

# UNIVERSITÉ DE LIMOGES

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCE – TECHNOLOGIE - SANTÉ

Faculté des Sciences et Techniques

UMR CNRS 6101 - Laboratoire d'Immunologie

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES**

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Véronique TRUFFINET**

Le 29 juin 2007

**CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DU RÔLE DES ACTIVATEURS  
TRANSCRIPTIONNELS 3' DU LOCUS IgH PAR DES MODÈLES *IN VIVO***

Directeur de thèse : Yves DENIZOT

Soutenue devant le jury composé de :

Président : **Michel Cogné** – Professeur, Université de Limoges

Rapporteurs : **Pierre Dubus** – Professeur, Université de Bordeaux

**Bertrand Nadel** – Chargé de Recherche INSERM, Marseille

Examineurs : **Véronique Blanquet** – Professeur, Université de Limoges

Invité : **Yves Denizot** – Chargé de Recherche INSERM, Limoges

*À Emmanuel,  
À ma famille,*

# REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Michel Cogné de m'avoir accueillie chaleureusement au sein de son laboratoire ainsi que d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.*

*Je remercie Monsieur Pierre Dubus, Professeur à l'Université de Bordeaux, et Monsieur Bertrand Nadel, Chargé de Recherche INSERM à Marseille, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en qualité de rapporteurs. Je remercie également Madame Véronique Blanquet, Professeur à l'Université de Limoges, d'avoir bien voulu assumer la tâche d'examineur.*

*Je témoigne toute ma reconnaissance à Yves Denizot pour m'avoir encadrée tout au long de mon travail, pour son aide et ses conseils qui m'ont été très précieux ainsi que pour la confiance qu'il m'a témoignée durant ces quatre années de thèse.*

*Un grand merci à tous les membres, passés et présents, de l'UMR CNRS 6101 pour ces instants aussi chaleureux qu'inoubliables que nous avons passés ensemble durant toutes ces années : Hei-lanne, Stéphane, Eric toujours présent pour m'apporter son aide précieuse ; Christian pour toutes les commandes de dernières minutes ; Carine pour son aide « administrative » ; Nadine pour l'obtention de mes lignées de souris ; Gaël, Christelle, Christophe, Laurent, Claire, les deux Virginie, Rada, Anne-Gaëlle, Armelle, Nathalie, Aurélie, Stéphanie pour les bons moments passés autour de la table à café... et tous ceux que j'oublie car la liste est trop longue. Enfin, une petite pensée pour mes « collègues de 4<sup>ème</sup> année » : Sophie et Ibtissam. C'est bientôt votre tour !*

*Durant cette dernière année, j'ai eu le plaisir de travailler avec Christelle et Rémi avec qui j'ai partagé les avancées dans nos recherches.*

*D'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier mes parents et mes sœurs pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de mon travail.*

*Je terminerai en remerciant Emmanuel pour tout le bonheur que nous partageons, son aide dans les moments de doute et son soutien inconditionnel.*

# ABRÉVIATIONS

**Ac** : anticorps

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**Ag** : antigène

**AID** : cytidine désaminase induite après activation

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : acide ribonucléique messenger

**APE1** : endonucléase apyrimidique 1

**B** : lymphocyte B

**BCR** : récepteur des cellules B

**BSAP** : B-cell specific activation protein

**C** : région constante

**CAT** : chloramphénicol acétyltransférase

**CD40-L** : ligand de CD40

**CG** : centre germinatif

**CSH** : cellule souche hématopoïétique

**CSR** : commutation de classe

**D** : segment de diversité

**DNase I** : désoxyribonucléase I

**HAT** : histone acétyltransférase

**hs** : site hypersensible à la DNase I

**HLH** : hélice-boucle-hélice

**IFN** : interféron

**Ig** : immunoglobuline

**IgH** : locus de chaîne lourde d'immunoglobuline

**IgL** : locus de chaîne légère d'immunoglobuline

**IL** : interleukine

**J** : segment de jonction

**Kb** : kilobase

**kDa** : kilodalton

**KO** : « knock-out » : délétion de gène par recombinaison homologue

**LB** : lymphome de Burkitt

**LCR** : région de contrôle du locus

**LPS** : lipopolysaccharide bactérien

**MAR** : région d'ancrage à la matrice

**MB** : boîte Myc

**Néo<sup>r</sup>** : gène de résistance à la néomycine

**NHEJ** : jonction d'extrémités non homologues

**pb** : paire de bases

**PCR** : réaction de polymérisation en chaîne

**Pgk** : promoteur de la phosphoglycérate kinase

**pV<sub>H</sub>** : promoteur des régions variables des chaînes d'immunoglobulines

**RAG** : gène activant la recombinaison VDJ

**RFLP** : polymorphisme de taille de fragment de restriction

**RSS** : séquence signal de recombinaison

**S** : région switch

**SHM** : hypermutation somatique

**TCR** : récepteur des cellules T

**TdT** : déoxynucléotidyltransférase

**TGF** : transforming growth factor

**UNG** : uracil glycosilase

**V** : région variable

**-/-** : homozygote négatif

**+/+** : homozygote positif

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>- 1 -</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>- 5 -</b>
<b>1 ORGANISATION ET EXPRESSION DES GÈNES D'Ig .....</b>	<b>- 6 -</b>
1.1 LOCI DES CHAÎNES LÉGÈRES .....	- 6 -
1.1.1 Locus Igκ.....	- 6 -
1.1.2 Locus Igλ .....	- 6 -
1.2 LOCUS DES CHAÎNES LOURDES (IgH) .....	- 6 -
1.3 EXPRESSION AU COURS DU DÉVELOPPEMENT B .....	- 7 -
1.3.1 Le stade pré-proB.....	- 9 -
1.3.2 Le stade pro-B.....	- 9 -
1.3.3 Le stade pré-B.....	- 9 -
1.3.4 Le stade B immature.....	- 11 -
<b>2 GÉNÉRATION DU RÉPERTOIRE DES CELLULES B .....</b>	<b>- 12 -</b>
2.1 LES RECOMBINAISONS VDJ.....	- 12 -
2.2 L'HYPERMUTATION SOMATIQUE .....	- 15 -
2.2.1 Sélection clonale .....	- 15 -
2.2.2 Mécanismes de la SHM et rôle de AID.....	- 17 -
2.3 LA COMMUTATION ISOTYPIQUE .....	- 20 -
2.3.1 Les différents isotypes. ....	- 21 -
2.3.2 Les régions S .....	- 21 -
2.3.3 Rôles des cytokines.....	- 22 -
2.3.4 Transcription germinale et commutation de classe .....	- 23 -
2.3.5 Le rôle de AID dans la commutation de classe .....	- 25 -
<b>3 RÉGULATION DES GÈNES DU LOCUS IgH .....</b>	<b>- 27 -</b>
3.1 LES PROMOTEURS .....	- 27 -
3.2 L'ACTIVATEUR INTRONIQUE Eμ.....	- 29 -
3.3 LE PROMOTEUR/ACTIVATEUR DQ52 .....	- 32 -
3.4 LA RÉGION RÉGULATRICE SITUÉE EN 3' DU LOCUS IgH .....	- 33 -
3.4.1 Découverte de la région 3'IgH .....	- 33 -
3.4.2 Activité de la région 3'IgH au cours du développement B.....	- 36 -
3.4.3 Synergies entre les éléments 3' du locus IgH.....	- 36 -
3.4.4 Région de contrôle du locus IgH (LCR) .....	- 38 -
3.4.5 Protéines se fixant à la région 3'IgH .....	- 39 -

3.4.5.1 Protéines se fixant à hs1,2 .....	- 41 -
3.4.5.2 Protéines se fixant à hs3 .....	- 44 -
3.4.5.3 Protéines se fixant à hs4 .....	- 45 -
3.4.6 Fonctions proposées de la région 3'IgH.....	- 46 -
3.4.6.1 Réplication .....	- 46 -
3.4.6.2 Transcription germinale et commutation isotypique .....	- 46 -
3.4.6.3 Hypermutation somatique.....	- 48 -
3.4.6.4 Expression du locus IgH.....	- 49 -
3.4.6.5 Structure de la chromatine .....	- 49 -
3.5 DÉCOUVERTE D'UNE NOUVELLE RÉGION RÉGULATRICE EN 5' .....	- 52 -
<b>4 TRANSLOCATION DU GÈNE C-MYC DANS LE LOCUS IgH .....</b>	<b>- 54 -</b>
4.1 RÔLES PHYSIOLOGIQUES DE C-MYC .....	- 54 -
4.1.1 Le gène <i>c-myc</i> .....	- 54 -
4.1.2 La protéine c-Myc .....	- 54 -
4.1.3 Fonctions de la protéine c-Myc .....	- 56 -
4.1.4 Régulation de l'expression de <i>c-myc</i> .....	- 59 -
4.2 TRANSLOCATION DU GÈNE C-MYC ET LYMPHOME DE BURKITT .....	- 59 -
4.2.1 Description du lymphome de Burkitt.....	- 60 -
4.2.2 Points de cassure dans les lymphomes de Burkitt.....	- 60 -
4.3 MÉCANISMES MIS EN JEU LORS DE LA TRANSLOCATION DE C-MYC DANS LE LOCUS IgH .....	- 61 -
4.4 DÉRÉGULATION DE C-MYC LORS DU LYMPHOME DE BURKITT .....	- 63 -
4.4.1 Dérégulation de <i>c-myc</i> par les activateurs du locus IgH .....	- 63 -
4.4.2 Mutations du gène <i>c-myc</i> transloqué.....	- 65 -
<b>5 LES ISOLATEURS.....</b>	<b>- 66 -</b>
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>- 69 -</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>- 71 -</b>
<b>ARTICLE 1 : The <math>\beta</math>-globin HS4 insulator confers copy-number dependent expression of IgH regulatory elements in stable B cell transfectants. ....</b>	<b>- 73 -</b>
<b>ARTICLE 2 : The chicken <math>\beta</math>-globin HS4 insulator is not a silver bullet to obtain copy-number dependent expression of transgenes in stable B cell transfectants. ....</b>	<b>- 75 -</b>
<b>ARTICLE 3 : The 5'HS4 insulator element is an efficient tool to analyse the transient expression of an E<math>\mu</math>-GFP vector in a transgenic mouse model. ....</b>	<b>- 76 -</b>

<b>ARTICLE 4 : Insulators to improve expression of 3'IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models.....</b>	<b>78 -</b>
<b>MANUSCRIT 5 : The 3'IgH locus control region is sufficient to deregulate a <i>c-myc</i> transgene and then promotes mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype. ....</b>	<b>79 -</b>
<b><i>DISCUSSION – PERSPECTIVES</i> .....</b>	<b>81 -</b>
<b><i>ANNEXE</i> .....</b>	<b>96 -</b>
<b><i>BIBLIOGRAPHIE</i> .....</b>	<b>98 -</b>

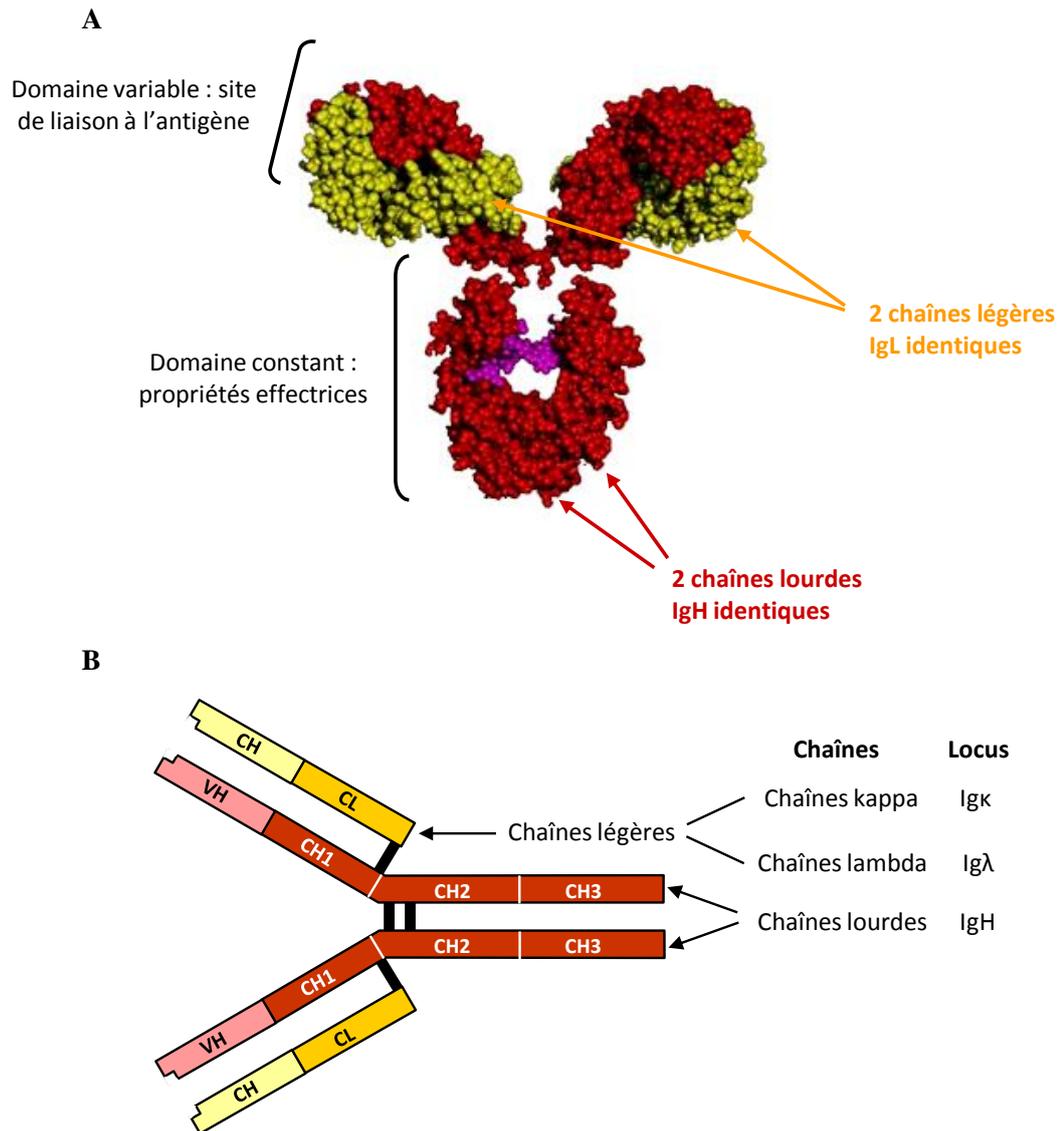
# TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Structure des immunoglobulines.</i> .....	- 3 -
<i>Figure 2 : Représentation schématique des loci codant les Ig chez la souris.</i> .....	- 7 -
<i>Figure 3 : Différenciation lymphocytaire B.</i> .....	- 8 -
<i>Figure 4 : Représentation schématique du complexe formant le pré-BCR.</i> .....	- 10 -
<i>Figure 5 : Réarrangements des gènes variables du locus IgH.</i> .....	- 12 -
<i>Figure 6 : Résolution des coupures double brin induites par les enzymes RAG.</i> .....	- 14 -
<i>Figure 7 : Cheminement des cellules B dans le centre germinatif.</i> .....	- 16 -
<i>Figure 8 : Modèle de déamination de l'ADN et implication de AID.</i> .....	- 18 -
<i>Figure 9 : Exemple de réarrangement de « switch » : commutation de classe vers les IgE.</i> .....	- 20 -
<i>Figure 10 : Structures générées par la transcription lors de la commutation de classe.</i> .....	- 24 -
<i>Figure 11 : Rôle de AID dans la commutation isotypique.</i> .....	- 26 -
<i>Figure 12 : Les promoteurs pV<sub>H</sub>.</i> .....	- 28 -
<i>Figure 13 : Sites de fixation et facteurs trans-activateurs au niveau de l'élément E<sub>μ</sub>.</i> .....	- 30 -
<i>Figure 14 : Structure des loci IgH chez la souris et l'homme.</i> .....	- 35 -
<i>Figure 15 : Schéma des sites consensuels de fixation pour les facteurs nucléaires au niveau de E<sub>μ</sub> et des activateurs 3' du locus IgH.</i> .....	- 40 -
<i>Figure 16 : Modèle d'activation d'un locus par une LCR.</i> .....	- 51 -
<i>Figure 17 : Organisation du gène c-myc et structure de la protéine c-Myc.</i> .....	- 55 -
<i>Figure 18 : Fonctions biologiques contrôlées par c-Myc dans des conditions normales et durant la lymphomagénèse.</i> .....	- 56 -
<i>Figure 19 : Localisation des points de cassure sur le gène c-myc et sur le locus IgH lors du lymphome de Burkitt chez l'homme.</i> .....	- 61 -
<i>Figure 20 : Mode d'action des isolateurs (I).</i> .....	- 66 -
<i>Figure 21 : Localisation et structure de l'isolateur situé en 5' du locus de la β-globine de poulet.</i> .....	- 68 -
<i>Figure 22 : Délétion de l'activateur hs4 par recombinaison homologue.</i> .....	- 93 -
<i>Figure 23 : Analyse des clones ES par Southern blot.</i> .....	- 94 -

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

Le système immunitaire est un système de défense remarquable qui existe chez de très nombreux organismes mais dont la forme la plus évoluée est retrouvée chez les vertébrés supérieurs. Il consiste en un ensemble de moyens (organes, tissus, cellules et molécules) permettant à un organisme de reconnaître et de tolérer ce qui lui est propre (les antigènes du soi) mais aussi de reconnaître et rejeter ce qui lui est étranger (les antigènes du non-soi). Cette fonction permet ainsi d'assurer la défense de l'organisme contre les pathogènes (d'origine bactérienne, virale ou parasitaire) et de contrôler certains dérèglements cellulaires aboutissant à la formation de tumeurs. A l'intérieur de ce système de protection, la réponse immunitaire humorale repose sur la production de molécules effectrices appelées immunoglobulines (Ig) ou anticorps et produites par les cellules de la lignée lymphocytaire B. Ces molécules sont capables de lier spécifiquement un antigène en vue de le neutraliser ou de l'éliminer.

Les immunoglobulines sont des hétérodimères protéiques, d'environ 150 kDa, exprimées à la surface des lymphocytes B ou excrétées par les plasmocytes. Elles sont composées de deux chaînes lourdes (H pour Heavy) identiques et deux chaînes légères (L pour Light) identiques (**Figure 1**). Les chaînes lourdes sont unies entre elles par un ou plusieurs ponts disulfures. Les chaînes légères sont unies aux chaînes lourdes par un pont disulfure proche de leur extrémité carboxy-terminale. Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'antigène tandis que les domaines constants des chaînes lourdes confèrent ses propriétés effectrices à l'immunoglobuline. La plupart des vertébrés possèdent deux types de chaînes légères, appelés  $\kappa$  et  $\lambda$ , qui peuvent s'associer à chacune des cinq classes de chaînes lourdes ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  et  $\alpha$ ) définissant respectivement les IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Chez la souris, les IgG sont subdivisées en sous-classes : IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.



**Figure 1 : Structure des immunoglobulines.**

**A :** Représentation tridimensionnelle d'une IgG1 de souris. Les chaînes lourdes sont représentées en rouge, les chaînes légères en jaune et les glycosylations en violet.

**B :** Représentation bidimensionnelle d'une Ig. VH et VL : régions variables des chaînes lourdes et légères. CH, CL : régions constantes des chaînes lourdes et légères.

La différenciation lymphocytaire B repose sur un programme complexe d'activation génique contrôlant, d'une part, la transcription des gènes d'Ig et, d'autre part, leur accessibilité à des remaniements majeurs par recombinaison ou mutation. Outre les recombinaisons V(D)J établissant le répertoire primaire des immunoglobulines, une diversification secondaire résultant des recombinaisons de commutation de classe et de

l'hypermutation somatique survient dans les cellules B matures. Tous ces évènements sont sous le contrôle de multiples éléments *cis*-régulateurs agissant de façon synergique. Le locus IgH, codant les chaînes lourdes, constitue ainsi une zone critique pour des évènements de translocations chromosomiques aboutissant à la dérégulation transcriptionnelle d'oncogènes, due à leur juxtaposition aux puissants activateurs transcriptionnels du locus IgH.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés, tout particulièrement, au locus IgH. C'est pourquoi l'introduction bibliographique sera essentiellement consacrée aux processus qui affectent ce locus.

# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

# 1 ORGANISATION ET EXPRESSION DES GÈNES D'Ig

Il existe trois complexes génétiques distincts mis en jeu lors de la synthèse d'immunoglobulines : les loci  $Ig\kappa$  et  $Ig\lambda$  codant les chaînes légères et le locus  $IgH$  codant les chaînes lourdes. Chaque complexe est composé de segments variables (V), de segments de jonction (J) et de gènes codant les régions constantes. Les segments de diversité (D) sont propres au locus  $IgH$ .

## 1.1 LOCI DES CHAÎNES LÉGÈRES

### 1.1.1 Locus $Ig\kappa$

Les gènes des chaînes légères  $\kappa$  sont situés sur le chromosome 6 chez la souris (sur le chromosome 2 chez l'homme). Le locus  $Ig\kappa$  murin, en configuration germinale, comporte 140 segments  $V\kappa$  (93 segments fonctionnels et 47 pseudogènes) répartis en 18 familles et 5 segments  $J\kappa$  (dont 4 sont fonctionnels). Ces segments  $V\kappa$  et  $J\kappa$  codent la partie variable de la chaîne légère  $\kappa$ . Un seul segment  $C\kappa$  code la partie constante (**Figure 2**).

### 1.1.2 Locus $Ig\lambda$

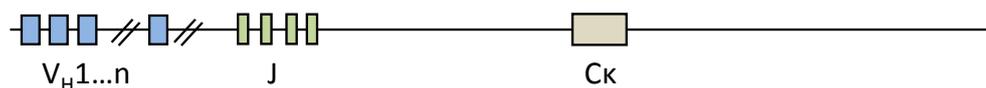
Les gènes de chaînes légères  $\lambda$  sont situés sur le chromosome 16 chez la souris (sur le chromosome 22 chez l'homme). Ils sont répartis en 4 familles comprenant chacune une paire de segments  $J\lambda$  et  $C\lambda$  ( $J\lambda 1$  à  $J\lambda 4$  et  $C\lambda 1$  à  $C\lambda 4$ ). Le locus de la souris ne comporte que trois segments  $V\lambda$  ; le segment  $V\lambda 1$  s'associe préférentiellement à  $J\lambda 1$  et  $J\lambda 3$  tandis que le segment  $V\lambda 2$  et  $V\lambda 3$  s'associe préférentiellement à  $J\lambda 2$  ( $J\lambda 4$  et  $C\lambda 4$  étant défectifs) (**Figure 2**).

## 1.2 LOCUS DES CHAÎNES LOURDES ( $IgH$ )

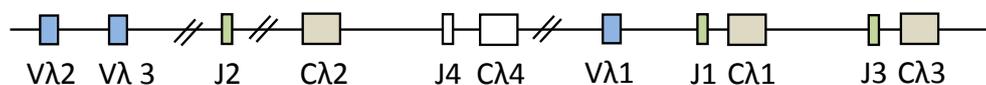
Le locus des chaînes lourdes, situé sur le chromosome 12 chez la souris (sur le chromosome 14 chez l'homme), s'étend sur plus de trois mégabases. Il comprend 150 à 200

segments  $V_H$  (dont une partie de pseudogènes), regroupés en 15 familles, localisés à l'extrémité 5' du locus IgH à proximité du télomère du bras court du chromosome 12 (Chevallard et al., 2002). Près de la moitié des segments  $V_H$  appartiennent à la famille J558. Le locus IgH comporte également 12 segments  $D_H$  et 4 segments  $J_H$  suivis de huit gènes codant les régions constantes des 8 classes et sous-classes d'immunoglobulines :  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma_3$ ,  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2b$ ,  $\gamma_2a$ ,  $\epsilon$  et  $\alpha$  (**Figure 2**). Chaque gène constant est composé de multiples exons codant les domaines structuraux propres à chaque chaîne lourde ainsi que les régions charnières pour certaines immunoglobulines. Enfin, des exons indépendants codent les régions intracytoplasmiques et transmembranaires pour chaque isotype.

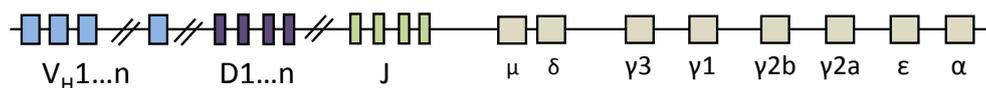
### Locus Ig $\kappa$ (chromosome 6)



### Locus Ig $\lambda$ (chromosome 16)



### Locus IgH (chromosome 12)



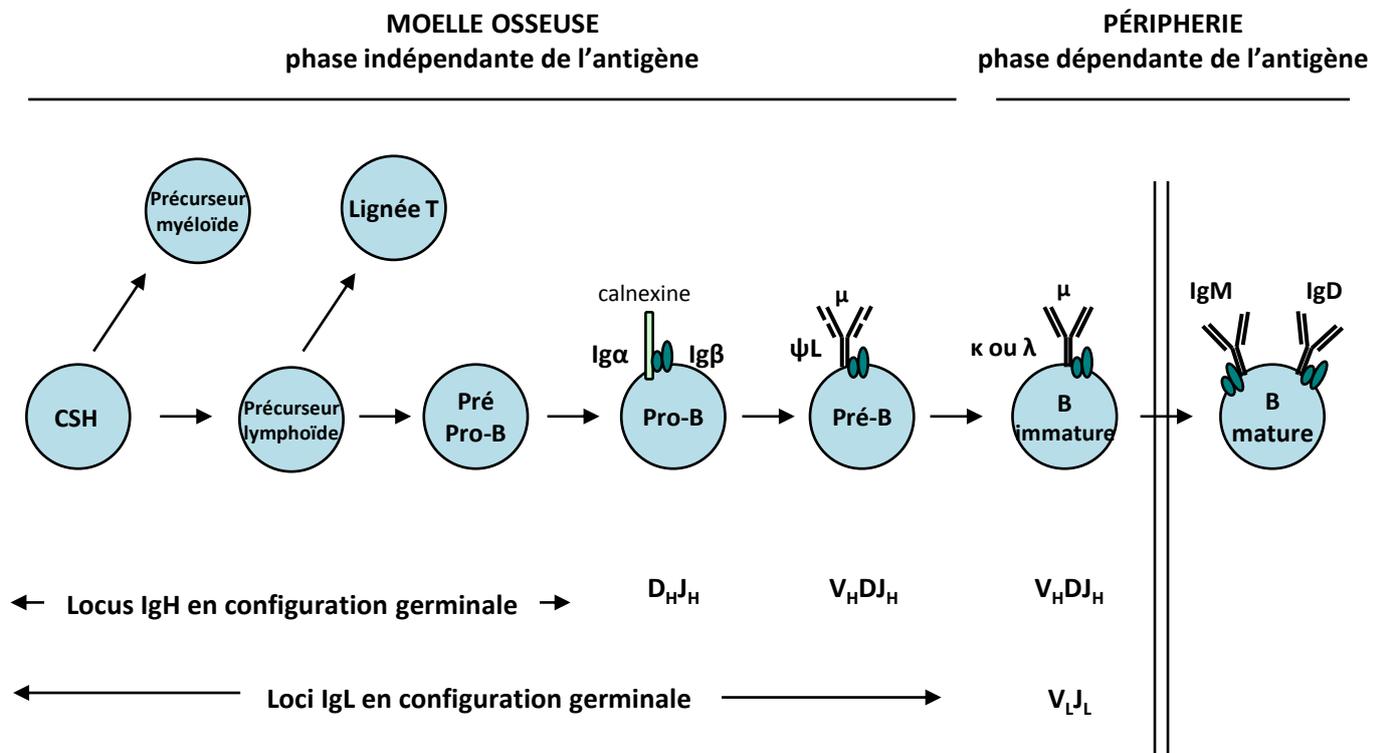
**Figure 2 : Représentation schématique des loci codant les Ig chez la souris.**

Les segments variables  $V$  sont représentés en bleu. Les segments de diversité  $D$  sont en violet, les segments de jonction  $J$  en vert et les gènes constants  $C$  en beige.

## 1.3 EXPRESSION AU COURS DU DÉVELOPPEMENT B

Les gènes d'immunoglobulines sont spécifiquement exprimés dans la lignée lymphocytaire B. Ils ne sont pas fonctionnels dans leur disposition germinale et devront d'abord subir, de façon ordonnée au cours du développement B, une série de

réarrangements somatiques aboutissant à une perte de matériel génétique. La différenciation progresse de la périphérie vers le centre de la moelle osseuse. Les principales étapes du développement B peuvent être suivies selon l'état des réarrangements des gènes d'Ig et d'après l'expression ou la perte, à la surface de la cellule, de marqueurs de différenciation (**Figure 3**). L'ontogénèse des cellules B peut globalement être divisée en deux étapes : une phase de différenciation indépendante de l'antigène qui se déroule dans la moelle osseuse, et une phase de maturation dépendante d'une stimulation antigénique et conduisant aux cellules produisant des Ig ou aux lymphocytes B mémoires. Cette dernière a lieu en périphérie (rate, ganglions lymphatiques et plaques de Peyer).



**Figure 3 : Différenciation lymphocytaire B.**

CSH : cellule souche hématopoïétique ; ψL : pseudo-chaîne légère. (Meffre et al., 2000).

### 1.3.1 Le stade pré-proB

Dans la moelle osseuse, les précurseurs B les plus immatures expriment notamment les marqueurs B220, c-kit et CD43 mais n'expriment pas CD19 (Hardy et al., 1991; Rolink et al., 1996). Ces cellules, appelées pré-proB, n'ont pas encore réarrangé les gènes d'Ig et expriment fortement le transcrite germinale JH1 (appelé aussi  $\mu 0$ ) (Li et al., 1996) (**Figure 3**). Elles expriment très faiblement les gènes RAG-1 et RAG-2, laissant ainsi supposer que l'accessibilité des gènes d'Ig précède l'activité de recombinaison.

### 1.3.2 Le stade pro-B

C'est à ce stade que débutent les réarrangements des gènes d'Ig. Ils ont d'abord lieu entre un segment  $D_H$  et un segment  $J_H$  sur les deux allèles, aboutissant à un segment  $DJ_H$ . Ce premier événement caractérise le stade pro-B, stade au cours duquel l'expression du marqueur CD19 apparaît. Au cours des réarrangements  $DJ_H$ , une forme tronquée de la protéine  $\mu$  (appelée  $D\mu$ , dépourvue de région variable  $V_H$ ) est parfois produite par le réarrangement du segment D à  $J_H$  dans le cadre de lecture RF2. Lorsque cette protéine  $D\mu$  est formée, le développement B est bloqué par un signal négatif transduit *via*  $Ig\alpha/Ig\beta$  (Gong and Nussenzweig, 1996).

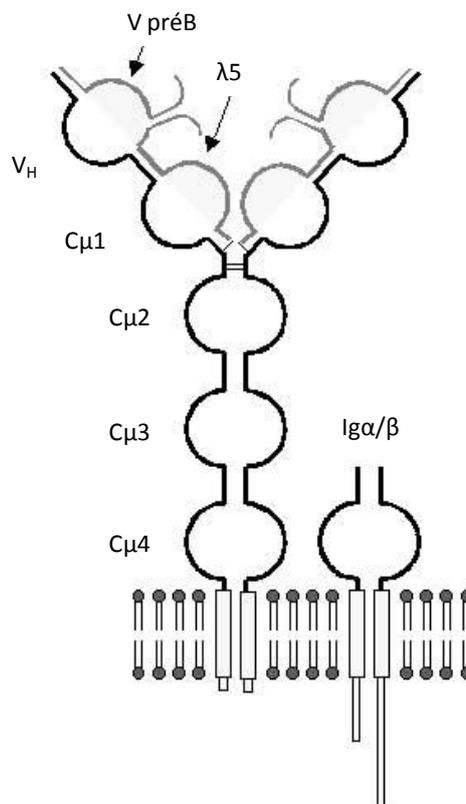
Les cellules pro-B expriment les protéines  $V_{pr\text{B}}$  et  $\lambda 5$  (appelées pseudo-chaînes légères) et l'hétérodimère  $Ig\alpha/Ig\beta$  est détecté à la membrane de ces cellules en association avec la calnexine (Nagata et al., 1997). Une signalisation peut être induite par ce complexe permettant le recrutement de protéines tyrosines kinases. 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).

### 1.3.3 Le stade pré-B

Un second réarrangement a lieu entre un segment  $V_H$  et le segment  $DJ_H$  déjà réarrangé. Ce réarrangement requiert une accessibilité induite par l'action de Pax5 et de l'IL7 particulièrement au niveau des segments  $V_H$  les plus distaux (Corcoran et al., 1998; Hesslein et al., 2003; Nutt et al., 1997). Si ce réarrangement est productif, l'ARNm est fonctionnel

(cadre de lecture correcte) et une chaîne lourde  $\mu$  est produite. Elle s'associe aux pseudo-chaînes légères et aux protéines  $Ig\alpha$  et  $Ig\beta$  dans le réticulum endoplasmique, et le complexe est exporté à la surface de la cellule. Ce dernier forme le récepteur des cellules pré-B (pré-BCR) (Melchers et al., 1993) (**Figure 4**). Le stade pré-B est également caractérisé par la perte des marqueurs c-kit et CD43 et le début de l'expression du marqueur CD25 (Rolink et al., 1994).

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



**Figure 4 : Représentation schématique du complexe formant le pré-BCR.**

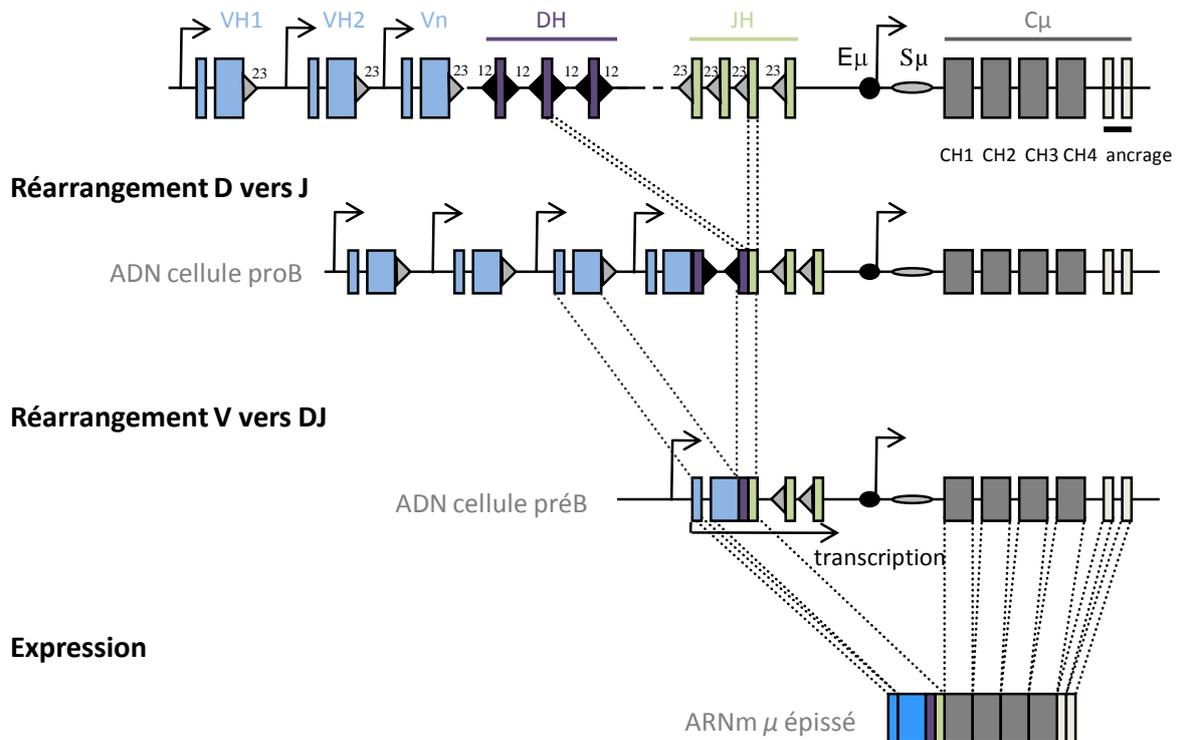
### 1.3.4 Le stade B immature

L'expression du pré-BCR permet à la cellule de passer au stade suivant où les réarrangements  $V_LJ_L$  se déclenchent d'abord sur le locus  $\kappa$ , puis sur le locus  $\lambda$  si les réarrangements  $\kappa$  ne sont pas productifs. Le stade B immature est caractérisé par la production de chaînes légères classiques qui vont remplacer les pseudo-chaînes légères et donner naissance à une IgM de surface. Celle-ci confère à la cellule une spécificité donnée de reconnaissance à l'antigène. Les lymphocytes B immatures sont alors sujets à un processus de sélection négative où les cellules possédant des Ig membranaires spécifiques pour les antigènes du soi sont éliminées par apoptose. Les cellules qui survivent quittent la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes périphériques où elles pourront subir les dernières étapes de maturation.

## 2 GÉNÉRATION DU RÉPERTOIRE DES CELLULES B

### 2.1 LES RECOMBINAISONS VDJ

Les régions variables des immunoglobulines sont codées par l'association d'un segment V, d'un segment D, spécifique des chaînes lourdes, et d'un segment J, par un mécanisme appelé « recombinaison V(D)J » (**Figure 5**). Le grand nombre de segments V, D et J disponibles, les multiples combinaisons entre ces éléments (diversité combinatoire) ainsi que l'imprécision de leurs jonctions (diversité jonctionnelle) contribuent considérablement à la multiplicité des immunoglobulines.



**Figure 5 : Réarrangements des gènes variables du locus IgH.**

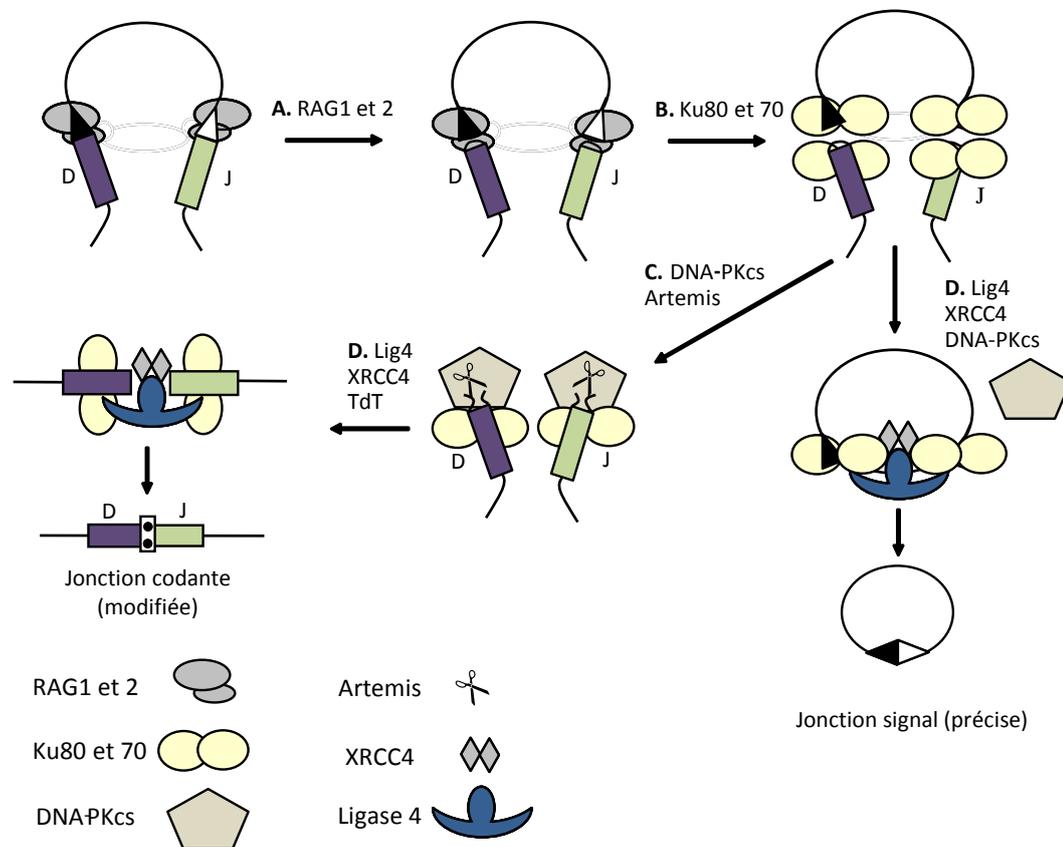
Les exons codant sont représentés par des rectangles gris, les introns par des traits fins, les signaux de recombinaisons par des triangles, les promoteurs par des flèches et les activateurs par des cercles. (Dudley et al., 2005).

Tous les segments V, D et J sont bordés par des séquences particulières, appelées RSS (séquence signal de recombinaison). Chaque RSS est constituée d'un motif consensuel très conservé de sept nucléotides (heptamère CACAGTG) et d'un autre de neuf nucléotides (nonamère ACAAAAACC). Ces deux motifs sont séparés par une séquence peu conservée de 12 ou 23 nucléotides (Tonegawa, 1983). Ces séquences sont présentes en 3' des gènes V, en 5' des gènes J et flanquent les gènes D (**Figure 5**). La recombinaison ne peut s'effectuer qu'entre RSS possédant un séparateur de taille différente (règle 12/23) permettant d'éviter des réarrangements non désirés. Ainsi, chaque segment D est flanqué du même type de RSS en 5' et en 3', ne l'autorisant à réarranger qu'avec les RSS compatibles d'un V en 5' et d'un J en 3' et évitant la formation d'exons  $V_H-J_H$  ou  $V_H-D-D-J_H$  (Meek et al., 1989).

Les recombinaisons V(D)J mettent en jeu une machinerie enzymatique composée des protéines RAG-1 et RAG-2 (pour « Recombination Activating Gene ») dont l'expression n'est détectée qu'aux stades de développement durant lesquels ont lieu les réarrangements V(D)J (Oettinger et al., 1990; Schatz et al., 1989). Ces protéines sont à elles seules responsables du confinement des réarrangements des gènes du BCR et du TCR (« T cell receptor ») aux seules lignées lymphoïdes B et T, et leur importance a été indiscutablement démontrée *in vivo* chez la souris. En effet, l'inactivation de RAG-1 ou RAG-2, par recombinaison homologue, conduit à un blocage complet du développement B aux stades précoces (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992). L'expression des gènes RAG-1 et RAG-2 lors du développement lymphocytaire B est strictement contrôlée : une première vague d'expression survient au stade pro-B permettant les réarrangements au niveau du locus IgH, puis au stade pré-B pour les réarrangements des gènes de chaînes légères.

Les protéines RAG induisent une coupure endonucléolytique précisément à l'extrémité de l'heptamère. La coupure génère quatre extrémités libres intermédiaires : deux extrémités « codantes » en épingle à cheveux et deux extrémités « signal » phosphorylées en 5' (**Figure 6**). La résolution des extrémités fait appel à la voie NHEJ (« Non Homologous End Joining »), voie prédominante de réparation des cassures double brin de l'ADN dans les cellules de mammifères. Elle met en jeu plusieurs facteurs dont Ku70/Ku80, DNA-PKcs, XRCC4, DNA ligase IV, Artemis et Cernunnos (Dudley et al., 2005). Les deux extrémités signal sont liguées par la DNA ligase IV tandis que les extrémités codantes sont d'abord reconnues

par Ku70 qui interagit avec Ku80. Ce dernier recrute la kinase DNA-PKcs qui forme un complexe avec Artemis facilitant l'ouverture des structures en épingle à cheveux. La DNA ligase IV en complexe avec XRCC4, et avec peut-être Cernunnos, un nouveau facteur qui semble activer l'étape de ligation (Ahnesorg et al., 2006), relie les extrémités codantes (**Figure 6**). 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 appelées N ajoutées par la TdT (terminal désoxynucléotidyltransférase) avant la ligation des extrémités. Cette cascade de réaction aboutit à la juxtaposition des segments recombinants avec une importante flexibilité jonctionnelle (pour revue (Schlüssel, 2003; Sekiguchi and Ferguson, 2006)).



**Figure 6 : Résolution des coupures double brin induites par les enzymes RAG.**

**A :** Les coupures induites par les enzymes RAG-1 et RAG-2 se produisent au niveau des séquences RSS. **B :** Ku70 et Ku80 se lient aux extrémités coupées de l'ADN. **C :** DNA-PKcs et Artemis facilitent l'ouverture des structures en épingle à cheveux générées par RAG-1 et RAG-2. **D :** TdT ajoute des nucléotides au niveau des extrémités codantes. XRCC4 et DNA ligase IV relient les extrémités franches formées et produisent des jonctions codantes modifiées. (Dudley et al., 2005).

## 2.2 L'HYPERMUTATION SOMATIQUE

Après stimulation antigénique, une fraction de cellules B alors activées initie la formation d'un centre germinatif, dans les organes lymphoïdes périphériques (rate, ganglions lymphatiques et plaques de Peyer). C'est au sein de ce centre germinatif qu'auront lieu deux processus supplémentaires de diversification du répertoire B : l'hypermutation somatique (SHM pour « somatic hypermutation ») et la commutation isotypique (CSR pour « class switch recombination »).

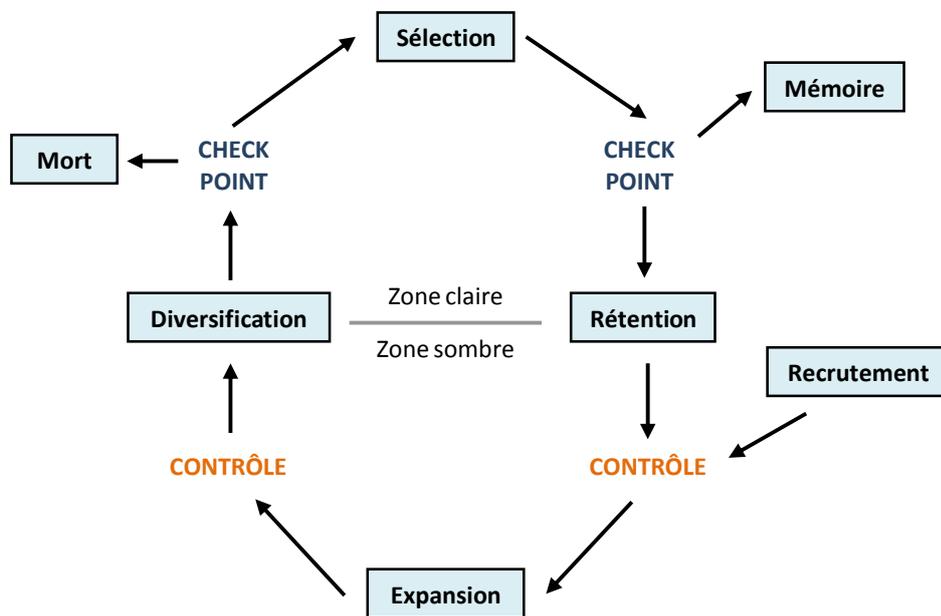
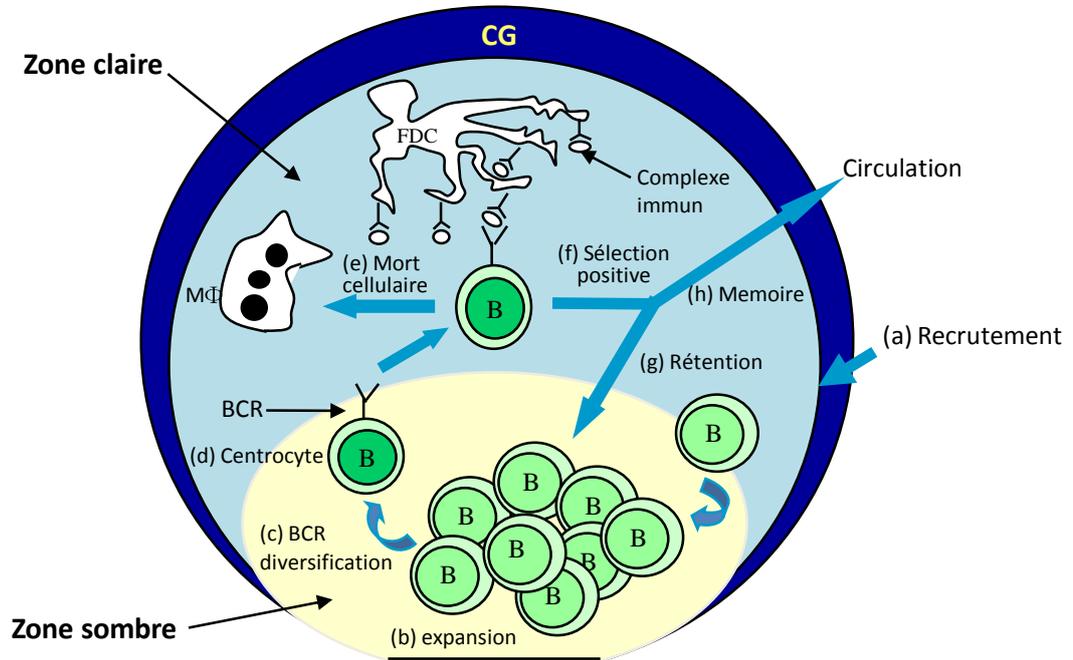
L'hypermutation somatique introduit des mutations au niveau des régions variables des gènes d'Ig déjà réarrangés. Elle permet alors éventuellement d'augmenter l'affinité de l'anticorps pour l'antigène spécifique et la sélection des cellules B exprimant cet anticorps.

### 2.2.1 Sélection clonale

La rencontre avec un antigène qui déclenche une réponse T-dépendante entraîne la formation de centres germinatifs (CG) (pour revue (MacLennan, 1994)). Les CG apparaissent quelques jours après la stimulation antigénique et persistent de quelques jours à quelques semaines. Ils sont associés à l'expansion clonale de cellules B spécifiques et sont le siège de l'hypermutation somatique, de la commutation isotypique (toujours dans le cadre d'une réponse T-dépendante), de la sélection positive ou négative (contre les anticorps de faible affinité ou autoréactifs) et de l'induction de la différenciation en cellules B mémoires ou plasmocytes. Les CG sont constitués de deux parties : une zone sombre et une zone claire (**Figure 7**). Les centroblastes sont localisés dans la zone sombre, siège d'une prolifération massive, et sont la cible de l'hypermutation somatique tandis que les centrocytes sont localisés dans la zone claire et sont la cible de la commutation de classe (pour revue (Rajewsky, 1996)).

Les mécanismes de sélection des cellules exprimant des anticorps de haute affinité sont particulièrement stringents et font intervenir des interactions spécifiques avec des cellules T reconnaissant le même antigène. Les cellules B en prolifération dans le centre germinatif expriment faiblement le gène *Bcl-2* et fortement la molécule de surface Fas. Elles sont destinées à mourir si elles n'interagissent pas avec d'autres types cellulaires tels que les

lymphocytes 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... (pour revue (MacLennan, 1994)).



**Figure 7 : Cheminement des cellules B dans le centre germinatif.**

B : lymphocyte B, FDC : cellules folliculaires dendritiques et MΦ : macrophages. Le schéma du bas résume les étapes de multiplication et de sélection des cellules B. (McHeyzer-Williams and Ahmed, 1999).

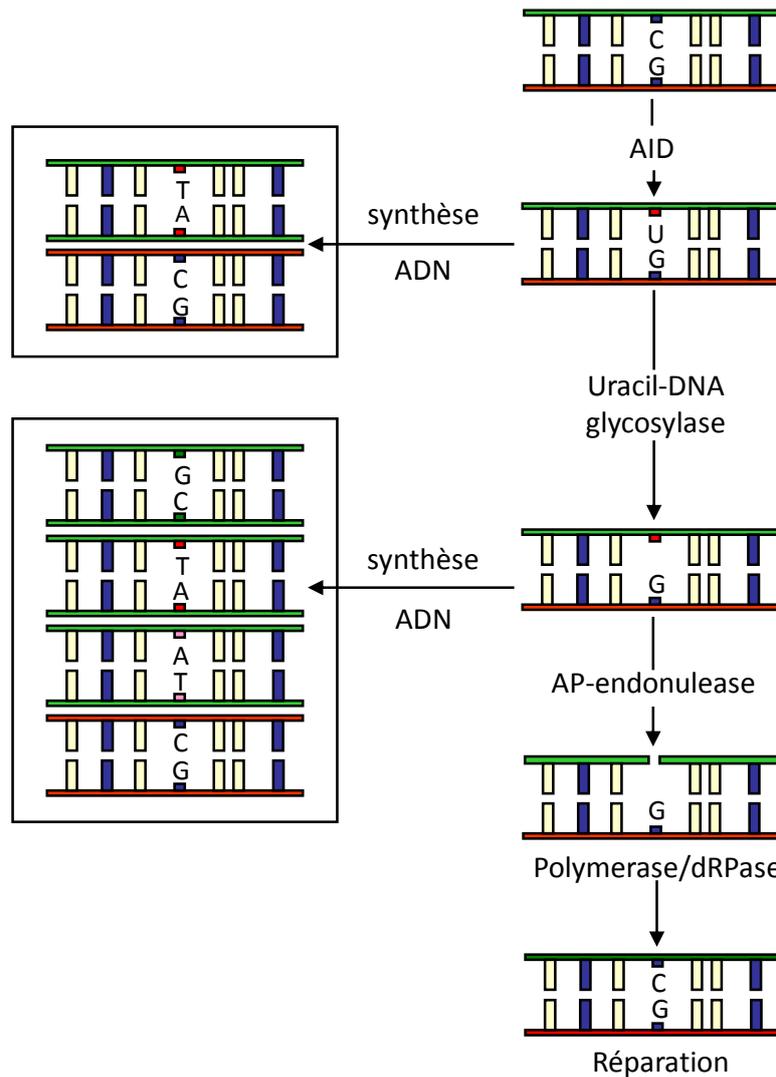
Après quelques semaines, le centre germinatif régresse et finit par disparaître. Les cellules B survivantes expriment fortement *Bcl-2* et deviennent des cellules B résiduelles, exprimant des immunoglobulines mutées de très haute affinité pour l'antigène (Pascual et al., 1994; Schitteck and Rajewsky, 1990). Elles constituent le répertoire mémoire et ont une durée de vie très longue qui peut atteindre plusieurs mois à plusieurs années.

### 2.2.2 Mécanismes de la SHM et rôle de AID

Une nouvelle protéine a été découverte, par criblage soustractif de banques d'ADNc, dans une lignée B pouvant commuter *in vitro*. Cette protéine, nommée AID (« Activation-induced cytidine deaminase »), est exclusivement exprimée dans les centres germinatifs *in vivo*, ou après stimulation de splénocytes *in vitro* (Muramatsu et al., 1999). Il a été montré que AID est absolument indispensable pour la SHM et la CSR (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000). Chez des souris déficientes en AID, le développement B est normal ; IgM et IgD sont normalement exprimées. Cependant, les souris sont déficientes pour tous les autres isotypes malgré une transcription germinale (Muramatsu et al., 2000).

L'analyse de la séquence codante d'AID a révélé une forte homologie avec APOBEC-1. APOBEC-1 est une sous-unité catalytique d'un complexe multiprotéique d'édition de l'ARN ; elle agit sur l'ARNm de l'apolipoprotéine Apob. AID a ainsi été considérée dans un premier temps comme une nouvelle protéine d'édition de l'ARN agissant sur un ou plusieurs ARNm codant des endonucléases impliquées dans l'introduction de cassures dans l'ADN au cours de l'hypermutation (Muramatsu et al., 1999). Ce modèle est encore aujourd'hui soutenu par l'équipe de Honjo. Cependant, des expériences plus récentes suggèrent qu'AID pourrait agir directement sur l'ADN (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003; Dickerson et al., 2003; Petersen-Mahrt et al., 2002; Pham et al., 2003). En effet, AID entraîne une déamination des cytosines (dC) en uraciles (dU) dans l'ADN (pour revue (Honjo et al., 2005; Neuberger et al., 2003)). Mais, l'uracile, qui n'est pas un composant naturel de l'ADN, doit être réparée. C'est le mode de traitement de l'uracile, par les mécanismes de réplication et/ou de réparation, qui déterminera le devenir et le profil des mutations introduites (**Figure 8**). Si la mutation est ignorée et considérée comme une thymine par les ADN polymérases répliquatives, il y a alors transition C → T après réplication. La mutation peut, également, être

éliminée par l'uracile glycosylase (UNG) créant ainsi un site abasique. Ce dernier peut être la cible d'une endonucléase APE1, endonucléase majeure de la voie BER (« Base Excision Repair »), qui clive l'ADN. Les ADN polymérases 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 (**Figure 8**).



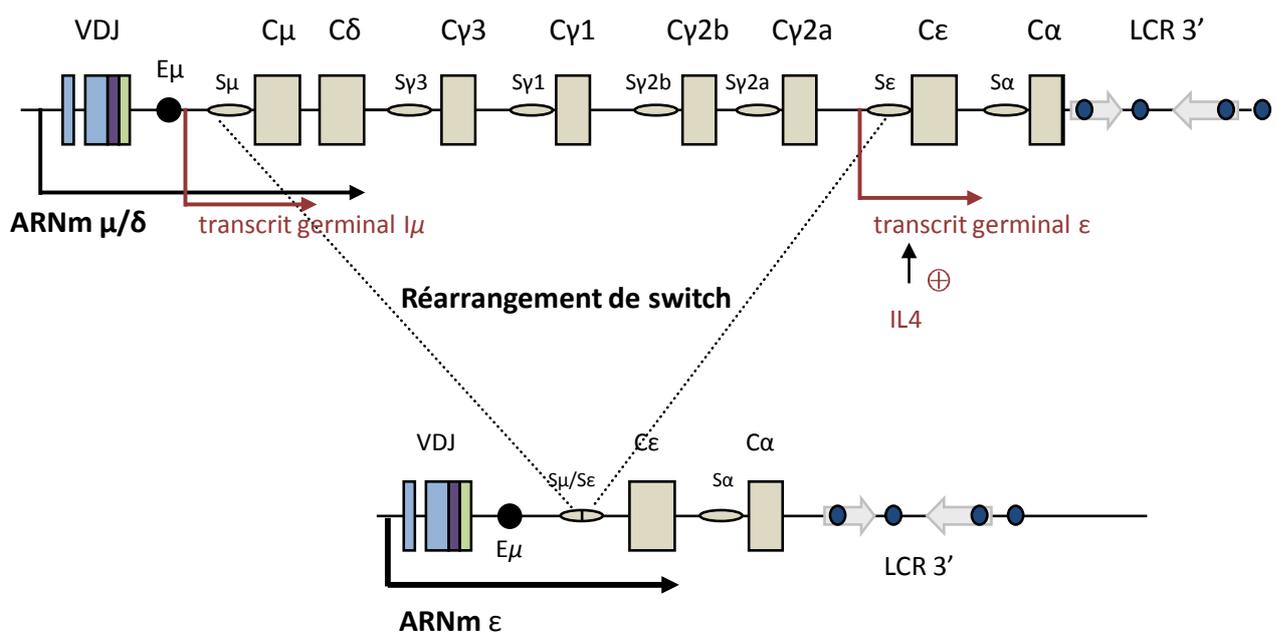
**Figure 8 : Modèle de déamination de l'ADN et implication de AID.**

AP-endonuclease : apyrimidic endonuclease APE1; dRPase : 5'desoxyribofosfodiesterase. (Neuberger et al., 2003).

La lignée humaine Ramos, possédant la capacité d'hypermuter *in vitro*, a été utilisée pour évaluer l'implication de AID dans un autre contexte. Le taux de mutations observé dans la région variable des différents clones est proportionnel au niveau d'ARNm de AID. Les mutations induites par AID semblent se localiser sur des « hotspots » riches en G ou C, souvent localisés dans des motifs du type RGYW ou WRCY. L'action de AID a été également étudiée dans des hybridomes représentatifs du stade plasmocytaire. Cette étude a révélé que AID était suffisante pour induire l'hypermutation somatique dans ces cellules (Martin and Scharff, 2002). Il a également été démontré que cette protéine pouvait induire des mutations dans des cellules non B (Yoshikawa et al., 2002). Ceci suggère que AID agirait seule ou que les cofacteurs nécessaires à son action sont ubiquitaires.

## 2.3 LA COMMUTATION ISOTYPIQUE

La spécificité antigénique des Ig est déterminée par les régions variables des chaînes lourdes et légères des Ig. Les fonctions effectrices, en revanche, dépendent des régions constantes des chaînes lourdes et varient selon les isotypes. Au cours de la stimulation antigénique, les lymphocytes B matures synthétisent dans un premier temps des IgM qui sont par la suite remplacées par des Ig d'isotypes différents : c'est la commutation isotypique. Ce phénomène, qui affecte les chaînes lourdes, rapproche le segment VDJ réarrangé d'un nouveau segment constant de classe différente par un processus de recombinaison somatique. Les lymphocytes B matures peuvent alors exprimer et sécréter des IgG, IgA ou IgE (**Figure 9**).



**Figure 9 : Exemple de réarrangement de « switch » : commutation de classe vers les IgE.**

Les exons codants sont représentés par des rectangles beiges, les introns par des traits fins, les régions S par des ellipses et les activateurs par des cercles.

### 2.3.1 Les différents isotypes.

L'IgG est l'isotype prédominant dans le sang et la lymphe. Les différentes sous-classes d'IgG ont des fonctions effectrices différentes : les IgG3 jouent un rôle important dans la réponse antibactérienne et est très efficace dans la phagocytose. Les IgG2a sont prédominantes dans les réponses antivirales. Elles peuvent activer le complément et sont particulièrement efficaces dans le rôle de médiateur de la cytotoxicité en liant les récepteurs Fc sur les macrophages. Dans les réponses T-dépendantes, les IgG1 sont l'isotype dominant dans la lutte contre les infections virales et parasitaires. La voie du complément n'est pas activée mais les IgG1 stimulent la phagocytose efficacement.

Les IgA sont prédominantes dans les sécrétions (respiratoires, digestives ou génitales) et sont fortement résistantes à la protéolyse enzymatique.

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

### 2.3.2 Les régions S

Les sites de recombinaison sont appelés régions « switch » (S) et sont composés de motifs répétés, riches en G/C, situés en 5' de chacun des gènes constants, à l'exception de Cδ (**Figure 9**). Les séquences S<sub>μ</sub>, S<sub>ε</sub> et S<sub>α</sub> sont composées de pentamères tels que GGGGT, GAGCT et GGGCT. La région S<sub>γ</sub> contient également ces éléments mais se distingue par la longueur de ces segments répétés (Dunnick et al., 1993). La taille des régions S varient de 1 kb (S<sub>ε</sub>) à 10 kb (S<sub>γ1</sub>).

La recombinaison a lieu entre différents sites localisés dans les régions S. Les étapes de reconnaissance et de clivage demeurent mal comprises. Des cassures à la fois double et simple brin pourraient être impliquées dans l'initiation de la commutation de classe (Chen et al., 2001). De fréquentes mutations sont retrouvées au voisinage des points de cassures

(Kenter, 2003; Manis et al., 2002). Les cassures d'ADN situées dans les régions S sont suivies d'une étape de réparation et de ligation impliquant le mécanisme NHEJ et les processus de réparation ubiquitaires, tels que les mécanismes de réparation des « mismatches ». L'ADN intermédiaire, sous forme circulaire, est supprimé et la région constante cible se trouve à proximité de la région VDJ (**Figure 9**).

### 2.3.3 Rôles des cytokines

Différents modèles d'études ont mis en évidence le contrôle de la production des différents isotypes par les cytokines telles que l'interleukine 4 (IL-4) (commutation vers IgG1 et IgE), l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (commutation vers IgG2a) ou le « transforming growth factor » (TGF- $\beta$ ) (commutation vers IgA et IgG2b). En plus des cytokines, les signaux issus des contacts entre cellules T et B sont impliqués dans la commutation de classe. L'élément le plus important dans ces contacts est CD40-L exprimé sur les cellules T activées. Il induit, en synergie avec l'IL-4, la prolifération des cellules B. Le signal médié *via* CD40 induit la commutation de classe vers la majorité des isotypes.

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

### 2.3.4 Transcription germinale et commutation de classe

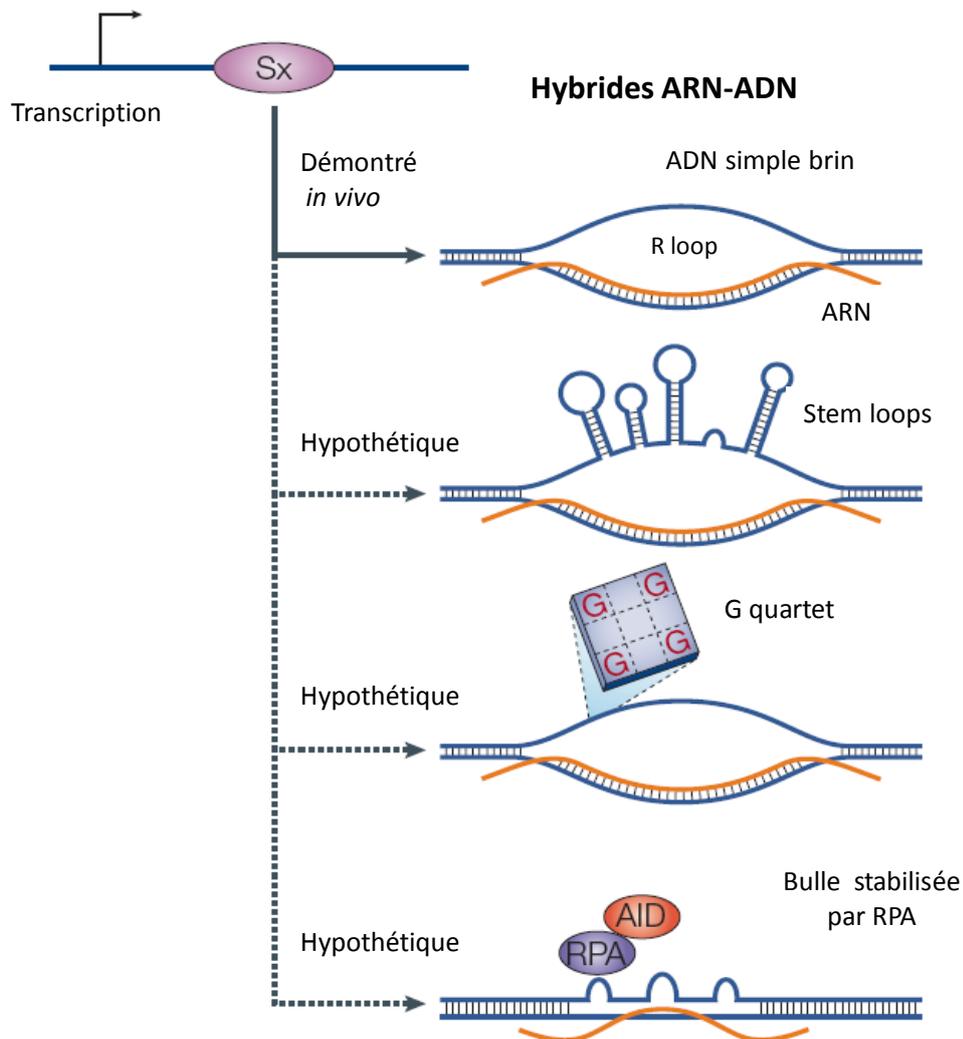
Avant la commutation, les cellules B activées expriment un ou plusieurs ARN appelés transcrits germinaux codés par les différents gènes constants. Ce phénomène de transcription germinale se déroule aussi bien sur l'allèle exprimé que sur l'allèle exclu (Delpy et al., 2003). Tous les transcrits germinaux ont une structure analogue présentant un site d'initiation localisé en 5' de chaque région S, site encore appelé promoteur I. Après initiation, la transcription se poursuit à travers la région S et les régions constantes jusqu'aux sites de polyadénylation (Dudley et al., 2005). L'épissage se fait normalement entre l'exon I et le site accepteur de CH1. La présence de nombreux codons stop rend ces transcrits stériles (Goodman et al., 1993), (pour revue (Chaudhuri and Alt, 2004)).

Le fait que tous les transcrits germinaux aient la même structure suggère qu'ils exercent, par eux-mêmes, une fonction importante. Des mutations ciblées qui abolissent ou altèrent la structure de ces transcrits indiquent qu'ils sont nécessaires au mécanisme de commutation isotypique (Bottaro et al., 1994). La transcription en elle-même n'est pas suffisante pour obtenir la commutation de classe, puisque le remplacement de l'exon I<sub>ε</sub> par un promoteur efficace (E<sub>μ</sub> associé au promoteur pV<sub>H</sub>) conduit à une transcription normale, mais ne permet pas la commutation de classe (Bottaro et al., 1994).

La corrélation entre la synthèse des transcrits germinaux et la commutation isotypique a conduit à proposer un modèle basé sur l'accessibilité de la chromatine. Grâce à la transcription germinale, les régions S deviendraient accessibles à des facteurs agissant en *trans* (Stavnezer-Nordgren and Sirlin, 1986; Yancopoulos and Alt, 1986). Au regard de cette hypothèse, il a été montré que les gènes constants, en cours de commutation, étaient hypométhylés, hyperacétylés et présentaient des sites d'hypersensibilité à la DNase I dans le promoteur germinale (Berton and Vitetta, 1990). Cependant, l'hyperacétylation des histones des régions S et des promoteurs germinaux ne suffit pas à induire la commutation isotypique sans transcription germinale (Nambu et al., 2003).

La transcription germinale pourrait également aboutir à la formation de structures particulières, au niveau de l'ADN, qui seraient la cible de AID pour initier le clivage de l'ADN et déclencher la commutation de classe (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 (Protéine de Réplication A) (Chaudhuri et al., 2004) (**Figure 10**). De ces quatre structures, seul le modèle de la boucle R simple brin a été démontré *in vivo* (Yu et al., 2003). Ces boucles contiennent un hybride stable ARN-ADN sur le brin riche en G et une région simple brin au niveau de la séquence riche en C.

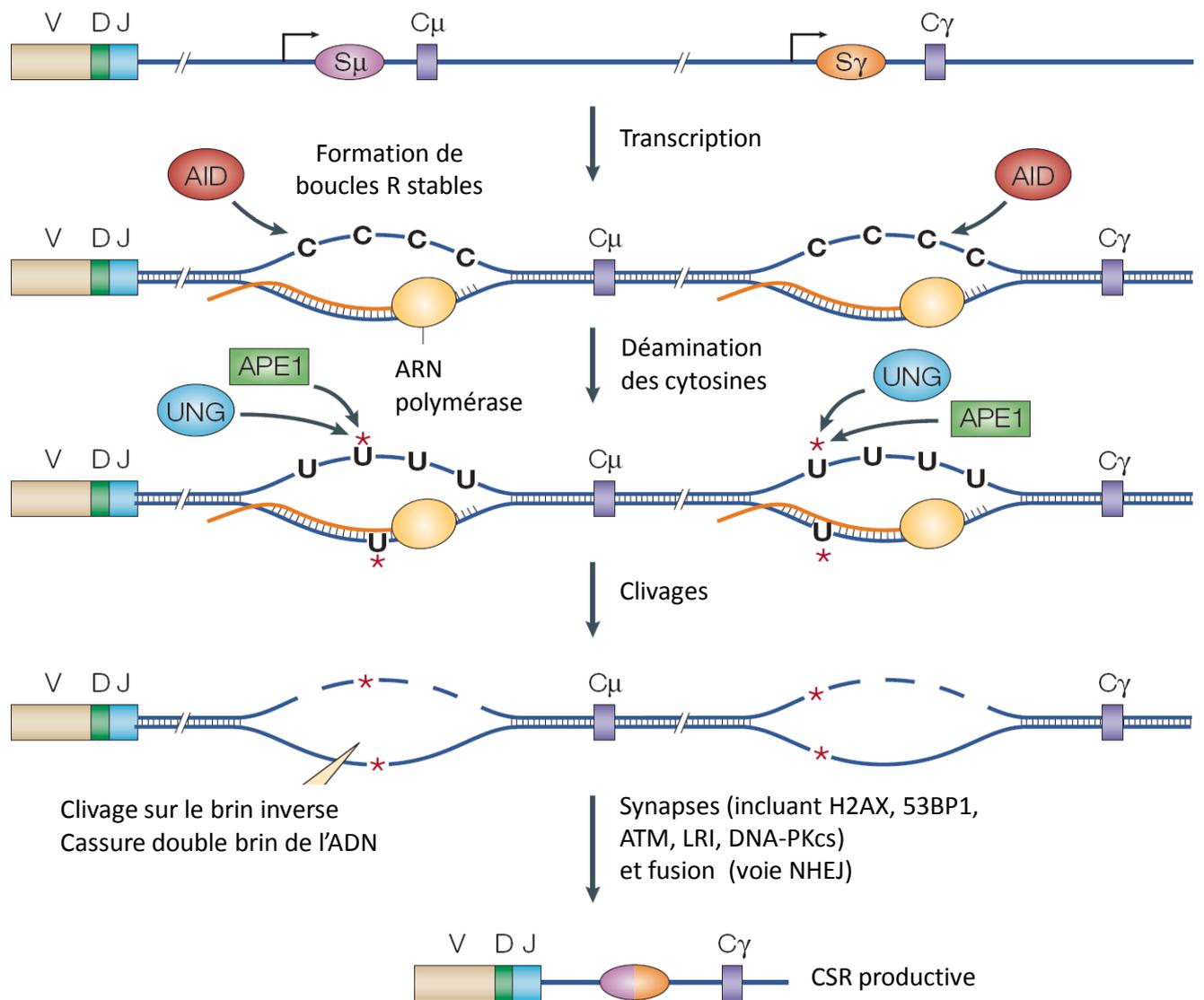


**Figure 10 : Structures générées par la transcription lors de la commutation de classe.**

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, en théorie, adopter différentes structures (quartets G, stems loops ou bulles) ou peut rester simple brin (R loop). RPA : protéine de réplication A. (Chaudhuri and Alt, 2004).

### 2.3.5 Le rôle de AID dans la commutation de classe

AID semble intervenir dans l'initiation de la commutation de classe en générant des uraciles par la déamination des cytosines dans les régions S (Chaudhuri and Alt, 2004). Ces régions comportent plusieurs motifs GAGCT dans lesquels G et C correspondent à des « hot spots » de déamination comparables à ceux de l'hypermutation somatique. La génération d'ADN simple brin au cours de la transcription germinale des régions S semble être impliquée dans le ciblage de l'action de AID vers les régions riches en GC (Chaudhuri and Alt, 2004; Chaudhuri et al., 2003) (**Figure 11**). A la suite de la déamination des cytosines par AID, l'action de UNG élimine l'uracile entraînant la formation d'un site abasique. APE 1 (apurinic/apyrimidique endonuclease I) génère une coupure au niveau de ce site. Cependant, des données récentes impliquent plutôt le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) dans ce clivage (Larson et al., 2005). Les coupures sont ensuite réassociées par un processus nécessitant l'intervention de nombreux facteurs protéiques tels que H2AX (histone 2A family member X), 53BP1 (p53 binding protein), mutL homologue 1 (MLH1), l'ataxia telangiectasia mutated (ATM) et DNA-PKcs. La commutation de classe est complètement achevée lorsque les deux régions S fusionnent selon un processus faisant intervenir la voie NHEJ (Chaudhuri and Alt, 2004) (**Figure 11**).



**Figure 11 : Rôle de AID dans la commutation isotypique.**

La transcription germinale génère des boucles R à l'origine de la formation de substrats ADN simple brin. A la suite de la déamination des cytosines, l'action de UNG élimine l'uracile entraînant la formation d'un site abasique. APE 1 génère une coupure au niveau de ce site. Les coupures sont ensuite réassociées. La commutation de classe est complètement achevée lorsque les deux régions S fusionnent. (Chaudhuri and Alt, 2004).

## 3 RÉGULATION DES GÈNES DU LOCUS IgH

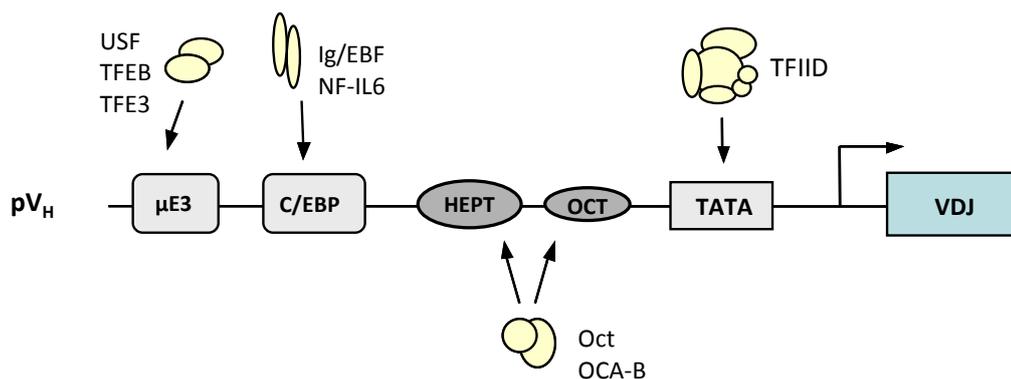
### 3.1 LES PROMOTEURS

Les promoteurs des gènes de chaînes lourdes et légères d'Ig se situent en amont de chaque région V et assurent un niveau basal de transcription. Leur activité est comprise dans une région d'environ 250 pb en amont du site d'initiation de la transcription. L'ensemble des promoteurs des gènes d'Ig possèdent une séquence octamérique très conservée en amont de la TATA box : ATGCAAAT dans les promoteurs des gènes de chaînes lourdes ( $pV_H$ ), ou la séquence inversée ATTTGCAT dans les promoteurs de chaînes légères (Falkner and Zachau, 1984; Parslow et al., 1984) (**Figure 12**). Des études de transfections stables (Dreyfus et al., 1987; Mason et al., 1985; Wirth et al., 1987) et de transgénèse chez la souris (Jenuwein and Grosschedl, 1991) ont montré que la spécificité cellulaire des promoteurs d'Ig pouvait en partie être expliquée par la présence des séquences octamères. Éléments essentiels des promoteurs des régions V, les sites octamères sont retrouvés également au niveau des activateurs transcriptionnels situés en 5' ( $E\mu$ ) et 3' (LCR) du locus IgH. Ces séquences sont entre autres reconnues par les facteurs Oct-1, exprimé de façon ubiquitaire, et Oct-2, spécifique à la lignée B. La forme en « hélice-boucle-hélice » du domaine de liaison à l'ADN permet une forte affinité pour l'ADN. Ces deux protéines activent efficacement la transcription à partir d'un promoteur d'immunoglobuline mais uniquement dans la lignée B (LeBowitz et al., 1988; Pfisterer et al., 1994; Pierani et al., 1990).

Un co-activateur appelé OCA-B interagit physiquement avec les facteurs Oct-1 et Oct-2. Il facilite l'activation transcriptionnelle d'un promoteur d'Ig par Oct-1 ou Oct-2 (Luo et al., 1992; Luo and Roeder, 1995; Pierani et al., 1990). Cependant, des souris déficientes en Oct-2 et OCA-B ont un développement B précoce normal (Schubart et al., 2001). OCA-B semble utile à la commutation de classe, à la formation de centres germinatifs et à la différenciation terminale conduisant à la sécrétion de certaines sous-classes d'Ig (Kim et al., 1996; Schubart et al., 1996; Schubart et al., 2001). La simple inactivation du gène *Oct-2* chez la souris entraîne un blocage de la prolifération des cellules B ainsi qu'un défaut dans la sécrétion d'Ig suite à une stimulation antigénique (Corcoran and Karvelas, 1994; Corcoran et al., 1993). Ces

résultats suggèrent que Oct-2 est important dans les stades tardifs de la différenciation des lymphocytes B alors que l'activation transcriptionnelle semble pouvoir être initiée de façon égale par l'un ou l'autre des facteurs Oct (Pfisterer et al., 1994; Schubart et al., 2001).

En plus de l'octamère, les promoteurs  $pV_H$  contiennent une séquence heptamérique (**Figure 12**). Cet heptamère est nécessaire pour assurer, en association avec l'octamère, une activation spécifique et optimale du promoteur (Eaton and Calame, 1987). L'octamère et l'heptamère lient *in vitro* les mêmes facteurs de transcription Oct et semblent avoir une interaction coopérative (Kemler et al., 1989; Poellinger et al., 1989). D'autres éléments ont été localisés en amont de l'heptamère : une région riche en pyrimidines (Eaton and Calame, 1987) de fonction inconnue, un motif reconnu par le facteur de transcription Ig/EBP-1 et un motif  $\mu E3$ .



**Figure 12 : Les promoteurs  $pV_H$ .**

Les différents motifs fixant des activateurs transcriptionnels sont indiqués. La flèche coudée indique le site d'initiation de la transcription. Les motifs heptamère et octamère sont représentés par des ellipses grises. (Ernst and Smale, 1995).

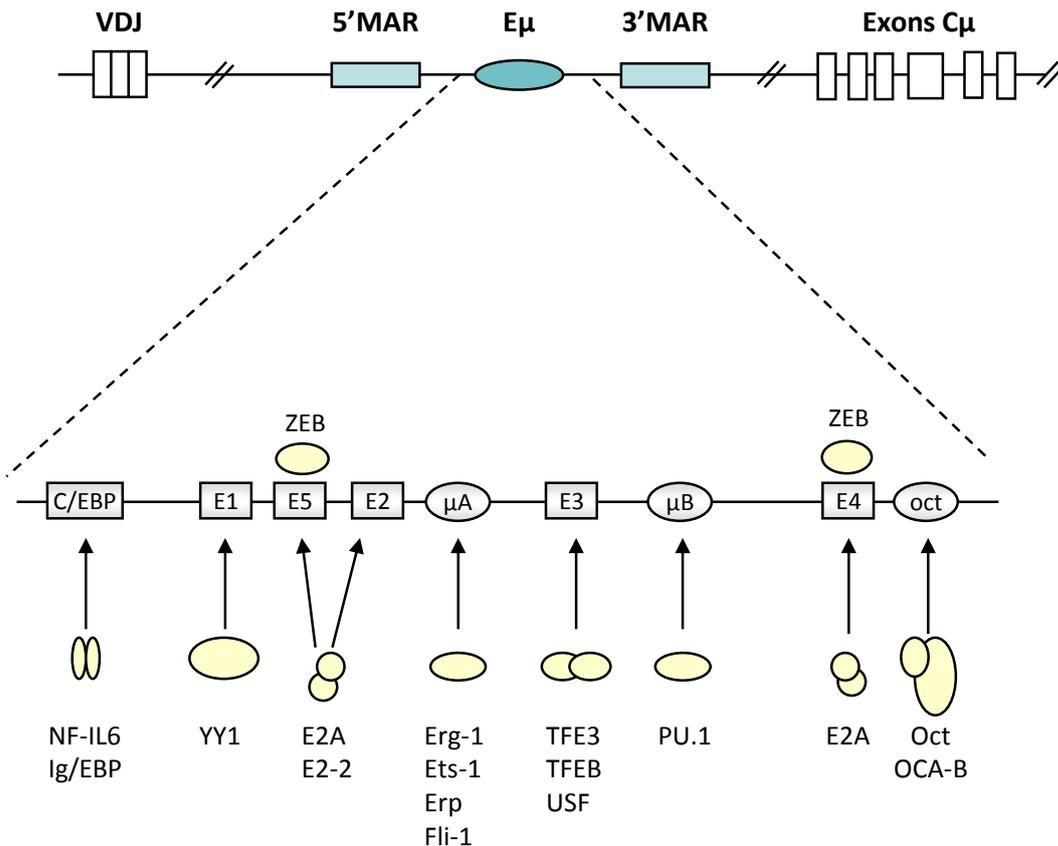
Des promoteurs ont également été décrits en amont de chaque gène des régions constantes des chaînes lourdes d'Ig, à l'exception de  $C\delta$ . Ce sont les sites d'initiation de la transcription germinale. Les activateurs situés en amont des promoteurs germinaux jouent également un rôle important dans la commutation isotypique. Le mieux caractérisé est celui de  $I\gamma 1$ . Une région de 150 pb située en amont de  $I\gamma 1$  contient un activateur inductible par

l'IL-4. Dans cette région, on note aussi la présence de séquences consensus liant des facteurs de transcriptions tels que C/EBP (Xu and Stavnezer, 1992).

### 3.2 L'ACTIVATEUR INTRONIQUE E $\mu$

L'activateur intronique E $\mu$  fut le premier découvert au sein du locus IgH. Il est localisé dans l'intron entre le dernier segment J $_H$  et le gène C $\mu$  (Banerji et al., 1983). Il est entouré par deux régions d'attachement à la matrice (MAR : « Matrix Associated Region ») (**Figure 13**). Cet élément semble actif tout au long du développement B. Sa localisation en amont de S $\mu$  lui permet d'être préservé de tous les événements de recombinaisons survenant dans le locus. E $\mu$  régule positivement les réarrangements V(D)J et la transcription initiée au niveau de multiples promoteurs du locus IgH (Chen et al., 1993; Engler et al., 1991; Serwe and Sablitzky, 1993).

E $\mu$  fixe de nombreux facteurs parmi lesquels Oct-1 et Oct-2 que nous avons évoqué précédemment (pour revue (Ernst and Smale, 1995)). La région centrale de E $\mu$  (« core » de E $\mu$ ) contient les sites  $\mu$ E5,  $\mu$ E2,  $\mu$ A,  $\mu$ E3 et  $\mu$ B (**Figure 13**). Cette région fixe des protéines activatrices de la famille « hélice-boucle-hélice » dont les produits du gène E2A. Ce dernier, après épissage alternatif, produit trois protéines : E12, E47 et E5-2. Les souris déficientes pour E2A ont un développement B bloqué aux stades précoces (Bain et al., 1994; Zhuang 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)). Des protéines nommées ZEB, exprimées de manière ubiquitaire et se fixant aux sites  $\mu$ E4 et  $\mu$ E5, pourraient jouer un rôle répresseur de E $\mu$  dans les cellules non B. L'activation de la transcription par PU.1, qui se fixe au niveau du site  $\mu$ B, dépendrait de la fixation des protéines adjacentes Ets-1 et TFE3 sur les sites respectifs adjacents  $\mu$ A et  $\mu$ E3 (pour revue (Ernst and Smale, 1995)).



**Figure 13 : Sites de fixation et facteurs *trans*-activateurs au niveau de l'élément E $\mu$ .**

Les sites de fixation et les facteurs nucléaires sont indiqués. (Ernst and Smale, 1995).

Le rôle de E $\mu$  a été étudié grâce à des KO concernant E $\mu$  et/ou les régions MAR adjacentes. Ainsi, le remplacement de E $\mu$  par un oligonucléotide entraîne une diminution, mais pas le blocage des réarrangements V(D)J (Serwe and Sablitzky, 1993). La diminution des réarrangements DJ<sub>H</sub> est modérée tandis que les réarrangements V<sub>H</sub>-DJ<sub>H</sub> sont fortement inhibés. Les auteurs de cette étude ont alors suggéré l'existence d'autres éléments *cis*-régulateurs contrôlant les réarrangements au sein du locus IgH. Le remplacement de E $\mu$  par une cassette *pgk-neo<sup>r</sup>* induit une diminution drastique des réarrangements, de la déméthylation du locus ainsi que de la transcription germinale. Un phénotype similaire est observé lorsque l'insertion de *pgk-neo<sup>r</sup>* a lieu dans la région 5'MAR 100 nucléotides en amont de E $\mu$ , mais ce remplacement n'empêche pas la déméthylation. En revanche, le remplacement d'une région de 700 pb en aval de E $\mu$  par un fragment *pgk-neo<sup>r</sup>* n'a pas

d'effet (Chen et al., 1993). L'intégrité de  $E\mu$  et des séquences flanquantes situées en amont est donc nécessaire pour obtenir des réarrangements efficaces.

La délétion propre de  $E\mu$ , c'est-à-dire avec suppression du gène  $neo^r$ , par l'utilisation de blastocystes RAG2<sup>-/-</sup>, a montré que  $E\mu$  était nécessaire et suffisant pour les recombinaisons V vers DJ (Sakai et al., 1999). Cependant, les réarrangements D vers J ne sont que partiellement affectés, ce qui suggère l'existence d'autres éléments de contrôle. De plus, la délétion des régions MAR n'a pas révélé de phénotype remarquable. Une étude récente basée sur des souris homozygotes pour la délétion du « core »  $E\mu$  (n'incluant pas les MAR) a confirmé le rôle de cet activateur dans la recombinaison des segments D vers J (Perlot et al., 2005). Elle a également montré que l'absence de  $E\mu$  diminue mais ne bloque pas la recombinaison de classe. Enfin,  $E\mu$  ne semble pas avoir d'effet sur le phénomène d'hypermutation somatique.

L'ensemble de ces résultats suggère une corrélation entre transcription germinale et réarrangements VDJ. Deux transcrits germinaux sont détectés dans le locus IgH avant tout réarrangement :  $\mu 0$  initié au promoteur DQ52 et  $I\mu$ . Le remplacement de  $E\mu$  par le gène  $neo^r$  bloque la transcription  $\mu 0$  et les réarrangements  $V_H-DJ_H$ . La délétion propre de  $E\mu$  inhibe fortement  $V_H-DJ_H$  mais n'a qu'un effet modéré sur la recombinaison D- $J_H$ . Ce phénotype confirme le rôle central de  $E\mu$  dans la régulation de l'accessibilité du locus IgH et de la transcription germinale mais suggère fortement la présence d'autres éléments de contrôle (Perlot et al., 2005; Sakai et al., 1999).

Le rôle des MAR n'est pas encore totalement élucidé. Ces régions seraient impliquées dans l'interaction avec le facteur de transcription spécifique du locus IgH des cellules B Bright (pour « B cell regulator of IgH transcription ») qui activerait  $E\mu$  (Kaplan et al., 2001; Zong et al., 2000). Une hypothèse serait que l'ensemble  $E\mu$ -MAR régule négativement les cellules non B.

### 3.3 LE PROMOTEUR/ACTIVATEUR DQ52

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

- le segment DQ52 est préférentiellement utilisé lors des premiers réarrangements DJ au cours de l'ontogénie (Bangs et al., 1991; Tsukada et al., 1990).
- DQ52 est le seul segment D à être transcrit bien avant la survenue des premiers réarrangements V(D)J (Alessandrini and Desiderio, 1991; Li et al., 1996). Ces transcrits germinaux ( $\mu_0$ ) peuvent être considérés comme l'un des indicateurs les plus précoces de l'engagement vers la lignée B (Li et al., 1996) et leur transcription pourrait être un préalable nécessaire à l'accessibilité de la région D-J à la recombinaison V(D)J (Thompson et al., 1995). Ils sont initiés, aussi bien chez l'homme que chez la souris, au niveau d'une séquence située immédiatement en amont du segment DQ52. Une analyse de la région située en 5' de DQ52, réalisée à partir de précurseurs B humains, a révélé de nombreux sites potentiels de fixation pour des facteurs nucléaires comme E2A, Ets, NF- $\kappa$ B et AP2 (Thompson et al., 1995).

L'activateur situé en 5' de DQ52 a finalement été caractérisé par Kottmann et al. (1994). Il constitue un promoteur-activateur synergique de  $E\mu$  (Kottmann et al., 1994). Les résultats obtenus après délétion de cet activateur chez la souris montrent une altération dans l'utilisation des segments  $J_H$  les plus éloignés de DQ52. La délétion de cet activateur chez la souris n'inhibe pas le réarrangement  $DJ_H$  et ne bloque pas la transcription  $\mu_0$ . En revanche, une diminution des réarrangements impliquant  $J_H3$  et  $J_H4$  est observée (Nitschke et al., 2001). La délétion conjointe de cet élément avec  $E\mu$  a révélé que DQ52 n'était pas requis pour le réarrangement  $DJ_H$  et pour la transcription  $\mu_0$  (Afshar et al., 2006). Ceci suggère l'existence d'autres éléments de contrôle dans le locus IgH qui régulent le réarrangement  $DJ_H$  et la transcription.

## 3.4 LA RÉGION RÉGULATRICE SITUÉE EN 3' DU LOCUS IgH

### 3.4.1 Découverte de la région 3'IgH

L'activateur intronique  $E\mu$  intervient dans l'expression tissu-spécifique des gènes d'Ig durant le développement lymphocytaire B. Il a, ainsi, été longtemps considéré comme l'élément majeur de régulation du locus IgH. Cependant, la délétion spontanée de  $E\mu$  dans certaines lignées cellulaires, notamment de plasmocytomes de souris, n'affecte pas le niveau d'expression de la chaîne lourde des immunoglobulines (Aguilera et al., 1985; Klein et al., 1984; Wabl and Burrows, 1984; Zaller and Eckhardt, 1985). Il a été également observé que certaines translocations réciproques rapprochant l'oncogène *c-myc* du gène *Cy2b* permettent une forte expression de *c-myc* même si la translocation entraîne la disparition de  $E\mu$  (Neuberger and Calabi, 1983). Deux hypothèses ont alors été émises afin d'expliquer ces phénotypes :

- $E\mu$  serait nécessaire à l'activation de la transcription mais pas à son maintien (Zaller and Eckhardt, 1985).
- D'autres activateurs transcriptionnels seraient présents au niveau du locus IgH.

C'est finalement la seconde proposition qui s'est révélée exacte suite à la caractérisation d'une lignée cellulaire présentant une délétion d'environ 4 kb immédiatement en 3' de  $C\alpha$  et manifestant une diminution de la transcription (Gregor and Morrison, 1986). Cette région est donc une candidate potentielle pour contenir des éléments *cis*-régulateurs d'autant qu'elle n'est jamais affectée par les divers réarrangements qui ont lieu au sein du locus IgH.

L'équipe de Petterson a été la première à s'intéresser à la région 3'IgH et a découvert la présence d'un activateur transcriptionnel 25 kb en aval de  $C\alpha$  chez le rat. Des expériences de transfections transitoires, utilisant le gène humain de la  $\beta$ -globine, ont montré qu'il était actif spécifiquement dans la lignée lymphocytaire B quelle que soit son orientation (Petterson et al., 1990). Son équivalent chez la souris, appelé 3' $\alpha E$ , a été localisé 16 kb en 3' de  $C\alpha$  (Dariavach et al., 1991; Lieberson et al., 1991). Les deux activateurs, de rat et de

souris, ont une structure très similaire bien qu'ils soient en orientation opposée. Ils présentent 82% d'homologies et sont entourés de séquences répétées inversées. Un second activateur a été identifié seulement 2 kb en aval du gène  $C\alpha$  chez la souris. Il s'agit de  $C\alpha 3'$  (Matthias and Baltimore, 1993). La caractérisation des sites hypersensibles à la DNase I (sites hs) a permis de confondre l'élément  $3'\alpha E$  avec les sites hs1 et hs2 (Giannini et al., 1993). Par cette technique, deux autres éléments *cis*-activateurs ont pu être mis en évidence : hs3 et hs4, localisés respectivement à 29 et 33 kb en 3' de  $C\alpha$  (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995).

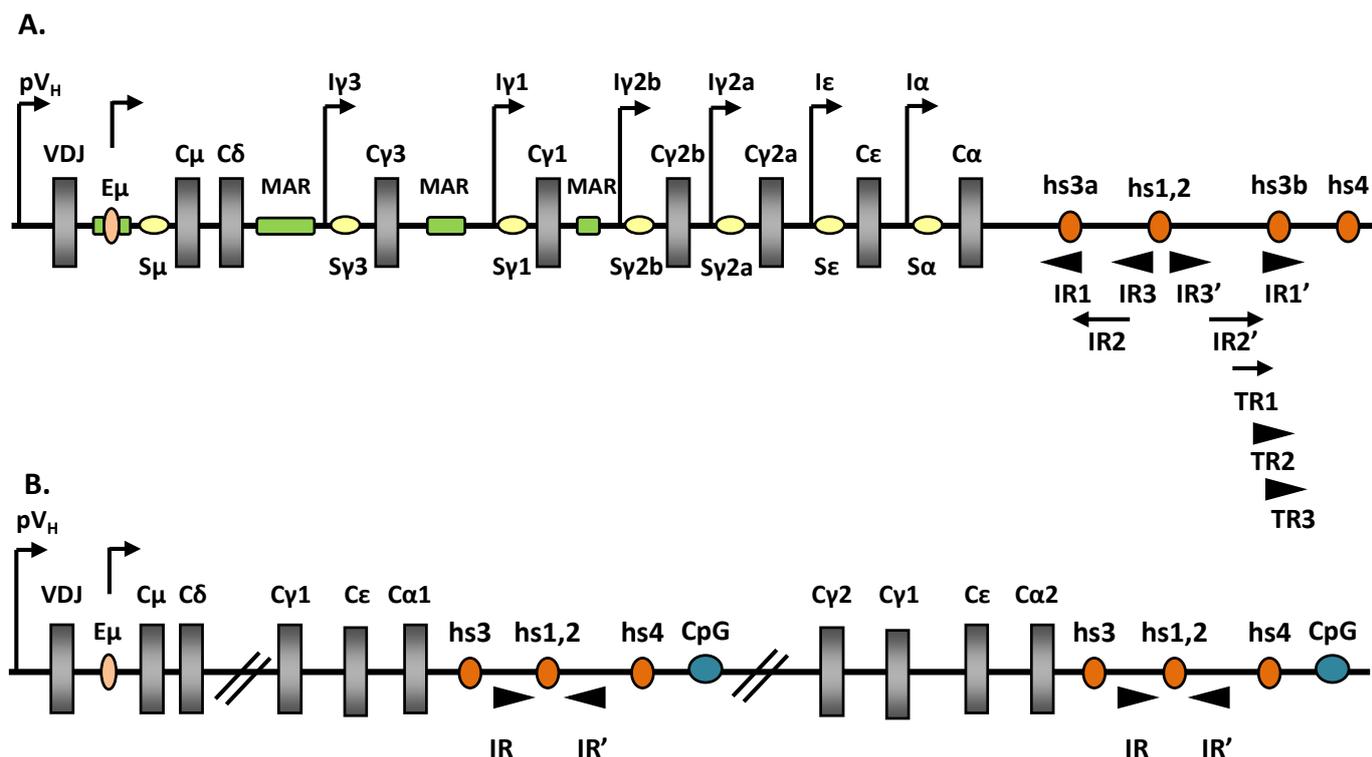
Une analyse plus approfondie par séquençage de la région 3'IgH a montré que les activateurs  $C\alpha 3'E$ ,  $3'\alpha E$  et hs3 constituent un palindrome qui s'étend sur plus de 20 kb, avec un axe de symétrie correspondant à  $3'\alpha E$  (Chauveau and Cogné, 1996). De longues séquences répétées et inversées flanquent cet élément de façon symétrique. Les éléments  $C\alpha 3'E$  et hs3 présentent 97% d'homologies entre eux mais sont en orientation opposée au sein du locus IgH (**Figure 14**).

Pour plus de clarté dans notre exposé, nous adopterons la nomenclature proposée par Saleque et al. concernant les activateurs 3' du locus IgH. Ainsi, de 5' vers 3',  $C\alpha 3'E$  correspond à **hs3a**,  $3'\alpha E$  à **hs1,2**, hs3 à **hs3b** et enfin, hs4 à **hs4** (Saleque et al., 1997). Trois autres sites hs, sans rôle activateur, ont été découverts en aval de hs4. Il s'agit de hs5, hs6 et hs7 (Garrett et al., 2005).

Chez l'homme, les gènes constants sont dupliqués en deux blocs, séparés d'environ 35 kb. Trois équipes ont pu mettre en évidence des éléments similaires aux activateurs murins. Ces éléments sont au nombre de trois et sont localisés en aval de chaque gène  $\alpha$  (**Figure 14**). Il s'agit de hs3 (Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997), hs1,2 (Chen and Birshtein, 1997; Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997) et hs4 (Mills et al., 1997). Comme chez la souris, hs1,2 est entouré de régions répétées et inversées d'environ 2 kb mais leurs séquences diffèrent totalement de celles des régions flanquant l'élément hs1,2 de la souris. L'activateur hs3b n'est pas présent chez l'homme. Il existe un polymorphisme complexe pour hs1,2. En effet, l'étude par southern blot des régions situées en 3' des gènes  $\alpha 1$  montre un polymorphisme de taille de fragments de restriction (RFLP) (Pinaud et al., 1997).

L'amplification de hs1,2 par PCR montre également un polymorphisme de taille, correspondant à un nombre variable de régions répétées en tandem (VNTR) ou mini-satellites au sein même des séquences activatrices (Denizot et al., 2001).

Des îlots de séquences riches en CpG sont présents en aval de chaque activateur hs4 humain (Sadhu et al., 1997), mais leur fonction n'a pas été définie.



**Figure 14 : Structure des loci IgH chez la souris et l'homme.**

Les gènes constants sont représentés par des rectangles gris, les activateurs par des ellipses rouges, les régions répétées en tandem (TR) et répétées inversées (IR) sont positionnées en 3' des gènes  $\alpha$ .

**A : Locus murin.** Les ellipses jaunes représentent les régions S et les rectangles verts les régions d'ancrage à la matrice (MAR), les promoteurs germinaux sont signalés par des flèches coudées.

**B : Locus humain.** Les régions en 3' des gènes  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  contiennent des activateurs et des régions riches en G+C (ellipses bleues).

### 3.4.2 Activité de la région 3'IgH au cours du développement B

L'activité des différents éléments *cis*-régulateurs situés en 3' du locus IgH a surtout été appréciée par des expériences de transfections dans des lignées cellulaires établies correspondant à des stades B définis, et plus récemment par des modèles transgéniques.

Ainsi, il a été montré que l'élément hs1,2 de rat est actif aux stades B tardifs avec une activité maximale au stade plasmocytaire (Pettersson et al., 1990). L'élément hs1,2 de souris est un activateur plus faible (25% de l'activité de E $\mu$ ) également actif aux stades B tardifs (Dariavach et al., 1991; Lieberson et al., 1991). Cependant, les résultats obtenus dans les lignées B matures sont contrastés (Dariavach et al., 1991; Fulton and van Ness, 1994). Des souris transgéniques contenant un gène rapporteur placé sous le contrôle de hs1,2 de souris montrent une expression importante dans les cellules B activées. Toutefois, la spécificité B de cet élément pris isolément n'est pas complète puisqu'une expression faible a été détectée dans d'autres tissus tels que le thymus, le cœur et le rein (Andersson et al., 1999; Arulampalam et al., 1994). Des expériences de transfections transitoires utilisant le gène CAT (chloramphénicol acétyltransférase) ont montré que l'activité de hs3a est faible (5 à 15% de l'activité de E $\mu$ ) et qu'elle n'est détectée qu'au stade B mature et plasmocytaire (Matthias and Baltimore, 1993). Des résultats similaires ont été obtenus avec hs3b (Madisen and Groudine, 1994). Enfin, hs4 est également considéré comme un activateur faible mais semble actif tout long du développement B, depuis le stade pro-B jusqu'au stade plasmocytaire (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995).

Ces profils d'expression corrélerent assez bien avec le profil de méthylation de la région 3' du locus IgH. En général, la région 3' est hyperméthylée au stade B précoce et se déméthyle au cours de l'ontogénie B jusqu'au stade ultime, c'est-à-dire le stade plasmocytaire (Giannini et al., 1993).

### 3.4.3 Synergies entre les éléments 3' du locus IgH

La répartition et la multiplicité des éléments *cis*-activateurs du locus IgH laissent penser que ceux-ci pourraient agir de façon concertée pour activer la transcription. Il faut noter que la région 3' est séparée de E $\mu$  d'environ 200 kb avant la recombinaison de classe

et que les quatre hs sont distants de plusieurs kilobases. De plus, ils constituent, à l'exception de hs4, un palindrome centré sur hs1,2.

Les premières données expérimentales suggérant une synergie entre les différents activateurs du locus IgH proviennent de l'analyse de cellules plasmocytaires transfectées par un vecteur contenant un gène  $\mu$  réarrangé placé sous le contrôle d'un promoteur  $pV_H$ . Cette construction contient également  $E\mu$  avec ou sans hs1,2. Il a été observé que l'ajout de hs1,2 permet d'augmenter la transcription d'un facteur deux à partir du promoteur  $pV_H$  (Dariavach et al., 1991). En utilisant la même approche, l'équipe de Mocikat a montré que la distance séparant  $E\mu$  de hs1,2 a des conséquences importantes sur l'activation de la transcription (Mocikat et al., 1993; Mocikat et al., 1995). Ainsi, hs1,2, placé en aval des exons constants, a un effet synergique de l'élément  $E\mu$ . En revanche, la juxtaposition de hs1,2 à  $E\mu$  annule tout effet activateur. Hs1,2 semble interagir avec  $E\mu$  de façon dépendante de la position et de la distance. Pourtant, dans une étude utilisant le gène rapporteur de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur de la thymidine kinase, les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence de coopération entre  $E\mu$  et hs1,2, en expression transitoire, quel que soit le stade de développement B (Fulton and van Ness, 1994).

Suite à l'identification de hs3b et hs4, Madisen et Groudine ont étudié l'effet d'une combinaison des quatre hs sur la transcription du gène humain de l'hormone de croissance placé sous le contrôle d'un promoteur *c-myc* humain ou d'un promoteur de chaîne légère. Dans une lignée de plasmocytome, les deux promoteurs sont activés de façon modérée quand hs1,2, hs3b et hs4 sont utilisés séparément. En revanche, une forte activation de la transcription est observée en présence d'une combinaison des différents activateurs 3'. L'activation maximale est obtenue avec la combinaison hs1,2-hs3-hs4. Dans une lignée pré-B, ni hs1,2, ni hs3 ne stimulent la transcription, même si plusieurs copies de l'activateur sont présentes. Hs4 permet une activation du promoteur (Madisen and Groudine, 1994).

Deux groupes se sont intéressés à la coopération entre  $E\mu$  et les éléments 3'. Pour cela, ils ont utilisé des vecteurs d'expression contenant le gène de la luciférase (Ong et al., 1998) ou le gène CAT (Chauveau et al., 1998), chacun étant sous contrôle d'un promoteur  $pV_H$ . Dans des lignées pré-B, en présence ou en absence de  $E\mu$ , hs4 semble nécessaire pour

permettre une activité de transcription. Cette activité est augmentée si on lui ajoute une combinaison d'activateurs hs1,2 et hs3 (Chauveau et al., 1998; Ong et al., 1998). Pris séparément, les éléments 3' n'augmentent pas significativement l'effet de  $E\mu$ . Par contre, la combinaison de plusieurs éléments 3' devient un puissant co-activateur de  $E\mu$ , en particulier quand l'association mime la disposition palindromique (Chauveau et al., 1998). Aux stades B matures, le palindrome hs3a-hs1,2-hs3b stimule efficacement la transcription. Hs4 est utile pour avoir une meilleure activité. L'effet le plus important est obtenu quand  $E\mu$  est combiné à hs3a-hs1,2-hs3b-hs4, indépendamment du stade de développement B (Chauveau et al., 1998; Ong et al., 1998). Une partie de notre travail a consisté à confirmer *in vivo* les résultats obtenus à partir de différentes lignées cellulaires, grâce à des modèles transgéniques.

En résumé, aux stades précoces (pré-B), hs4 et  $E\mu$  semblent prépondérants (mais sont incapables de synergiser) (Chauveau et al., 1998) ; aux stades B matures, hs1,2 et hs3 deviennent actifs mais leurs effets continuent d'être potentialisés par  $E\mu$  et hs4 jusqu'au stade plasmocytaire où l'efficacité de la combinaison  $E\mu$ -hs3a-hs1,2-hs3b-hs4 semble optimale.

### **3.4.4 Région de contrôle du locus IgH (LCR)**

La présence d'éléments activateurs, spécifiques de la lignée B et du stade de développement, en 3' du locus IgH a suggéré que cette région pouvait agir comme une région de contrôle du locus (LCR : « locus control region »). Une LCR est définie comme une séquence d'ADN capable, dans un système transgénique ou de transfection stable, de conférer au gène associé une expression tissu-spécifique avec un taux transcriptionnel élevé dépendant du nombre de copies et indépendant du site d'intégration (pour revue (Li et al., 2002)). En général, les composants d'une LCR sont colocalisés avec des sites d'hypersensibilité à la DNase I.

Madisen et Groudine ont été les premiers à suggérer que les éléments 3'IgH constituaient une LCR, lors de transfusions stables de plasmocytes ayant intégré *c-myc* sous la dépendance de hs1,2, hs3b et hs4 (Madisen and Groudine, 1994). Ces trois éléments confèrent une expression indépendante du site d'intégration. Des souris portant un

transgène où le gène de la  $\beta$ -globine est sous la dépendance du promoteur  $pV_H$  et des quatre éléments 3'IgH, ont été obtenues (Chauveau et al., 1999). Cette construction mime le locus endogène puisqu'elle respecte l'orientation et l'ordre des activateurs. L'analyse des animaux a montré un haut niveau d'expression du transgène, indépendante du site d'intégration et restreinte aux cellules B de la rate. En revanche, aucune corrélation stricte entre le nombre de copies du transgène et le niveau d'expression n'a pu être établie. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que la combinaison des quatre activateurs 3' du locus IgH se comporte comme une LCR partielle. Les auteurs de cette étude ont émis l'hypothèse que d'autres séquences seraient nécessaires pour que hs3a-hs1,2-hs3b-hs4 agissent comme une LCR classique.

### 3.4.5 Protéines se fixant à la région 3'IgH

L'activité des éléments 3' du locus IgH est finement régulée au cours du développement B, grâce notamment à l'intervention de nombreux facteurs protéiques *trans*-modulateurs. La LCR 3'IgH contient un grand nombre de séquences consensuelles correspondant à des sites potentiels de fixation de facteurs agissant en *trans* (**Figure 15**).

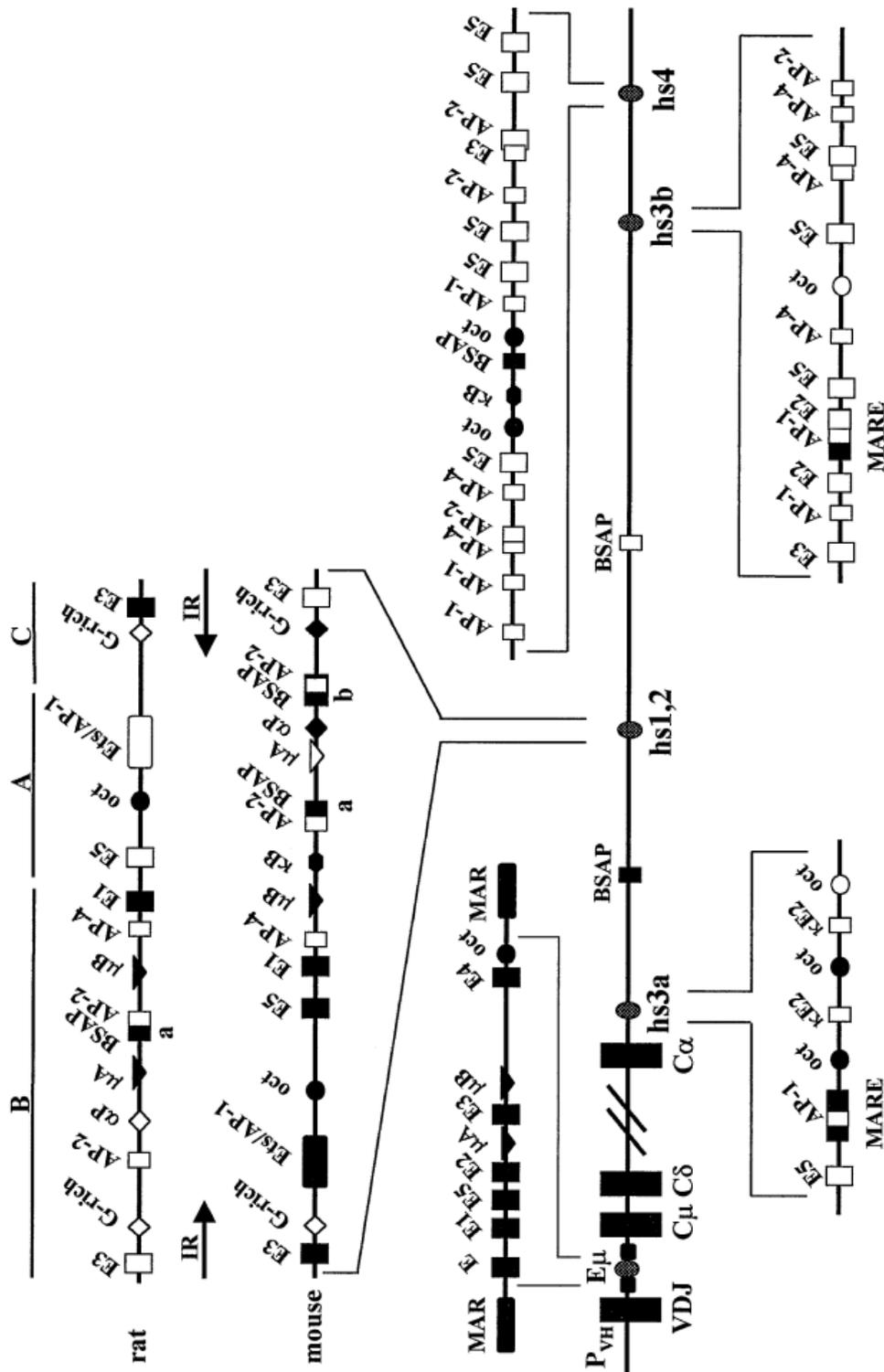


Figure 15 : Schéma des sites consensuels de fixation pour les facteurs nucléaires au niveau de Eμ et des activateurs 3' du locus IgH.

Les sites pour lesquels la fixation a été démontrée apparaissent en noir. Les sites potentiels sont en blanc. (Khamlichi et al., 2000).

### 3.4.5.1 Protéines se fixant à hs1,2

Hs1,2 est l'élément le mieux caractérisé parmi les quatre activateurs 3'. Il est actif aux stades B tardifs et contient de nombreux sites de fixation pour des facteurs nucléaires. L'activateur hs1,2 de rat contient un motif consensus de fixation des facteurs Oct et des sites présentant des homologies avec les motifs  $\mu$ E1,  $\mu$ E5, AP1, AP2 et AP4 (Pettersson et al., 1990). Le cœur de cet activateur a été situé sur une séquence de 600 pb (Grant et al., 1992). Cette région a été découpée en trois domaines fonctionnels A, B et C. Afin d'étudier plus précisément chacun de ces fragments, ils ont été clonés dans un vecteur d'expression contenant le gène de la  $\beta$ -globine et ont été testés pour leur activité transcriptionnelle. Le domaine A présente une activité équivalente à 60% de celle de l'élément considéré dans sa globalité. Les activités respectives des domaines B et C sont d'environ 30 et 25%. La délétion du motif Oct, localisé dans le domaine A, n'abolit pas complètement l'activité transcriptionnelle, suggérant l'existence d'autres motifs consensus. Le domaine B contient trois motifs  $\mu$ E1,  $\mu$ A et un motif  $\mu$ B inversé. La perte du motif  $\mu$ E1 réduit l'activité de transcription de façon drastique. Le domaine C contient un motif  $\mu$ E3 et n'est pas B spécifique. Cependant, la spécificité lymphoïde est retrouvée quand il est combiné aux domaines A et B. Il a été suggéré que le site  $\mu$ E3 fixait des facteurs de la famille « hélice-boucle-hélice » (HLH) (Grant et al., 1992). Le site  $\mu$ B peut lier des facteurs nucléaires issus de cellules B ou non. Enfin, les motifs  $\mu$ B et  $\mu$ A semblent pouvoir fixer des protéines de la famille Ets, contribuant à l'activité B spécifique de hs1,2.

L'équipe de Meyer a démontré la présence d'un site  $\mu$ E5, important pour l'activité de hs1,2 de souris (Meyer et al., 1995). Si plusieurs copies de ce site sont placées en amont d'un gène rapporteur, l'expression de ce gène peut être induite dans une lignée plasmocytaire. Le motif  $\mu$ E5 fixe les protéines E47 et E12, membres de la famille HLH, qui sont soumis à une régulation négative par les protéines de la famille Id (pour revue (Kadesch, 1992)) telle que Id3, exprimée aux stades B précoces mais inactive au stade plasmocytaire. Id3 empêche la fixation du complexe E12/E47 sur le motif  $\mu$ E5 (Meyer et al., 1995).

Dans le domaine B de hs1,2, un site de fixation pour NF- $\kappa$ B a été identifié (Linderson et al., 1997; Michaelson et al., 1996a). De même, un site fixant le facteur NFE (protéine de la

famille Ets) a été découvert à proximité du site NF- $\kappa$ B (Linderson et al., 1997). La mutation de l'un de ces deux sites diminue considérablement l'activité de hs1,2 sur un gène rapporteur dans des lignées plasmocytaires. Dans un système utilisant un vecteur d'expression contenant un ou plusieurs sites NF- $\kappa$ B, les auteurs ont montré que plusieurs copies étaient nécessaires pour augmenter la transcription. En revanche, la présence d'un site NF- $\kappa$ B et d'un site NFE est suffisante pour entraîner une forte activité de transcription du gène rapporteur, suggérant alors que les deux protéines entrent en synergie. Les facteurs nucléaires recrutés au niveau du site NF- $\kappa$ B sont p50, c-Rel et p65 (Linderson et al., 1997). Afin de savoir si p50 et/ou c-Rel régule l'activité de hs1,2 dans les cellules B normales, Zelazowski et al. ont introduit un transgène  $\beta$ -globine, contrôlé par hs1,2, dans des souris homozygotes pour la délétion de p50 ou de c-Rel (Zelazowski et al., 2000). Ils ont observé que p50 augmente l'activité de hs1,2 dans les cellules B activées par du LPS tandis que c-Rel est requis pour une induction optimale de hs1,2 dans les cellules B activées par CD40.

Parmi toutes les protéines se fixant à la région 3'IgH, le facteur BSAP (« B-cell-specific activator protein ») a été le plus étudié. BSAP est le produit du gène *Pax 5*, exprimé dans la lignée lymphocytaire B, du stade pro-B au stade B mature (Adams et al., 1992). Grâce à un épissage alternatif, quatre types de messagers différents peuvent être produits : *Pax 5 a, b, d* et *e*. *Pax 5a* est exprimé aux stades précoces de la différenciation B alors que la présence de *Pax 5b* est restreinte aux stades B matures (Zwollo et al., 1997). Des souris homozygotes pour la mutation de *Pax 5* meurent, en général, au bout de trois semaines. Seuls 5% des animaux atteignent l'âge adulte, et présentent alors un arrêt complet du développement B à un stade très précoce. Aucune cellule pré-B, B et plasmocytaire n'est produite, indiquant un rôle clé de *Pax 5* dans la lymphopoïèse B précoce (Urbanek et al., 1994). Il a été montré que BSAP se fixe à de multiples sites du locus IgH et qu'il contrôle la prolifération des cellules B, la commutation isotypique et la transcription des gènes de chaînes lourdes aux stades B tardifs (pour revue (Busslinger and Urbanek, 1995)). Une région capable de fixer BSAP a d'abord été découverte en 5' de hs1,2 mais son importance fonctionnelle n'a jamais été démontrée (Liao et al., 1992). Au sein de l'élément hs1,2, deux sites liant le facteur BSAP ont été identifiés dans le domaine A : un site de haute affinité appelé BSAPa et un site de faible affinité appelé BSAPb (Neurath et al., 1994; Singh and Birshtein, 1993). Des expériences de

transfections transitoires utilisant le gène CAT, sous la dépendance de hs1,2 normal ou de hs1,2 muté (le site de fixation de BSAP est inactivé par mutagenèse) ont été réalisées (Singh and Birshtein, 1993). Il apparaît que l'activité de l'élément hs1,2 muté est 5 à 6 fois plus importante que celle de hs1,2 normal dans les cellules B (exprimant *Pax 5*). En revanche, aucune différence significative n'est observée dans les cellules plasmocytaires (n'exprimant pas *Pax5*). De même, une étude dans la lignée de plasmocyte MOPC-15 (qui n'exprime pas BSAP) montre que l'expression de BSAP régule négativement hs1,2 (Neurath et al., 1994). L'ensemble de ces résultats suggère une répression active de hs1,2 aux stades B précoces grâce à l'intervention de BSAP.

Un site  $\alpha P$  a été découvert dans hs1,2, à proximité du site BSAPa (Neurath et al., 1995). Ce motif fixe un facteur nucléaire spécifique appelé NF- $\alpha P$  (appelé également PU.1) et membre de la famille Ets. Cette protéine est exprimée dans les cellules B et se lie à  $\alpha P$  au stade plasmocytaire uniquement. La mutation de  $\alpha P$  diminue l'activité de hs1,2 aux stades B tardifs. Dans une lignée B mature, le blocage du site BSAPb, grâce à un oligonucléotide formant une triple hélice, autorise la fixation du facteur NF- $\alpha P$  sur son site et permet une augmentation de l'effet de hs1,2. Dans des lignées B exprimant différents isotypes, il a été montré que la fixation de NF- $\alpha P$  sur son site (après blocage du site BSAPb) augmentait la transcription des isotypes IgA, IgG2b et IgG3 mais pas IgM. Ces résultats suggèrent que les facteurs BSAP bloquent l'activation de hs1,2, aux stades B précoces, en empêchant la fixation du facteur NF- $\alpha P$  sur son site (Neurath et al., 1995). Si le site  $\alpha P$  est remplacé par un site Elf-1, la répression médiée par BSAP n'a plus lieu (Linderson et al., 2001). Par la suite, il a été démontré que BSAP pouvait recruter un corépresseur transcriptionnel de la famille Groucho, Grg4, qui est nécessaire pour la répression induite par Pax5 de gènes B spécifiques (Linderson et al., 2004).

BSAP semble donc avoir un rôle répresseur de l'activité de hs1,2. Pourtant, quand le site BSAPb est cloné en amont du gène de la  $\beta$ -globine, il est capable d'activer la transcription dans une lignée B, quel que soit son sens d'insertion (Singh and Birshtein, 1996). Les auteurs ont alors émis l'hypothèse suivante : la fonction répressive de BSAP au niveau de hs1,2 serait due à son interaction avec d'autres facteurs liant des séquences

adjacentes. Il a ainsi été montré, par transfections transitoires, que les séquences entourant les sites a et b sont essentielles à la régulation de hs1,2 par BSAP. La région située en 5' du site a est capable de fixer les facteurs Oct et NF- $\kappa$ B tandis que la région en 3' du site b peut fixer une protéine liant un motif riche en G (Michaelson et al., 1996a; Singh and Birshtein, 1996). La mutation de l'un ou l'autre de ces motifs entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle dans les lignées B. Des mutations combinées de ces différents sites démontrent cependant que les motifs BSAP sont nécessaires à la répression. La fixation des facteurs Oct-1 et Oct-2 a 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 Birshtein, 1996).

### **3.4.5.2 Protéines se fixant à hs3**

Deux octamères imparfaits mais fonctionnels ont été identifiés dans hs3a (Matthias and Baltimore, 1993). Il a été montré qu'ils lient les facteurs de transcription Oct-1 et Oct-2. Cependant, aucune coopération entre ces deux facteurs n'a pu être mise en évidence.

Les éléments hs3a et hs3b sont la cible, au niveau de sites MARE, de facteurs de la famille Maf. Ces protéines constituent d'importants régulateurs de la différenciation cellulaire. Elles contiennent un domaine riche en leucine (« basic leucine zipper » ou bZip) qui médie les interactions protéine-protéine et la liaison à l'ADN. Les petites protéines de la famille Maf (MafF, MafG et MafK) ne possèdent pas de domaine de transactivation et sont essentiellement composées de domaines bZip (pour revue (Blank and Andrews, 1997)). Bach2 est une protéine dont l'expression est restreinte à la lignée B et au cerveau. Elle est capable de former un hétérodimère avec les petites protéines de la famille Maf et est abondamment exprimée aux stades B précoces. Son expression diminue au cours de la différenciation B pour atteindre un taux zéro au stade plasmocytaire. Bach2 agit avec MafK en tant que répresseur (Muto et al., 1998). La production de souris déficientes en Bach2 a mis en évidence le rôle majeur joué par cette protéine dans l'hypermutation somatique et la recombinaison de classe (Muto et al., 2004).

Récemment, deux sites Oct, deux sites BSAP et deux sites NF- $\kappa$ B ont été découverts dans hs3b (Gordon et al., 2003). Dans la même étude, il a été montré que le facteur de transcription Ying Yang 1 (YY1) se liait au niveau de hs3b et activait la transcription notamment en réponse au LPS et au LPS plus IL4. La protéine Rb inhibe cette liaison de manière dose-dépendante. Le LPS stimule l'hyperphosphorylation de la protéine Rb causant ainsi la dissociation du complexe Rb-YY1 et permettant à YY1 de se fixer à hs3 (Gordon et al., 2003). Enfin, Greenbaum et al. ont montré que le facteur de transcription E2A était capable de fixer hs3b mais ne liait pas son homologue hs3a (Greenbaum et al., 2004).

### **3.4.5.3 Protéines se fixant à hs4**

Hs4 est actif depuis les stades B précoces jusqu'au stade plasmocytaire. L'activité de hs4 est contrôlée par les mêmes facteurs qui répriment en même temps hs1,2 : BSAP, Oct et NF- $\kappa$ B (Michaelson et al., 1996b). La fixation des facteurs BSAP à hs4 a pu être détectée aux stades précoces mais pas au stade plasmocytaire tout comme Oct-1. Le complexe NF- $\kappa$ B (fixé au site  $\kappa$ B) est détecté, quant à lui, du stade pré-B jusqu'au stade plasmocytaire (Michaelson et al., 1996b).

Dans des systèmes utilisant des gènes rapporteurs en expression transitoire, des mutations dans les sites BSAP, Oct ou  $\kappa$ B diminuent l'activité de hs4 dans les lignées B. Dans une lignée pré-B, alors que les mutations effectuées dans les sites  $\kappa$ B et Oct diminuent très significativement l'activité de hs4, une mutation du site BSAP conduit à un doublement de l'activité transcriptionnelle (Michaelson et al., 1996b). Le rôle des facteurs BSAP semble donc double, répresseur au stade pré-B puis activateur au stade B mature. Chez l'homme, il n'y a pas de site BSAP au niveau de hs4. En revanche, il y a présence d'un site YY1 (Sepulveda et al., 2004).

## 3.4.6 Fonctions proposées de la région 3'IgH

### 3.4.6.1 Réplication

La description de la région contenant  $E_{\mu}$  comme étant une origine de réplication (Ariizumi et al., 1993) laissait envisager qu'il en soit de même pour la région 3'IgH. 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  $C_{\alpha}$ , la réplication se poursuivant vers les gènes en amont. Dans les cellules non B,  $C_{\alpha}$  semble se répliquer très précocement alors que les autres gènes constants se répliquent progressivement au cours du temps (Brown et al., 1987; Ermakova et al., 1999). Au contraire, dans les cellules B, tous les gènes C se répliquent de façon précoce, au tout début de la phase S. Des études sur la réplication dans une lignée B de souris suggèrent que des séquences en aval de  $C_{\alpha}$  sont impliquées dans la régulation de ce processus, au début de la phase S (Brown et al., 1987; Ermakova et al., 1999). Cependant, le maintien d'une même chronologie de la réplication est constatée dans la lignée murine LP1-2, portant une délétion de la région 3'IgH, excluant ainsi tout rôle de cette région dans le contrôle de la réplication (Michaelson et al., 1997). Il semble, pour l'instant, que l'initiation précoce de la réplication débute au niveau de régions situées en aval de la région 3' et que des changements dans l'initiation de la réplication se produisent au cours du développement B sur les deux allèles (Ermakova et al., 1999; Michaelson et al., 1997; Norio et al., 2005).

### 3.4.6.2 Transcription germinale et commutation isotypique

Le remplacement de  $hs1,2$  par un gène de résistance à la néomycine sous contrôle d'un promoteur  $pgk$  ( $pgk-neo^r$ ), chez la souris, n'entraîne pas de modification des recombinaisons V(D)J mais altère la transcription germinale ainsi que la commutation isotypique. La stimulation des splénocytes *in vitro* par le LPS ou LPS plus IL4 montre que cette mutation, à l'état homozygote, diminue de façon drastique la transcription germinale des gènes constants  $\gamma 3$ ,  $\gamma 2b$ ,  $\gamma 2a$  et  $\epsilon$ , et par conséquent, la commutation de classe vers les isotypes IgG3, IgG2b, IgG2a et IgE. *In vivo*, les taux d'IgG3 et IgG2b sériques sont diminués alors que les IgG2a et IgA sont normalement présentes, indiquant ainsi que seules certaines

voies de la commutation de classe sont perturbées. Les isotypes IgM et IgG1 ne sont pas affectés (Cogné et al., 1994).

Un phénotype similaire est observé lorsque l'élément *hs3a* est remplacé par une cassette *pgk-néor* (Manis et al., 1998). Toutefois, la délétion de la cassette *pgk-néor* grâce à l'action de la recombinaison *cre* permet la restauration d'un phénotype sauvage pour la délétion de *hs1,2* ou *hs3a* (Manis et al., 1998). Ces résultats suggèrent ainsi que ni *hs1,2* ni *hs3a* ne sont requis pour la commutation isotypique ou qu'ils ont un rôle redondant au sein de la LCR 3'IgH.

Comment expliquer alors le phénotype observé lorsque *hs3a* ou *hs1,2* sont remplacés par une cassette *pgk-néor* ? Un défaut d'accessibilité des régions « switch » pourrait être lié à l'inhibition de la transcription germinale ou à la perturbation du remodelage de la chromatine. En effet, les activateurs 3' agiraient grâce à la formation de boucles permettant une interaction physique directe entre un activateur et un promoteur rendu accessible selon les stimuli (Arulampalam et al., 1997). Des phénomènes de compétition entre promoteurs pourraient notamment survenir à distance. Ainsi, le promoteur *pgk* du gène *néor* pourrait priver certains promoteurs germinaux de facteurs de transcription (Cogné et al., 1994). Alternativement, le gène *néor*, ou son promoteur, pourrait jouer un rôle d'isolateur et empêcher la propagation d'influences activatrices provenant de la partie la plus en aval de la région 3'IgH.

L'hypothèse d'une action polarisée de la région 3'IgH a été étayée par l'étude de Seidl et al. (Seidl et al., 1999). Son équipe a montré que le remplacement du promoteur *IgG2b* ou des exons  $\epsilon$  par une cassette *pgk-néor* affecte dans le premier cas la transcription germinale et la commutation vers *Cy3*, et dans le second cas la transcription germinale et la commutation vers *Cy3*, *Cy2b* et *Cy2a*. Les recombinaisons vers *Cy1* et *C $\alpha$*  ne sont quasiment pas affectées. La compétition entre le promoteur *pgk* et les promoteurs germinaux n'interviendrait qu'avec les gènes en amont. Les gènes en aval pourraient être activés par la région 3'IgH (Seidl et al., 1999).

Toutes ces études indiquent que les éléments de la région 3'IgH intervenant dans la régulation de la commutation de classe se trouvent en aval de *hs1,2*. L'insertion d'une

cassette *pgk-néof* 2 kb en aval de *hs4* n'entraîne aucune altération de la sécrétion d'immunoglobulines. La commutation de classe vers tous les isotypes a lieu de façon normale (Manis et al., 2003). Ceci suggère que les éléments clés de la région 3'IgH se situent dans un espace de 17kb situé entre l'élément *hs1,2* et la région localisée 2 kb en aval de *hs4*.

La délétion conjointe des deux activateurs les plus distaux de la région 3'IgH (*hs3b* et *hs4*) ou leur remplacement par une cassette *pgk-néof* altèrent la transcription germinale des régions constantes et la commutation de classe vers tous les isotypes à l'exception de IgG1 et IgM (Pinaud et al., 2001). Cet effet peut s'expliquer par le fait que les éléments *hs3b* et *hs4* (ou *hs4* seul) sont des régulateurs clés de la transcription germinale ou bien par le fait qu'il s'agit d'un « effet dose » causé par la délétion de deux activateurs en même temps. Lorsque le locus IgH est exprimé sans les activateurs 3' dans un chromosome artificiel chez des souris transgéniques, la transcription germinale est altérée et la commutation de classe est indétectable (Dunnick et al., 2005). Il est difficile de savoir précisément quels éléments interviennent dans la régulation de la transcription et de la commutation isotypique. *Hs3b* et *hs4* sont essentiels. En revanche la délétion d'un seul activateur (*hs1,2* ou *hs3a*) est plus facilement compensée par les autres.

Une autre étude va en faveur d'un rôle prépondérant des éléments *hs3b* et *hs4* lors des phénomènes de transcription et de commutation de classe. En effet, des souris transgéniques contenant le promoteur germinale  $\epsilon$ , le gène  $C\epsilon$  et la région  $S\epsilon$  placés sous contrôle de *hs3a/hs1,2* ou *hs3b/hs4* montrent une expression accrue de  $C\epsilon$  comparée aux témoins et une meilleure réponse après stimulation (Laurencikienė et al., 2007). Cependant, seule la combinaison *hs3b/hs4* induit des mutations dans la région  $S\epsilon$ . De telles mutations sont connues pour précéder la commutation de classe et sont dépendantes de l'enzyme AID.

### **3.4.6.3 Hypermutation somatique**

Des souris transgéniques contenant un segment VDJ réarrangé sous contrôle de  $E\mu$  et de *hs1,2* ne présentent pas d'hypermutation somatique (Tumas-Brundage et al., 1997). L'analyse des souris « knock-out » pour *hs3b/hs4* (Pinaud et al., 2001) montre que ces deux activateurs ne sont pas nécessaires ni pour l'assemblage des segments VDJ ni pour la

survenue de l'hypermutation somatique (Morvan et al., 2003). Ces résultats sont en contradiction avec une étude précédente qui a montré que les éléments hs3b et hs4 en association avec pV<sub>H</sub> et E<sub>μ</sub> étaient capables d'induire l'hypermutation d'un gène rapporteur (Terauchi et al., 2001).

#### **3.4.6.4 Expression du locus IgH**

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  $\mu$  n'a pu être constatée. La seule présence de E<sub>μ</sub> et des éléments distaux hs3b et hs4 suffit à induire une forte expression de la chaîne lourde à ce stade. De plus, l'hybridome 70Z/3-NSO, dérivé de la lignée pré-B, est capable spontanément de commuter vers C $\gamma$ 1 (Saleque et al., 1999), confirmant que les deux premiers éléments de la LCR 3' ne sont pas nécessaires à la commutation de classe vers IgG1, en accord avec les résultats chez les souris mutantes (Cogné et al., 1994; Manis et al., 1998).

Chez les souris déficientes pour hs1,2, la transcription des gènes  $\mu$ ,  $\gamma$ 1 et  $\alpha$  demeure normale, seule la transcription germinale de quelques gènes constants est affectée (Cogné et al., 1994). La délétion conjointe des activateurs hs3b et hs4 affecte la transcription germinale de la plupart des gènes constants, et probablement l'expression du gène  $\mu$  dans les lymphocytes B au repos (Pinaud et al., 2001). La lignée LP1-2, dont le locus IgH présente une large délétion incluant cette fois toute la région 3' (mais conserve E<sub>μ</sub>), présente une très faible expression du gène  $\alpha$  en comparaison avec la lignée parentale sans délétion (Gregor and Morrison, 1986). Ceci laisse penser que la région 3', dans sa globalité, régule la transcription des gènes de chaînes lourdes réarrangés par le biais de coopérations entre des éléments multiples et redondants.

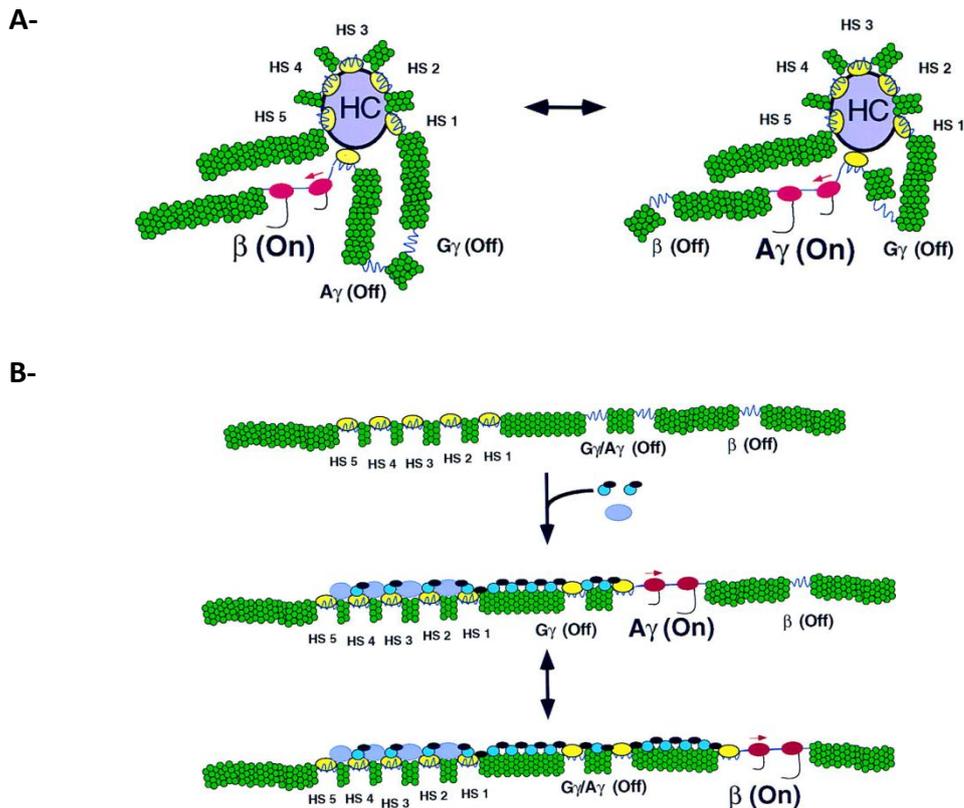
#### **3.4.6.5 Structure de la chromatine**

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. Le groupe de Groudine a décrit l'association hs1,2-hs3b-hs4 comme une LCR. Il a montré que

cette combinaison d'activateurs pouvait déréguler la transcription de l'oncogène *c-myc* par changement de promoteur (de P2 à P1) de façon similaire à ce qui est observé lors du lymphome de Burkitt et dans les plasmocytomes de souris (Madisen and Groudine, 1994). Cette même combinaison est cependant capable de conférer une forte expression de *c-myc* en présence du seul promoteur P2 (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. Cependant, une immuno-précipitation de la chromatine montre une augmentation de l'acétylation des histones sur la totalité du vecteur contenant hs1,2-hs3b-hs4, et non pas simplement l'acétylation des histones situés sur les régions promotrices. La LCR pourrait ainsi contribuer au maintien d'une région dans un état transcriptionnellement actif en recrutant des facteurs tels que des histones acétyl-transférases (HAT), initiant une acétylation des histones qui se propage par la suite dans toute la région environnante (Madisen et al., 1998).

D'importants travaux réalisés sur le locus de la  $\beta$ -globine ont permis de proposer deux modèles d'activation d'un promoteur par une LCR (Bulger and Groudine, 1999) :

- le modèle « looping » suggère la formation d'une boucle permettant des interactions directes et stables entre les facteurs transcriptionnels fixés à la LCR et ceux fixés à proximité des promoteurs (**Figure 16**). Un tel modèle pourrait expliquer le fonctionnement de la LCR 3' du locus IgH. En effet, le remplacement de l'élément hs1,2 provoquant l'effondrement de certaines classes d'Ig (Cogné et al., 1994) fait supposer qu'il puisse interagir, en plus de sa capacité à stimuler les promoteurs pV<sub>H</sub>, avec les promoteurs situés en amont des régions I rendues accessibles selon les stimuli. Les éléments de la LCR interagiraient, de façon alternative et selon le stade de différenciation de la cellule B, avec les différents promoteurs (pV<sub>H</sub> et pI) du locus IgH (Arulampalam et al., 1997).
- le modèle « linking » implique une chaîne de complexes protéiques ancrés à la fibre chromatinienne se propageant depuis l'activateur jusqu'au promoteur. Il met en jeu des protéines à homéodomains.



**Figure 16 : Modèle d'activation d'un locus par une LCR.**

**A : Modèle « looping ».** Selon les stimuli, la transcription est initiée pour le gène  $\beta$  ou pour le gène  $A\gamma$ . Les protéines de la chromatine condensée sont représentées en vert. Un holocomplexe protéique permettant l'initiation de la transcription (HC) est représenté en gris, l'ARN polymérase est représentée par des ellipses rouges, les activateurs et promoteurs fixant les facteurs nucléaires sont représentés en jaune.

**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 homéodomaines ou d'autres protéines (ovales bleus clairs). La chaîne qui se constitue se propage le long de la chromatine entre la LCR et le gène à transcrire. (Bulger and Groudine, 1999).

Récemment, trois nouveaux sites hypersensibles à la DNase I ont été découverts en aval de hs4 : hs5, hs6 et hs7 sans rôle activateur (Garrett et al., 2005). Une analyse approfondie de toute la région 3'IgH a été réalisée par CHIP et a révélé une ouverture progressive de la chromatine en fonction du stade de développement mais pas lors 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, suivies de hs4. Hs3a, hs1,2 et hs3b seraient associés à une chromatine active à partir du stade B mature.

La chromatine active est associée à l'acétylation des histones H3 et H4 ainsi qu'à la méthylation de H3K4. La méthylation de H3K9 est, quant à elle, caractéristique de l'hétérochromatine (ou chromatine inactive). Ainsi, au stade pro-B les trois modifications associées à une chromatine active sont détectées au niveau de hs5, hs6 et hs7. En revanche, l'acétylation de H3 dans hs4 n'est retrouvée qu'à partir du stade pré-B. Pour, hs3a, hs1,2 et hs3b, ces modifications n'apparaissent que plus tardivement.

La méthylation de H3K9 a été détectée en amont de hs3a et en aval de hs7 suggérant que la région 3'IgH est entourée d'hétérochromatine (Garrett et al., 2005). La région en aval de hs4 contient de multiples sites CTCF dont plusieurs coïncident avec hs5, hs6 et surtout hs7. Si ces trois hs ne semblent pas avoir de fonction activatrice, ils présentent cependant une activité insulatrice 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.

### **3.5 DÉCOUVERTE D'UNE NOUVELLE RÉGION RÉGULATRICE EN 5'**

L'étude de la région 5'IgH, en amont des gènes V, a permis de mettre en évidence la présence de trois sites hypersensibles à la DNase I appelés HS1, HS2 et HS3, localisés respectivement 32,6 kb, 27,9 kb et 26,2 kb en amont du gène V<sub>H</sub>J558.55 (Pawlitzky et al., 2006). HS1 est détecté uniquement au stade pro-B tandis que les sites HS2 et HS3 sont présents tout au long du développement B : du stade pré-proB jusqu'au stade plasmocytaire, ainsi que dans les cellules T. L'analyse plus précise de HS3 a montré l'existence de deux sites distincts séparés de 250 pb : un site 5' faible (HS3a) et un site 3' plus fort (HS3b) (Pawlitzky et al., 2006).

HS1 possède des sites de fixation pour PU.1, Pax5 et E2A. Ces protéines se lient à HS1, *in vitro*, uniquement au stade pro-B. Les trois HS ont été testés pour leur capacité à activer ou à réprimer la transcription d'un gène rapporteur. Il a été observé que la

combinaison HS1-2-3 entraîne une diminution de la transcription. Le même résultat est obtenu avec HS1 seul. Une mutation du site de fixation de PU.1, empêchant la liaison de PU.1 à HS1, n'a pas d'effet. Mais si le site Pax5 est muté, la transcription est augmentée. Pax5 a donc une fonction répressive (Pawlitzky et al., 2006).

## 4 TRANSLOCATION DU GÈNE *C-MYC* DANS LE LOCUS IgH

### 4.1 RÔLES PHYSIOLOGIQUES DE *C-MYC*

#### 4.1.1 Le gène *c-myc*

Le gène *c-myc* code un facteur de transcription de type « hélice-boucle-hélice » (HLH) ayant un domaine « leucine-zipper ». Il contient trois exons (**Figure 17**). L'exon 1 est non codant. Il contient deux promoteurs, P1 et P2, en amont et des séquences régulatrices en aval. Deux autres promoteurs ont été décrits : le promoteur cryptique P3 dans l'intron 1 et le promoteur P0 dans la région 5' non traduite, en amont de l'exon 1. P1 et P2 possèdent chacun une boîte TATA contrairement à P0 et P3. Les exons 2 et 3 codent la protéine c-Myc (pour revue (Ryan and Birnie, 1996)). L'initiation de la transcription se fait principalement au niveau du promoteur P2 dans les cellules non transformées.

#### 4.1.2 La protéine c-Myc

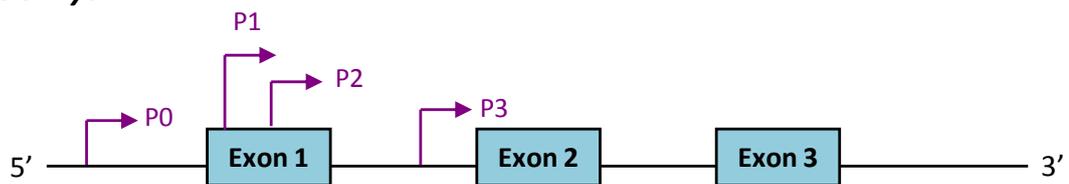
La protéine c-Myc est un facteur de transcription et possède ainsi plusieurs domaines caractéristiques (**Figure 17**) :

- un domaine carboxy-terminal constitué d'une région basique impliquée dans la reconnaissance et la liaison à des séquences d'ADN spécifiques, d'une région HLH et d'une région « leucine-zipper » responsable de l'hétérodimérisation de c-Myc avec son partenaire Max. L'hétérodimère Myc-Max est capable de se lier à l'ADN au niveau de la boîte CACGTG (E box). La protéine Mad régule négativement c-Myc en formant un hétérodimère avec Max.
- un domaine de localisation nucléaire permettant à la protéine c-Myc nouvellement synthétisée de passer du cytoplasme au noyau.
- un domaine d'activation de la transcription dans sa partie amino-terminale (TAD) permettant l'interaction avec la machinerie transcriptionnelle. Ce domaine contient deux

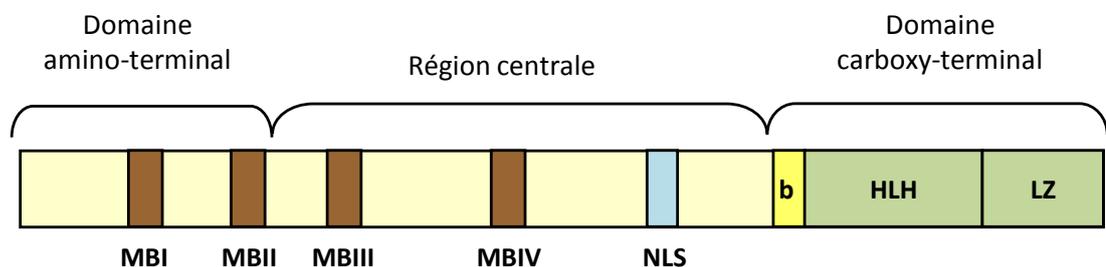
régions très conservées : les boîtes Myc I et Myc II (MBI et MBII pour « Myc Box » I et II) essentielles pour la transactivation et la transrépression des gènes cibles.

Récemment, un domaine MBIII a été découvert dans la région centrale de c-Myc. C'est un médiateur de l'apoptose, de la transformation cellulaire et de la tumorigénèse (Herbst et al., 2005). Enfin, une quatrième boîte Myc (MBIV) régule la liaison à l'ADN, l'apoptose, la transformation ainsi que l'arrêt du cycle en phase G2 (Cowling et al., 2006).

### A- Gène *c-myc*



### B- Protéine c-Myc



**Figure 17 : Organisation du gène *c-myc* et structure de la protéine c-Myc.**

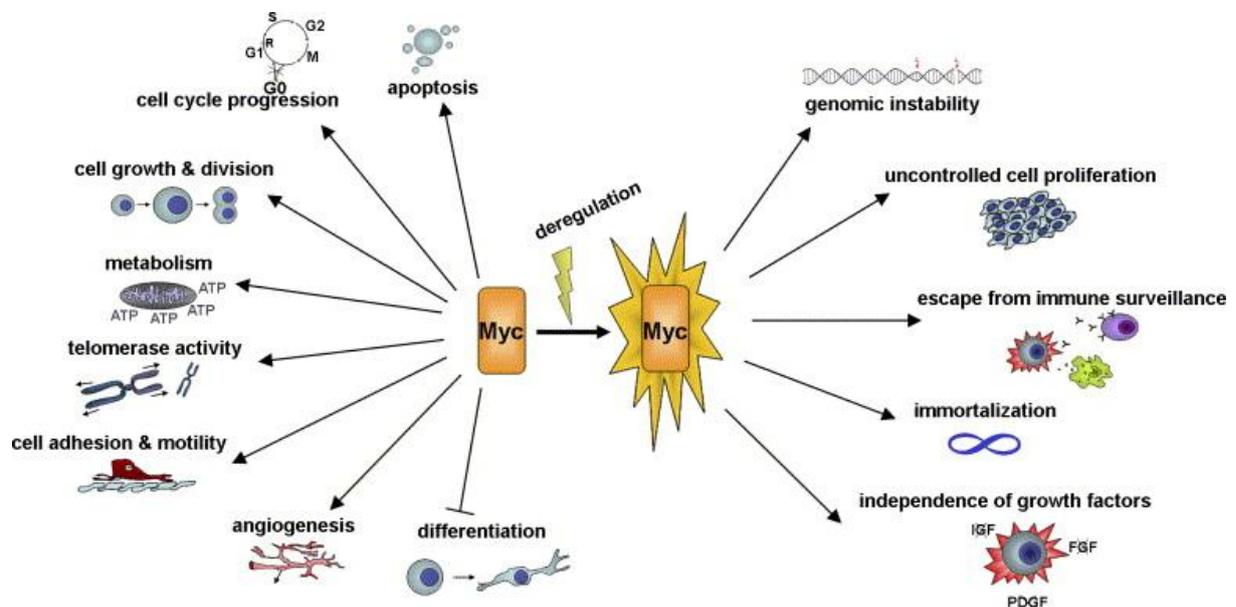
**A : Représentation du gène *c-myc*.** Les flèches courbées représentent les promoteurs. Les introns sont représentés par des traits fins et les exons par des rectangles.

**B : Structure de la protéine c-Myc.** MB : Myc Box ; NLS : signal de localisation nucléaire ; HLH : hélice-boucle-hélice ; LZ : leucine zipper ; b : région basique.

### 4.1.3 Fonctions de la protéine c-Myc

c-Myc appartient à une famille de facteurs de transcription qui forment des hétérodimères et qui se lient à des séquences d'ADN spécifiques sur le promoteur des gènes cibles. La liaison du complexe Myc-Max aux séquences E box induit l'activation du gène cible dans la plupart des cas, alors que les complexes Mad-Max ou Max-Max, qui n'ont pas de domaine de transactivation, bloquent l'effet biologique de Myc-Max par une compétition de l'occupation de la séquence E box.

La protéine c-Myc est exprimée durant l'embryogenèse de façon ubiquitaire ainsi que dans les tissus adultes possédant une forte capacité de prolifération. c-Myc joue un rôle essentiel dans la régulation de plusieurs fonctions biologiques telles que la prolifération, la différenciation, l'adhésion cellulaire, le métabolisme et l'apoptose (**Figure 18**). Les souris « knock-out » pour *c-myc* meurent au stade embryonnaire 9,5 - 10,5 jours suite à diverses anomalies dans le développement de l'embryon (Davis et al., 1993).



**Figure 18 : Fonctions biologiques contrôlées par c-Myc dans des conditions normales et durant la lymphomagenèse.**

c-Myc régule de nombreuses fonctions biologiques. Elles sont fortement perturbées lorsque l'expression de *c-myc* est dérégulée. (Vita and Henriksson, 2006).

- **c-Myc et la prolifération cellulaire :**

Un des rôles clés de c-Myc est de promouvoir la progression du cycle cellulaire. Dans des cellules quiescentes *in vitro*, l'expression de *c-myc* est indétectable. Cependant, sous l'effet de signaux mitogéniques, les niveaux en ARNm et en protéine augmentent rapidement, les cellules entrent alors en phase G1. Puis, les taux diminuent jusqu'à un niveau faible mais stable dans les cellules en prolifération. L'importance de *c-myc* pour la transition G1-S est illustrée par le constat que des cellules *c-myc* *-/-* prolifèrent 3 fois moins vite que leur forme sauvage, et présentent des phases G1 et G2 très ralenties (Mateyak et al., 1997). Divers travaux ont montré que c-Myc participe à l'activation des complexes cdk2-cycline E en phase G1 (Berns et al., 1997; Perez-Roger et al., 1997; Steiner et al., 1995). Les cellules *c-myc* *-/-* présentent une activité kinase cdk2 très réduite par rapport aux cellules *c-myc* *+/+* et des niveaux en p27 (inhibiteur des cdk) très élevés (Mateyak et al., 1997). Différents travaux ont suggéré que l'effet activateur de c-Myc sur les complexes cdk2-cycline E serait médié par l'induction d'une protéine de séquestration de p27, qui empêcherait alors p27 d'exercer son effet inhibiteur sur l'activité kinase de cdk2-cycline E (Steiner et al., 1995; Vlach et al., 1996). Il existe des données contradictoires concernant l'effet de c-Myc sur l'expression de la cycline D1, mais des travaux ont cependant montré que l'induction de l'expression des cyclines D par c-Myc pourrait contribuer à séquestrer p27 (Bouchard et al., 1999; Perez-Roger et al., 1999). D'autres hypothèses ont été envisagées : c-Myc pourrait, en particulier, stimuler la transcription du gène de la cycline E bien qu'il ne contienne aucune E-box (Perez-Roger et al., 1997). c-Myc stimule également la transcription du gène *cdc25A*, codant pour une phosphatase qui élimine les groupements phosphates inhibiteurs sur les kinases cdk2 ce qui engendre une activité kinase cdk2 accrue (Galaktionov et al., 1996). Enfin, il a été montré que l'augmentation de l'expression de c-Myc provoque une répression de la transcription du gène codant pour p27 (Yang et al., 2001). Indirectement, c-Myc pourrait également diriger la dégradation de p27 par la voie Ubiquitine – Protéasome, car il stimule l'expression du gène *Cul1* codant un composé du complexe ubiquitine ligase SCF<sup>Skp2</sup> (O'Hagan et al., 2000).

- **c-Myc inhibe la différenciation cellulaire**

Dans de nombreux types cellulaires, une diminution de c-Myc accompagne le processus de différenciation terminale et la sortie définitive des cellules du cycle cellulaire. Le blocage de l'activité de *c-myc* par des oligonucléotides anti-sens, par l'expression ectopique de Max ou par l'expression de mutants dominants négatifs de *c-myc* peut induire la différenciation des cellules leucémiques HL-60, des cellules F9 (tératocarcinome) ou des cellules MEL (érythro-leucémie de souris) (Canelles et al., 1997; Griep and Westphal, 1988; Holt et al., 1988; Prochownik et al., 1988). Réciproquement, l'expression ectopique de *c-myc* est suffisante pour abolir l'induction de la différenciation dans les cellules MEL (Prochownik and Kukowska, 1986), F9 (Onclercq et al., 1989), U-937 (lignée de monoblastes) (Larsson et al., 1988) ou PC12 (lignée neuronale) (Maruyama et al., 1987).

- **c-Myc et l'apoptose**

Les avancées réalisées dans la connaissance des fonctions de c-Myc ont permis de découvrir que paradoxalement, c-Myc est capable d'induire l'apoptose dans certaines circonstances. Des études effectuées sur des fibroblastes (Evan et al., 1992) ou des cellules hématopoïétiques (Askew et al., 1991) ont révélé que l'expression constitutive de c-Myc nécessite la présence de facteurs de croissance ou de survie pour que les cellules puissent proliférer. L'élimination du sérum (pour les fibroblastes) ou de l'interleukine 3 (pour les cellules hématopoïétiques) provoque l'apoptose. La fonction de c-Myc serait alors de sensibiliser les cellules à ces signaux apoptotiques. Les mécanismes de l'apoptose induite par c-Myc sont peu connus. Plusieurs gènes impliqués dans l'apoptose (p19<sup>ARF</sup>, p21, p53, Bax) contiennent dans leur promoteur des régions répondant à c-Myc, mais le rôle direct de ces gènes dans ce processus de sensibilisation pro-apoptotique reste incertain. c-Myc couple la prolifération cellulaire à l'induction de l'apoptose dans certaines conditions pour lesquelles les facteurs de survie sont limitants. Pour que des cellules puissent survivre à une expression dérégulée de c-Myc, elles ont besoin soit d'un apport continu en facteurs de survie, soit de l'acquisition de mutations anti-apoptotiques supplémentaires (Sears and Nevins, 2002).

#### 4.1.4 Régulation de l'expression de *c-myc*

Le gène *c-myc* est régulé par des mécanismes complexes à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. De nombreux facteurs de transcription interagissent avec *c-myc*. Plusieurs sites hypersensibles à la DNase I ont été identifiés en 5' de *c-myc* et dans le gène *c-myc*. NF- $\kappa$ B est un important facteur régulateur des promoteurs *c-myc* murins et humains. Les mécanismes de contrôle de l'élongation de la transcription jouent également un rôle important dans la régulation de *c-myc*.

#### 4.2 TRANSLOCATION DU GÈNE *C-MYC* ET LYMPHOME DE BURKITT

Le lymphome de Burkitt chez l'homme, le plasmocytome chez la souris et l'immunocytome chez le rat sont invariablement associés à une translocation de *c-myc* au niveau d'un des trois loci codant les immunoglobulines. La translocation affecte majoritairement le locus IgH codant les chaînes lourdes (80% des cas chez l'homme) (Tableau 1).

Pathologie et espèce	Translocation	Réarrangement	Fréquence
Lymphome de Burkitt (Homme)	T(8 ;14)	Myc-IgH	80%
Lymphome de Burkitt (Homme)	T(2 ;8)	Myc-Igk	15%
Lymphome de Burkitt (Homme)	T(8 ;22)	Myc-Ig $\lambda$	5%
Plasmocytome (Souris)	T(12 ;15)	Myc-IgH	90%
Plasmocytome (Souris)	T(6 ;15)	Myc-Igk	10%
Plasmocytome (Souris)	T(15 ;16)	Myc-Ig $\lambda$	<1%
Immunocytome (Rat)	T(6 ;7)	Myc-IgH	100%

**Tableau 1 : Translocations chromosomiques dérégulant *c-myc* chez trois espèces de mammifères.**

### 4.2.1 Description du lymphome de Burkitt

Le lymphome de Burkitt (LB) consiste en une prolifération monoclonale maligne de cellules B matures. Il est caractérisé par ses aspects morphologiques (lymphome monotone de cellules B de taille moyenne, aspect de « ciel étoilé » dû aux macrophages contenant des débris de corps apoptotiques), son profil immunophénotypique (CD10<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD77<sup>+</sup>, profil caractéristique des centroblastes) et ses anomalies cytogénétiques impliquant *c-myc*. Trois cas différents ont été mis en évidence : le LB endémique africain, le LB sporadique caucasien et le LB associé au déficit immunitaire lors de l'infection par le VIH (Blum et al., 2004).

### 4.2.2 Points de cassure dans les lymphomes de Burkitt

Les points de cassure dans les lymphomes de Burkitt sont répertoriés en trois classes selon leur localisation par rapport au gène *c-myc* (Cory, 1986) (**Figure 19**) :

- Classe I : le point de cassure intervient dans le gène *c-myc* soit dans l'exon 1, soit dans le premier intron. La région codante reste cependant intacte.
- Classe II : le point de cassure est situé immédiatement en 5' de *c-myc*.
- Classe III : le point de cassure intervient au moins 100 kb en amont du gène *c-myc*.

Pour les classes I et II, les points de cassure sur le locus IgH se produisent au niveau des régions « switch ». Ces deux classes sont associées aux LB sporadiques et aux LB associés au VIH. Pour la classe III, le point de cassure se produit au niveau des régions VDJ sur le locus IgH et ces translocations sont associées aux LB endémiques (**Figure 19**) (Blum et al., 2004).

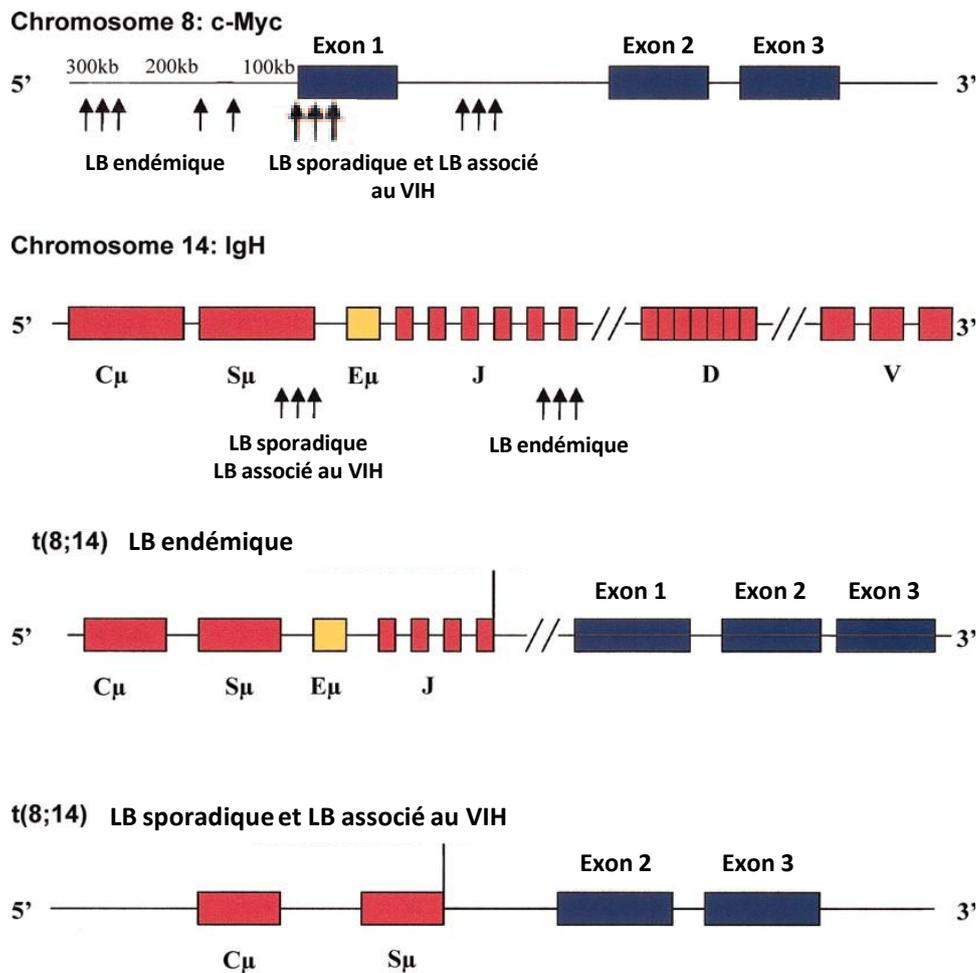


Figure 19 : Localisation des points de cassure sur le gène *c-myc* et sur le locus IgH lors du lymphome de Burkitt chez l'homme.

Les points de cassure sont représentés par des flèches. (Blum et al., 2004).

### 4.3 MÉCANISMES MIS EN JEU LORS DE LA TRANSLOCATION DE C-MYC DANS LE LOCUS IgH

Le locus IgH, qui est physiologiquement soumis à des remaniements et des mutations au cours de la différenciation lymphocytaire B, constitue une zone critique pour des événements de translocations chromosomiques. Les recombinaisons VDJ, l'hypermutation somatique et la commutation de classe génèrent des cassures de l'ADN. Lors du lymphome de Burkitt, la translocation de *c-myc* dans le locus IgH implique soit la région VDJ et semble

correspondre à des cassures de l'ADN liées au phénomène d'hypermutation somatique, soit les régions « switch » et correspond alors à des aberrations du processus de recombinaison de classe. La commutation isotypique implique le clivage de l'ADN au niveau de deux régions « switch » tandis que la translocation implique seulement une seule région. Ceci suggère que la structure du complexe de recombinaison favorise l'interaction d'une seule région « switch » avec l'autre chromosome contenant le gène *c-myc*, durant l'évènement de translocation (pour revue (Kuppers and Dalla-Favera, 2001)).

Les mécanismes précis mis en jeu lors de la translocation restent à élucider. Des études sur des lymphomes de Burkitt humains ont indiqué que l'enzyme AID était exprimée dans les cellules B tumorales des centres germinatifs (Smit et al., 2003). Il a également été montré que la translocation de *c-myc* dans le locus IgH est dépendante de AID et de UNG (Ramiro et al., 2006; Ramiro et al., 2004). Lors de la commutation de classe, la formation de boucles R dans des régions riches en GC permet la formation d'ADN simple brin qui est la cible de AID. Une étude basée sur la transcription *in vitro* de l'exon 1 et l'intron 1 de *c-myc* a suggéré que de telles boucles R pouvaient également se former dans *c-myc* (Duquette et al., 2005). Ces résultats suggèrent que AID est la clé de l'instabilité génétique de *c-myc* dans les cellules B activées. De même, la séquence de *c-myc* explique en partie son instabilité. L'exon 1 et l'intron 1 sont riches en GC, ce qui prédispose le gène *c-myc* à former des structures où l'ADN est simple brin. Cependant, l'ensemble de ces résultats n'a pas encore été démontré *in vivo*.

Récemment, une étude portant sur des souris transgéniques E $\mu$ -*c-myc* a montré que si ces souris étaient déficientes en enzyme AID, elles développaient un lymphome pré-B. En revanche, lorsqu'elles expriment cette protéine, elles développent un lymphome de phénotype B mature, indiquant un rôle de AID dans le développement de lymphomes B matures (Kotani et al., 2007). AID semble avoir une fonction double dans le développement de lymphome B : l'initiation par translocation chromosomique et l'expansion clonale par mutagenèse.

L'utilisation de souris déficientes pour AID a permis de vérifier l'implication de cette enzyme dans la translocation de *c-myc*. L'injection d'huile minérale (pristane), par voie intra-

péritonéale, conduit à la production accrue de cytokines telles que l'IL-6 qui stimule la prolifération B. Des injections répétées engendrent des changements génétiques supplémentaires conduisant à la formation de plasmocytomes. Ces derniers contiennent dans 85 à 90% des cas une translocation de *c-myc*. Il a été montré qu'il existait le même taux de translocations chez les souris déficientes pour AID que chez les sauvages, suggérant que AID n'est pas nécessaire pour la translocation ou que la fragilité intrinsèque des régions S est suffisante (Unniraman et al., 2004).

## **4.4 DÉRÉGULATION DE *C-MYC* LORS DU LYMPHOME DE BURKITT**

### **4.4.1 Dérégulation de *c-myc* par les activateurs du locus IgH**

Le lymphome de Burkitt est invariablement associé à une translocation de *c-myc* au niveau d'un des trois loci codant les Ig. Le gène *c-myc* transloqué est exprimé tandis que l'allèle normal reste silencieux (Spencer and Groudine, 1991). Dans des lignées cellulaires de Burkitt, la transcription de l'allèle *c-myc* transloqué s'effectue préférentiellement à partir du promoteur P1 au lieu du promoteur normal P2 (Strobl and Eick, 1992; Strobl et al., 1993; Taub et al., 1984). La cause de ce changement de promoteur n'est pas connue mais il apparaît évident que ces diverses modifications sont à l'origine de l'activation ou de la dérégulation du gène *c-myc* transloqué. La perte d'une partie des régions régulatrices de *c-myc* lors des translocations de classe I ou II ne semble pas suffisante pour la transformation cellulaire. Il semble que des éléments régulateurs des loci d'Ig soient mis en jeu.

La dérégulation de l'expression de *c-myc* constitue l'évènement transformant majeur. Ainsi, des souris transgéniques chez lesquelles *c-myc* est placé sous le contrôle de E $\mu$  développent des tumeurs B clonales (Adams et al., 1985; Nussenzweig et al., 1988). Ces études démontrent qu'un haut niveau d'expression de *c-myc* engendré par E $\mu$  suffit pour entraîner le développement de tumeurs B. Cependant, ce modèle reste assez éloigné du lymphome de Burkitt puisque les cellules tumorales sont au stade pré-B et non au stade B mature.

Des souris portant une seule copie d'un chromosome artificiel de levure (YAC) contenant *c-myc* et une partie du locus IgH humain développent rapidement des lymphomes B (Butzler et al., 1997). Cependant, des résultats similaires ont été obtenus avec des souris portant un YAC avec ou sans E $\mu$  (Palomo et al., 1999). Plus récemment, un modèle plus proche du lymphome de Burkitt a été réalisé grâce à l'obtention de souris portant un transgène où le gène humain *c-myc* est sous la dépendance des séquences régulatrices de Ig $\lambda$ . Le transgène est exprimé de façon B spécifique et permet le développement de lymphome B mature clonal avec un phénotype « ciel étoilé » caractéristique du lymphome de Burkitt (Kovalchuk et al., 2000).

La région 3'IgH est liée au gène *c-myc* transloqué dans toutes les translocations impliquant le locus IgH lors du lymphome de Burkitt. Il semble que cette région joue un rôle prépondérant dans la dérégulation de l'expression de *c-myc*. Il a, en effet, été montré *in vitro* que la LCR 3'IgH induit un haut niveau d'expression de *c-myc* et un changement de promoteur de P2 vers P1 (Madisen and Groudine, 1994). Par ailleurs, la région 3'IgH favorise l'expression de *c-myc* à partir du promoteur P2 en permettant une augmentation de l'acétylation des histones. Toutefois, ce phénomène n'explique pas l'activation de la transcription à partir du promoteur P1 (Madisen et al., 1998). Des études ont été réalisées afin de déterminer les sites spécifiques requis pour la dérégulation de *c-myc*. Il a été montré qu'un site NF- $\kappa$ B dans l'activateur hs4 du locus IgH est nécessaire pour le changement de promoteur. Ce changement induit par hs4 est perdu lorsque le site NF- $\kappa$ B est muté (Kanda et al., 2000). Enfin, il a été montré récemment que la région 3'IgH avait des effets similaires sur les promoteurs P1 et P2 du gène *bcl-2*. Elle induit une augmentation de la transcription à partir du promoteur P1, promoteur mineur à l'état normal, comme pour le gène *c-myc* (Duan et al., 2006).

Des souris chez lesquelles le gène *c-myc* est inséré dans le segment C $\alpha$ , en amont de la région 3'IgH, développent des lymphomes B matures avec une faible incidence (9,3%) au bout d'un temps très long (330 jours en moyenne) (Cheung et al., 2004). Un modèle plus récent de lymphome de Burkitt endémique a été réalisé grâce à l'insertion de l'ADNc de *c-myc* par recombinaison homologe dans la région J<sub>H</sub> du locus IgH. Entre 6 et 21 mois, 70% des animaux développent des lymphomes clonaux de types B matures ou des

plasmocytomes (Park et al., 2005a; Park et al., 2005b). *C-myc* est surexprimé et il y a un changement de promoteur de P2 vers P1. Dans un autre modèle, la région 3'IgH tronquée (absence de hs3b) est insérée par recombinaison homologue en amont du gène *c-myc*. Les souris développent alors des lymphomes B (Wang and Boxer, 2005). Cette étude met en évidence le rôle clé de la région 3'IgH, même tronquée, dans la dérégulation de *c-myc*. Mais, il est possible que les activateurs 3'IgH coopèrent avec les éléments régulateurs du gène *c-myc* pour déréguler *c-myc* (Mautner et al., 1995; Remmers et al., 1986).

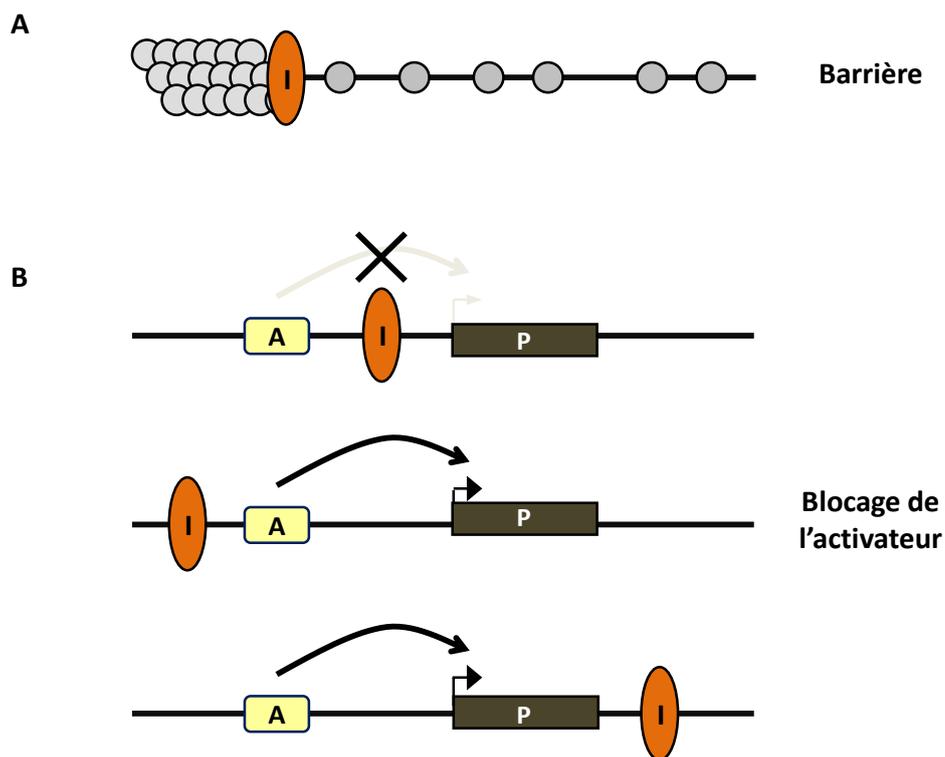
#### **4.4.2 Mutations du gène *c-myc* transloqué**

La majorité des allèles *c-myc* transloqués dans les lignées de lymphome de Burkitt contiennent des altérations de séquence : le plus souvent des mutations ponctuelles ou des délétions (Rabbitts et al., 1984; Taub et al., 1984). L'allèle transloqué est localisé dans des régions qui subissent le phénomène d'hypermutation somatique et est ainsi soumis à des mutations somatiques qui surviennent à des fréquences élevées (Bemark and Neuberger, 2000). La plupart des mutations ont lieu à proximité des promoteurs P1 et P2 dans l'exon 1 et à la jonction exon1-intron1. Ces régions correspondent à des séquences régulatrices importantes qui lient, *in vivo*, de nombreuses protéines. Cependant, il n'est pas encore établi que ces mutations soient un évènement critique dans l'activation de *c-myc* et que les mêmes sites soient mutés dans la majorité des lymphomes.

## 5 LES ISOLATEURS

Les isolateurs (ou insulateurs) sont des séquences d'ADN impliquées dans le contrôle de l'expression génique. Ils ont été identifiés chez la drosophile, et plus récemment chez les vertébrés, et ont pour propriété principale de protéger un gène des signaux émanant de l'ADN adjacent. Ces séquences agissent sur la transcription de deux façons :

- elles protègent les gènes en agissant comme une barrière prévenant l'avancée de chromatine condensée qui pourrait éteindre l'expression du gène en question.
- elles empêchent l'action d'un activateur (ou d'un atténuateur) si, et seulement si, elles sont localisées entre l'activateur et le promoteur (Brasset and Vaury, 2005; West et al., 2002). Cette propriété permet d'éviter l'activation inappropriée d'un gène (**Figure 20**).



**Figure 20 : Mode d'action des isolateurs (I).**

**A :** Ils fonctionnent comme une barrière contre la formation et la progression de chromatine condensée.

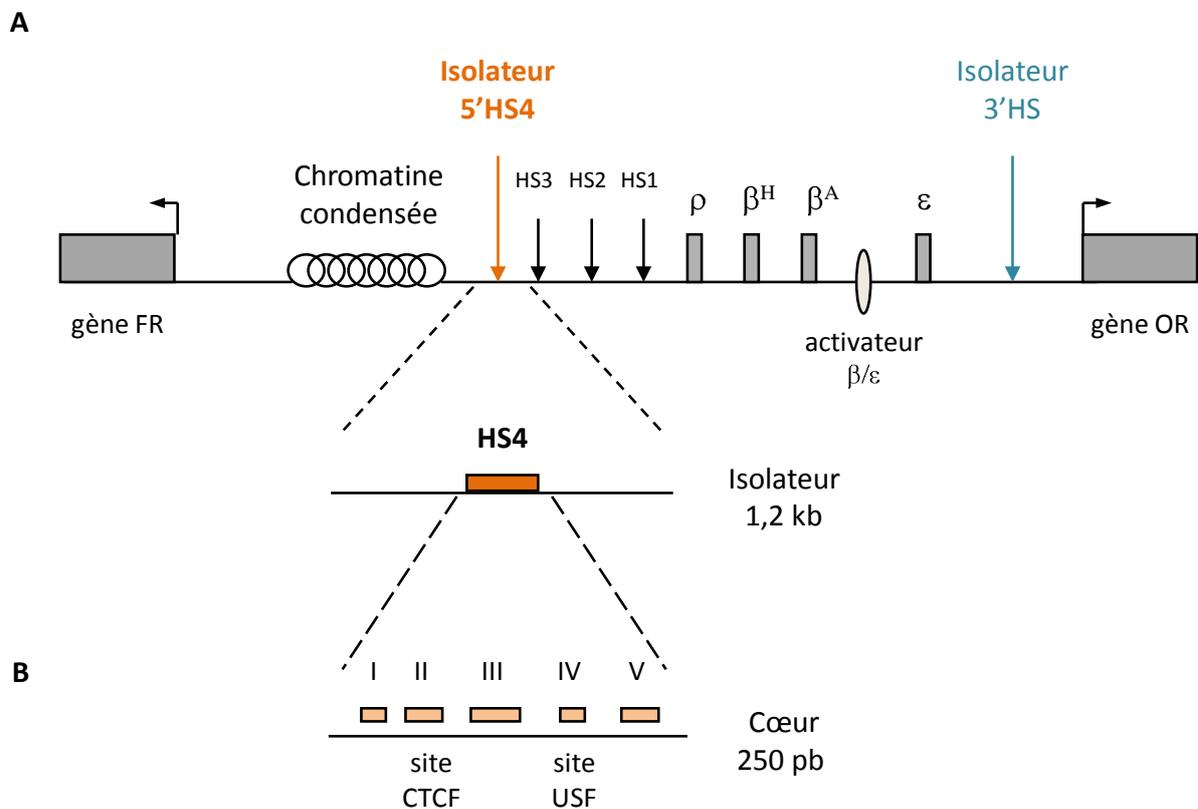
**B :** Ils protègent les gènes en bloquant les interactions activateur-promoteur s'ils sont placés entre un activateur (A) et un promoteur (P). (Burgess-Beusse et al., 2002).

Le premier isolateur décrit chez les vertébrés est celui présent à l'extrémité 5' du locus de la  $\beta$ -globine chez le poulet (Chung et al., 1993) (**Figure 21**). Il contient un site hypersensible à la DNase I appelé HS4 qui est retrouvé dans tous les tissus. Sa localisation coïncide avec la région transitoire entre la conformation active et inactive de la chromatine (Hebbes et al., 1994). Il marque la limite entre la chromatine ouverte, acétylée et sensible à la DNase I et l'hétérochromatine condensée, hypoacétylée et résistante à la DNase I. L'activité isolatrice a été localisée sur un fragment d'ADN de 250 pb riches en GC. Ce fragment contient cinq sites de fixation pour des facteurs nucléaires dont un site de fixation pour la protéine CTCF (CCCTC-binding factor) à onze motifs en doigt de zinc (Chung et al., 1997). Cette protéine est très conservée chez les vertébrés et son expression est ubiquitaire. Elle serait responsable de l'activité bloquante des isolateurs (Bell et al., 1999). Un seul site de fixation pour la protéine CTCF est suffisant pour assurer cette activité.

Fonctionnel au niveau de différentes lignées cellulaires et chez de nombreuses espèces (pour revue (Bell et al., 2001)), y compris la souris (Szabo et al., 2002), l'isolateur 5' de la  $\beta$ -globine a été testé pour sa capacité à protéger un gène rapporteur contre les effets de position. Ainsi, il confère une expression indépendante du site d'intégration d'un gène responsable de la couleur des yeux chez la drosophile (Chung et al., 1997). Il agirait comme une barrière chromatinienne en permettant l'acétylation des histones des régions protégées, et/ou en inhibant l'action des histones déacétylases et des méthylases (Lutz et al., 2000; Pikaart et al., 1998).

L'isolateur 5' de la  $\beta$ -globine est capable d'assurer les deux fonctions caractéristiques des isolateurs : la fonction de blocage des interactions promoteur-activateur et la fonction de protection contre les effets répressifs de la chromatine adjacente. Il a été montré que ces deux activités sont séparables. En effet, la fixation de CTCF à son motif spécifique est absolument nécessaire pour la fonction de blocage. En revanche, elle n'est pas requise pour la fonction de barrière (Recillas-Targa et al., 2002). Cette dernière nécessite la fixation des protéines USF 1 et USF 2 au site IV (West et al., 2004). La mutation du site IV abolit la fonction de barrière. Les protéines USF1 et USF2 recrutent les HAT (histone acétyltransférase) et HMT (histone méthyltransférase), ce qui permet l'acétylation et la

méthylation H3K4 des histones. Ceci empêcherait la propagation de la chromatine condensée (pour revue (Gaszner and Felsenfeld, 2006)).



**Figure 21 : Localisation et structure de l'isolateur situé en 5' du locus de la  $\beta$ -globine de poulet.**

**A :** Schéma du locus de la  $\beta$ -globine de poulet. Les gènes de la globine sont représentés par des rectangles gris, l'activateur  $\beta/\epsilon$  par une ellipse grise. La LCR est localisée en amont des gènes de la  $\beta$ -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.

**B :** Structure du cœur de l'isolateur  $\beta$ -globine montrant le site II de fixation de CTCF.

# **OBJECTIFS**

Le lymphome de Burkitt est invariablement associé à une translocation du gène *c-myc* au sein d'un des trois loci codant les immunoglobulines. Le locus IgH est touché dans 80% des cas. Le gène *c-myc* se retrouve alors transloqué à proximité des éléments régulateurs de ce locus dont E $\mu$  et les activateurs 3'IgH localisés en aval du gène C $\alpha$ . Les modèles animaux existants ont largement utilisé l'activateur E $\mu$  et ont conduit à une expression très précoce de *c-myc* (dès le stade pro-B) à la différence de ce qui est observé lors du lymphome de Burkitt. La région 3'IgH est toujours conservée lors de la translocation et constitue un bon candidat pour jouer un rôle dans la dérégulation de *c-myc*. Afin de réaliser un modèle de lymphome de Burkitt plus proche de la pathologie humaine et dans le but de tester la fonction de la région 3'IgH seule dans la dérégulation de *c-myc*, mon travail de thèse a consisté à réaliser des souris transgéniques chez lesquelles *c-myc* est sous le contrôle des activateurs transcriptionnels 3'IgH, dans leur configuration palindromique.

Une première partie de mon travail a tout d'abord consisté à construire des vecteurs d'expression spécifiques de la lignée B, intégrant des combinaisons complètes ou incomplètes des quatre activateurs transcriptionnels de la région 3'IgH ceci afin d'avoir une expression du transgène qui soit ciblée le plus spécifiquement possible sur les stades B tardifs ; le lymphome de Burkitt étant caractérisé par une prolifération de cellules B matures. Ces « mini-loci », associés à un gène rapporteur, ont été intégrés à la fois dans des lignées lymphoïdes B (représentative de différents stades de maturation) et dans le génome de souris transgéniques. Nous avons également testé l'utilisation d'isolateurs afin d'obtenir une meilleure expression de nos transgènes et éviter au maximum les effets de position dûs à une intégration aléatoire dans le génome hôte.

Toutes ces études ont été les préliminaires indispensables à la seconde partie de mon travail de thèse qui a consisté à établir un modèle murin de lymphome de Burkitt où le gène *c-myc* est sous le seul contrôle de la région 3'IgH.

# RÉSULTATS

**PREMIÈRE PARTIE** : Mise au point de vecteurs d'expression B originaux.

**Article 1** : The  $\beta$ -globin HS4 insulator confers copy-number dependent expression of IgH regulatory elements in stable B cell transfectants.

Laurence Guglielmi, Véronique Truffinet, Michel Cogné et Yves Denizot.

*Immunology Letters*, 2003, Volume 89, pages 119-123.

**Article 2** : The chicken  $\beta$ -globin HS4 insulator is not a silver bullet to obtain copy-number dependent expression of transgenes in stable B cell transfectants.

Véronique Truffinet, Laurence Guglielmi, Michel Cogné et Yves Denizot.

*Immunology Letters*, 2005, Volume 96, pages 303-304.

**Article 3** : The 5'HS4 insulator element is an efficient tool to analyse the transient expression of an E $\mu$ -GFP vector in a transgenic mouse model.

Laurence Guglielmi, Véronique Truffinet, Claire Carrion, Marc Le Bert, Nadine Cogné, Michel Cogné et Yves Denizot.

*Transgenic Research*, 2005, Volume 14, pages 361-364.

**Article 4** : Insulators to improve expression of 3'IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models.

Laurence Guglielmi, Marc Le Bert, Véronique Truffinet, Michel Cogné et Yves Denizot.

*Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2003, Volume 307, pages 466-471.

**DEUXIÈME PARTIE** : Établissement d'un modèle murin de lymphome de Burkitt.

**Manuscrit 5** : The 3'IgH locus control is sufficient to deregulate a *c-myc* transgene and then promotes mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype.

Véronique Truffinet, Eric Pinaud, Nadine Cogné, Barbara Petit, Laurence Guglielmi, Michel Cogné, et Yves Denizot.

Soumis à *Blood*.

**ARTICLE 1 : The  $\beta$ -globin HS4 insulator confers copy-number dependent expression of IgH regulatory elements in stable B cell transfectants.**

Laurence Guglielmi, Véronique Truffinet, Michel Cogné et Yves Denizot.

*Immunology Letters*, 2003, Volume 89, pages 119-123.

Une LCR est définie comme une séquence d'ADN capable de conférer au gène associé une expression tissu-spécifique avec un taux transcriptionnel élevé dépendant du nombre de copies et indépendant du site d'intégration. Il a été suggéré que la région 3'IgH constituait une région de contrôle du locus. Elle est en effet capable de conférer, à elle seule, une forte expression à un transgène, de façon tissu-spécifique. Une telle fonction a été décrite pour l'association hs1,2-hs3b-hs4 sur l'expression du gène *c-myc* après analyse de transfectants stables dans une lignée plasmocytaire (Madisen and Groudine, 1994) et pour le palindrome hs3a-hs1,2-hs3b pour des transfectants d'hybridomes (Chauveau et al., 1998). Dans ce dernier cas, une expression indépendante du site d'intégration est observée mais sans corrélation avec le nombre de copies intégrées. La fonction LCR de la région 3'IgH a également été confirmée *in vivo*. En effet, des souris portant un transgène où le gène de la  $\beta$ -globine est sous la dépendance des quatre éléments 3'IgH, montrent un haut niveau d'expression B spécifique du transgène, expression indépendante du site d'intégration (Chauveau et al., 1999). En revanche, aucune relation stricte entre le nombre de copies et le niveau d'expression n'a pu être établie.

Afin de préciser le rôle de la région 3'IgH et de E $\mu$  dans l'expression copie-dépendante d'un gène associé, nous avons étudié, par transfection stable de lignées cellulaires B, l'expression d'un gène rapporteur associé aux différents activateurs du locus IgH. Nous avons utilisé, pour ces expériences, le gène GFP (green fluorescent protein). La GFP est une protéine qui émet une fluorescence verte dans les cellules vivantes après stimulation par les UV. Les cellules exprimant cette protéine peuvent être facilement analysées individuellement par cytométrie en flux. Nous avons également testé si l'utilisation de l'isolateur 5'HS4 de la  $\beta$ -globine de poulet, de part et d'autre de nos constructions, pouvait être bénéfique pour renforcer l'expression de nos transgènes.

Nous montrons, *in vitro*, par transfections de lignées 18-81 (pré-B) et A20 (B mature), que la région 3'IgH, avec ou sans E $\mu$ , ne permet pas, à elle seule, une expression dépendante du nombre de copies. En revanche, l'ajout d'isolateurs rétablit cette propriété. La région 3'IgH se comporte, alors, comme une vraie LCR, capable de conférer une forte expression à un transgène, de façon tissu-spécifique, indépendante du site d'intégration et dépendante du nombre de copies.

**ARTICLE 2 : The chicken  $\beta$ -globin HS4 insulator is not a silver bullet to obtain copy-number dependent expression of transgenes in stable B cell transfectants.**

Véronique Truffinet, Laurence Guglielmi, Michel Cogné et Yves Denizot.

*Immunology Letters*, 2005, Volume 96, pages 303-304.

L'utilisation de l'isolateur 5'HS4 de la  $\beta$ -globine de poulet permet une amélioration de l'expression d'un gène rapporteur placé sous le contrôle de la région 3'IgH. Il confère, en effet, une expression dépendante du nombre de copies du transgène insérée dans le génome. Deux hypothèses ont été, alors, émises afin d'expliquer ce résultat :

- il est dû à l'architecture du transgène associant à la fois la LCR 3'IgH et les isolateurs.
- l'isolateur 5'HS4 possède une capacité intrinsèque à conférer une expression copie-dépendante à un transgène dans les cellules B.

Afin de trancher en faveur d'une hypothèse, nous avons réalisé un transgène associant la GFP et une LCR incomplète, sans hs4. Cette construction est flanquée d'isolateurs ou non. Elle est transfectée, de façon stable, dans des lignées B. Nous n'observons plus d'effet copie-dépendant même lorsque les vecteurs sont entourés d'isolateurs.

Nous montrons que l'effet copie-dépendant observé dans l'article 1 est dû à l'architecture de notre transgène plutôt qu'à l'activité intrinsèque de l'isolateur. La copie-dépendance conférée par les séquences isolatrices ne fonctionne que si la LCR est complète.

**ARTICLE 3 : The 5'HS4 insulator element is an efficient tool to analyse the transient expression of an E $\mu$ -GFP vector in a transgenic mouse model.**

Laurence Guglielmi, Véronique Truffinet, Claire Carrion, Marc Le Bert, Nadine Cogné, Michel Cogné et Yves Denizot.

*Transgenic Research*, 2005, Volume 14, pages 361-364.

L'activateur intronique E $\mu$  est caractérisé par une activité transcriptionnelle s'exprimant principalement dans la lignée lymphocytaire B. Il régule positivement les réarrangements VDJ et la transcription initiée au niveau de multiples promoteurs du locus IgH. Son étude, *in vitro*, a montré qu'il était actif tout au long de la différenciation lymphocytaire B. Un modèle de souris transgéniques a été généré afin de déterminer, *in vivo*, les stades de développement au cours desquels E $\mu$  est actif (Guglielmi et al., 2003). Un transgène contenant le gène GFP sous le contrôle de E $\mu$  et du promoteur pV<sub>H</sub> a été construit. Il s'exprime fortement dans des lignées de souris pré-B (18-81) et B mature (A20), mais aucune expression n'est détectée dans les trois lignées de souris transgéniques établies. Des expériences de digestions enzymatiques par *Hpa*II et *Msp*I ont montré la totale méthylation du transgène dans les différents tissus analysés (la séquence codante de la GFP contient, en effet, 92 sites CpG, sites potentiels de méthylation). De plus, aucun transcrit GFP n'a pu être mis en évidence.

Afin d'obtenir des lignées de souris exprimant le transgène E $\mu$ -GFP, nous avons borné cette construction par deux isolateurs 5'HS4 de la  $\beta$ -globine de poulet. Des souris I-E $\mu$ -pV<sub>H</sub>-GFP-I ont ainsi été obtenues. Des cellules GFP positives ont été détectées dans la moelle osseuse de nos souris par microscopie confocale. Elles ont, ensuite, été marquées par des anticorps dirigés contre des antigènes de surface caractéristiques d'un type cellulaire ou d'un stade de différenciation donné. Ces analyses en cytométrie en flux ont montré que E $\mu$  permet une expression B spécifique du transgène, expression retrouvée du stade pro-B (B220<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>, CD43<sup>+</sup>) au stade pré-B (B220<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD117<sup>low</sup>, CD43<sup>low</sup>, IgM<sup>-</sup>).

Cette étude montre que l'isolateur 5'HS4 est efficace, *in vivo*, pour protéger un transgène des effets de position occasionnés par une insertion aléatoire dans le génome hôte et d'une extinction médiée par des processus de méthylation. Elle met, également, en évidence l'expression précoce de E $\mu$  au cours de l'ontogénèse B.

**ARTICLE 4 : Insulators to improve expression of 3'IgH LCR-driven reporter gene in transgenic mouse models.**

Laurence Guglielmi, Marc Le Bert, Véronique Truffinet, Michel Cogné et Yves Denizot.

*Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2003, Volume 307, pages 466-471.

La région 3' du locus IgH permet, dans des systèmes de transfection transitoire, une forte expression d'un gène rapporteur dans des lignées cellulaires B matures (Chauveau et al., 1998). Cependant, elle semble inactive dans des cellules représentatives de stades de différenciation B plus précoces (Chauveau et al., 1998; Ong et al., 1998).

Afin de déterminer la cinétique d'activation, *in vivo*, de la région 3'IgH, nous avons établi un modèle de souris transgénique analogue à celui présenté précédemment. Le gène codant la GFP est placé sous le contrôle du promoteur  $\rho V_H$  et de la LCR complète en respectant son organisation palindromique. Le transgène est entouré, ou non, d'isolateurs 5'HS4 de la  $\beta$ -globine de poulet. Nous montrons que la région 3'IgH, seule, n'est pas capable d'induire, *in vivo*, l'expression de la GFP. Ceci semble être dû à une inactivation très précoce du transgène par un processus de méthylation. En revanche, la présence d'isolateurs permet d'éviter, du moins partiellement, l'inactivation du transgène. L'analyse des souris montre que la région 3'IgH est active, spécifiquement dans la lignée lymphocytaire B, du stade pré-B ( $B220^+$ ,  $CD19^+$ ,  $CD117^{low}$ ,  $CD43^{low}$ ,  $IgM^-$ ) au stade B mature ( $B220^+$ ,  $CD19^+$ ,  $IgM^+$ ,  $IgD^+$ ).

Cette étude met, donc, en évidence une expression de la LCR jusqu'au stade B mature. Elle confirme, également, le bénéfice que peuvent apporter, *in vivo*, les isolateurs pour faciliter l'expression d'un transgène.

**MANUSCRIT 5 : The 3'IgH locus control region is sufficient to deregulate a *c-myc* transgene and then promotes mature B cell malignancies with a predominant Burkitt-like phenotype.**

Véronique Truffinet, Eric Pinaud, Nadine Cogné, Barbara Petit, Laurence Guglielmi, Michel Cogné, et Yves Denizot.

Soumis à *Blood*.

Le lymphome de Burkitt est invariablement associé à une translocation du gène *c-myc* au sein d'un des trois loci codant les immunoglobulines. L'expression de *c-myc* se trouve alors fortement dérégulée suite à sa juxtaposition aux activateurs transcriptionnels des loci d'Ig. La translocation affecte le locus IgH dans 80% des cas. E $\mu$ , premier activateur découvert au sein de ce locus, a également été le premier à être utilisé pour modéliser le lymphome de Burkitt (souris E $\mu$ -*c-myc*). Ces modèles ont conduit à une expression très précoce de *c-myc* (dès le stade pro-B) et au développement de lymphomes assez éloignés du lymphome de Burkitt. Récemment, deux modèles plus proches de la pathologie humaine ont été réalisés chez la souris. Dans le premier, *c-myc* est inséré en aval de E $\mu$  (Park et al., 2005a; Park et al., 2005b). Les animaux développent, de façon tardive, des lymphomes B matures ou des plasmocytomes. La dérégulation de *c-myc* ne peut, cependant, pas être attribué à un activateur particulier puisque *c-myc* se trouve inséré dans le locus entier. Dans le second modèle, la région 3'IgH tronquée (sans hs3b) est insérée en amont du gène *c-myc* sur le chromosome 15 chez la souris (Wang and Boxer, 2005). Cette insertion entraîne le développement de lymphomes « Burkitt-like ». Ce modèle met en évidence le rôle important de la région 3'IgH dans la dérégulation de *c-myc* mais, il n'est pas exclu que le « knock-in » ait perturbé les éléments régulateurs de *c-myc*.

Afin de tester l'hypothèse que la LCR 3'IgH complète, dans sa configuration palindromique, et indépendamment d'autres éléments régulateurs, est suffisante pour déréguler *c-myc*, *in vivo*, nous avons généré une lignée de souris portant une copie du transgène *c-myc*-3'LCR. Nous avons eu recours à des isolateurs afin de protéger notre transgène des influences de la chromatine adjacente.

Les splénocytes des jeunes souris transgéniques, sans aucun signe de maladie, prolifèrent de façon accrue en réponse à divers stimuli, ont un taux d'apoptose élevé mais le

nombre de cellules B dans la rate est normal. Les taux de toutes les classes d'Ig sont diminués dans le sérum, mais la commutation isotypique et la sécrétion d'Ig sont normales *in vitro*. A partir de l'âge de douze semaines, les souris développent des lymphomes avec une incidence de 80% à 40 semaines. Dans 75% des cas, le lymphome développé est de type « Burkitt-like ». Il est de nature clonale. Il présente un phénotype B mature (B220<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>) et une morphologie « ciel étoilé » caractéristique du lymphome de Burkitt. Dans 25% des cas, le lymphome est un plasmocytome anaplastique. Il est également de nature clonale. Les cellules sont B220<sup>-</sup>, IgM<sup>low</sup> et CD138<sup>-</sup>.

La LCR 3'IgH seule est donc capable de déréguler *c-myc* et de mimer les caractéristiques du lymphome de Burkitt humain. La survenue très rapide et constante des lymphomes chez nos souris fait de ce modèle un outil intéressant pour tester de nouvelles approches thérapeutiques.

## **DISCUSSION – PERSPECTIVES**

## DISCUSSION

### **PREMIÈRE PARTIE : Mise au point de vecteurs d'expression B originaux.**

Dans le but d'étudier la capacité de la région 3'IgH à déréguler un gène qui lui est apposé, nous avons cherché à modéliser les événements de translocations chromosomiques survenant au niveau du locus IgH. Ces translocations placent divers oncogènes sous le seul contrôle des éléments régulateurs de ce locus. Elles affectent, notamment, le gène *c-myc* au cours des lymphomes de Burkitt.

Une première partie de notre travail a consisté en la mise au point de vecteurs d'expression B spécifiques originaux s'exprimant aux stades tardifs de la lymphopoïèse B et ayant une expression maintenue. Pour ces études, nous avons utilisé le gène codant la GFP. La GFP est une protéine qui émet une fluorescence verte dans les cellules vivantes après stimulation par les UV. Les cellules exprimant cette protéine peuvent être facilement analysées individuellement et directement par passage au cytomètre de flux. Elles peuvent alors être marquées par des anticorps dirigés contre des antigènes de surface caractéristiques d'un type cellulaire et d'un stade de développement particulier. Par ailleurs, dans ces vecteurs, l'arrangement endogène du locus IgH est respecté : l'organisation palindromique de la région 3'IgH est conservée et le fragment E $\mu$  contient les éléments MAR en 5' et en 3' de l'activateur.

Ces études nous ont permis d'analyser la spécificité tissulaire de l'expression de transgènes placés sous le contrôle de la région 3'IgH et/ou E $\mu$ , ainsi que les stades de développement B au cours desquels ces vecteurs s'expriment. De plus, elles nous ont permis de vérifier le bénéfice que peuvent apporter les isolateurs pour obtenir une expression maintenue.

#### ***Spécificité tissulaire de l'expression de nos transgènes :***

Nous avons montré que l'activateur E $\mu$  et la région 3'IgH confèrent au gène rapporteur GFP une expression strictement B spécifique (**articles 3 et 4**). La spécificité tissulaire de l'expression des gènes d'Ig a fait l'objet de nombreuses études. Elle a tout

d'abord été attribuée aux promoteurs. Des études de transfections stables dans des lignées cellulaires ont montré qu'ils étaient actifs spécifiquement dans la lignée lymphocytaire B, tout au long du développement (Dreyfus et al., 1987; Mason et al., 1985; Wirth et al., 1987). Cependant, dans des expériences de transgénèse chez la souris, le promoteur pV<sub>H</sub> est actif aussi bien dans les cellules B que dans les cellules T lorsqu'il est associé à l'activateur E<sub>μ</sub> (Grosschedl et al., 1984; Jenuwein and Grosschedl, 1991). Une expression aberrante a également été observée dans les muscles squelettiques (Jenuwein and Grosschedl, 1991). L'activité de E<sub>μ</sub> dans la lignée T peut s'expliquer par la fixation sur cet activateur de facteurs transcriptionnels soit spécifiques de la lignée lymphoïde soit ubiquitaires. Certains auteurs ont suggéré que des protéines de régulation négative pourraient se fixer sur les séquences activatrices afin de réprimer leur expression dans des cellules non B (Kadesch et al., 1986).

Dans une autre étude, un gène rapporteur C<sub>μ</sub> placé sous le contrôle de hs1,2 et de pV<sub>H</sub> s'exprime à la fois dans les lignées B et T (Andersson et al., 1999). Des expériences de transfections transitoires utilisant le gène CAT ont montré une activité basale non négligeable dans des lignées T conférée par le promoteur pV<sub>H</sub> (Chauveau et al., 1998). L'ajout de différentes combinaisons d'activateurs de la région 3'IgH diminuent globalement cette activité. Dans ces lignées, les éléments 3' sont inactifs ou semblent jouer un rôle suppresseur.

Un modèle de souris transgéniques dans lequel le gène tronqué de la β-globine est placé sous le contrôle du promoteur pV<sub>H</sub> et des quatre activateurs hs3a, hs1,2, hs3b, et hs4 a été réalisé (Chauveau et al., 1999). Cette construction respecte l'orientation et l'ordre des éléments transcriptionnels du locus IgH. L'analyse de ces animaux a mis en évidence la présence d'ARN β-globine spécifiquement dans les cellules B de la rate. Une très faible expression a pu être observée dans le thymus. Elle serait due à la présence de quelques cellules B dans ce tissu. La différence entre la stricte B spécificité de la combinaison hs3a-hs1,2,-hs3b-hs4 (Chauveau et al., 1999) et l'expression moins bien restreinte conférée par l'élément hs1,2 seul (Andersson et al., 1999; Arulampalam et al., 1994) montre que hs1,2 seul ne suffit pas à réprimer l'activité dans d'autres types cellulaires. Ainsi, l'association de l'ensemble des activateurs situés en 3' du locus IgH semble nécessaire à l'activité spécifique de la région régulatrice 3' dans les cellules B.

A la vue de l'ensemble de ces résultats, il apparaît que chacun des éléments de régulation participe à la spécificité cellulaire de l'expression des gènes d'Ig sans en être, pour autant, suffisant : ils n'agissent pas individuellement mais en collaboration afin d'obtenir une expression correcte selon le stade du développement et le type cellulaire. Il faut noter que la région 3'IgH seule confère une expression strictement B spécifique lorsque elle est utilisée dans sa configuration germinale. Il reste à élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans cette régulation. Tous ces activateurs possèdent de multiples motifs de fixation pour des facteurs nucléaires qui sont soit ubiquitaires soit spécifiques de la lignée lymphoïde ou de la lignée B.

#### ***Cinétique d'activation de l'élément E $\mu$ et de la région 3'IgH :***

Ce travail nous a permis de déterminer *in vivo* la cinétique d'activation de l'élément E $\mu$  (**article 3**) et de la région 3'IgH (**article 4**) chez la souris au cours du développement lymphocytaire B. L'activateur E $\mu$  est actif aux stades précoces de la différenciation B : du stade pro-B au stade pré-B. Il joue un rôle dans la transcription, et sa délétion a montré son importance dans le contrôle des recombinaisons V<sub>H</sub> à DJ<sub>H</sub> (Chen et al., 1993; Serwe and Sablitzky, 1993). Dans les étapes plus tardives de la différenciation, E $\mu$  devient moins important.

Nos résultats concernant la région 3'IgH vont dans le sens de ceux observés précédemment *in vitro* lors d'expériences de transfection transitoire utilisant les gènes rapporteurs luciférase ou CAT (Chauveau et al., 1998; Ong et al., 1998). Cette région est active du stade pré-B au stade B mature (**article 4**). Les éléments 3'IgH agissent en synergie et en coopération avec E $\mu$  afin de permettre la transcription de gènes leur étant associés. Pris séparément, ils n'augmentent pas significativement l'effet de E $\mu$  mais la combinaison de plusieurs activateurs 3' devient un puissant coactivateur de E $\mu$ , en particulier lorsque la disposition palindromique est respectée (Chauveau et al., 1998). Leur implication dans les événements tels que la commutation de classe renforce l'idée d'une activité tardive de ces activateurs au cours du développement B.

La région 3' du locus consiste en deux unités : la première est constituée du palindrome hs3a-hs1,2-hs3b et la seconde comprend l'élément isolé hs4. Chez la souris, en plus de cette dualité structurale, intervient une dualité fonctionnelle avec des éléments

réputés faibles et spécifiques des cellules B matures et des plasmocytes (hs3a, hs1,2, hs3b) et un élément fortement actif aux stades précoces de la différenciation B (hs4). Il a été montré un effet concerté des trois partenaires du palindrome : l'activité de hs1,2 est particulièrement augmentée si ce dernier est flanqué de deux copies inversées de hs3 (Chauveau et al., 1998). L'association de hs4 aux autres activateurs 3' ne s'avère efficace qu'avec la combinaison palindromique, soulignant ainsi le bénéfice de cette architecture et la nécessité des quatre éléments pour obtenir un effet optimal de la région 3'IgH.

### ***Bénéfice apporté par les isolateurs :***

- Protection contre les effets de position :

Pour pallier à l'inactivation de nos constructions chez la souris, nous avons utilisé l'isolateur 5'HS4 de  $\beta$ -globine de poulet. Nous l'avons choisi car il s'agit de l'isolateur le mieux caractérisé chez les vertébrés. Différentes études ont montré que cet isolateur était fonctionnel aussi bien dans des lignées cellulaires que dans des souris transgéniques (Chung et al., 1993; Szabo et al., 2002). De plus, ces études n'ont pas révélé de spécificité tissulaire lors de l'insertion ectopique de cet isolateur.

L'isolateur 5'HS4 a été testé pour sa capacité à protéger un gène rapporteur des effets de position dû à l'intégration aléatoire dans le génome. En absence d'isolateur, l'expression du transgène est sous l'influence de l'hétérochromatine environnante. Cette hétérochromatinisation est associée à la méthylation de l'ADN et à la déacétylation des histones. L'expression du transgène est alors éteinte. Une construction dans laquelle le gène GFP est sous le contrôle du promoteur  $pV_H$  et de  $E\mu$  ne s'exprime pas chez la souris (Guglielmi et al., 2003). L'ajout d'isolateurs 5'HS4 rétablit une expression de la GFP (**article 3**). De même, nous avons montré, chez la souris, que le transgène GFP-LCR ne s'exprime pas en absence d'isolateur (**article 4**). En revanche, lorsque le transgène est encadré par deux isolateurs, des cellules B fluorescentes sont détectables chez nos souris. Les isolateurs n'empêchent cependant pas une perte progressive de son expression. Sur quatre lignées de souris portant le transgène I-GFP-LCR-I provenant de quatre clones ES différents seule la moitié d'entre elles présente une expression de la GFP. Nous avons vérifié qu'il ne s'agissait pas d'une délétion du transgène ou de mutations introduites dans la séquence codant la GFP. L'extinction de la GFP semble plutôt due à un phénomène de méthylation de ce gène. Il

a, en effet, été montré que le gène GFP des transgènes E $\mu$ -GFP (Guglielmi et al., 2003) et GFP-LCR (**article 4**) est fortement méthylé *in vivo* entraînant une perte d'expression. Ce phénomène d'extinction a également été observé dans des cellules souches hématopoïétiques transfectées par un vecteur rétroviral MFG-GFP (Klug et al., 2000). Cette inactivation se produit aux stades très précoces de la différenciation B avant même l'acquisition de l'antigène de surface B220.

Une étude a mis en évidence que la méthylation au sein d'un transgène dépend notamment : 1) de la force du promoteur et des activateurs transcriptionnels qui lui sont associés (plus un activateur est fort, moins la méthylation est rapide) ; et 2) de la séquence nucléotidique du gène rapporteur (Hertz et al., 1999). La région codante du gène GFP contient 92 sites CpG, qui sont des sites potentiels de méthylation (Hong et al., 2001). La méthylation de 7% des sites CpG réduit l'expression de la GFP de 60% (Hong et al., 2001). La séquence du gène rapporteur GFP expliquerait les phénomènes d'extinction des transgènes que nous observons chez nos animaux.

- Expression dépendante du nombre de copies intégrées :

La région 3'IgH constitue une région de contrôle du locus (LCR). Cette fonction a tout d'abord été montrée *in vitro* par transfection stable d'une lignée plasmocytaire (Madisen and Groudine, 1994). Elle a ensuite été confirmée par des animaux transgéniques chez lesquels le gène tronqué de la  $\beta$ -globine humaine a été placé sous le contrôle du promoteur pV<sub>H</sub> et de la LCR globale. L'expression du transgène est restreinte au compartiment B et indépendante du site d'intégration. Il n'a cependant pas pu être établi de relation linéaire entre le nombre de copies du transgène et son niveau d'expression, faisant de la région 3'IgH une LCR partielle (Chauveau et al., 1999). L'ensemble des constructions utilisant les éléments 3' ne renferme que le cœur des activateurs. Il pourrait exister au sein des régions flanquantes d'autres séquences nécessaires aux éléments 3' pour constituer une LCR complète. Ainsi, l'activateur hs1,2 est entouré de répétitions inversées qui jouent probablement un rôle important dans la régulation de la région 3'. Ces répétitions pourraient participer, avec l'aide de facteurs de liaison à l'ADN, à l'établissement d'une structure secondaire ou tertiaire de la chromatine.

Nous avons eu recours à des isolateurs afin de tester si l'ajout de telles séquences à nos transgènes permettrait une expression qui soit dépendante du nombre de copies intégrées. Nous avons montré, par transfection stable de lignée cellulaire B 18-81 et A20, que, seuls, ni  $E\mu$  ni la région 3'IgH ne pouvaient conférer une expression du gène rapporteur GFP dépendante du nombre de copies. En revanche, la présence des isolateurs flanquant la construction rétablit cette propriété (**article 1**). Ainsi, en protégeant nos différentes constructions des signaux activateurs ou répresseurs émanant des séquences adjacentes, l'isolateur 5'HS4 permet une expression plus homogène d'un clone cellulaire à un autre pour un nombre de copies de transgène intégré équivalent. La région 3'IgH se comporte alors comme une vraie région de contrôle du locus, capable de conférer une forte expression à un transgène, de façon tissu-spécifique, indépendante du site d'intégration et dépendante du nombre de copies.

Si l'on perturbe la disposition des activateurs 3'IgH dans nos transgènes en supprimant l'élément hs4, nous n'observons plus cet effet copie-dépendant (**article 2**). Il semble donc que cette copie-dépendance soit due à l'architecture de notre construction associant à la fois la LCR 3'IgH et les isolateurs plutôt qu'à une capacité intrinsèque de l'isolateur à conférer une expression copie-dépendante dans une cellule B. Cette étude montre que la LCR doit être utilisée dans son intégralité pour pouvoir bénéficier d'un effet dépendant du nombre de copies intégrées dans le génome hôte.

En conclusion, l'ensemble de ces études nous a permis de mettre au point des vecteurs d'expression spécifiques de la lignée lymphocytaire B. Nous avons montré *in vivo* que la région 3'IgH dans sa configuration palindromique (avec les 4 hs) s'exprime uniquement dans les cellules B jusqu'aux stades les plus matures de la différenciation. L'addition d'isolateur 5'HS4 flanquant la cassette d'expression lui permet de se comporter comme une vraie LCR et permet une protection contre les effets positionnels. Cette construction associant les isolateurs et la LCR constitue un outil intéressant pour permettre l'expression d'un transgène qui soit ciblée sur les stades les plus matures de la lignée B.

## DEUXIÈME PARTIE : Établissement d'un modèle murin de lymphome de Burkitt.

Le lymphome de Burkitt est caractérisé par une translocation du gène *c-myc* au niveau d'un des trois loci codant les Ig. La translocation affecte de façon majoritaire le locus IgH (80% des cas). L'expression de *c-myc* se trouve alors fortement dérégulée suite à sa juxtaposition aux multiples éléments régulateurs du locus IgH. La translocation frappe soit la région J<sub>H</sub> et correspond à des cassures de l'ADN liées au phénomène d'hypermutation somatique, soit les régions « switch » et correspond alors à des aberrations de recombinaison de commutation de classe. Quel que soit le type de translocation qui survient dans le locus IgH, *c-myc* est toujours en relation avec la région 3'IgH.

Afin d'évaluer plus précisément le rôle de la LCR 3'IgH dans la dérégulation de *c-myc*, nous avons construit un vecteur dans lequel le gène *c-myc* est sous le double contrôle de ses promoteurs P1 et P2 et de la LCR 3'IgH dans sa configuration palindromique. Ce transgène est borné par des isolateurs. Il nous a permis d'obtenir une lignée de souris transgéniques ne portant qu'une seule copie du vecteur. En effet, lors du lymphome de Burkitt, la translocation n'intervient que sur un allèle et une seule copie de *c-myc* est dérégulée. L'autre allèle reste silencieux.

Nous avons choisi d'utiliser la région 3'IgH complète avec les quatre hs en respectant la disposition palindromique endogène. Cette combinaison permet de conférer une haute expression à un transgène restreinte à la lignée B et indépendamment du site d'intégration. Lors du lymphome de Burkitt, *c-myc* est toujours en relation avec la région 3'IgH entière. Nous avons souhaité nous placer dans les conditions les plus proches de ce qui est observé lors de la pathologie. L'utilisation d'isolateurs présente un grand avantage puisqu'elle permet de créer un domaine isolé et protégé des influences de la chromatine adjacente. *C-myc* est alors sous l'unique contrôle de la région 3'IgH, sans interférence avec les autres éléments régulateurs du locus IgH.

Nous avons mis en évidence, chez nos jeunes souris transgéniques (8 semaines) et sans aucun signe apparent de la maladie, une augmentation de l'expression de *c-myc* spécifiquement dans les cellules B de la rate par rapport aux animaux sauvages. Aucune

variation de l'expression n'a été observée dans le foie, le thymus, le cœur, le rein et le poumon. Ce résultat montre que la région 3'IgH seule est capable de déréguler *c-myc* uniquement dans les lymphocytes B.

Les splénocytes de jeunes animaux *c-myc*-LCR possèdent une capacité accrue à proliférer en réponse à divers stimuli, ainsi qu'un taux élevé d'apoptose. L'apoptose semble agir comme une limite intrinsèque au potentiel oncogénique de *c-myc*, ce qui explique pourquoi les jeunes souris ne possèdent pas plus de lymphocytes B dans la rate que les contrôles. Dans le modèle de Wang et Boxer (2005), les jeunes animaux présentent déjà un nombre élevé de cellules B. Nous avons également observé, à l'âge de 8 semaines, une baisse du taux d'Ig circulantes qui affecte tous les isotypes. Après stimulation *in vitro*, par du LPS en présence ou non de cytokines, les cellules B restent capables de commuter et de synthétiser des Ig. La diminution du taux d'Ig circulantes observée *in vivo* semble due à un blocage fonctionnel engendré par *c-myc*. *C-myc* inhibe, en effet, la différenciation cellulaire et bloque les cellules à un stade de la différenciation B où elles ne secrètent pas d'Ig.

À partir de l'âge de douze semaines, nos souris développent deux types de lymphomes avec une très forte incidence (80% à 40 semaines). Dans 75% des cas, les animaux développent un lymphome clonal de type « Burkitt-like », avec un phénotype B mature (B220<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>) et une morphologie « ciel étoilé » caractéristique du lymphome de Burkitt. Dans 25% des cas, le lymphome est un plasmocytome anaplastique, de nature clonale. Les cellules tumorales sont B220<sup>-</sup>, IgM<sup>low</sup> et CD138<sup>-</sup>. Notre modèle s'avère être plus proche du modèle de Park et al (Park et al., 2005a; Park et al., 2005b) puisqu'ils obtiennent globalement deux types de tumeurs : des lymphomes « Burkitt-like » et d'autres « plasmocytomes-like » (un ensemble de tumeurs caractéristiques des différents stades de la maturation plasmocytaire). Dans le modèle de Wang et Boxer, les seules tumeurs observées sont de nature « Burkitt-like ». L'absence de tumeur de nature plasmablastique pourrait avoir comme origine l'utilisation d'une LCR tronquée, où le palindrome n'existe plus, et/ou son insertion en amont de *c-myc* dans le locus endogène à proximité d'autres séquences régulatrices.

Une différence importante est observée dans la cinétique d'apparition des tumeurs, les lymphomes « Burkitt-like » apparaissant de façon bien plus précoce que les plasmocytomes anaplastiques. Cette différence semble être corrélée avec l'expression de *c-myc* mesurée par RT-PCR quantitative. Les splénocytes de souris présentant un lymphome « Burkitt-like » surexpriment *c-myc* d'un facteur 15 en moyenne par rapport aux contrôles contre 6 pour les animaux avec un plasmocytome anaplastique. La composante leucémique (nombre de globules blancs circulants) est également beaucoup plus élevée chez les souris « Burkitt-like », ainsi que l'expression de la protéine nucléaire Ki67 au sein des tumeurs. Globalement, l'état prolifératif des lymphomes « Burkitt-like » semble largement supérieur aux lymphomes anaplastiques expliquant l'apparition plus précoce des tumeurs « Burkitt-like ». L'analyse du transcriptome conforte cette hypothèse. Un très grand nombre de gènes impliqués dans la régulation positive du cycle cellulaire montre une expression altérée.

Bien que plus proche du modèle de Park et al., notre modèle présente une différence majeure dans la cinétique d'apparition des tumeurs. Les animaux *c-myc*<sup>EM</sup> développent un lymphome avec une incidence de 68% à 21 mois. Cette différence de vitesses d'apparition des tumeurs peut être due au fait que nous avons créé, grâce aux isolateurs, un domaine chromatinien indépendant protégé des influences de la chromatine adjacente. De plus, nous avons utilisé une LCR complète, contrairement au modèle de Wang et Boxer, où les tumeurs apparaissent après un délai de 12 mois en moyenne. Dans ce dernier modèle, la LCR 3'IgH est insérée en amont de *c-myc*, à proximité d'éléments régulateurs négatifs de ce locus. Ceci pourrait également expliquer pourquoi les tumeurs apparaissent aussi tardivement.

L'absence de mutation somatique au niveau des régions variables de la chaîne lourde, dans notre modèle, suggère que la tumeur est d'origine pré-centre germinatif et que les cellules n'ont pas subi le phénomène d'hypermutation somatique. C'est également ce qui est observé chez les souris de Park et al. où *c-myc* est inséré en amont des régions J<sub>H</sub> (Zhu et al., 2005).

Pour qu'il y ait émergence d'un clone leucémique, la cellule, outre la surexpression de *c-myc*, doit acquérir des mutations additionnelles qui inhibent l'apoptose ou qui permettent la surexpression de molécules activatrices du cycle cellulaire. Dans le modèle de

Wang et Boxer, une augmentation de l'expression des protéines *bcl-2* et *bcl-xL* a été mise en évidence. Ce n'est pas le cas pour nos souris où ces molécules ne varient pas. En revanche, les cellules semblent tirer avantage de la dérégulation de la voie p21. Un ensemble de gènes impliqués dans cette voie est sous-exprimé dans notre modèle. De nombreuses études ont montré que la voie p21 pouvait avoir des fonctions apoptotiques dans certaines conditions (Gartel and Tyner, 2002).

En conclusion, nous avons montré que la LCR 3'IgH seule est suffisante pour induire une dérégulation de *c-myc* et initier le développement, chez la souris, d'un lymphome proche du lymphome de Burkitt humain. La survenue rapide des tumeurs fait de ce modèle un outil intéressant pour tester de nouvelles approches thérapeutiques.

## PERSPECTIVES

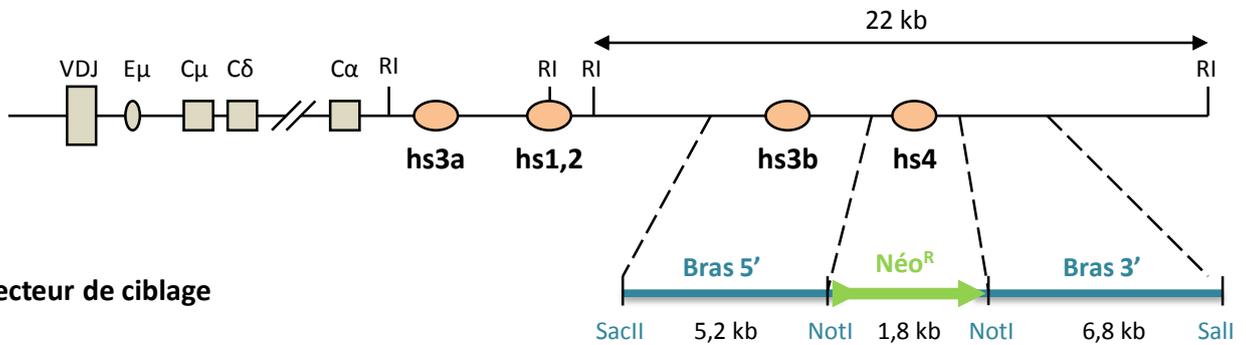
### DÉLÉTION DE hs4 CHEZ LA SOURIS

L'étude de la régulation de la transcription et des remaniements au sein du locus IgH est rendue complexe par l'existence d'éléments *cis*-régulateurs multiples en 5' et en 3' du locus. Il a été montré que la délétion de hs3a ou de hs1,2 ne présente aucun phénotype (Manis et al., 1998). En revanche, la délétion conjointe des deux activateurs les plus en aval du locus (hs3b et hs4) altère la commutation de classe vers tous les isotypes (à l'exception de IgG1) et la synthèse d'Ig (Pinaud et al., 2001). Cette étude a en outre suggéré que hs3b et/ou hs4 pouvaient interagir avec E $\mu$  (distants d'environ 200 kb avant commutation isotypique) dans le contrôle de l'expression du gène C $\mu$  *in vivo*. Différents arguments vont en faveur d'un rôle prépondérant de hs4 : il est actif durant tout le développement B tandis que hs3a, hs1,2 et hs3b ne sont actifs qu'à des stades tardifs. De plus, une délétion de hs3a chez la souris n'affecte pas l'expression du gène  $\mu$ . Ceci laisse penser qu'il en soit de même pour son homologue hs3b. Enfin, il a été montré que l'insertion d'une cassette pgk-néo 2 kb en aval de hs4 n'affecte pas la commutation de classe ni la synthèse d'Ig (Manis et al., 2003). Ceci suggère que les éléments clés de la région 3' du locus IgH se situent dans une région de 17 kb comprise entre l'élément hs1,2 et 2 kb en aval de hs4.

Pour mieux comprendre le rôle, la spécificité et la cinétique d'activation de hs4 au cours de la lymphopoïèse B, nous souhaitons réaliser sa délétion par recombinaison homologue chez la souris. Cette technique nous permettra d'étudier les effets *in vivo* de la délétion de hs4 sur la synthèse d'Ig et la commutation isotypique. Nous avons réalisé un vecteur de ciblage contenant un bras 5' correspondant aux séquences situées en amont de hs4 et un bras 3' correspondant aux séquences situées en aval de hs4 (**Figure 22**). Cette construction permet le remplacement de hs4 par un fragment d'ADN contenant le gène Néo<sup>R</sup> borné par deux *loxP*. Elle nous a permis d'obtenir quatre clones recombinants (**Figure 23**). Des chimères ont été obtenues pour un clone. Elles sont actuellement en accouplement avec des souris C57BL/6 en vue d'obtenir une transmission germinale. Nous étudierons, chez les souris homozygotes pour la délétion de hs4 (hs4<sup>-/-</sup>), l'impact de la perte de cet élément

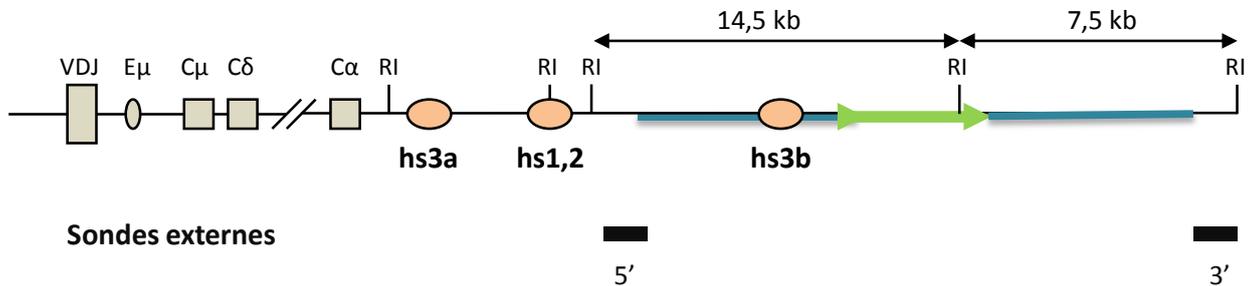
sur la transcription germinale des gènes d'Ig, la synthèse d'anticorps ainsi que sur les processus de commutation isotypique et d'hypermutation somatique.

### A. Locus endogène



### B. Vecteur de ciblage

### C. Recombinaison homologue

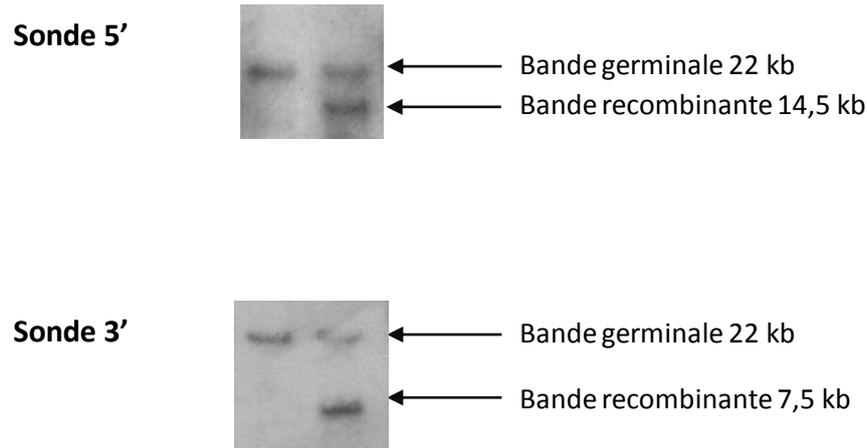


**Figure 22 : Délétion de l'activateur hs4 par recombinaison homologue.**

**A :** Représentation du locus IgH chez la souris. Les activateurs transcriptionnels situés en 3' sont représentés par des ellipses roses. Les sites *EcoRI* (RI) sont mentionnés.

**B :** Vecteur de ciblage portant la cassette NéoR (rectangle vert) flanquée par deux séquences de recombinaison LoxP (triangles verts). NéoR est inséré entre les bras 5' et 3' (trait bleu) au niveau du site *NotI*.

**C :** Carte du locus IgH après recombinaison homologue. Les sondes utilisées pour le criblage des clones sont représentées par des rectangles noirs.



**Figure 23 : Analyse des clones ES par Southern blot.**

Après transfection des cellules ES avec le vecteur de ciblage, les clones résistants à la néomycine sont testés par Southern blot : 10 µg d'ADN génomique sont digérés par *EcoRI* et hybridés avec une sonde 5' puis 3'. La sonde 5' permet de distinguer une bande germinale de 22 kb et une bande recombinante de 14,5 kb. La sonde 3' révèle également la bande germinale de 22 kb mais la bande recombinante dans ce cas est de 7,5 kb.

#### **OBTENTION DE SOURIS SUREXPRIMANT *CYCLINE D1*, *CYCLINE D3*, *Bcl-xL* ou *Bcl-2***

Dans la continuité des travaux réalisés avec les souris *c-myc*-LCR 3'IgH, nous avons entrepris d'établir des lignées de souris transgéniques chez lesquelles les ADNc *cycline D1*, *cycline D3*, *Bcl-xL* ou *Bcl-2* sont placés sous la dépendance de la région 3'IgH. Deux isolateurs encadrent chacun de ces transgènes. Nous possédons des chimères pour la construction *cycline D1* ainsi qu'une transmission germinale. Nous avons également des chimères pour le transgène *cycline D3*. Elles sont actuellement en reproduction et nous sommes en attente de la transmission germinale pour l'établissement de lignées transgéniques stables.

Dans l'avenir, nous pourrions ainsi réaliser des doubles ou des triples transgéniques *c-myc/cycline D1* ou *D3*, et mimer ainsi les phénomènes d'activation multiples de ces mêmes oncogènes, qui sont notamment observés chez l'homme au cours du myélome, et qui sont là aussi caractérisés par le passage des oncogènes sous le contrôle de la région 3'IgH après

translocation. Enfin, nous pourrons réaliser des combinaisons transgéniques associant *c-myc/Bcl-xL* ou *Bcl-2* et mimer ainsi les altérations qui apparaissent lors du lymphome de Burkitt chez l'homme.

# **ANNEXE**

**The polymorphism of the locus control region lying downstream the human IgH locus is restricted to hs1,2 but not to hs3 and hs4 enhancers.**

Laurence Guglielmi, Véronique Truffinet, Emmanuelle Magnoux, Michel Cogné et Yves Denizot

*Immunology Letters*, 2004, Volume 94, pages 77-81.

Chez l'homme, une région régulatrice est présente en 3' de chaque gène  $\alpha$ . Elle est constituée de trois activateurs : hs3 (Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997), hs1,2 (Chen and Birshstein, 1997; Mills et al., 1997; Pinaud et al., 1997) et hs4 (Mills et al., 1997). L'activateur hs3b n'existe chez l'homme. Comme chez la souris, l'élément hs1,2 est entouré de régions répétées et inversées d'environ 2 kb. L'étude, par southern blot, des régions situées en 3' du gène  $\alpha 1$  a mis en évidence un polymorphisme de taille de fragments de restriction (RFLP) (Pinaud et al., 1997). L'amplification de hs1,2 par PCR a montré un polymorphisme de taille, correspondant à un nombre variable de régions répétées en tandem (VNTR) ou mini-satellites au sein même des séquences activatrices (Denizot et al., 2001).

Afin de vérifier s'il existait un polymorphisme affectant hs3 et hs4, nous avons étudié ces activateurs par PCR et southern blot. Nous montrons l'absence de polymorphisme additionnel au niveau de ces deux éléments. L'analyse par séquençage montre que la séquence des « core » hs3 et hs4 est invariante.

# **BIBLIOGRAPHIE**

**Adams, B., Dorfler, P., Aguzzi, A., Kozmik, Z., Urbanek, P., Maurer-Fogy, I. and Busslinger, M.** (1992). Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev* **6**, 1589-607.

**Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D. and Brinster, R. L.** (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* **318**, 533-8.

**Afshar, R., Pierce, S., Bolland, D. J., Corcoran, A. and Oltz, E. M.** (2006). Regulation of IgH gene assembly: role of the intronic enhancer and 5'DQ52 region in targeting DHJH recombination. *J Immunol* **176**, 2439-47.

**Aguilera, R. J., Hope, T. J. and Sakano, H.** (1985). Characterization of immunoglobulin enhancer deletions in murine plasmacytomas. *Embo J* **4**, 3689-93.

**Ahnesorg, P., Smith, P. and Jackson, S. P.** (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**, 301-13.

**Alessandrini, A. and Desiderio, S. V.** (1991). Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol Cell Biol* **11**, 2096-107.

**Andersson, T., Furebring, C., Borrebaeck, C. A. and Pettersson, S.** (1999). Temporal expression of a V(H) promoter-Cmu transgene linked to the IgH HS1,2 enhancer. *Mol Immunol* **36**, 19-29.

**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 U S A* **90**, 3695-9.

**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**, 549-54.

**Arulampalam, V., 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**, 1671-7.

**Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C. and Cleveland, J. L.** (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* **6**, 1915-22.

**Bain, G., Maandag, E. C., Izon, D. J., Amsen, D., Kruisbeek, A. M., Weintraub, B. C., Krop, I., Schlissel, M. S., Feeney, A. J., van Roon, M. et al.** (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* **79**, 885-92.

**Banerji, J., Olson, L. and Schaffner, W.** (1983). A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* **33**, 729-40.

**Bangs, L. A., Sanz, I. E. and Teale, J. M.** (1991). Comparison of D, JH, and junctional diversity in the fetal, adult, and aged B cell repertoires. *J Immunol* **146**, 1996-2004.

**Bell, A. C., West, A. G. and Felsenfeld, G.** (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* **98**, 387-96.

**Bell, A. C., West, A. G. and Felsenfeld, G.** (2001). Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic. *Science* **291**, 447-50.

**Bemark, M. and Neuberger, M. S.** (2000). The c-MYC allele that is translocated into the IgH locus undergoes constitutive hypermutation in a Burkitt's lymphoma line. *Oncogene* **19**, 3404-10.

**Berns, K., Hijmans, E. M. and Bernards, R.** (1997). Repression of c-Myc responsive genes in cycling cells causes G1 arrest through reduction of cyclin E/CDK2 kinase activity. *Oncogene* **15**, 1347-56.

**Berton, M. T. and Vitetta, E. S.** (1990). Interleukin 4 induces changes in the chromatin structure of the gamma 1 switch region in resting B cells before switch recombination. *J Exp Med* **172**, 375-8.

**Blank, V. and Andrews, N. C.** (1997). The Maf transcription factors: regulators of differentiation. *Trends Biochem Sci* **22**, 437-41.

**Blum, K. A., Lozanski, G. and Byrd, J. C.** (2004). Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* **104**, 3009-20.

**Bottaro, A., Lansford, R., Xu, L., Zhang, J., Rothman, P. and Alt, F. W.** (1994). S region transcription per se promotes basal IgE class switch recombination but additional factors regulate the efficiency of the process. *Embo J* **13**, 665-74.

**Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J. and Eilers, M.** (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* **18**, 5321-33.

**Bransteitter, R., Pham, P., Scharff, M. D. and Goodman, M. F.** (2003). Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4102-7.

**Brasnet, E. and 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**, 450-7.

**Bulger, M. and Groudine, M.** (1999). Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev* **13**, 2465-77.

**Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., Recillas-Targa, F., Simpson, M., West, A. and Felsenfeld, G.** (2002). The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99 Suppl 4**, 16433-7.

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

**Butzler, C., Zou, X., Popov, A. V. and Bruggemann, M.** (1997). Rapid induction of B-cell lymphomas in mice carrying a human IgH/c-mycYAC. *Oncogene* **14**, 1383-8.

**Canelles, M., Delgado, M. D., Hyland, K. M., Lerga, A., Richard, C., Dang, C. V. and Leon, J.** (1997). Max and inhibitory c-Myc mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Oncogene* **14**, 1315-27.

**Chaudhuri, J. and Alt, F. W.** (2004). Class-switch recombination: interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nat Rev Immunol* **4**, 541-52.

**Chaudhuri, J., Khuong, C. and Alt, F. W.** (2004). Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* **430**, 992-8.

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

**Chauveau, C. and Cogné, M.** (1996). Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat Genet* **14**, 15-6.

**Chauveau, C., Jansson, E. A., Muller, S., Cogné, M. and Pettersson, S.** (1999). Cutting edge: Ig heavy chain 3' HS1-4 directs correct spatial position-independent expression of a linked transgene to B lineage cells. *J Immunol* **163**, 4637-41.

**Chauveau, C., Pinaud, E. and Cogné, M.** (1998). Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur J Immunol* **28**, 3048-56.

**Chen, C. and Birshstein, B. K.** (1997). Virtually identical enhancers containing a segment of homology to murine 3'IgH-E(hs1,2) lie downstream of human Ig C alpha 1 and C alpha 2 genes. *J Immunol* **159**, 1310-8.

**Chen, J., Young, F., Bottaro, A., Stewart, V., Smith, R. K. and Alt, F. W.** (1993). Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *Embo J* **12**, 4635-45.

**Chen, X., Kinoshita, K. and Honjo, T.** (2001). Variable deletion and duplication at recombination junction ends: implication for staggered double-strand cleavage in class-switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13860-5.

**Cheung, W. C., Kim, J. S., Linden, M., Peng, L., Van Ness, B., Polakiewicz, R. D. and Janz, S.** (2004). Novel targeted deregulation of c-Myc cooperates with Bcl-X(L) to cause plasma cell neoplasms in mice. *J Clin Invest* **113**, 1763-73.

**Chevillard, C., Ozaki, J., Herring, C. D. and Riblet, R.** (2002). A three-megabase yeast artificial chromosome contig spanning the C57BL mouse Igh locus. *J Immunol* **168**, 5659-66.

**Chung, J. H., Bell, A. C. and Felsenfeld, G.** (1997). Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 575-80.

**Chung, J. H., Whiteley, M. and Felsenfeld, G.** (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell* **74**, 505-14.

**Cogné, M., Lansford, R., Bottaro, A., Zhang, J., Gorman, J., Young, F., Cheng, H. L. and Alt, F. W.** (1994). A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* **77**, 737-47.

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

**Corcoran, L. M. and Karvelas, M.** (1994). Oct-2 is required early in T cell-independent B cell activation for G1 progression and for proliferation. *Immunity* **1**, 635-45.

**Corcoran, L. M., Karvelas, M., Nossal, G. J., Ye, Z. S., Jacks, T. and Baltimore, D.** (1993). Oct-2, although not required for early B-cell development, is critical for later B-cell maturation and for postnatal survival. *Genes Dev* **7**, 570-82.

**Cory, S.** (1986). Activation of cellular oncogenes in hemopoietic cells by chromosome translocation. *Adv Cancer Res* **47**, 189-234.

**Cowling, V. H., Chandriani, S., Whitfield, M. L. and Cole, M. D.** (2006). A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol Cell Biol* **26**, 4226-39.

**Dariavach, P., Williams, G. T., Campbell, K., Pettersson, S. and Neuberger, M. S.** (1991). The mouse IgH 3'-enhancer. *Eur J Immunol* **21**, 1499-504.

**Davis, A. C., Wims, M., Spotts, G. D., Hann, S. R. and Bradley, A.** (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev* **7**, 671-82.

**Delphin, S. and Stavnezer, J.** (1995). Regulation of antibody class switching to IgE: characterization of an IL-4-responsive region in the immunoglobulin heavy-chain germline epsilon promoter. *Ann N Y Acad Sci* **764**, 123-35.

**Delpy, L., Le Bert, M., Cogne, M. and Khamlichi, A. A.** (2003). Germ-line transcription occurs on both the functional and the non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes. *Eur J Immunol* **33**, 2108-13.

**Dempsey, L. A., Sun, H., Hanakahi, L. A. and 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.

**Denizot, Y., Pinaud, E., Aupetit, C., Le Morvan, C., Magnoux, E., Aldigier, J. C. and Cogne, M.** (2001). Polymorphism of the human alpha1 immunoglobulin gene 3' enhancer hs1,2 and its relation to gene expression. *Immunology* **103**, 35-40.

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

**Dreyfus, M., Doyen, N. and Rougeon, F.** (1987). The conserved decanucleotide from the immunoglobulin heavy chain promoter induces a very high transcriptional activity in B-cells when introduced into an heterologous promoter. *Embo J* **6**, 1685-90.

**Duan, H., Heckman, C. A. and Boxer, L. M.** (2006). The immunoglobulin heavy-chain gene 3' enhancers deregulate bcl-2 promoter usage in t(14;18) lymphoma cells. *Oncogene*.

**Dudley, D. D., Chaudhuri, J., Bassing, C. H. and Alt, F. W.** (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* **86**, 43-112.

**Dunnick, W., Hertz, G. Z., Scappino, L. and Gritzmacher, C.** (1993). DNA sequences at immunoglobulin switch region recombination sites. *Nucleic Acids Res* **21**, 365-72.

**Dunnick, W. A., Shi, J., Graves, K. A. and Collins, J. T.** (2005). The 3' end of the heavy chain constant region locus enhances germline transcription and switch recombination of the four gamma genes. *J Exp Med* **201**, 1459-66.

**Duquette, M. L., Pham, P., Goodman, M. F. and Maizels, N.** (2005). AID binds to transcription-induced structures in c-MYC that map to regions associated with translocation and hypermutation. *Oncogene* **24**, 5791-8.

**Eaton, S. and Calame, K.** (1987). Multiple DNA sequence elements are necessary for the function of an immunoglobulin heavy chain promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7634-8.

**Engler, P., Roth, P., Kim, J. Y. and Storb, U.** (1991). Factors affecting the rearrangement efficiency of an Ig test gene. *J Immunol* **146**, 2826-35.

**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**, 321-30.

**Ernst, P. and Smale, S. T.** (1995). Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* **2**, 427-38.

**Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. and Hancock, D. C.** (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**, 119-28.

**Falkner, F. G. and Zachau, H. G.** (1984). Correct transcription of an immunoglobulin kappa gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements. *Nature* **310**, 71-4.

**Fulton, R. and van Ness, B.** (1994). Selective synergy of immunoglobulin enhancer elements in B-cell development: a characteristic of kappa light chain enhancers, but not heavy chain enhancers. *Nucleic Acids Res* **22**, 4216-23.

**Galaktionov, K., Chen, X. and Beach, D.** (1996). Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* **382**, 511-7.

**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.

**Gartel, A. L. and Tyner, A. L.** (2002). The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* **1**, 639-49.

**Gaszner, M. and Felsenfeld, G.** (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet* **7**, 703-13.

**Giannini, S. L., Singh, M., Calvo, C. F., Ding, G. and Birshtein, B. K.** (1993). DNA regions flanking the mouse Ig 3' alpha enhancer are differentially methylated and DNAase I hypersensitive during B cell differentiation. *J Immunol* **150**, 1772-80.

**Gong, S. and Nussenzweig, M. C.** (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.

**Gordon, S. J., Saleque, S. and Birshtein, B. K.** (2003). Yin Yang 1 is a lipopolysaccharide-inducible activator of the murine 3' Igh enhancer, hs3. *J Immunol* **170**, 5549-57.

**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**, 4401-8.

**Greenbaum, S., Lazorchak, A. S. and Zhuang, Y.** (2004). Differential functions for the transcription factor E2A in positive and negative gene regulation in pre-B lymphocytes. *J Biol Chem* **279**, 45028-35.

**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**, 1903-16.

**Griep, A. E. and Westphal, H.** (1988). Antisense Myc sequences induce differentiation of F9 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6806-10.

**Grosschedl, R., Weaver, D., Baltimore, D. and Costantini, F.** (1984). Introduction of a mu immunoglobulin gene into the mouse germ line: specific expression in lymphoid cells and synthesis of functional antibody. *Cell* **38**, 647-58.

**Guglielmi, L., Le Bert, M., Cogné, M. and Denizot, Y.** (2003). Effect of the Emu IgH enhancer on expression of a GFP reporter gene in transfected B cells and transgenic mice. *Immunol Lett* **86**, 77-83.

**Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D. and Hayakawa, K.** (1991). Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J Exp Med* **173**, 1213-25.

**Hebbes, T. R., Clayton, A. L., Thorne, A. W. and Crane-Robinson, C.** (1994). Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *Embo J* **13**, 1823-30.

**Herbst, A., Hemann, M. T., Tworkowski, K. A., Salghetti, S. E., Lowe, S. W. and Tansey, W. P.** (2005). A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep* **6**, 177-83.

**Hertz, J. M., Schell, G. and Doerfler, W.** (1999). Factors affecting de novo methylation of foreign DNA in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* **274**, 24232-40.

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

**Holt, J. T., Redner, R. L. and Nienhuis, A. W.** (1988). An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol Cell Biol* **8**, 963-73.

**Hong, K., Sherley, J. and Lauffenburger, D. A.** (2001). Methylation of episomal plasmids as a barrier to transient gene expression via a synthetic delivery vector. *Biomol Eng* **18**, 185-92.

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

**Jenuwein, T. and Grosschedl, R.** (1991). Complex pattern of immunoglobulin mu gene expression in normal and transgenic mice: nonoverlapping regulatory sequences govern distinct tissue specificities. *Genes Dev* **5**, 932-43.

**Kadesch, T.** (1992). Helix-loop-helix proteins in the regulation of immunoglobulin gene transcription. *Immunol Today* **13**, 31-6.

**Kadesch, T., Zervos, P. and Ruezinsky, D.** (1986). Functional analysis of the murine IgH enhancer: evidence for negative control of cell-type specificity. *Nucleic Acids Res* **14**, 8209-21.

**Kanda, K., Hu, H. M., Zhang, L., Grandchamps, J. and Boxer, L. M.** (2000). NF-kappa B activity is required for the deregulation of c-myc expression by the immunoglobulin heavy chain enhancer. *J Biol Chem* **275**, 32338-46.

**Kaplan, M. H., Zong, R. T., Herrscher, R. F., Scheuermann, R. H. and Tucker, P. W.** (2001). Transcriptional activation by a matrix associating region-binding protein. contextual requirements for the function of bright. *J Biol Chem* **276**, 21325-30.

**Kemler, I., Schreiber, E., Muller, M. M., Matthias, P. and Schaffner, W.** (1989). Octamer transcription factors bind to two different sequence motifs of the immunoglobulin heavy chain promoter. *Embo J* **8**, 2001-8.

**Kenter, A. L.** (2003). Class-switch recombination: after the dawn of AID. *Curr Opin Immunol* **15**, 190-8.

**Khamlichi, A. A., Pinaud, E., Decourt, C., Chauveau, C. and Cogné, M.** (2000). The 3' IgH regulatory region: a complex structure in a search for a function. *Adv Immunol* **75**, 317-45.

**Kim, U., Qin, X. F., Gong, S., Stevens, S., Luo, Y., Nussenzweig, M. and Roeder, R. G.** (1996). The B-cell-specific transcription coactivator OCA-B/OBF-1/Bob-1 is essential for normal production of immunoglobulin isotypes. *Nature* **383**, 542-7.

**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**, 2473-6.

**Klug, C. A., Cheshier, S. and Weissman, I. L.** (2000). Inactivation of a GFP retrovirus occurs at multiple levels in long-term repopulating stem cells and their differentiated progeny. *Blood* **96**, 894-901.

**Kotani, A., Kakazu, N., Tsuruyama, T., Okazaki, I. M., Muramatsu, M., Kinoshita, K., Nagaoka, H., Yabe, D. and Honjo, T.** (2007). Activation-induced cytidine deaminase (AID) promotes B cell lymphomagenesis in Emu-cmyc transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 1616-20.

**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**, 817-21.

**Kovalchuk, A. L., Qi, C. F., Torrey, T. A., Taddesse-Heath, L., Feigenbaum, L., Park, S. S., Gerbitz, A., Klobeck, G., Hoernagel, K., Polack, A. et al.** (2000). Burkitt lymphoma in the mouse. *J Exp Med* **192**, 1183-90.

**Kuppers, R. and Dalla-Favera, R.** (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* **20**, 5580-94.

**Larson, E. D., Cummings, W. J., Bednarski, D. W. and Maizels, N.** (2005). MRE11/RAD50 cleaves DNA in the AID/UNG-dependent pathway of immunoglobulin gene diversification. *Mol Cell* **20**, 367-75.

**Larsson, L. G., Ivhed, I., Gidlund, M., Pettersson, U., Vennstrom, B. and Nilsson, K.** (1988). Phorbol ester-induced terminal differentiation is inhibited in human U-937 monoblastic cells expressing a v-myc oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2638-42.

**Laurencikiene, J., Tamosiunas, V. and Severinson, E.** (2007). Regulation of epsilon germline transcription and switch region mutations by IgH locus 3' enhancers in transgenic mice. *Blood* **109**, 159-67.

**LeBowitz, J. H., Kobayashi, T., Staudt, L., Baltimore, D. and Sharp, P. A.** (1988). Octamer-binding proteins from B or HeLa cells stimulate transcription of the immunoglobulin heavy-chain promoter in vitro. *Genes Dev* **2**, 1227-37.

**Li, Q., Peterson, K. R., Fang, X. and Stamatoyannopoulos, G.** (2002). Locus control regions. *Blood* **100**, 3077-86.

**Li, Y. S., Wasserman, R., Hayakawa, K. and Hardy, R. R.** (1996). Identification of the earliest B lineage stage in mouse bone marrow. *Immunity* **5**, 527-35.

**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 Ig H chain gene cluster. *J Immunol* **148**, 2909-17.

**Lieberson, R., Giannini, S. L., Birshtein, B. K. and Eckhardt, L. A.** (1991). An enhancer at the 3' end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucleic Acids Res* **19**, 933-7.

**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**, 468-75.

**Linderson, Y., Eberhard, D., Malin, S., Johansson, A., Busslinger, M. and Pettersson, S.** (2004). Corecruitment of the Grg4 repressor by PU.1 is critical for Pax5-mediated repression of B-cell-specific genes. *EMBO Rep* **5**, 291-6.

**Linderson, Y., French, N. S., Neurath, M. F. and Pettersson, S.** (2001). Context-dependent Pax-5 repression of a PU.1/NF-kappaB regulated reporter gene in B lineage cells. *Gene* **262**, 107-14.

**Luo, Y., Fujii, H., Gerster, T. and Roeder, R. G.** (1992). A novel B cell-derived coactivator potentiates the activation of immunoglobulin promoters by octamer-binding transcription factors. *Cell* **71**, 231-41.

**Luo, Y. and Roeder, R. G.** (1995). Cloning, functional characterization, and mechanism of action of the B-cell-specific transcriptional coactivator OCA-B. *Mol Cell Biol* **15**, 4115-24.

**Lutz, M., Burke, L. J., Barreto, G., Goeman, F., Greb, H., Arnold, R., Schultheiss, H., Brehm, A., Kouzarides, T., Lobanekov, V. et al.** (2000). Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases. *Nucleic Acids Res* **28**, 1707-13.

**MacLennan, I. C.** (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* **12**, 117-39.

**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**, 2212-26.

**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**, 6281-92.

**Manis, J. P., Michaelson, J. S., Birshtein, B. K. and Alt, F. W.** (2003). Elucidation of a downstream boundary of the 3' IgH regulatory region. *Mol Immunol* **39**, 753-60.

**Manis, J. P., Tian, M. and Alt, F. W.** (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends Immunol* **23**, 31-9.

**Manis, J. P., van der Stoep, N., Tian, M., Ferrini, R., Davidson, L., Bottaro, A. and Alt, F. W.** (1998). Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J Exp Med* **188**, 1421-31.

**Martin, A. and Scharff, M. D.** (2002). Somatic hypermutation of the AID transgene in B and non-B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 12304-8.

**Maruyama, K., Schiavi, S. C., Huse, W., Johnson, G. L. and Ruley, H. E.** (1987). myc and E1A oncogenes alter the responses of PC12 cells to nerve growth factor and block differentiation. *Oncogene* **1**, 361-7.

**Mason, J. O., Williams, G. T. and Neuberger, M. S.** (1985). Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell* **41**, 479-87.

**Mateyak, M. K., Obaya, A. J., Adachi, S. and Sedivy, J. M.** (1997). Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ* **8**, 1039-48.

**Matthias, P. and Baltimore, D.** (1993). The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3' enhancer close to the alpha constant region. *Mol Cell Biol* **13**, 1547-53.

**Mautner, J., Joos, S., Werner, T., Eick, D., Bornkamm, G. W. and Polack, A.** (1995). Identification of two enhancer elements downstream of the human c-myc gene. *Nucleic Acids Res* **23**, 72-80.

**McHeyzer-Williams, M. G. and Ahmed, R.** (1999). B cell memory and the long-lived plasma cell. *Curr Opin Immunol* **11**, 172-9.

**Meek, K. D., Hasemann, C. A. and Capra, J. D.** (1989). Novel rearrangements at the immunoglobulin D locus. Inversions and fusions add to IgH somatic diversity. *J Exp Med* **170**, 39-57.

**Meffre, E., Casellas, R. and Nussenzweig, M. C.** (2000). Antibody regulation of B cell development. *Nat Immunol* **1**, 379-85.

**Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B. and Rolink, A.** (1993). The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol Today* **14**, 60-8.

**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**, 1770-7.

**Michaelson, J. S., Ermakova, O., Birshtein, 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**, 6167-74.

**Michaelson, J. S., Giannini, S. L. and Birshtein, B. K.** (1995). Identification of 3' alpha-hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic Acids Res* **23**, 975-81.

**Michaelson, J. S., Singh, M. and Birshtein, B. K.** (1996a). B cell lineage-specific activator protein (BSAP). A player at multiple stages of B cell development. *J Immunol* **156**, 2349-51.

**Michaelson, J. S., Singh, M., Snapper, C. M., Sha, W. C., Baltimore, D. and Birshtein, B. K.** (1996b). Regulation of 3' IgH enhancers by a common set of factors, including kappa B-binding proteins. *J Immunol* **156**, 2828-39.

**Mills, F. C., Harindranath, N., Mitchell, M. and Max, E. E.** (1997). Enhancer complexes located downstream of both human immunoglobulin Calpha genes. *J Exp Med* **186**, 845-58.

**Mocikat, R., Harloff, C. and Kutemeier, G.** (1993). The effect of the rat immunoglobulin heavy-chain 3' enhancer is position dependent. *Gene* **136**, 349-53.

**Mocikat, R., Kardinal, C. and Klobeck, H. G.** (1995). Differential interactions between the immunoglobulin heavy chain mu intron and 3' enhancer. *Eur J Immunol* **25**, 3195-8.

**Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S. and Papaioannou, V. E.** (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**, 869-77.

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

**Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y. and Honjo, T.** (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553-63.

**Muramatsu, M., Sankaranand, V. S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N. O. and Honjo, T.** (1999). Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* **274**, 18470-6.

**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. et al.** (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**, 5734-43.

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

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

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

**Neuberger, M. S. and Calabi, F.** (1983). Reciprocal chromosome translocation between c-myc and immunoglobulin gamma 2b genes. *Nature* **305**, 240-3.

**Neuberger, M. S., Harris, R. S., Di Noia, J. and Petersen-Mahrt, S. K.** (2003). Immunity through DNA deamination. *Trends Biochem Sci* **28**, 305-12.

**Neurath, M. F., Max, E. E. and Strober, W.** (1995). Pax5 (BSAP) regulates the murine immunoglobulin 3' alpha enhancer by suppressing binding of NF-alpha P, a protein that controls heavy chain transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5336-40.

**Neurath, M. F., Strober, W. and Wakatsuki, Y.** (1994). The murine Ig 3' alpha enhancer is a target site with repressor function for the B cell lineage-specific transcription factor BSAP (NF-HB, S alpha-BP). *J Immunol* **153**, 730-42.

**Nitschke, L., Kestler, J., Tallone, T., Pelkonen, S. and 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, N. M., Thomas, S., Riblet, R. and Schildkraut, C. L.** (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, M. C., Schmidt, E. V., Shaw, A. C., Sinn, E., Campos-Torres, J., Mathey-Prevot, B., Pattengale, P. K. and Leder, P.** (1988). A human immunoglobulin gene reduces the incidence of lymphomas in c-Myc-bearing transgenic mice. *Nature* **336**, 446-50.

**Nutt, S. L., Thevenin, C. and Busslinger, M.** (1997). Essential functions of Pax-5 (BSAP) in pro-B cell development. *Immunobiology* **198**, 227-35.

**O'Hagan, R. C., Ohh, M., David, G., de Alboran, I. M., Alt, F. W., Kaelin, W. G., Jr. and DePinho, R. A.** (2000). Myc-enhanced expression of Cul1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev* **14**, 2185-91.

**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.

**Onclercq, R., Babinet, C. and Cremisi, C.** (1989). Exogenous c-myc gene overexpression interferes with early events in F9 cell differentiation. *Oncogene Res* **4**, 293-302.

**Ong, J., Stevens, S., Roeder, R. G. and Eckhardt, L. A.** (1998). 3' IgH enhancer elements shift synergistic interactions during B cell development. *J Immunol* **160**, 4896-903.

**Palomo, C., Zou, X., Nicholson, I. C., Butzler, C. and Bruggemann, M.** (1999). B-cell tumorigenesis in mice carrying a yeast artificial chromosome-based immunoglobulin heavy/c-myc translocus is independent of the heavy chain intron enhancer (Emu). *Cancer Res* **59**, 5625-8.

**Park, S. S., Kim, J. S., Tessarollo, L., Owens, J. D., Peng, L., Han, S. S., Tae Chung, S., Torrey, T. A., Cheung, W. C., Polakiewicz, R. D. et al.** (2005a). Insertion of c-Myc into Igh induces B-cell and plasma-cell neoplasms in mice. *Cancer Res* **65**, 1306-15.

**Park, S. S., Shaffer, A. L., Kim, J. S., duBois, W., Potter, M., Staudt, L. M. and Janz, S.** (2005b). Insertion of Myc into Igh accelerates peritoneal plasmacytomas in mice. *Cancer Res* **65**, 7644-52.

**Parslow, T. G., Blair, D. L., Murphy, W. J. and Granner, D. K.** (1984). Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2650-4.

**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**, 329-39.

**Pawlitzky, I., Angeles, C. V., Siegel, A. M., Stanton, M. L., Riblet, R. and Brodeur, P. H.** (2006). Identification of a candidate regulatory element within the 5' flanking region of the mouse Igh locus defined by pro-B cell-specific hypersensitivity associated with binding of PU.1, Pax5, and E2A. *J Immunol* **176**, 6839-51.

**Perez-Roger, I., Kim, S. H., Griffiths, B., Sewing, A. and Land, H.** (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J* **18**, 5310-20.

**Perez-Roger, I., Solomon, D. L., Sewing, A. and Land, H.** (1997). Myc activation of cyclin E/Cdk2 kinase involves induction of cyclin E gene transcription and inhibition of p27(Kip1) binding to newly formed complexes. *Oncogene* **14**, 2373-81.

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

**Petersen-Mahrt, S. K., Harris, R. S. and Neuberger, M. S.** (2002). AID mutates E. coli suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* **418**, 99-103.

**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 locus. *Nature* **344**, 165-8.

**Pfisterer, P., Annweiler, A., Ullmer, C., Corcoran, L. M. and Wirth, T.** (1994). Differential transactivation potential of Oct1 and Oct2 is determined by additional B cell-specific activities. *Embo J* **13**, 1654-63.

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

**Pierani, A., Heguy, A., Fujii, H. and Roeder, R. G.** (1990). Activation of octamer-containing promoters by either octamer-binding transcription factor 1 (OTF-1) or OTF-2 and requirement of an additional B-cell-specific component for optimal transcription of immunoglobulin promoters. *Mol Cell Biol* **10**, 6204-15.

**Pikaart, M. J., Recillas-Targa, F. and Felsenfeld, G.** (1998). Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev* **12**, 2852-62.

**Pinaud, E., Aupetit, C., Chauveau, C. and Cogné, M.** (1997). Identification of a homolog of the C alpha 3'/hs3 enhancer and of an allelic variant of the 3'IgH/hs1,2 enhancer downstream of the human immunoglobulin alpha 1 gene. *Eur J Immunol* **27**, 2981-5.

**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**, 187-99.

**Poellinger, L., Yoza, B. K. and Roeder, R. G.** (1989). Functional cooperativity between protein molecules bound at two distinct sequence elements of the immunoglobulin heavy-chain promoter. *Nature* **337**, 573-6.

**Prochownik, E. V. and Kukowska, J.** (1986). Deregulated expression of c-myc by murine erythroleukaemia cells prevents differentiation. *Nature* **322**, 848-50.

**Prochownik, E. V., Kukowska, J. and Rodgers, C.** (1988). c-myc antisense transcripts accelerate differentiation and inhibit G1 progression in murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biol* **8**, 3683-95.

**Rabbitts, T. H., Forster, A., Hamlyn, P. and Baer, R.** (1984). Effect of somatic mutation within translocated c-myc genes in Burkitt's lymphoma. *Nature* **309**, 592-7.

**Rajewsky, K.** (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* **381**, 751-8.

**Ramiro, A. R., Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H. T., McBride, K. M., Eisenreich, T. R., Chen, J., Dickins, R. A., Lowe, S. W. et al.** (2006). Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-IgH translocations. *Nature* **440**, 105-9.

**Ramiro, A. R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M. C.** (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* **118**, 431-8.

**Recillas-Targa, F., Pikaart, M. J., Burgess-Beusse, B., Bell, A. C., Litt, M. D., West, A. G., Gaszner, M. and Felsenfeld, G.** (2002). Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6883-8.

**Remmers, E. F., Yang, J. Q. and Marcu, K. B.** (1986). A negative transcriptional control element located upstream of the murine c-myc gene. *Embo J* **5**, 899-904.

**Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A. et al.** (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* **102**, 565-75.

**Rolink, A., Grawunder, U., Winkler, T. H., Karasuyama, H. and Melchers, F.** (1994). IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int Immunol* **6**, 1257-64.

**Rolink, A., Haasner, D., Melchers, F. and Andersson, J.** (1996). The surrogate light chain in mouse B-cell development. *Int Rev Immunol* **13**, 341-56.

**Ryan, K. M. and Birnie, G. D.** (1996). Myc oncogenes: the enigmatic family. *Biochem J* **314** ( Pt 3), 713-21.

**Sadhu, A., Shen, M. L., Hackbarth, M., Hume, E. and McKeithan, T. W.** (1997). CpG-rich sequences close to the site of duplication within the human IGH constant region. *Immunogenetics* **45**, 365-70.

**Sakai, E., Bottaro, A., Davidson, L., Sleckman, B. P. and Alt, F. W.** (1999). Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1526-31.

**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**, 2791-803.

**Saleque, S., Singh, M., Little, R. D., Giannini, S. L., Michaelson, J. S. and Birshtein, B. K.** (1997). Dyad symmetry within the mouse 3' IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3'E and hs3). *J Immunol* **158**, 4780-7.

**Schatz, D. G., Oettinger, M. A. and 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**, 749-51.

**Schlissel, M. S.** (2003). Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat Rev Immunol* **3**, 890-9.

**Schubart, D. B., Rolink, A., Kosco-Vilbois, M. H., Botteri, F. and Matthias, P.** (1996). B-cell-specific coactivator OBF-1/OCA-B/Bob1 required for immune response and germinal centre formation. *Nature* **383**, 538-42.

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

**Sears, R. C. and Nevins, J. R.** (2002). Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem* **277**, 11617-20.

**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-neor cassettes inserted into the immunoglobulin heavy chain constant region locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3000-5.

**Sekiguchi, J. M. and Ferguson, D. O.** (2006). DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey. *Cell* **124**, 260-2.

**Sepulveda, M. A., Emelyanov, A. V. and Birshtein, B. K.** (2004). NF-kappa B and Oct-2 synergize to activate the human 3' Igh hs4 enhancer in B cells. *J Immunol* **172**, 1054-64.

**Serwe, M. and Sablitzky, F.** (1993). V(D)J recombination in B cells is impaired but not blocked by targeted deletion of the immunoglobulin heavy chain intron enhancer. *Embo J* **12**, 2321-7.

**Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M. et al.** (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-67.

**Singh, M. and Birshtein, B. K.** (1993). NF-HB (BSAP) is a repressor of the murine immunoglobulin heavy-chain 3' alpha enhancer at early stages of B-cell differentiation. *Mol Cell Biol* **13**, 3611-22.

**Singh, M. and Birshtein, B. K.** (1996). Concerted repression of an immunoglobulin heavy-chain enhancer, 3' alpha E(hs1,2). *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4392-7.

**Smit, L. A., Bende, R. J., Aten, J., Guikema, J. E., Aarts, W. M. and van Noesel, C. J.** (2003). Expression of activation-induced cytidine deaminase is confined to B-cell non-Hodgkin's lymphomas of germinal-center phenotype. *Cancer Res* **63**, 3894-8.

**Spencer, C. A. and Groudine, M.** (1991). Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* **56**, 1-48.

**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.

**Steiner, P., Philipp, A., Lukas, J., Godden-Kent, D., Pagano, M., Mittnacht, S., Bartek, J. and Eilers, M.** (1995). Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *Embo J* **14**, 4814-26.

**Strobl, L. J. and Eick, D.** (1992). Hold back of RNA polymerase II at the transcription start site mediates down-regulation of c-myc in vivo. *Embo J* **11**, 3307-14.

**Strobl, L. J., Kohlhuber, F., Mautner, J., Polack, A. and Eick, D.** (1993). Absence of a paused transcription complex from the c-myc P2 promoter of the translocation chromosome in Burkitt's lymphoma cells: implication for the c-myc P1/P2 promoter shift. *Oncogene* **8**, 1437-47.

**Szabo, P. E., Tang, S. H., Reed, M. R., Silva, F. J., Tsark, W. M. and Mann, J. R.** (2002). The chicken beta-globin insulator element conveys chromatin boundary activity but not imprinting at the mouse Igf2/H19 domain. *Development* **129**, 897-904.

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

**Taub, R., Moulding, C., Battey, J., Murphy, W., Vasicek, T., Lenoir, G. M. and Leder, P.** (1984). Activation and somatic mutation of the translocated c-myc gene in burkitt lymphoma cells. *Cell* **36**, 339-48.

**Terauchi, A., Hayashi, K., Kitamura, D., Kozono, Y., Motoyama, N. and Azuma, T.** (2001). A pivotal role for DNase I-sensitive regions 3b and/or 4 in the induction of somatic hypermutation of IgH genes. *J Immunol* **167**, 811-20.

**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**, 257-61.

**Tonegawa, S.** (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575-81.

**Tsukada, S., Sugiyama, H., Oka, Y. and 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.

**Tumas-Brundage, K. M., Vora, K. A. and Manser, T.** (1997). Evaluation of the role of the 3'alpha heavy chain enhancer [3'alpha E(hs1,2)] in Vh gene somatic hypermutation. *Mol Immunol* **34**, 367-78.

**Unniraman, S., Zhou, S. and Schatz, D. G.** (2004). Identification of an AID-independent pathway for chromosomal translocations between the Igh switch region and Myc. *Nat Immunol* **5**, 1117-23.

**Urbanek, 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**, 901-12.

**Vita, M. and Henriksson, M.** (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* **16**, 318-30.

**Vlach, J., Hennecke, S., Alevizopoulos, K., Conti, D. and Amati, B.** (1996). Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *Embo J* **15**, 6595-604.

**Wabl, M. R. and Burrows, P. D.** (1984). Expression of immunoglobulin heavy chain at a high level in the absence of a proposed immunoglobulin enhancer element in cis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2452-5.

**Wang, J. and Boxer, L. M.** (2005). Regulatory elements in the immunoglobulin heavy chain gene 3'-enhancers induce c-myc deregulation and lymphomagenesis in murine B cells. *J Biol Chem* **280**, 12766-73.

**Warren, W. D. and Berton, M. T.** (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.

**West, A. G., Gaszner, M. and Felsenfeld, G.** (2002). Insulators: many functions, many mechanisms. *Genes Dev* **16**, 271-88.

**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**, 453-63.

**Wirth, T., Staudt, L. and Baltimore, D.** (1987). An octamer oligonucleotide upstream of a TATA motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity. *Nature* **329**, 174-8.

**Xu, M. Z. and Stavnezer, J.** (1992). Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line gamma 1 RNA: analysis of the promoter/enhancer. *Embo J* **11**, 145-55.

**Yancopoulos, G. D. and Alt, F. W.** (1986). Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Annu Rev Immunol* **4**, 339-68.

**Yang, W., Shen, J., Wu, M., Arsur, M., FitzGerald, M., Suldan, Z., Kim, D. W., Hofmann, C. S., Pianetti, S., Romieu-Mourez, R. et al.** (2001). Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* **20**, 1688-702.

**Yoshikawa, K., Okazaki, I. M., Eto, T., Kinoshita, K., Muramatsu, M., Nagaoka, H. and Honjo, T.** (2002). AID enzyme-induced hypermutation in an actively transcribed gene in fibroblasts. *Science* **296**, 2033-6.

**Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C. L., Wilson, T. E. and Lieber, M. R.** (2003). R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat Immunol* **4**, 442-51.

**Zaller, D. M. and Eckhardt, L. A.** (1985). Deletion of a B-cell-specific enhancer affects transfected, but not endogenous, immunoglobulin heavy-chain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5088-92.

**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-hsl,2 enhancer in normal murine B cells in an activation-dependent manner. *Int Immunol* **12**, 1167-72.

**Zhu, D., Qi, C. F., Morse, H. C., 3rd, Janz, S. and Stevenson, F. K.** (2005). Deregulated expression of the Myc cellular oncogene drives development of mouse "Burkitt-like" lymphomas from naive B cells. *Blood* **105**, 2135-7.

**Zhuang, Y., Soriano, P. and Weintraub, H.** (1994). The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation. *Cell* **79**, 875-84.

**Zong, R. T., Das, C. and Tucker, P. W.** (2000). Regulation of matrix attachment region-dependent, lymphocyte-restricted transcription through differential localization within promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Embo J* **19**, 4123-33.

**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**, 10160-8.

# RÉSUMÉ

Le locus des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) est le site de nombreux évènements de recombinaisons et de mutations au cours de la différenciation lymphocytaire B. Il constitue ainsi une zone critique pour des évènements de translocations chromosomiques aboutissant à la dérégulation d'oncogènes, tels que *c-myc* au cours du lymphome de Burkitt. *C-myc* se retrouve transloqué à proximité des multiples éléments régulateurs du locus IgH : E $\mu$  en 5' du locus et les activateurs 3' constituant une région de contrôle du locus (LCR). Son expression est alors fortement dérégulée. Notre objectif a été d'étudier le rôle de la région 3'IgH dans la dérégulation de *c-myc* lors du lymphome de Burkitt.

Une première partie de notre travail a consisté à construire et à valider des vecteurs d'expression B spécifiques ayant comme caractéristique une expression aux stades matures de la différenciation B. Nous avons montré que, *in vitro*, la région 3'IgH se comporte comme une LCR « partielle » ne permettant pas l'expression d'un transgène de façon dépendante du nombre de copies intégrées. Lorsque nos vecteurs d'expression sont flanqués de l'isolateur 5'HS4 de la  $\beta$ -globine de poulet, l'expression devient alors dépendante du nombre de copies. Cette copie-dépendance ne fonctionne, toutefois, que si la LCR est complète. En parallèle, nous avons développé des modèles de souris transgéniques afin d'étudier *in vivo* la cinétique d'activation de l'élément E $\mu$  et de la LCR 3'IgH. Nous avons pour cela utilisé la GFP comme gène rapporteur. Nos résultats ont montré que E $\mu$  et la LCR confèrent une expression strictement B spécifique à la GFP, E $\mu$  étant actif du stade pro-B au stade pré-B alors que la LCR s'exprime jusqu'au stade B mature. L'expression n'est observée que si les vecteurs sont entourés par des isolateurs.

Afin de tester l'hypothèse que la LCR 3'IgH est suffisante pour déréguler *c-myc in vivo* et ainsi être à l'origine de la surexpression de *c-myc* lors du lymphome de Burkitt, nous avons généré des souris portant un transgène *c-myc*-3'LCR flanqué d'isolateurs. Les splénocytes des jeunes souris transgéniques ont des taux augmentés de transcrits *c-myc*, prolifèrent de façon accrue en réponse à divers stimuli et ont un taux d'apoptose élevé. Cependant, le nombre de cellules B dans la rate est normal. Les taux de toutes les classes d'Ig sont diminués dans le sérum, mais la commutation isotypique et la sécrétion d'Ig sont normales *in vitro*. À partir de l'âge de douze semaines, les souris développent des lymphomes avec une très forte incidence (80% à 40 semaines). Dans 75% des cas, il s'agit d'un lymphome clonal de type « Burkitt-like », avec un phénotype B mature (B220<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>) et une morphologie « ciel étoilé » caractéristique du lymphome de Burkitt. Dans 25% des cas, le lymphome est un plasmocytome anaplastique. Il est également de nature clonale ; les cellules tumorales sont B220<sup>-</sup>, IgM<sup>low</sup> et CD138<sup>-</sup>. La LCR 3'IgH seule est donc capable de déréguler *c-myc* et de mimer les caractéristiques du lymphome de Burkitt humain. La survenue très rapide et constante des lymphomes chez nos souris fait de ce modèle un outil intéressant pour tester de nouvelles approches thérapeutiques.