants de la 3'RR, ce qui inviterait à reformuler les modèles rendant compte de l'« effet neo » dans le locus constant, d'autant plus que le gène *neo^r* n'est pas inductible par le LPS en dehors du locus IgH (Manis et al., 1998). Notons qu'au vu de l'identification de multiples sites CTCF en aval de la 3'RR (et du site d'insertion du gène *neo^r* dans l'étude évoquée ci-dessus), la propagation éventuelle de ce signal pourrait être bloquée par ces sites CTCF et n'aurait donc pas d'effet sur les séquences (essentiellement répétées) en aval. Néanmoins, la signification biologique d'un tel signal et son lien avec la transcription resterait à déterminer. Pour contribuer à répondre à ces questions, nous avons inséré une construction chimérique composée du promoteur GL I α et d'un exon hétérologue en aval de la 3'RR. Nous avons obtenu des clones ES recombinants et leur injection est en cours.

Toujours dans le cadre de la problématique de la bipolarité de la « signalisation » par les enhancers, nous avons récemment obtenu des clones ES recombinants où le cHS4Ins est inséré en aval de l'enhancer E μ , et nous sommes en train de l'insérer en amont également. Ces modèles devraient permettre d'aborder des questions intéressantes concernant le rôle de E μ dans le contrôle de la transcription GL de S μ et de la transcription/réarrangements V(D)J.

Au regard des principaux modèles qui essaient d'expliquer les interactions de longue distance, nos résultats ne permettent pas de trancher définitivement en faveur d'un modèle donné. Ils présentent plutôt des données que le modèle looping ne peut expliquer de manière satisfaisante à moins d'évoquer des mécanismes facilitateurs. A l'origine, le modèle looping a été postulé puis démontré pour des distances relativement courtes entre éléments régulateurs chez la bactérie et les eucaryotes simples comme la levure (Ptashne, 1986). La transposition du modèle à des génomes et des loci complexes pose un certain nombre de problèmes dont ce modèle rend difficilement compte, et sa généralisation à tous les loci est probablement

excessive. Parmi les problèmes, évoquons : **1)** le coût énergétique que représenterait pour la cellule la tâche de transférer « librement » d'énormes blocs de chromatine sur des dizaines de kb, **2)** l'existence des insulateurs qui interrompent la communication entre éléments distants, **3)** l'expression simultanée de gènes sous le contrôle d'un enhancer ou d'une LCR, et **4)** le caractère relativement aléatoire du processus alors que l'expression des gènes cibles est d'une importance cruciale pour le développement ou la différenciation. Certes, des boucles ont été détectées par plusieurs groupes entre des éléments distants dans des loci complexes et pour des processus très variés comme les réarrangements V(D)J ou l'expression du locus de la globine, mais rien n'exclut d'envisager que la formation de ces boucles soit l'aboutissement d'un scanning préalable ou d'un autre mécanisme encore inconnu. De fait, quand la cinétique du processus est étudiée (e.g. Hatzis and Talianidis, 2002), le résultat est clairement en faveur du modèle scanning.

Dans le cadre spécifique de nos résultats, le modèle looping devrait prédire que la 3'RR court-circuiterait le cHS4Ins ou le promoteur endogène I γ 1 (chez les souris où I γ 1 remplace I γ 3), auquel cas la transcription GL à partir des promoteurs en amont serait normale. Par contre, un modèle scanning ou linking rendraient mieux compte de nos résultats. Le cHS4Ins bloquerait un signal activateur, dont la nature reste à déterminer, qui émane de la 3'RR, les gènes cibles sont alors transcrits au niveau basal assuré par leurs éléments adjacents après activation des cellules B par des signaux extracellulaires spécifiques. De façon similaire, le promoteur I γ 1 endogène isolerait le promoteur I γ 1 inséré des effets activateurs de la 3'RR. Dans l'état actuel de nos résultats, nous ne pouvons pas encore trancher entre les modèles looping et linking. Nous essayons de mettre au point une approche associant l'immunoprécipitation de la chromatine et la cinétique d'activation de la CSR par la 3'RR.

Nos résultats ne permettent pas non plus d'évaluer précisément le modèle de relocalisation nucléaire. Il est tout à fait envisageable que la 3'RR dirige le locus IgH vers des compartiments riches en ARNp II et en facteurs de transcription...etc, mais cela ne résout certainement pas tous les problèmes. Si l'action de la 3'RR se limitait à cela, on devrait s'attendre à une transcription équivalente à partir des deux promoteurs I γ 1. L'induction de la transcription GL à partir de I γ 1 inséré à 25 ng/ml d'IL4 suggère que la disponibilité des ARNp II et des facteurs de transcription n'est pas le facteur limitant, et qu'il ne s'agit pas non plus d'une affinité supérieure de I γ 1 endogène pour des facteurs de transcription. A moins

d'assumer que la 3'RR oriente les deux promoteurs $I\gamma 1$ vers deux compartiments différents, le plus plausible est que la 3'RR est d'une certaine façon « séquestrée » par le promoteur $I\gamma 1$ endogène.

Initialement, nous avons prévu de remplacer $I\gamma 3$ par $I\gamma 1$, $I\alpha$, $I\epsilon$ et $E\mu$. Le risque majeur était pour nous qu'il y ait justement un effet insulateur par les promoteurs endogènes. Nous avons donc finalement opté pour $I\gamma 1$ (le moins sensible à la 3'RR) en priorité et pour $E\mu$ ensuite. Nous avons récemment obtenu des souris chimériques pour le remplacement de $I\gamma 3$ par $E\mu$ (qui, comme $I\gamma 3$, répond au LPS). Si nous obtenons la transmission germinale de la mutation, le modèle serait un outil intéressant pour aborder des questions fondamentales sur les interactions à distance entre la 3'RR et $E\mu$ et sur le contrôle épigénétique des séquences S.

Le modèle de duplication du promoteur $I\gamma 1$ nous a permis de répondre à certaines questions encore non résolues et peut être de découvrir une nouvelle fonction assurée par la 3'RR. Ce modèle tient compte de tous les paramètres connus comme requis *in vivo* pour la CSR : 1) la transcription GL, 2) l'épissage et 3) la 3'RR. Ces trois paramètres n'ont été, à notre connaissance, respectés par aucun des modèles de remplacement antérieurs. Quant aux études utilisant des substrats de switch dans des lignées cellulaires (et ne respectant pas non plus les trois critères requis), elles ont abouti à deux conclusions contrastées, mais pas forcément mutuellement exclusives. D'un côté, Honjo propose que AID est le seul facteur B-spécifique requis pour la CSR, tous les autres facteurs étant ubiquitaires (Okazaki et al., 2002). De son côté, Kenter propose qu'en plus de AID, des facteurs isotype-spécifiques sont requis pour cibler une séquence S transcrite, et dans le cas spécifique de $S\gamma 3$, c'est NF- κ B p50 qui jouerait ce rôle (Shanmugam et al., 2000 ; Kenter et al., 2004). L'implication du modèle de Honjo est que toute séquence S transcrite, et donc générant un simple brin (sous forme de boucle R ou d'autres structures), peut recombinaison du moment que AID est disponible, c'est le modèle de recrutement passif de AID. Le modèle de Kenter, quant à lui, a pour conséquence l'existence d'un mécanisme qui permet un ciblage spécifique de facteurs isotype-spécifiques vers une séquence S donnée.

Le résultat majeur de notre étude est que le remplacement de $I\gamma 3$ par $I\gamma 1$ inhibe la CSR vers $IgG3$ *in vivo* et *in vitro* malgré une transcription GL inductible. Du fait que la séquence $S\gamma 3$ est transcrite sous le contrôle de $I\gamma 1$, nous assumons mais nous ne l'avons pas démontré, qu'elle génère un simple-brin, cible de AID. Mais étant donné que la CSR vers $S\gamma 3$ est

inhibée, la conclusion qui s'impose est que toute séquence S transcrite *in vivo* n'est pas forcément la cible de AID.

Nos résultats sont donc plutôt en faveur de l'existence de facteurs isotype-spécifiques qui sont ciblés vers les séquences S. Mais par quelle structure et par quel mécanisme s'effectue ce ciblage ? La découverte d'une transcription diminuée (mais inductible) à partir de I γ 1 inséré à la place de I γ 3 nous laisse penser qu'un signal de nature pour le moment inconnue, émanant de la 3'RR, est bloqué par le promoteur I γ 1 endogène. L'augmentation de la concentration en IL4 induit fortement la transcription à partir des deux promoteurs I γ 1, pourtant l'augmentation de la CSR n'est détectée que pour S γ 1. Il semble donc raisonnable de penser que le même signal extracellulaire (dans ce cas anti-CD40+IL4 ou LPS+IL4) induit la transcription GL des deux promoteurs I γ 1, mais que des facteurs spécifiques sont ciblés vers S γ 1 pour « assister » AID et pas vers S γ 3. Comme l'analyse de la transcription GL nous mène à penser que le « signal » de la 3'RR est bloqué par I γ 1 endogène, nous proposons que c'est la 3'RR elle-même qui est responsable du ciblage spécifique des facteurs isotype-spécifiques vers la séquence S transcrite, agissant ainsi comme un enhancer de la CSR tout comme E μ pour les réarrangements V(D)J.

L'analogie avec E μ est justifiée sur plusieurs plans mais souffre aussi de notre compréhension très partielle du mécanisme de contrôle des réarrangements V(D)J par E μ et de la CSR par la 3'RR. La corrélation dans ces processus entre transcription et recombinaison est bien établie même si la relation de cause à effet n'est pas très claire dans le cas des réarrangements V(D)J (Spicuglia et al., 2006). Dans le cas de la CSR par contre, la transcription est clairement un prérequis (Dudley et al., 2005). Dans tous les cas, il s'agit de processus qui se déclenchent par des signaux et à des stades développementaux différents (Dudley et al., 2005) et les enhancers qui les contrôlent recrutent des facteurs partiellement différents (Khamlichi et al., 2000). Néanmoins, ils font probablement appel à des processus de base similaires tels que le remodelage de la chromatine ou l'interaction avec des promoteurs distants.

Le mécanisme par lequel la 3'RR recrute et cible des facteurs isotype-spécifiques pour la CSR est pour le moment inconnu. Une possibilité est que suite à un signal extracellulaire approprié, la 3'RR recrute ces facteurs puis cible par scanning le promoteur cible et y livre

son complexe de facteurs. Ces derniers s'associent à la machinerie transcriptionnelle et AID au cours de la transcription GL jusqu'à atteindre la séquence S spécifique. Une autre possibilité est que la 3'RR livre son « chargement » directement sur la séquence S spécifique et participe activement à la réaction de recombinaison par le biais des facteurs recrutés. Il serait très intéressant de dupliquer I γ 1 en aval du promoteur endogène pour vérifier les prédictions de notre modèle. L'équipe essaie actuellement de remplacer I α par I γ 1.

Est-ce que AID est également recrutée par la 3'RR comme cela a été suggéré (Garrett et al., 2005) ? C'est une question pour laquelle nous n'avons pas encore de réponse. Est-ce que la 3'RR joue en plus un rôle dans la synapse des séquences S partenaires comme suggéré (Dudley et al., 2005) ? Rien ne permet actuellement de l'exclure. En tout cas, le rôle de la 3'RR dans le ciblage des facteurs isotype-spécifiques et l'identification de ces facteurs est une des pistes que l'équipe creuse actuellement. Le modèle décrit sera un outil précieux pour aborder ces questions.

Le rôle de la 3'RR dans la CSR qui est un processus strictement B-spécifique suggère que les mécanismes par lesquels la 3'RR contrôle le locus IgH ne sont pas forcément identiques à ceux mis en jeu par d'autres régions de contrôle. Non seulement au regard de la spécificité tissulaire et son corrolaire, l'identité des facteurs recrutés, mais également de la nature même des processus. La comparaison avec la LCR de la β -globine s'impose parce que certaines similitudes existent avec la 3'RR (Khamlichi et al., 2000). De plus, cette LCR a été analysée plus en profondeur que la 3'RR et s'est imposée comme un système de « référence ».

Une des nombreuses surprises de la délétion de la LCR de la β -globine est la démonstration qu'elle jouait un rôle primordial dans l'élongation de la transcription. Nous nous sommes donc intéressés au rôle potentiel de la 3'RR et de E μ dans ce processus en insérant une cassette de polyadénylation et de pause transcriptionnelle (pAp) en aval de I γ 3 et de I μ . A notre surprise, la CSR vers IgG3 était complètement abolie malgré l'initiation de la transcription de I γ 3, excluant un rôle majeur de la 3'RR dans l'étape d'élongation. La deuxième surprise vint du fait que l'insertion de pAp en aval de I μ résultait en un phénotype différent : les transcrits I μ -C μ étaient relativement abondants et normalement épissés bien que diminués par rapport à la normale, résultant en une altération générale mais modérée dans la production de tous les isotypes. Comment rendre compte de cette différence entre pAp μ et

pAp γ ? La première donnée est que les gènes μ et $\gamma 3$ sont exprimés à des stades développementaux différents. La deuxième est que leur expression est contrôlée pour l'essentiel par des enhancers différents. La troisième donnée est que pour un gène μ réarrangé, deux transcrits sont générés, un à partir du PV_H et l'autre à partir de I μ alors que pour le gène $\gamma 3$ (avant CSR), il n'y a qu'un transcrit initié à I $\gamma 3$.

Nous avons exclu l'hypothèse de rares clones B précurseurs qui échapperaient aux systèmes de contrôle (checkpoints) précoces dans la moelle osseuse. La population B n'est diminuée que de moitié environ dans la moelle osseuse. Nous sommes en train de vérifier l'état de la transcription dans des pro-B et des pré-B purifiés. Dans la rate, la tendance s'inverse et on y détecte une population B légèrement supérieure à la normale. La diminution de la transcription a été détectée dans des splénocytes stimulés *in vitro*. Ceci suggère que l'inhibition partielle de l'élongation de la transcription par pAp est une propriété intrinsèque aux cellules pAp μ . Le point critique dans cette étude est que l'insertion de pAp dans le génome instaure un niveau d'arrêt de l'élongation et corrélativement une capacité relative à le surmonter, difficile à quantifier. Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure *a priori* que la 3'RR joue un rôle dans l'élongation de la transcription, mais par rapport au seuil d'inhibition instauré par pAp et par la capacité des transcrits μ à surmonter le signal d'arrêt, le rôle de la 3'RR semble relativement minime. Par contre, le rôle de E μ (et/ou d'autres enhancers contrôlant la région μ) semble plus important.

Il se pourrait que cette fonction soit cruciale aux stades précoces de développement où les cellules B tentent d'assembler un récepteur à l'Ag fonctionnel. Un mécanisme attrayant serait que l'élongation transcriptionnelle, de par le remodelage de la chromatine qu'elle nécessite pour l'avancée de la machinerie transcriptionnelle et d'élongation, imprimerait une marque épigénétique sur les histones du locus favorisant l'interaction avec la recombinaise RAG. Une interaction entre le domaine C-terminal de RAG2 et les histones H2A, H2B, H3 et H4 a été récemment rapportée (West et al., 2005). La signification biologique de la régulation de l'élongation transcriptionnelle à ce stade serait alors la régulation de l'accessibilité des RSS à la recombinaise RAG (Roth et Roth, 2000 ; Oettinger, 2004). L'enhancer qui contrôlerait l'élongation transcriptionnelle contrôlerait du même coup l'accessibilité du locus.

Dans le cas de l'élongation transcriptionnelle dans l'intron majeur du gène $\gamma 3$, nous spéculons que l'élongation transcriptionnelle est moins critique. Au cours de la CSR, la fonction principale de la transcription GL semble être la formation du simple-brin d'ADN (brin non transcrit) qui sera la cible d'AID. En raison de la grande stabilité des hybrides ARN-ADN au cours de la transcription GL, il suffirait de peu de transcrits entiers.

La sévérité du phénotype des souris pAp γ est suprenante, néanmoins elle indique clairement que la disponibilité du seul site donneur d'épissage n'est pas suffisante pour la CSR et que la transcription de la séquence S $\gamma 3$ est absolument requise. Dans le cas de pAp μ , les transcrits sont normalement épissés indiquant que S μ a été transcrite. La relation entre épissage des transcrits GL et CSR n'est pas très claire. La mutation du site donneur d'épissage de I $\gamma 1$ altère la CSR vers IgG1 (Hein et al., 1998), celle du site donneur d'épissage de I μ active des sites cryptiques permettant un taux normal de CSR (Kuzin et al., 2000) et l'insertion du gène *neo'* en aval de I $\gamma 3$ active un site cryptique d'épissage permettant un taux partiel de CSR (Samara et al., 2006). Il serait intéressant d'insérer le pAp en aval de S $\gamma 3$ de sorte à permettre la transcription de S $\gamma 3$, et donc la disponibilité du substrat simple-brin pour AID, tout en bloquant l'accessibilité du site accepteur d'épissage. L'équipe est en train de générer un modèle dans ce sens.

En conclusion, nos travaux nous ont permis d'aborder des mécanismes fondamentaux relatifs aux interactions de longue distance entre des éléments de régulation transcriptionnelle dans le locus IgH et ont jeté la base à des travaux et projets stimulants.

REFERENCES

- Afshar R**, Pierce S, Bolland DJ, Corcoran A, Oltz EM. (2006) Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J. Immunol.* 176 ; 2439-47.
- Aguilera, R. J.**, Hope, T. J. and Sakano, H. (1985) Characterization of immunoglobulin enhancer deletions in murine plasmacytomas. *EMBO J.* 4 ; 3689-3693.
- Akira S**, Takeda K, Kaisho T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2 ; 675-80.
- Albrecht B**, Peiritsch S, Woisetschlager M. (1994) A bifunctional control element in the human IgE germline promoter involved in repression and IL-4 activation. *Int Immunol.* 6 ; 1143-51.
- Allen, R. C.**, Armitage, R. J., Conley, M. E., Rosenblatt, H., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Bedell, M. A., Edelhoff, S., Disteché, C. M., Simoneaux, D. K., Fanslow, W. C., Belmont, J. and Spriggs, M. K. (1993) CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* 259 ; 990-993.
- Andersson, T.**, Neurath, M. F., Grant, P. A. and Pettersson, S. (1996) Physiological activation of the IgH 3' enhancer in B lineage cells is not blocked by Pax-5. *Eur J Immunol.* 26 ; 2499-2507.
- Andersson, T.**, Furebring, C., Borrebaeck, C. A. K. and Pettersson, S. (1999) Temporal expression of a V_H promoter-C μ transgene linked to the IgH HS1,2 enhancer. *Mol Immunol.* 36 ; 19-29.
- Arakawa, H.**, Iwasato, T., Hayashida, H., Shimizu, A., Honjo, T. and Yamagishi, H. (1993) The complete murine immunoglobulin class switch region of the α heavy chain gene-hierarchical repetitive structure and recombination breakpoints. *J Biol Chem.* 268 ; 4651-4655.
- Ariizumi, K.**, Wang Z. and Tucker, P. W. (1993) Immunoglobulin heavy chain enhancer is located near or in an initiation zone of chromosomal DNA replication. *Proc Natl Acad Sci. USA* 90 ; 3695-3699.
- Aruffo, A.**, Farrington, M., Hollenbaugh, D., Li, X., Milatovich, A., Nonoyama, S., Bajorath, J., Grosmaire, L., Stenkamp, R., Neubauer, M., Roberts, R., Noelle, R., Ledbetter, J., Franke, U. and Ochs, H. (1993) The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM syndrome. *Cell* 72, 291-300.
- Arulampalam, M.**, Grant, P. A., Samuelsson, A., Lendahl, U. and Pettersson, S. (1994). Lipopolysaccharide-dependent transactivation of the temporally regulated immunoglobulin heavy chain 3' enhancer. *Eur J Immunol.* 24 ; 1671-1677.
- Arulampalam, V .**, Eckhardt, 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**, Olsson C, Chitkara N, Wabl M. (1998) The Ig mutator is dependent on the presence, position, and orientation of the large intron enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 ; 2396-9.
- Bain, G.**, Robanus Maandag, E. C., Izon, D. J., Armsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feenley, A. J., van Roon, M., van der Valk, M., te Riele, H. P. J., Berns, A. and Murre, C. (1994) E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* 79 ; 885-892.
- Banchereau, J.**, Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J. P., van Kooten, C. V., Liu, Y. J., Rousset, F. and Saeland, S. (1994) The CD40 antigen, and its ligands. *Annu Rev Immunol.* 12 ; 881-922.
- Bassing CH**, Alt FW. (2004) H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle* 3 ; 149-53.
- Basu U**, Chaudhuri J, Alpert C, Dutt S, Ranganath S, Li G, Schrum JP, Manis JP, Alt FW. (2005) The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 438 ; 508-11.
- Begum NA**, Kinoshita K, Muramatsu M, Nagaoka H, Shinkura R, Honjo T. (2004) De novo protein synthesis is required for activation-induced cytidine deaminase-dependent DNA cleavage in immunoglobulin class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101 ; 13003-7.
- Bell AC**, West AG, Felsenfeld G (1999) The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* 98 ; 387-396.
- Berek, C.** and Milstein, C. (1988) The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol Rev.* 105 ; 5-26.
- Bergstedt-Lindqvist, S.**, Sideras, 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.
- Berton, M. T.**, Uhr, J. W. and Vietta, E. (1989) Synthesis of germline $\gamma 1$ 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.
- 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., González-Fernández, 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.
- Bishop GA.** (2004) The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat Rev Immunol.* 4 ; 775-86.
- Blackwood, E.M.** & Kadonaga, J.T. (1998) Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281 ; 61-63.

Blank, V. and Andrews, N. C. (1997) The Maf transcription factors : regulators of differentiation. Trends in Biochem Sci. 22 ; 437-441.

Bolland DJ, Wood AL, Johnston CM, Bunting SF, Morgan G, Chakalova L, Fraser PJ, Corcoran AE. (2004) Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination. Nat Immunol. 5 ; 630-7.

Bosma GC, Kim J, Urich T, Fath DM, Cotticelli MG, Ruetsch NR, Radic MZ, Bosma MJ. (2002) DNA-dependent protein kinase activity is not required for immunoglobulin class switching. J Exp Med. 196 ; 1483-95.

Bottaro, A., Lansford, R., Xu, L., Zhang, J., Rhothman, P. and Alt, F. W. (1994) I region transcription (per se) promotes basal IgE class switching 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.

Bransteitter R, Pham P, Scharff MD, Goodman MF. (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 ; 4102-7.

Brasset E, Vaury C. (2005) Insulators are fundamental components of the eukaryotic genomes. Heredity 94 ; 571-6.

Brown, E. H., Iqbal, M. A., Stuart, S., Hatton, K. S., Valinsky, J. and Schildkraut, C. L. (1987) Rate of replication of the murine immunoglobulin heavy-chain locus : evidence that the region is part of a single replicon. Mol Cell.Biol. 7 ; 450-457.

Bulger, M. and Groudine, M. (1999) Looping versus linking : toward a model for a long distance gene activation. Genes Dev. 13 ; 2465-2477.

Bulger M, Doorninck JHV, Saitoh N, Telling A, Farrell C, Bender MA, Felsenfeld G, Axel R, Groudine M (1999) Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human β -globin loci : The β -globin genes are embeded within an array of odorant receptor genes. Proc Natl Acad Sci USA 96 ; 512-5134.

Busslinger, M. and Urbánek, P. (1995) The role of BSAP (Pax-5) in B-cell development. Curr Opin Genet Dev. 5 ; 595-601.

Cai HN, Shen P (2001) Effects of cis arrangement of chromatin insulators on enhancer-blocking activity. Science 291 ; 493-495.

Casellas R, Nussenzweig A, Wuerffel R, Pelanda R, Reichlin A, Suh H, Qin XF, Besmer E, Kenter A, Rajewsky K, Nussenzweig MC. (1998) Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. EMBO J. 17 ; 2404-11.

Castigli, E., Alt, F. W., Davidson, L., Bottaro, A., Mizoguchi, E., Bhan, A. K. and Geha, R. S. (1994) CD40-deficient mice generated by recombinaison-activating gene-2-deficient blastocyst complementation. Proc Natl Acad Sci USA 91 ; 12135-12139.

Cerrutti, A., Schaffer, A., Shah, S., Zan, H., Liou, H. C., Goodwin, R. G. and Casali, P. (1998) CD30 is a CD40-inductible molecule that negatively regulates CD40-mediated immunoglobulin class switching in non-antigen-selected human B cells. *Immunity*. 9 ; 247-256.

Chaudhuri J, Tian M, Khuong C, Chua K, Pinaud E, Alt FW. (2003) Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422 ; 726-30.

Chaudhuri, J. & Alt, F.W. (2004) Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat. Rev. Immunol.* 4 ; 541-552.

Chaudhuri, J., Khuong, C. & Alt, F.W. (2004) Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* 430 ; 992-998.

Chauveau, C. and Cogné, M. (1996) Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat Genet.* 14 ; 15-16.

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

Chowdhury D, Sen R. (2001) Stepwise activation of the immunoglobulin mu heavy chain gene locus. *EMBO J.* 20 ; 6394-403.

Chowdhury, D. and Sen, R. (2004) .Regulation of immunoglobuline heavy-chain gene rearrangements. *Immunol. Reviews* 200 ; 182-196.

Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G (1993) A 5' element of the chicken β -globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* 74 ; 505-514.

Chung JH, Bell AC, Felsenfeld G (1997) Characterization of the chicken β -globin insulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 ; 575-580.

Cockerill, P. N. (1990) Nuclear matrix attachment occurs in several regions of the IgH locus. *Nucleic Acids Res.* 18 ; 2643-2648.

Coffman, R. 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., Ohara, J., Bond, M. W., Cary, J., Zlotnik, A and Paul, W. E. (1986) B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE responses of lipopolysaccharide-activated B cells. *J immunol.* 136 ; 4538-4545.

Coffman RL, Lebman DA, Shrader B. (1989) Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J Exp Med.* 170 ; 1039-44.

Coffman, R.L., Lebman, D. A. and Rothman, P. B. (1993) Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv Immunol.* 54 ; 229-270.

Cogné M, Landsford R, Bottaro A, Zhang J, Gorman J, Young F, Cheng HL, Alt FW (1994) A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* 77 ; 734-747.

Collins JT, Dunnick WA. (1993) Germline transcripts of the murine immunoglobulin gamma 2a gene: structure and induction by IFN-gamma. *Int Immunol.* 5 ; 885-91.

Cook AJ, Oganessian L, Harumal P, Basten A, Brink R, Jolly CJ. (2003) Reduced switching in SCID B cells is associated with altered somatic mutation of recombined S regions. *J Immunol.* 171 ; 6556-64.

Corcoran AE, Riddell A, Krooshoop D, Venkitaraman AR. (1998) Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor. *Nature* 391 ; 904-7.

Dariavach, P., Williams, G. T., Campbell, K., Pettersson, S. and Neuberger, M. S. (1991) The mouse IgH 3'-enhancer. *Eur J Immunol.* 21 ; 1499-1504.

Davis MM, Kim SK, Hood LE. (1980) DNA sequences mediating class switching in alpha-immunoglobulins. *Science* 209 ; 1360-5.

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

Delphin, S. & Stavnezer, J. (1995) Characterization of an interleukin 4 (IL-4) responsive region in the immunoglobulin heavy chain germline epsilon promoter: regulation by NF-IL-4, a C/EBP family member and NF-kappa B/p50. *J. Exp. Med.* 181 ; 181-92.

Delpy, L., Decourt, C., Le Bert, M. and Cogné, M. (2002) B cell development arrest upon insertion of a *neo* gene between JH and E μ : promoter competition results in transcriptional silencing of germline JH and complete V(D)J rearrangements. *J. Immunol.* 169 ; 6875-6882.

Dempsey LA, Sun H, Hanakahi LA, Maizels N. (1999) G4 DNA binding by LR1 and its subunits, nucleolin and hnRNP D, A role for G-G pairing in immunoglobulin switch recombination. *J Biol Chem.* 274 ; 1066-71.

Dickerson, S.K., Market, E., Besmer, E. & Papavasiliou, F.N. (2003) AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J. Exp. Med.* 197 ; 1291-6.

DiSanto, J. P., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., Fischer, A. and de Saint Basile, G. (1993) CD40 ligand mutations in X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361 ; 541-543.

Doi, T.S., Takahashi, T., Taguchi, O., Azuma, T. and Obata, Y. (1997) NF- κ B RelA-deficient lymphocytes : normal development of T cells and B cells, impaired production of IgA and IgG1 and reduced proliferative responses. *J. Exp. Med.* 185 ; 953-961.

Doi T, Kinoshita K, Ikegawa M, Muramatsu M, Honjo T. (2003) De novo protein synthesis is required for the activation-induced cytidine deaminase function in class-switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 ; 2634-8.

Dudley DD, Manis JP, Zarrin AA, Kaylor L, Tian M, Alt FW. (2002) Internal IgH class switch region deletions are position-independent and enhanced by AID expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99 ; 9984-9.

Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H. & 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.

Dunnick WA, Shi J, Graves KA, Collins JT. (2004) Germline transcription and switch recombination of a transgene containing the entire H chain constant region locus: effect of a mutation in a STAT6 binding site in the gamma 1 promoter. *J Immunol.* 173 ; 5531-9.

Eckhardt, L. A. and Birshtein, B. K. (1985) Immunoglobulin class-switch events occurring in a single myeloma cell line. *Mol Cell Biol.* 5 ; 856-868.

Ehrenstein MR, Neuberger MS. (1999) Deficiency in Msh2 affects the efficiency and local sequence specificity of immunoglobulin class-switch recombination: parallels with somatic hypermutation. *EMBO J.* 18 ; 3484-90.

Ermakova, O. V., Nguyen, L. H., Little, R. D., Chevillard, C., Riblet, R., Ashouian, N., Birshtein, B. K. and Schildkraut, C. L. (1999) Evidence that a single replication fork proceeds from early to late replicating domains in the IgH locus in a non-B cell line. *Mol. Cell* 3 ; 321-330.

Ernst P, Smale ST (1995) Combinatorial regulation of transcription II : the immunoglobulin μ heavy chain gene. *Immunity* 2 ; 427-438.

Faili A, Aoufouchi S, Weller S, Vuillier F, Stary A, Sarasin A, Reynaud CA, Weill JC. (2004) DNA polymerase eta is involved in hypermutation occurring during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med.* 199 ; 265-70.

Farrell CM, West AG, Felsenfeld G (2002) Conserved CTCF insulator elements flank the mouse and human β -globin loci. *Mol Cell Biol.* 22 ; 3820-3831.

Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003) Controlling the double helix. *Nature* 421 ; 448-53.

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.

Fitzsimmons, D., Hodsdon, W., Wheat, W., Maira, S-M., Waslyk, B. and Hagman, J. (1996) Pax-5 (BSAP) recruits Ets proto-oncogene family proteins to form functional ternary complexes on a B-cell-specific promoter. *Genes Dev.* 10 ; 2198-2211.

Francastel, C., Schubeler, D., Martin, D.I. & Groudine, M. (2000) Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1 ; 137-43.

Fukita, Y., Mizuta, T. R., Shirozu, M., Ozawa, K, Shimizu, A. and Honjo, T. (1993) The human Subp-2, a DNA-binding protein specific to the single-stranded guanin-rich sequence related to the immunoglobulin μ chain switch region. *J Biol Chem.* 268 ; 17463-17470.

Fukita Y, Jacobs H, Rajewsky K. (1998) Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* 9 ; 105-14.

Fuleihan, R., Ramesh, N., Loh, R., Jabara, H., Rosen, F. S., Chatila, T., Fu, S. M., Stamenkovic, I. and Geha, R. S. (1993) Defective expression of the CD40 ligand in X chromosome-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90 , 2170-2173.

Fuxa M, Skok J, Souabni A, Salvaggio G, Roldan E, Busslinger M. (2004) Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev.* 18 ; 411-22.

Garrett, F.E., Emelyanov, A.V., Sepulveda, M.A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L.A., Lobanenko, V.V., and Birshtein, B.K. (2005). Chromatin architecture near a potential 3' end of the Igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Mol. Cell. Biol.* 25 ; 1511-25.

Geha, R.S., Jabara, H.H. and Brodeur, S.R. (2003) The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 3 ; 721-732.

Gerondakis, S., Gaff, C., Goodman, D.J. & Grumont, R.J. (1991) Structure and expression of mouse germline immunoglobulin gamma 3 heavy chain transcripts induced by the mitogen lipopolysaccharide. *Immunogenetics* 34 ; 392-400.

Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins : evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16 ; 225-260.

Giallourakis, C., Alt, F.W. and Bassing, C.H. (2004) V(D)J recombination accessibility-heading in the opposite direction? *Nat. Immunol.* 5 ; 561-562.

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 I hypersensitive during B cell differentiation. *J Immunol.* 150 ; 1772-1780.

Goldmit M, Ji Y, Skok J, Roldan E, Jung S, Cedar H, Bergman Y. (2005) Epigenetic ontogeny of the Igh locus during B cell development. *Nat Immunol.* 6 ; 198-203.

Gonda H, Sugai M, Nambu Y, Katakai T, Agata Y, Mori KJ, Yokota Y, Shimizu A. (2003) The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J Exp Med.* 198 ; 1427-37.

Gong S, Nussenzweig MC. (1996) Regulation of an early developmental checkpoint in the B cell pathway by Ig beta. *Science* 272 ;411-4.

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.

Goyenechea B, Klix N, Yelamos J, Williams GT, Riddell A, Neuberger MS, 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 ; 3987-94.

Grant, P. A., Arulampalam, V., Ahrlund-Richter, L. and Pettersson, S. (1992) Identification of Ets-like lymphoid specific elements within the immunoglobulin heavy chain 3' enhancer. *Nucleic Acids Res.* 20 ; 4401-4408.

Gregor, P. D. and Morrison, S. L. (1986) Myeloma mutant with a novel 3' flanking region : loss of normal sequence and insertion of repetitive elements leads to decreased transcription but normal processing of the alpha heavy-chain gene products. *Mol. Cell. Biol.* 6 ; 1903-1916.

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.

Harriman, G. R., Bradley, A., Das, S., Rogers-Fani, P. and Davis, C. (1996) IgA class switch in Ia exon-deficient mice, role of germline transcription in class switch recombination. *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.

Hatzis, P., and Talianidis, I. (2002) Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Mol. Cell* 10 ; 1467-1477

Hein, K. et al. (1998) Processing of switch transcripts is required for targeting of antibody class switch recombination. *J. Exp. Med.* 188 ; 2369-2374.

Hengstschlager M, Williams M, Maizels N. (1994) A lambda 1 transgene under the control of a heavy chain promoter and enhancer does not undergo somatic hypermutation. *Eur J Immunol.* 24 ; 1649-56.

Hesslein DG, Schatz DG. (2001) Factors and forces controlling V(D)J recombination. *Adv Immunol.* 78 ; 169-232.

Hesslein DG, Pflugh DL, Chowdhury D, Bothwell AL, Sen R, Schatz DG. (2003) Pax5 is required for recombination of transcribed, acetylated, 5' IgH V gene segments. *Genes Dev.* 17 ; 37-42.

Honjo T, Nagaoka H, Shinkura R, Muramatsu M. (2005) AID to overcome the limitations of genomic information. *Nat Immunol.* 6 ; 655-61.

Horwitz, B. H., Zelazowski, P., Shen, Y., Wolcott, K. M., Scott, M. L., Baltimore, D. and Snapper, C. M. (1999) The p65 subunit of NF- κ B is redundant with p50 during B cell proliferative responses, and is required for germline C_H transcription and class switching to IgG3. *J Immunol.* 162 ; 1941-1946.

Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethamann, H., Kamijo, R, Vilcek, J. Zinkernagel, R. M. and Aguet, M. (1993) Immune response in mice lack the interferon- γ receptor. *Science* 259 ; 1742-1745.

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.

Ito S, Nagaoka H, Shinkura R, Begum N, Muramatsu M, Nakata M, Honjo T. (2004) Activation-induced cytidine deaminase shuttles between nucleus and cytoplasm like apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 ; 1975-80.

Johnson K, Angelin-Duclos C, Park S, Calame KL. (2003) Changes in histone acetylation are associated with differences in accessibility of V(H) gene segments to V-DJ recombination during B-cell ontogeny and development. *Mol Cell Biol*. 23 ; 2438-50.

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., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. & Alt, F.W. (2006) Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol*. 24 ; 541-70.

Kadesh, T. (1992) Helix-loop-helix proteins in the regulation of immunoglobulin gene transcription. *Immunol. Today* 13 ; 31-36.

Kaminski, D.A. and Stavnezer, J. (2004) Antibody class switching : uncoupling S region accessibility from transcription. *Trends Genetics* 20 ; 337- 340.

Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T. and Grusby, M. J. (1996) STAT6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity* 4 ; 313.

Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Kikutani, H. (1994) The immune response in CD40-deficient mice : impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1 ; 167-178.

Kenter, A. L., Wuerffel, R., Sen, R., Jamieson, C. E. and Merkulov, G. V. (1993) Switch recombination breakpoints occur at nonrandom positions in the S γ tandem repeat. *J Immunol*. 151 ; 4718-4731.

Kenter, A.L., Wuerfell, R., Dominguez, C., Shanmugam, A. & Zhang, H. (2004) Mapping of a functional recombination motif that defines isotype specificity for mu \rightarrow gamma3 switch recombination implicates NF-kappaB p50 as the isotype-specific switching factor. *J. Exp. Med*. 199 ; 617-27.

Kerr WG, Hendershot LM, Burrows PD. (1991) Regulation of IgM and IgD expression in human B-lineage cells. *J Immunol*. 146 ; 3314-21.

Khamlichi AA, Pinaud E, Decourt C, Chauveau C, Cogné M (2000) The 3' IgH regulatory region : a complex structure in a search for a function. *Adv Immunol*. 75 ; 317-345.

Kim, U., Qin, X. F., Gong, S., Stevens, S., Luo, Y., Nussenzweig, M. and Roeder, R. G. (1996) The B-celle specific transcription factor OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. *Nature* 383 ; 542-547.

Kinoshita, K. and Honjo, T. (2001) Linking class-switch recombination with somatic hypermutation. *Nat.Rev. Mol. Cell. Biol*. 2 ; 493-503.

Kitamura D, Rajewsky K. (1992) Targeted disruption of mu chain membrane exon causes loss of heavy-chain allelic exclusion. *Nature* 356 ; 154-6.

- Klein, S.**, Sablitzky, F. and Radbruch, A. (1984) Deletion of the IgH enhancer does not reduce immunoglobulin heavy chain production of a hybridoma IgD class switch variant. *EMBO J.* 3 ; 2473-2476.
- Klix N**, Jolly CJ, Davies SL, Bruggemann M, Williams GT, Neuberger MS. (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 ; 317-26.
- Köntgen, F.**, Grumont, R. J., Strasser, A., Metclaf, D., Li, R., Tarlington, D. and Gerondakis, S. (1995) Mice lacking the c-rel proto-oncogene exhibits defects in lymphocyte proliferation, humoral immunity, and interleukin-2 expression. *Genes Dev.* 9 , 1965-1977.
- Koralov SB**, Novobrantseva TI, Hochedlinger K, Jaenisch R, Rajewsky K. (2005) Direct in vivo VH to JH rearrangement violating the 12/23 rule. *J Exp Med.* 201 ; 341-8.
- Korthauer, U.**, Graf, D., Mages, H. W., Briere, F., Padayachee, M., Malcom, S., Ugazio, A. G., Nortarangelo, L. D., Levinsky, R. J. and Kroccek, R. A. (1993) Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 361 ; 539-541.
- Kosak, S.T.**, Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Le Beau, M.M., Fisher, A.G., and Singh, H. (2002) Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* 296 ;158-62.
- 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.
- Kuhn, R.**, Rajewsky, K. and Muller, W. (1991) Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254 ; 707-710.
- 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 mu exon splice donor site : evidence for multiple I mu-like germline transcripts. *J Immunol.* 164 ; 1451-1457.
- Larson ED**, Cummings WJ, Bednarski DW, Maizels N. (2005) MRE11/RAD50 cleaves DNA in the AID/UNG-dependent pathway of immunoglobulin gene diversification. *Mol Cell* 20 ; 367-75.
- Layton, J. E.**, Vitetta, E. S., Uhr, J. W. and Krammer, P. H. (1984) Clonal analysis of B cells induced to secrete IgG by T cell-derived lymphokine(s). *J Exp Med.* 160 ; 1850-1863.
- Lebman, D. A.**, Lee, F. D. and Coffman, R. L. (1990)a. Mechanism for transforming growth factor beta and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J Immunol.* 144 ; 952-959.
- Lebman, D. A.**, Nomura, D.Y., Coffman, R. L. and Lee, F. (1990)b. Molecular characterization of germ-line immunoglobulin A transcripts produced during transforming growth factor type beta-induced isotype switching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87 ; 3962-3966.
- Lehmann A.** (2003) Low-fidelity DNA polymerases. *Curr Biol.* 13 ; R585.
- Leonard WJ**, O'Shea JJ. (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol.* 16 ; 293-322.

- Li, S.C.**, Rothman, P. B., Zhang, J., Chan, C., Hirsh, D. and Alt, F. W. (1994) Expression of I μ -C μ hybrid germline transcript subsequent to immunoglobulin heavy chain class switching. *Int Immunol.* 6 ; 491-497.
- Li Z**, Zhao C, Iglesias-Ussel MD, Polonskaya Z, Zhuang M, Yang G, Luo Z, Edelman W, Scharff MD. (2006) The mismatch repair protein Msh6 influences the in vivo AID targeting to the Ig locus. *Immunity* 24 ; 393-403.
- Liang HE**, Hsu LY, Cado D, Schlissel MS. (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.
- Liao, F.**, Giannini, S. L. and Birshtein, B. K. (1992) A nuclear DNA-binding protein expressed during early stages of B cell differentiation interacts with diverse segments within and 3' of the IgH chain gene cluster. *J. Immunol.* 148 ; 2909-2917.
- Lieberson, R.**, Giannini, S. L., Birstein, B. K. and Eckhardt, L. (1991) An enhancer at the 3' end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucleic Acids Res.* 19 ; 933-937.
- Lieberson, R.**, Ong, J., Shi, X. and Eckhardt, L. (1995) Immunoglobulin gene transcription ceases upon deletion of a distant enhancer. *EMBO J.* 14 ; 6229-6238.
- Lin, Y. C.** and Stavnezer, J. (1992) Regulation of transcription of the germ-line Ig alpha constant region gene by an ATF element and by novel transforming growth factor-beta 1-responsive elements. *J Immunol.* 149 ; 2914-2925.
- Lin, M. M.**, Green, N. S., Zhang, W. and Scharff, M. D. (1998) The effects of Emu, 3' alpha (hs 1,2) and 3' kappa enhancers on mutation of an Ig-VDJ-Cgamma2a Ig heavy gene in cultured B cells. *Int. Immunol.* 10 ; 1121-1129.
- Linderson, Y.**, Cross, D., Neurath, M. F. and Pettersson, S. (1997) NFE, a new transcriptional activator that facilitates p50 and c-Rel-dependent IgH 3' enhancer activity. *Eur. J. Immunol.* 27 ; 468-475.
- Linehan, L. A.**, Warren, W. D., Thompson, P. A., Grusby, M. J. and Berton, M. T. (1998) STAT6 is required for IL-4-induced germline Ig gene transcription and switch recombination. *J Immunol.* 161 ; 302-310.
- Litt MD**, Simpson M, Recillas-Targa F, Prioleau MN, Felsenfeld G (2001) Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *EMBO J.* 20 ; 2224-2235.
- Liu, Y. J.**, Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y. and MacLennan, I. C. (1991) Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol.* 21 ; 2951-2962.
- Liu YJ**, Barthelemy C, de Bouteiller O, Arpin C, Durand I, Banchereau J. (1995) Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. *Immunity* 2 ; 239-248.

Longerich S, Tanaka A, Bozek G, Nicolae D, Storb U. (2005) The very 5' end and the constant region of Ig genes are spared from somatic mutation because AID does not access these regions. *J Exp Med.* 202 ; 1443-54.

Lozano F, Rada C, Jarvis JM, Milstein C. (1993) Affinity maturation leads to differential expression of multiple copies of a kappa light-chain transgene. *Nature* 363 ; 271-3.

Lutz M, Burke LJ, Barreto G, Goeman F, Greb H, Arnold R, Schultheiß H, Brehm A, Kouzarides T, Lobanenkov V, Renkawitz R (2000) Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases. *Nucleic Ac Res.* 28 ; 1707-1713.

Lutzker, S. and Alt, F. W. (1988) Structure and expression of germ line immunoglobulin gamma 2b transcripts. *Mol Cell Biol.* 8 ; 1849-1852.

Lutzker S, Rothman P, Pollock R, Coffman R, Alt FW. (1988) Mitogen- and IL-4-regulated expression of germ-line Ig gamma 2b transcripts: evidence for directed heavy chain class switching. *Cell* 53 ; 177-84.

McBride KM, Barreto V, Ramiro AR, Stavropoulos P, Nussenzweig MC. (2004) Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *J Exp Med.* 199 ; 1235-44.

MacHeyzer-Williams, M.G. and Ahmed, R. (1999) B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr. Opin. Immunol.* 11 ; 172-179.

MacIntyre, T. M., Klinman, D. R., Rothman, P., Lugo, M., Dash, J. R., Monod, J. J. and Snapper, C. M. (1993) Transforming growth factor- β 1 selectively stimulates immunoglobulin G2b secretion by lipopolysaccharide-activated murine B cells. *J Exp Med.* 177 ; 1031-1037.

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 c-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.

Maes J, O'Neill LP, Cavelier P, Turner BM, Rougeon F, Goodhardt M. (2001) Chromatin remodeling at the Ig loci prior to V(D)J recombination. *J Immunol.* 167 ; 866-74.

Manis, J. P., Van der Stoep, N., Tian, M., Ferrini, R., Davidson, L., Bottaro, A. and Alt, F. W. (1998a) Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J. Exp. Med.* 188 ; 1421-1431.

Manis, J. P., Gu, Y., Lansford, R., Sonoda, E., Ferrini, R., Davidson, L., Rajewsky, K. and Alt, F. W. (1998b) Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. *J Exp Med.* 187 ; 2081-2189.

Manis, J.P., Tian, M. & Alt, F.W. (2002) Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol.* 23 ; 31-39.

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.

Manser, T., Thumas-Brundage, K. M., Casson, L. P., Giusti, A. M., Hande, S., Notidis, E. and Vora, K. A. (1998) The roles of antibody variable region hypermutation and selection in the development of the memory B-cell compartment. *Immunol. Rev.* 162 ; 182-196.

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.

Matthias, P. and Baltimore, D. (1993) The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3' enhancer close to the α constant region. *Mol. Cell. Biol.* 13 ; 1547-1553.

Meffre E., Casellas R, Nussenzweig MC (2000) Antibody regulation of B cell development. *Nature Immunol.* 1 ; 379-385.

Meyer, K. B., Skogberg, M., Margenfeld, C., Ireland, J. and Pettersson, S. (1995) Repression of the immunoglobulin heavy chain 3' enhancer by helix-loop-helix protein Id3 via a functionally important E47/E12 binding site : implications for developmental control of enhancer function. *Eur. J. Immunol.* 25 ; 1770-1777.

Michael N., Shen HM, Longerich S, Kim N, Longacre A, Storb U. (2003) The E box motif CAGGTG enhances somatic hypermutation without enhancing transcription. *Immunity* 19 ; 235-42.

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.

Michaelson, J. S., Ermakova, O., Birshstein, B. K., Ashouian, N., Chevillard, C., Riblet, R. and Schildkraut, C. L. (1997) Regulation of the replication of the murine immunoglobulin heavy chain gene locus : evaluation of the role of the 3' regulatory region. *Mol. Cell Biol.* 17 ; 6167-6174.

Michaelson, J. S., Singh, M. and Birshstein, B. K. (1996) B cell lineage-Specific Activator Protein (BSAP) : a player at multiple stages of B cell development. *J. Immunol.* 156 ; 2349-2351.

Michaelson, J. S., Singh, M., Snapper, C. M., Sha, W. C., Baltimore, D. and Birshstein, B. K. (1996) Regulation of 3' IgH enhancers by a common set of factors, including κ B-binding proteins. *J. Immunol.* 156 ; 2828-2839.

Mills, F. C., Brooker, J. S., Camerini-Otero, R. D. (1990) Sequences of human immunoglobulin switch regions: implications for recombination and transcription. *Nucleic Acids Res.* 18 ; 7305-7316.

Mizuta, T. R., Fukita, Y., Myoshi, T., Shimizu, A. and Honjo, T. (1993) Isolation of a cDNA encoding a binding protein to 5' phosphorylated single-stranded DNA with G-rich sequences. *Nucleic Acids Res.* 21 ; 1761-1766.

Morvan CL, Pinaud E, Decourt C, Cuvillier A, Cogne M. (2003) The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* 102 ; 1421-7.

Mostoslavsky, R., Alt, F.W. and Rajewsky, K. (2004) The lingering enigma of the allelic exclusion mechanism. *Cell* 118 ; 539-544.

Muramatsu M, Sankaranand VS, Anant S, Sugai M, Kinoshita K, Davidson NO, 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 ; 18470-6.

Muramatsu M, Kinoshita, K., Faragasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. and Honjo, T. (2000) Class switch recombination and hypermutation requires activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102 ; 553-563.

Muravyova E, Golovnin A, Gracheva E, Parshikov A, Belenkaya T, Pirrotta V, Georgiev P (2001) Loss of insulator activity by paired Su(Hw) chromatin insulators. *Science* 291 ; 495-497

Murre C. (2005) Helix-loop-helix proteins and lymphocyte development. *Nat Immunol.* 6 ; 1079-86.

Muto, A., Hoshino, H., Madisen, L., Yanai, N., Obinata, M., Karasuyama, H., Hayashi, N., Nakauchi, H., Yamamoto, M., Groudine, M. and Igarashi, K. (1998) Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small Maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer. *EMBO J.* 17 ; 5734-5743.

Muto A, Tashiro S, Nakajima O, Hoshino H, Takahashi S, Sakoda E, Ikebe D, Yamamoto M, Igarashi K. (2004) The transcriptional programme of antibody class switching involves the repressor Bach2. *Nature* 429 ; 566-71.

Muto T, Okazaki IM, Yamada S, Tanaka Y, Kinoshita K, Muramatsu M, Nagaoka H, Honjo T. (2006) Negative regulation of activation-induced cytidine deaminase in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 ; 2752-7.

Nabirochkin S, Ossokina M, Heidmann T (1998) A nuclear matrix/scaffold attachment region co-localizes with the gypsy retrotransposon insulator sequence. *J Biol Chem.* 273 ; 2473-2479.

Nagaoka H, Muramatsu M, Yamamura N, Kinoshita K, Honjo T. (2002) Activation-induced deaminase (AID)-directed hypermutation in the immunoglobulin Smu region: implication of AID involvement in a common step of class switch recombination and somatic hypermutation. *J Exp Med.* 195 ; 529-34.

Nagaoka H, Ito S, Muramatsu M, Nakata M, Honjo T. (2005) DNA cleavage in immunoglobulin somatic hypermutation depends on de novo protein synthesis but not on uracil DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102 ; 2022-7.

Nagata K, Nakamura T, Kitamura F, Kuramochi S, Taki S, Campbell KS, Karasuyama H. (1997) The Ig alpha/Igbeta heterodimer on mu-negative proB cells is competent for transducing signals to induce early B cell differentiation. *Immunity* 7 ; 559-70.

Nambu Y, Sugai M, Gonda H, Lee CG, Katakai T, Agata Y, Yokota Y, Shimizu A. (2003) Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* 302 ; 2137-40.

Neuberger, MS. and Calabi, F. (1983) Reciprocal chromosome translocation between c-myc and immunoglobulin $\gamma 2b$ genes. *Nature* 305 ; 240-243.

Neuberger MS, Milstein C. (1995) Somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol.* 7 ; 248-54.

Neuberger MS, Harris RS, Di Noia J, Petersen-Mahrt SK. (2003) Immunity through DNA deamination. *Trends Biochem Sci.* 28 ; 305-12.

Neurath, M. F., Strober, W. and Wakatsuki, Y. (1994) The murine Ig 3' α enhancer is a target site with repressor function for the B cell lineage-specific transcription factor BSAP (NF-HB, S α -BP). *J. Immunol.* 153 ; 730-742.

Neurath, M. F., Max, E. E. and Strober, W. (1995) Pax5 (BSAP) regulates the murine immunoglobulin 3' α enhancer by suppressing binding of NF- α P, a protein that controls heavy chain transcription. *Proc Natl Acad Sc. USA.* 92 ; 5336-5340.

Nikaido, T., Nikai, S. and Honjo, T. (1981) Switch region of immunoglobulin C μ gene is composed of simple tandem repetitive sequences. *Nature* 292 ; 845-848.

Nikaido, T., Yamawaki-Kataoka, Y. and Honjo, T. (1982) Nucleotide sequences of switch regions of immunoglobulin Ce and Cg genes and their comparison. *J Biol Chem.* 257 ; 7322-7329.

Nitschke L, Kestler J, Tallone T, Pelkonen S, Pelkonen J. (2001) Deletion of the DQ52 element within the Ig heavy chain locus leads to a selective reduction in VDJ recombination and altered D gene usage. *J Immunol.* 166 ; 2540-52.

Norio P, Kosiyatrakul S, Yang Q, Guan Z, Brown NM, Thomas S, Riblet R, Schildkraut CL. (2005) Progressive activation of DNA replication initiation in large domains of the immunoglobulin heavy chain locus during B cell development. *Mol Cell.* 20 ; 575-87.

Nussenzweig MC, Shaw AC, Sinn E, Danner DB, Holmes KL, Morse HC 3rd, Leder P. (1987) Allelic exclusion in transgenic mice that express the membrane form of immunoglobulin mu. *Science* 236 ; 816-9.

Nutt SL, Urbanek P, Rolink A, Busslinger M. (1997) Essential functions of Pax5 (BSAP) in pro-B cell development: difference between fetal and adult B lymphopoiesis and reduced V-to-DJ recombination at the IgH locus. *Genes Dev.* 11 ; 476-91.

Nutt, S. L., Morrison, A. M., Dörfler, P., Rolink, A. and Busslinger, M. (1998) Identification of BSAP (Pax-5) target genes in early B-cell development by loss- and gain-of-function experiments. *EMBO J.* 17 ; 2319-2333.

Obata, M., Kataoka, T., Nakai, S., Yamagashi, H., Takahashi, N., Yamawaki-Kataoka, Y., Nikaido, T., Shimizu, A and Honjo, T. (1981) Structure of rearranged $\gamma 1$ chain gene and its implication to immunoglobulin class-switch mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78 ; 2437-2441.

O'Brien RL, Brinster RL, Storb U. (1987) Somatic hypermutation of an immunoglobulin transgene in kappa transgenic mice. *Nature* 326; 405-9.

Ochsenbein, A., Pinschewer, D. D., Sierro, S., Horvath, E., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (2000). Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 ; 13263-13268.

Odegard VH, Kim ST, Anderson SM, Shlomchik MJ, Schatz DG. (2005) Histone modifications associated with somatic hypermutation. *Immunity* 23 ; 101-10.

Oettgen HC, Martin TR, Wynshaw-Boris A, Deng C, Drazen JM, Leder P. (1994) Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature* 370 ; 367-70.

Oettgen, H.C. (2000) Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signals and the functions of ϵ germline transcripts. *Curr. Opin. Immunol.* 12 ; 618-623.

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 ; 1517-23.

Oettinger, M.A. (2004) How to keep V(D)J recombination under control. *Immunol. Rev.* 200 ; 165-181.

Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V (2001) CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends in Genetics* 17 ; 520-527.

Okazaki, I.M., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Yoshikawa, K. & Honjo, T. (2002) The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts. *Nature* 416 ; 340-5

Okazaki IM, Hiai H, Kakazu N, Yamada S, Muramatsu M, Kinoshita K, Honjo T. (2003) Constitutive expression of AID leads to tumorigenesis. *J Exp Med.* 197 ; 1173-81.

Papavasiliou FN, Schatz DG. (2000) Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature* 408 ; 216-21.

Pascual, V., Liu, Y. J., Magalski, A., De Bouteiller, O., Banchereau, J. and Capra, J. D. (1994) Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med.* 180 ; 329-339.

Perlot T, Alt FW, Bassing CH, Suh H, Pinaud E. (2005) Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 ; 14362-7.

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

Petersen S, Casellas R, Reina-San-Martin B, Chen HT, Difilippantonio MJ, Wilson PC, Hanitsch L, Celeste A, Muramatsu M, Pilch DR, Redon C, Ried T, Bonner WM, Honjo T, Nussenzweig MC, Nussenzweig A. (2001) AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* 414 ; 660-5.

Petersen-Mahrt SK, Harris RS, Neuberger MS. (2002) AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 418 ; 99-103.

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

Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J. & Goodman, M.F. (2003) Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* 424 ; 103-7.

Pikaart MJ, Recillas-Targa F, Felsenfeld G (1998) Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes & Development* 12 ; 2852-2862.

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

Ptashne M. (1986) Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* 322 ; 697-701.

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 GT, Nilsen H, Barnes DE, Lindahl T, Neuberger MS. (2002) Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol.* 12 ; 1748-55.

Rada C, Di Noia JM, Neuberger MS. (2004) Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol Cell.* 16 ; 163-71.

Radcliffe, G., Lin, Y. C., Julius, M., Marcu, K. B. and Stavnezer, J. (1990) Structure of germ line immunoglobulin alpha heavy-chain RNA and its location on polysomes. *Mol Cell Biol.* 10 ; 382-386.

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

Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., Jankovic, M. & Nussenzweig, M.C. (2003) Transcription enhances AID-mediated cytosine deamination by exposing single-stranded DNA on the non template strand. *Nat. Immunol.* 4 ; 452-6.

Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, Bell AC, Litt MD, West AG, Gaszner M, Felsenfeld G (2002) Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken β -globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 ; 6883-6888.

Reina-San-Martin B, Difilippantonio S, Hanitsch L, Masilamani RF, Nussenzweig A, Nussenzweig MC. (2003) H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation. *J Exp Med.* 197 ; 1767-78.

Renshaw, B. R., Fanslow, W. C., Armitage, R. J., Campbell, K. A., Liggitt, D., Wright, B., Davison, B. L. and Maliszewski, C. R. (1994) Humoral immune response in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med.* 180 ; 1889-1900.

Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourc-Lagelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kaysereli, H., Ugazio, A. G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L., Kinoshita, K., Honjo, T., Fisher, A. and Durandy, A. (2000) Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (IgM2). *Cell* 102 ; 565-575.

Rinkenberger, J. L., Wallin, J. J., Johnson, K. W. and Koshland, M. E. (1996) An interleukin-2 signal relieves BSAP (Pax5)-mediated repression of the immunoglobulin J chain gene. *Immunity* 5 ; 377-386.

Roldan, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M., and Skok, J.A. (2005) Locus 'decontraction' and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat. Immunol.* 6 ; 31-41.

Rollink, A. G., Schaniel, C., Busslinger, M., Nutt, S. L. and Melchers, F. (2000) Fidelity and infidelity is commitment to B-lymphocyte lineage development. *Immunol Rev.* 175 ; 104-111.

Roth, D.B. and Roth, S.Y. (2000) Unequal access : regulating V(D)J recombination through chromatin remodelling. *Cell* 103 ; 699-702.

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 lipopolysaccharide-plus-interleukin-4-responsive element located at the promoter of germ line epsilon transcripts. *Mol Cell Biol.* 11 ; 5551-5561.

Saitoh N, Bell AC, Recillas-Targa F, West AG, Simpson M, Pikaart M, Felsenfeld G (2000) Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken β -globin domain. *EMBO J.* 19 ; 2315-2322.

Sakai, E., Bottaro, A. and Alt, F. W. (1999) The Ig heavy chain intronic enhancer core region is necessary and sufficient to promote efficient class switch recombination. *Int. Immunol.* 11 ; 1709-1713.

Saleque, S., Singh, M., Little, R. D., Giannini, S., Michaelson, J. S. and Birshtein, B. K. (1997) Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C α 3'E and hs3). *J. Immunol.* 158 ; 4780-4787.

Saleque, S., Singh, M. and Birshtein, B. K. (1999) Ig heavy chain expression and class switching in vitro from an allele lacking the 3' enhancers DNase I-hypersensitive hs3a and hs1,2. *J. Immunol.* 162 ; 2791-2803.

Samara M, Oruc Z, Dougier HL, Essawi T, Cogne M, Khamlichi AA. (2006) Germ line transcription in mice bearing neor gene downstream of I γ 3 exon in the Ig heavy chain locus. *Int Immunol.* 18 ; 581-589.

- Sayegh CE**, Quong MW, Agata Y, Murre C. (2003) E-proteins directly regulate expression of activation-induced deaminase in mature B cells. *Nat Immunol.* 4 ; 586-93.
- Sayegh, C.**, Jhunjhunwala, S., Riblet, R., and Murre, C. (2005) Visualization of looping involving the immunoglobulin heavy-chain locus in developing B cells. *Genes Dev.* 19 ; 322-327.
- Schatz DG**, Oettinger MA, Baltimore D. (1989) The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59 ; 1035-48.
- Schittek, B.** and Rajewsky, K. (1990) Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors. *Nature* 346 ; 749-751.
- Schlissel, M.S.** (2003) Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat. Rev. Immunol.* 3 ; 890-899.
- Schrader CE**, Edelmann W, Kucherlapati R, Stavnezer J. (1999) Reduced isotype switching in splenic B cells from mice deficient in mismatch repair enzymes. *J Exp Med.* 190 ; 323-30.
- Schrader CE**, Vardo J, Stavnezer J. (2002) Role for mismatch repair proteins Msh2, Mlh1, and Pms2 in immunoglobulin class switching shown by sequence analysis of recombination junctions. *J Exp Med.* 195 ; 367-73.
- Schrader CE**, Bradley SP, Vardo J, Mochegova SN, Flanagan E, Stavnezer J. (2003) Mutations occur in the Ig Smu region but rarely in Sgamma regions prior to class switch recombination. *EMBO J.* 22 ; 5893-903.
- Schubart, K.**, Rolink, A. G., Kosco-Vilbois, M. H., Botteri, F. and Mathias, P. (1996) B-cell specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob-1 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 Mathias, P. (2001) B cell development and immunoglobulin gene transcription in the absence of Oct-2 and OBF-1. *Nat 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.
- Seki, M.**, Gearhart, P.J. and Wood, R.D. (2005) DNA polymerases and somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *EMBO reports* 6 ; 1143-1148.
- Sekiguchi JM**, Ferguson DO. (2006) DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey. *Cell* 124 ; 260-2.
- Sen, R.** (2005) A move to exclude. *Nat. Immunol.* 6 ; 128-130.
- Sen R**, Oltz E. (2006) Genetic and epigenetic regulation of IgH gene assembly. *Curr Opin Immunol.* 18 ; 237-42.

Serwe, M. and Sablitzky, F. (1993) V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *EMBO J.* 12 ; 2321-2327.

Severinson E, Fernandez C, Stavnezer J. (1990) Induction of germ-line immunoglobulin heavy chain transcripts by mitogens and interleukins prior to switch recombination. *Eur J Immunol.* 20 ; 1079-84.

Sha, W. C., Liou, H-C., Tuomanen, E. I. and Baltimore, D. (1995) Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 80 ; 321-330.

Shanmugam, A., Shi, M.J., Yauch, L., Stavnezer, J. & Kenter, A.L. (2000) Evidence for class-specific factors in immunoglobulin isotype switching. *J. Exp. Med.* 191 ; 1365-80.

Shapiro DA, Threadgill DS, Copfer MJ, Corey DA, McCool TL, McCormick LL, Magnuson TR, Greenspan NS, Schreiber JR. (1998) Gamma 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 ; 3393-9.

Sharpe MJ, Milstein C, Jarvis JM, Neuberger MS. (1991) Somatic hypermutation of immunoglobulin kappa may depend on sequences 3' of C kappa and occurs on passenger transgenes. *EMBO J.* 10 ; 2139-45.

Shinkura R, Tian M, Smith M, Chua K, Fujiwara Y, Alt FW. (2003) The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat Immunol.* 4 ; 435-41.

Shinkura R, Ito S, Begum NA, Nagaoka H, Muramatsu M, Kinoshita K, Sakakibara Y, Hijikata H, Honjo T. (2004) Separate domains of AID are required for somatic hypermutation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 5 ; 707-12.

Shparago, N., Zelazowski, P., Jim, L., McIntyre, T. M., Stuber, E., Pecanha, L. M. T., Kehry, M. R., Monod, J. J., Max, E. E. and Snapper, C. M. (1996) IL-10 selectively regulates murine isotype switching. *Int Immunol.* 8 ; 781-890.

Siekevitz, M., Kocks, C., Rajewsky, K. and Dildrop, R. (1987) Analysis of somatic mutation and class switching in naive and memory B cells generating adoptive primary and secondary responses. *Cell* 48 ; 757-770.

Singh, M. and Birshstein, B. K. (1993) NF-HB (BSAP) is a repressor of the murine immunoglobulin heavy-chain 3' α enhancer at early stages of B-cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 13 ; 3611-3622.

Singh, M. and Birshstein, B. K. (1996) Concerted repression of an immunoglobulin heavy-chain enhancer, 3' α E(hs1,2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 ; 4392-4397.

Skok JA, Brown KE, Azuara V, Caparros ML, Baxter J, Takacs K, Dillon N, Gray D, Perry RP, Merckenschlager M, Fisher AG. (2001) Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat Immunol.* 2 ; 848-54.

Slifka, M. K., Antia, R., Whitmire, J. K. and Ahmed, R. (1998) Humoral immunity due to a long-lived plasma cells. *Immunity* 8 ; 363-372.

- Snapper, C. M.**, Finkelman, F. D., Stefany, D., Conrad, D. H. and Paul, W. E. (1988) IL-4 induces co-expression of intrinsic membrane IgG1 and IgE by murine B cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol.* 141 ; 489-498.
- Snapper, C. M.**, McIntyre, T. M., Mandler, R., Pecanha, L. M., Finkelman, F. D., Lees, A. and Mond, J. J. (1992) Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J Exp Med.* 175 ; 1367-1371.
- Snapper, C. M.**, Rosas, F. R., Zelazowsky, P., Moorman, M. A., Kehry, M. R., Bravo, R. and Weih, F. (1996) B cells lacking RelB are defective in proliferative responses, but undergo normal B cell maturation to Ig secretion and Ig class switching. *J. Exp. Med.* 184 ; 1537-1541.
- Snapper, C. M.**, Zelazowsky, P., Rosas, F. R., Kehry, M. R., Tian, M., Baltimore, D. and Sha, W. C. (1996) B cells from p50/NF- κ B knock-out mice have selective defects in proliferation, differentiation, germ-line C_H transcription, and Ig class switching. *J. Immunol.* 156 ; 183-191.
- Snapper, C. M.**, Marcu, K. B. and Zelazowsky, P. (1997) The immunoglobulin class switch : beyond « accessibility ». *Immunity* 6 ; 217-223.
- Spicuglia S**, Franchini DM, Ferrier P. (2006) Regulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol.* 18 ; 158-63.
- Stanton, L. W.** and Marcu, K. B. (1982) Nucleotide sequence and properties of the murine γ 3 immunoglobulin heavy chain gene swith region : implications for successive C γ gene switching. *Nucleic Acid Res.* 10 ; 5993-6006.
- 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.
- Sugai M**, Gonda H, Kusunoki T, Katakai T, Yokota Y, Shimizu A. (2003) Essential role of Id2 in negative regulation of IgE class switching. *Nat Immunol.* 4 ; 25-30.
- Szabo PE**, Tang SH, Rentsendorj A, Pfeifer GP, Mann JR (2000) Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Current biol*, 10 ; 607-610.
- Szabo PE**, Tang SH, Reed MR, Silva FJ, Tsark WM, Mann JR (2002) The chicken beta-globin insulator element conveys chromatin boundary activity but not imprinting at the Igf2/H19 domain. *Development* 129 ; 897-904.
- Tang, H. and Sharp, P. A.** (1999). Transcriptional regulation of the murine 3' IgH enhancer by OCT-2. *Immunity.* 11, 517-526.
- Tashiro J**, Kinoshita K, Honjo T. (2001) Palindromic but not G-rich sequences are targets of class switch recombination. *Int Immunol.* 13 ; 495-505.

- Taylor LD**, Carmack CE, Huszar D, Higgins KM, Mashayekh R, Sequer G, Schramm SR, Kuo CC, O'Donnell SL, Kay RM, et al. (1994) Human immunoglobulin transgenes undergo rearrangement, somatic mutation and class switching in mice that lack endogenous IgM. *Int Immunol.* 6; 579-91.
- 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.
- Thumas-Brundage, K. M.**, Vora, K. A. and Manser, T. (1997) Evaluation of the role of the 3'α heavy chain enhancer [3'αE(hs1,2)] in Vh gene somatic hypermutation. *Mol. Immunol.* 34 ; 367-378.
- Tonegawa, S.** (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302 ; 575-581.
- Tsukada S**, Sugiyama H, Oka Y, Kishimoto S. (1990) Estimation of D segment usage in initial D to JH joinings in a murine immature B cell line. Preferential usage of DFL16.1, the most 5' D segment and DQ52, the most JH-proximal D segment. *J Immunol.* 144 ; 4053-9.
- Udvardy A**, Maine E, Schedl P (1985) The 87A7 chromomere. Identification of novel chromatin structures flanking the heat shock locus that may define the boundaries of higher order domains. *J Mol Biol.* 185 ; 341-358.
- Urbánek, P.**, Wang, Z-Q., Fetka, I., Wagner, E. F. and Busslinger, M. (1994) Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. *Cell* 79 ; 901-912.
- Van Der Stoep, N.**, Gorman, J. R. and Alt, F. W. (1998) Reevaluation of 3'Ek function in stage- and lineage-specific rearrangement and somatic hypermutation. *Immunity* 8 ; 743-750.
- Wabl, M. and Burrows, P. D.** (1984) Expression of immunoglobulin heavy chains at a high level in the absence of a proposed immunoglobulin enhancer element in cis. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 ; 2452-2455.
- Wagner, S. D.**, Popov, A. V., Davies, S. L., Xian, J., Neuberger, M. S. and Brüggemann, M. (1994) The diversity of antigen-specific monoclonal antibodies from transgenic mice bearing human immunoglobulin gene miniloci. *Eur J Immunol.* 24 ; 2672-2681.
- Wang L**, Whang N, Wuerffel R, Kenter AL. (2006) AID-dependent histone acetylation is detected in immunoglobulin S regions. *J Exp Med.* 203 ; 215-26.
- Warren WD**, Berton MT. (1995) Induction of germ-line gamma 1 and epsilon Ig gene expression in murine B cells. IL-4 and the CD40 ligand-CD40 interaction provide distinct but synergistic signals. *J Immunol.* 155 ; 5637-46.
- Waters, S.**, Saikh, K. U. and Stanvezer, J. (1989) A B-cell-specific nuclear protein that binds to DNA sites 5' to immunoglobulin Sα tandem repeats is regulated during differentiation. *Mol Cell Biol.* 9 ; 5594-5601.

Weill JC, Bertocci B, Faili A, Aoufouchi S, Frey S, De Smet A, Storck S, Dahan A, Delbos F, Weller S, Flatter E, Reynaud CA. (2002) Ig gene hypermutation: a mechanism is due. *Adv Immunol.* 80 ; 183-202.

West, A.G., Gaszner, M., and Felsenfeld, G. (2002) Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev.* 16 ; 271-288.

West, A.G., Huang, S., Gaszner, M., Litt, M.D., and Felsenfeld, G. (2004) Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol. Cell* 16 ; 453-463.

West, A.G., and Fraser, P. (2005) Remote control of gene transcription. *Hum Mol Genet.* 14 ; Spec No 1:R101-11.

West KL, Singha NC, De Ioannes P, Lacomis L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Cortes P. (2005) A direct interaction between the RAG2 C terminus and the core histones is required for efficient V(D)J recombination. *Immunity* 23 ; 203-12.

Williams, M. and Maizels, N. (1991) LR1, a lipopolysaccharide responsive factor with binding sites in the immunoglobulin switch regions and heavy chain enhancer. *Genes Dev.* 5, 2353-2351.

Williams, M., Hanakahi, L. A. and Maizels, N. (1993) Purification and properties of LR1, an inducible DNA binding protein from mammalian B lymphocytes. *J Biol Chem.* 268 ; 13731-13737.

Winter DB, Phung QH, Umar A, Baker SM, Tarone RE, Tanaka K, Liskay RM, Kunkel TA, Bohr VA, Gearhart PJ. (1998) Altered spectra of hypermutation in antibodies from mice deficient for the DNA mismatch repair protein PMS2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 ; 6953-8.

Wuerffel, R. A., Nathan, A. T. and Kenter, A. L. (1990) Detection of an immunoglobulin switch region-specific DNA binding protein in mitogen-stimulated mouse splenic B cells. *Mol Cel Biol.* 10 ; 1714-1718.

Wuerffel, R., Jamieson, D. E., Morgan, L, Merkulov, G. V. and Sen, R. (1992) Switch recombination breakpoints are strictly correlated with DNA recognition motifs for immunoglobulin γ 3 DNA-binding proteins. *J Exp Med.* 176 ; 339-349.

Xu, M. J. and Stavnezer, J. (1992) Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line gamma 1 RNA : analysis of the promoter/enhancer. *EMBO J.* 11 ; 145-155.

Xu, L., Kim, M. G. and Marcu, K. B. (1992) Properties of B cell stage specific and ubiquitous factors binding to immunoglobulin heavy chain gene switch regions. *Int Immunol.* 4 ; 875-887.

Xu J, Foy TM, Laman JD, Elliott EA, Dunn JJ, Waldschmidt TJ, Elsemore J, Noelle RJ, Flavell RA. (1994) Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1 ; 423-31.

Yancopoulos, G. D., DePinho, R. A., Zimmerman, K. A., Lutzker, S. G., Rosenberg, N. and Alt, F. W. (1986) Secondary genomic rearrangement events in pre-B cells: VHDJH replacement by a LINE-1 sequence and directed class switching. *EMBO J.* 5 ; 3259-3266.

Yelamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y. L., Gonzalez Fernandez, A., Pannell, R., Neuberger, M. S. and Milstein, C. (1995) Targeting of non-Ig sequences in place of the V segment by somatic hypermutation. *Nature* 376 ; 225-229.

- Yoshida K**, Matsuoka M, Usuda S, Mori A, Ishizaka K, Sakano H. (1990) Immunoglobulin switch circular DNA in the mouse infected with *Nippostrongylus brasiliensis*: evidence for successive class switching from mu to epsilon via gamma 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87 ; 7829-33.
- 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 W**, Ginjala V, Pant V, Chernukhin I, Whitehead J, Docquier F, Farrar D, Tavoosidana G, Mukhopadhyay R, Kanduri C, Oshimura M, Feinberg AP, Lobanenko V, Klenova E, Ohlsson R. (2004) Poly(ADP-ribosyl)ation regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nat Genet*. 36 ; 1105-10.
- Yusufzai, T.M.**, Tagami, H., Nakatani, Y., and Felsenfeld, G. (2004) CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol. Cell* 13 ; 291-298.
- Zarrin AA**, Alt FW, Chaudhuri J, Stokes N, Kaushal D, Du Pasquier L, Tian M. (2004) An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol*. 5 ; 1275-81.
- Zarrin, A.A.**, Tian, M., Wang, J., Borjeson, T. & Alt, F.W. (2005) Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 ; 2466-70.
- Zelazowski, P.**, Carrasco, D., Rosas, F. R., Moorman, M. A., Bravo, R. and Snapper, C. M. (1997) B cells genetically deficient in the c-rel transactivation domain have selective defects in germline C_H transcription and Ig class switching. *J Immunol*. 159 ; 3133-3139.
- Zelazowski, P.**, Shen, Y. and Snapper, C. M. (2000) NF-kappaB/p50 and NF-kappaB/c-Rel differentially regulate the activity of the 3' alphaE-hs1,2 enhancer in normal murine B cells in an activation dependant manner. *Int Immunol*. 12 ; 1167-1172.
- Zhang, J.**, 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.
- Zhong XP**, Krangel MS (1997) An enhancer-blocking element between α and δ gene segments within the human T cell receptor α/δ locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 ; 5219-5224.
- Zhuang, Y.**, Soriano, P. and Weintraub, H. (1994) The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* 79 ; 875-885.
- Zwollo, P.**, Arrieta, H., Ede, K., Molinder, K., Desiderio, S. and Pollock, R. (1997) The Pax-5 gene is alternatively spliced during B-cell development. *J Biol Chem*. 272 ; 10160-10168.