

UNIVERSITE DE LIMOGES
Ecole doctorale « Science-Technologie-Santé » ED 258
Faculté des Sciences et Techniques

UMR CNRS 6101
**Laboratoire "Physiologie moléculaire de la
réponse immune et des lymphoproliférations"**

THESE

N°

Pour soutenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé
Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par
Sophie Raynal-Duchez

Le 19 Octobre 2007

**Modèles transgéniques pour l'étude de la fonction
des récepteurs des cellules B et de leur glycosylation**

Directeurs de Thèse : Pr. Michel Cogné
Pr. Raymond Julien

Jury :

Président : Abderrahman Maftah – Professeur, Limoges (UMR INRA 1061)
Rapporteurs : Claudine Schiff – Directrice de recherche INSERM, Marseille (CIML)
Hervé Watier - Professeur, Tours (IPGA)
Examineur : Bernardo Reina – Chargé de recherche 1 CNRS, Strasbourg (IGBMC)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Claudine Schiff, Hervé Watier et Bernardo Reina qui me font l'honneur de juger mon travail. Je remercie également Abdou Maftah d'avoir accepté de présider ce jury de thèse et Raymond Julien pour être l'instigateur du projet « cellules B et glycosylation ».

Je tiens à remercier Michel pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire dès mon stage de maîtrise et de m'avoir acceptée en thèse, sous sa direction. Merci de m'avoir dirigée, motivée et stressée (ça, ce n'était pas le plus facile pour moi !).

Je remercie *tous* mes collègues du 2^{ème} et du 3^{ème} pour tous les bons moments que nous avons partagés : les soirées de Noël, les repas de midi et apéros divers (de même qu'une fameuse omelette aux girolles après une soirée éprouvante au cyto !!!)... une sacrée équipe de joyeux lurons qui savent travailler, s'investir mais également prendre du bon temps quand il faut. Merci au « labo du fond », à la Denizot's team, Eric-le roi de la recup', Anne-Gaëlle, la Laurent's team, Vincent, Seb, Cathy, « la caisse », Cendrine, Chahrazed, ZO-la reine des southern, Jean- ses clusters et son petit monde du 2^{ème}, Bernadette... Sans oublier le personnel du CHU des laboratoires d'Hématologie et d'Immunologie qui ont également contribué au bon déroulement de cette thèse.

Un petit mot pour Rada, Cécile et V2 qui m'ont aidée dans les manip surtout à la fin... vous êtes trop mignonnes !!! mais également pour mes « serial killer »... de souris : Rémi, tu restes une énigme pour moi et Virgo : « t'es vraiment trop cool ». Je remercie Armelle pour les multiples immunisations, Nadine pour les jolies chimères et Sylvie, « ma petite souris préférée », continuellement souriante, qui s'est toujours occupée avec respect de mes diverses lignées de souris transgéniques...

Le petit bureau « Tempus »... nous sommes 4 (Claire, Laulau, Krap et moi) et je pense que je ne retrouverai jamais « meilleur bureau » !! Vous êtes plus dans mon cœur que des collègues ou copains de cerveau (voir freezbe VWR), ami(e)s ??? Outre les bonnes blagues, les « remontages de moral » et les grandes conversations-manip, j'ai beaucoup appris auprès de vous. Merci Krap

de m'avoir donnée le goût pour la recherche, c'est avec toi que tout a commencé et je t'en suis reconnaissante (même si tu m'avais dit que j'allais en ... baver !!!).

Je n'ai pas oublié mes copines « soirées – Grey's » (Virginie, Nathalie et Christelle), on a passé de bons moments ensemble et j'espère en passer plein d'autres... sans oublier les soirées « Pécharmant » avec Virgo qui seront suivies, j'espère, de superbes soirées « piña colada » dans un paysage de rêve !!!!!

Merci à Chantal, Jean-Luc et Claire, les Pro de la cytométrie de m'avoir donner le goût et les bases de cette technique, et surtout d'avoir passé pas mal d'heures à trier mes cellules (petit rappel douloureux pour Chantal !!!!)

Je tiens à remercier toute ma famille et ma belle-famille pour m'avoir soutenue et surtout mes parents pour leur présence, leur amour et leurs encouragements... sans oublier mes amies : Hélène, Emilie, Mylène et Vinciane qui sont continuellement à mon écoute, et toujours en attente de mes appels téléphoniques... je vais me rattraper... et toutes les personnes que j'oublie certainement de citer, qui me sont chères.

Enfin le meilleur pour la fin, mon Jordi... merci de m'avoir épaulée, soutenue, encouragée, réconfortée dans cette longue aventure et de t'être même transformé en homme à tout faire pendant quelques semaines... Tu as su respecter mon travail tout en supportant les contraintes... je t'aime fort. Je suis fière d'être ta femme et cette thèse, c'est un peu la tienne.

Abréviations

-/- : homozygote négatif	ELISA : enzyme linked immunosorbent assay (test avec un immunoabsorbant lié à une enzyme)
-/+ : hétérozygote	ES : Embryonic stem (cell)
+/+ : homozygote positif	Eμ : séquence stimulatrice intronique des chaînes lourdes
Ac : anticorps	Fab : domaine de liaison à l'antigène d'une immunoglobuline
ADCC : « Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity »	FACS : Fluorescence Activated Cell Sorter
ADN : acide désoxyribonucléique	Fc : domaine effecteur d'une immunoglobuline
Ag : antigène	FDC : Follicular dendritic cells (cellules dendritiques folliculaires)
AID : cytidine désaminase induite après activation	FR : framework (région « armature »)
APE1 : endonucléase apyrimidique 1	Fuc : fucose
ARN : acide ribonucléique	GAGs : Glycosaminoglycannes
ARNm : acide ribonucléique messenger	Gal : galactose
B : lymphocyte B	GalNAc : <i>N</i> -acétylgalactosamine
BCR : récepteur des cellules B	GalNAc-T : <i>N</i> -acétylgalactosaminyltransférase
BLNK : B-cell linker protein	Gal-T : Galactosyltransférase
BSAP : B-cell specific activation protein	Glc : glucose
C : région constante	GlcA : acide glucuronique
CAT : chloramphénicol acétyltransférase	GlcNAc : <i>N</i> -acétylglucosamine
CD40-L : ligand de CD40	GlcNAc-T : <i>N</i> -Acétylglucosaminyltransférase
CDC : « Complement-Dependent Cytotoxicity »	GlcT : Glucosyltransférase
CDGs : « Congenital Disorders of Glycosylation » (désordres congénitaux de la glycosylation)	GPI : Glycosyl Phosphatidyl Inositol
CDR : complementary determining region (protéine se liant aux immunoglobulines)	HAT : histone acétyltransférase
CG : centre germinatif	HES : Hairy/Enhancer of Split
CH : région constante de chaîne lourde	hs : site hypersensible à la DNase I
CL : région constante de chaîne légère	HSA : heat stable antigène
CSH : cellule souche hématopoïétique	HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycan
CSPG : Chondroïtin Sulfate Proteoglycan	ICN : Intracellular Notch
CSR : commutation de classe	IdoA : acide iduronique
D : segment de diversité	IFN : interféron
D.O : Densité Optique	Ig : immunoglobuline
Da : dalton	IgH : locus de chaîne lourde d'immunoglobuline
DH : segment de diversité de chaîne lourde	IgL : locus de chaîne légère d'immunoglobuline
DNase I : désoxyribonucléase I	IL : interleukine
dNTPs : désoxyribonucléosides triphosphates	J : segment de jonction
DO : absorbance	Kb : kilobase
EGF : « epidermal growth factor »	kDa : kilodalton
Eik : séquence stimulatrice intronique des chaînes légères kappa	

KO : « knock-out » : délétion de gène par recombinaison homologue
LCR : région de contrôle du locus
Lfng : Lunatic Fringe
LPS : lipopolysaccharide bactérien
Man : mannose
MAR : région d'ancrage à la matrice
MEC : Matrice extracellulaire member
Mfng : Manic Fringe
Néo^r : gène de résistance à la néomycine
NeuAc : N-acetyl-D-neuraminic acid
NeuAc : acide N-acétylneuraminique ou acide sialique
NHEJ : jonction d'extrémités non homologues
NMD : Nonsense-mediated mRNA decay (dégradation des ARNm non-sens)
ORF : Open Reading Frame
PALS : manchons périartériolaires spléniques
Pax : Paired box
pb : paire de bases
pb, Kpb : paire de bases, Kilo paires de bases
PBS : « phosphate buffered saline »
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
Pgk : promoteur de la phosphoglycérate kinase

PLC : phospholipase C
PolyA : site de polyadénylation
pVH : promoteur des régions variables des chaînes d'immunoglobulines
RAG : Recombination activating gene (gène activant la recombinaison)
REG : réticulum endoplasmique rugueux
RPMI : Rosewell Park Memorial Institut (milieu de culture pour cellules eucaryotes)
RSS : séquence signal de recombinaison
S : région switch
Shh : Sonic Hedgehog
SHM : hypermutation somatique
SiaT : Sialyltransférase
SVF : sérum de veau fœtal
TCR : récepteur des cellules T
TdT : déoxynucléotidyltransférase
TGF : transforming growth factor
TGFβ : Transforming Growth Factor β
TLDA : TaqMan Low Density micro-Array
TNF : tumor necrosis factor
UNG : uracil glycosilase
V : région variable
VH : région variable de chaîne lourde
VL : région variable de chaîne légère
Wnt : Wntless-type MMTV integration site family
Xyl : Xylose

Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Structure des immunoglobulines.	19
Figure 2 : Juxtaposition des régions hypervariables CDR en « 3D »	20
Figure 3 : Les Récepteurs de la cellule B (BCR) et de la cellule préB (préBCR) sont associés aux deux molécules de signalisation Ig α et Ig β .	21
Figure 4 : Représentation schématique des loci codant les Ig chez la souris.	23
Figure 5 : Les séquences signal de recombinaison (RSS)	25
Figure 6 : Réarrangements des gènes variables du locus IgH.	26
Figure 7 : Résolution des coupures double brin induites par les enzymes RAG.	27
Figure 8 : Les nucléotides N et P.	29
Figure 9 : L'accessibilité du locus des gènes d'Ig lors des réarrangements V(D)J par remodelage de la chromatine.	30
Figure 10 : L'exclusion allélique.	32
Figure 11 : Structure des loci IgH chez la souris et l'homme.	34
Figure 12 : Les différentes étapes de l'ontogénèse des lymphocytes B conventionnels (B2).	40
Figure 13 : PAX5 et lineage B	42
Figure 14 : Bilan des blocages partiels ou complets de la différenciation B causés par des défauts de gènes codant des facteurs de transcription mais également des protéines de la machinerie de transduction du signal.	45
Figure 15 : Maturation des B périphériques au niveau des centres germinatifs	47
Figure 16 : BLIMP-1 contrôle la différenciation plasmocytaire	49
Figure 17 : Schéma récapitulatif de la maturation des B périphériques	51
Figure 18 : Exemple de « switch » (commutation de classe) vers IgE.	52
Figure 19 : Structures générées par la transcription lors de la commutation de classe.	56
Figure 20 : Rôle de AID dans la commutation isotypique.	58
Figure 21 : Translocation des BCR dans les rafts après crosslinking avec un antigène.	60
Figure 22 : Signalisation médiée par le BCR.	61
Figure 23 : Représentation schématique de la transduction du signal par le BCR.	62
Figure 24 : Comparaison des régions spécifiques aux mIg	69
Figure 25 : Séquences des domaines cytoplasmiques.	70
Tableau 1 : Les principales glycosyltransférases de vertébrés greffant des sucres monosaccharidiques sur des substrats mono- ou polysaccharidiques.	79
Figure 26 : Synthèse des N-glycoprotéines	80

Figure 27 : Les trois types de N-glycannes présents chez les Eucaryotes.	82
Figure 28 : Représentation schématique des principaux monosaccharides <i>O</i> -liés sur des résidus Sérine et Thréonine.	83
Figure 29 : Liste non exhaustive des CSPGs et HSPGs	86
Figure 30 : La famille des glycosaminoglycannes	88
Figure 31 : Biosynthèse des HS et des CS.	90
Tableau 2 : Les différents motifs des CS	92
Figure 32 : Structure et fonction d'une IgG.	93
Figure 33 : Voie de signalisation Wnt.	98
Figure 34 : Voie de signalisation Notch.	100
Figure 35 : Les différentes structures de glycannes <i>O</i> -fucosylés observées sur la protéine Notch.	102
Figure 36 : Les HSPGs jouent de nombreux rôles dans la physiologie cellulaire.	105

Sommaire

<i>Introduction Générale</i>	11
<i>Rappels Bibliographiques</i>	17
I. Organisation et expression des gènes d'immunoglobuline	21
1.1 Le locus des chaînes lourdes (IgH)	22
1.2 Les loci des chaînes légères (IgL)	22
1.2.1 Le Locus Igκ	22
1.2.2 Le Locus Igλ	23
II. Génération du répertoire des cellules B	24
2.1 Les recombinaisons V(D)J	24
2.2 La régulation de la recombinaison V(D)J	29
2.2.1 Modèle ou théorie de l'accessibilité	29
2.2.2 La théorie de l'exclusion allélique	31
2.2.3. La régulation transcriptionnelle	33
a. Les promoteurs	33
b. Les enhancers introniques (Eμ, DQ52, Eκ)	35
c. Les enhancers 3' (3'IgH, 3'κ et 3'λ)	36
d. Les éléments atténuateurs « silencers » et les « MAR »	37
2.3 L'épissage des transcrits d'Ig	38
III. L'ontogenèse B	39
3.1 La phase indépendante des antigènes	41
3.2 La phase dépendante des antigènes	44
3.3 Le mécanisme de la commutation de classe	51
a. Les régions S	53
b. La transcription germinale et le rôle des cytokines	54
c. Le rôle de AID dans la commutation de classe	56
IV. L'activation des lymphocytes B où la signalisation via le BCR	59
4.1. La signalisation par le BcR et sa modulation	59
4.2. La signalisation en fonction des différents isotypes du BCR	68
V. « Glycannes et glycoconjugués »	77
5.1. La glycosylation	78
5.1.1. La N-glycosylation des protéines	80
5.1.2. La O-glycosylation des protéines	83
5.1.3. La O-Glycosylation de type Glycosaminoglycane (GAG)	85
a. Les différentes sous-familles de GAGs	87
b. La biosynthèse des GAGs	89
5.2. Les « sucres » et leur implication dans le système immunitaire	92
5.2.1. La glycosylation des Ig	92

5.2.2. Les galectines, les voies Notch et Wnt : importance de la glycosylation.	95
a. Les galectines	95
b. Les WNTs	97
c. Notch	99
5.2.3. Les différentes fonctions associées aux GAGs	102
<i>Résultats - Discussion</i>	107
<i>Première partie : les BCR modifiés</i>	109
Article 1	111
Article 2	113
Demande de dépôt de brevet	115
<i>Deuxième partie : les glycosaminoglycannes</i>	131
Article 3	133
<i>Perspectives</i>	135
<i>Annexes</i>	145
Article 4	147
Article 5	149
<i>Références Bibliographiques</i>	151
<i>Résumé</i>	15180

Introduction Générale

Afin d'assurer la défense de l'organisme, le système immunitaire dispose d'une capacité d'apprentissage permettant de spécifier la tolérance des antigènes du « soi » (ce qui est propre à l'organisme) et l'élimination des antigènes du « non-soi » (ce qui est étranger). Cette dichotomie est nuancée par la nécessité de co-signaux d'activation de l'immunité innée (signaux de « danger ») pour la mise en place d'une réponse immunitaire efficace. Les bases de la réponse adaptative reposent ensuite principalement sur les deux lignées lymphoïdes T et B et sur leurs récepteurs membranaires spécifiques d'antigènes, ainsi que sur la possibilité pour la lignée B de produire des formes solubles de leurs récepteurs pour l'antigène : les anticorps. Ces anticorps sont capables de se lier spécifiquement à un antigène dans le but de le neutraliser et de l'éliminer. Les cellules participant à cette immunité peuvent circuler dans l'ensemble de l'organisme et se localiser, à des étapes spécifiques de leur maturation, au niveau d'aires spécialisées (moelle osseuse, organes lymphoïdes secondaires...). Le système immunitaire inclut donc, non seulement les lymphocytes T ou B mais aussi des cellules accessoires telles que les macrophages et autres cellules présentatrices d'antigènes, et des cellules épithéliales de soutien ou des cellules stromales qui constituent le « microenvironnement » de la maturation lymphocytaire et de la réponse immune.

La capacité des lymphocytes à répondre de manière spécifique à un grand nombre d'antigènes étrangers, est le résultat d'un processus de différenciation à l'issue duquel chaque lymphocyte exprime un récepteur unique à l'antigène.

Une longue série de phénomènes d'activation et de coopération cellulaire est nécessaire avant d'aboutir à la sécrétion d'un anticorps spécifique par une cellule de la lignée lymphoïde B. Cette réponse présuppose l'expression à la surface cellulaire d'une forme membranaire de l'immunoglobuline au sein du récepteur des cellules B pour l'antigène (BCR), dont la spécificité est définie pour chaque clone B. La population des lymphocytes B est donc formée d'un vaste répertoire de clones produisant des BCR spécifiques des différents antigènes. Ce processus de génération de la diversité des immunoglobulines a été proposé par Burnet en 1959 dans sa *théorie de la sélection clonale*. Les cellules B subissent au cours de l'ontogenèse une sélection directement dépendante de la spécificité de leur récepteur pour l'antigène.

Chez l'homme et chez la souris, les cellules B se différencient à partir de cellules souches hématopoïétiques d'abord dans le foie fœtal puis dans la moelle osseuse par un processus ordonné qui comprend un nombre limité d'étapes et nécessite une série de réarrangements intragéniques permettant l'assemblage de gènes d'immunoglobulines fonctionnels. Ces

réarrangements aboutissent à la mise en place d'un récepteur pré-B à la surface des précurseurs B puis d'un récepteur B à la surface des cellules B immatures puis matures.

Immunocompétent, le lymphocyte B naïf va alors quitter la moelle osseuse via la circulation sanguine et gagner les organes lymphoïdes secondaires tels la rate et les ganglions lymphatiques. Si un lymphocyte B interagit avec un antigène dont son BCR est spécifique, la cellule entreprendra alors une expansion clonale et pourra subir les processus de commutation de classe et d'hypermutation somatique pour obtenir un récepteur de haute affinité dont l'expression sera ensuite durablement conservée par des cellules B mémoires, leur conférant une capacité de réponse rapide et adaptée en cas de nouveau contact avec le même antigène. La stimulation B pourra également bifurquer vers la différenciation terminale plasmocytaire, soit précocement en aboutissant à la génération de plasmocytes à courte durée de vie au niveau de foyers extra-folliculaires (capables de sécréter rapidement de grandes quantités d'Ig de faible affinité), soit plus tardivement au niveau des centres germinatifs, aboutissant alors à des plasmocytes qui produisent des anticorps de haute affinité, certains de ces plasmocytes étant en outre à longue durée de vie et capables de maintenir une production très prolongée d'anticorps spécifiques même en l'absence de nouveau challenge antigénique.

A chaque grande étape de la maturation B, des mécanismes de sélection ont lieu et permettent d'une part de ne conserver que les cellules exprimant un BCR fonctionnel et d'autre part de limiter l'apparition ou l'activation de cellules exprimant un récepteur auto-réactif (reconnaissant les antigènes du soi). Ces cellules auto-réactives sont en grande majorité éliminées ou « anergisées » pendant la différenciation B précoce, durant laquelle elles peuvent mourir par apoptose (délétion clonale), entrer en anergie, ou réinitier le réarrangement des gènes d'immunoglobulines (« BCR editing »).

Au final, tant au niveau de l'activation B que du contrôle de l'autoréactivité, on conçoit donc que la sélection d'un répertoire adapté de BCR (ou d'anticorps) via la sélection de clones B, n'est possible que grâce au caractère *clonotypique* du BCR, bénéficiant donc du fait que chaque cellule ne possède qu'un seul type de récepteur à sa surface grâce au phénomène d'exclusion allélique qui régit l'expression des chaînes lourdes et des chaînes légères d'immunoglobulines.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la fonction même du BCR et notamment du BCR commuté vers IgA et IgE afin de savoir si une chaîne lourde α ou une chaîne lourde ϵ étaient capables de jouer un rôle similaire à celui d'une chaîne lourde μ et donc apporter des éléments de réponse concernant la capacité d'un récepteur B (soit de type IgA soit de type IgE) à

conduire les cellules B au long de leur développement jusqu'au stade final plasmocyte-sécréteur d'anticorps. Pour cela, nous avons réalisé plusieurs modèles de knock-in portant des BCR modifiés où le gène C α 1 humain dans un cas et C ϵ humain dans un autre, ont été intégrés par recombinaison homologue au niveau de la région *switch* μ afin d'obtenir une lignée de souris transgéniques n'exprimant que des IgA ou des IgE. Nous avons choisi des gènes constants humains pour palier au problème de switch résiduel endogène.

Dans une autre perspective d'étude des phénomènes pouvant modifier la réactivité des récepteurs de surface de la cellule B, nous nous sommes intéressés à la modulation de la glycosylation au cours de la différenciation B. La glycosylation est un des principaux événements de maturation post-traductionnelle des protéines et des lipides. Elle consiste en une succession de réactions enzymatiques aboutissant à l'élaboration de motifs glycaniques greffés sur des glycoprotéines ou des glycolipides. La diversité des combinaisons glycaniques permet de multiples interactions. Sachant que chaque modification (le greffage ou le clivage d'un sucre) dépend de l'activité d'un gène, il nous a semblé intéressant d'étudier les variations de l'expression de gènes impliqués dans la glycosylation afin d'être capables, par la suite, de différencier des sous-populations B correspondant à différents états de maturation, d'activation ou de localisation. Cette étude du glycotranscriptome au cours de la maturation B, nous a permis de cibler puis d'étudier d'une manière plus approfondie 2 gènes d'intérêt CsGalNacT1 et Ext11 jouant un rôle dans la biosynthèse des glycosaminoglycannes. Nous avons donc réalisé des lignées de souris transgéniques surexprimant de façon B-spécifique ces gènes afin de comprendre plus précisément le rôle de ces enzymes *in vivo* au cours du développement B.

Rappels Bibliographiques

Les immunoglobulines sont des hétérodimères protéiques, d'environ 150 kDa, exprimés à la surface des lymphocytes B (comme un composant majeur du récepteur pour l'antigène) ou excrétés par les plasmocytes. Elles sont composées de deux chaînes lourdes (H pour Heavy) identiques et deux chaînes légères (L pour Light) identiques. **Figure 1.**

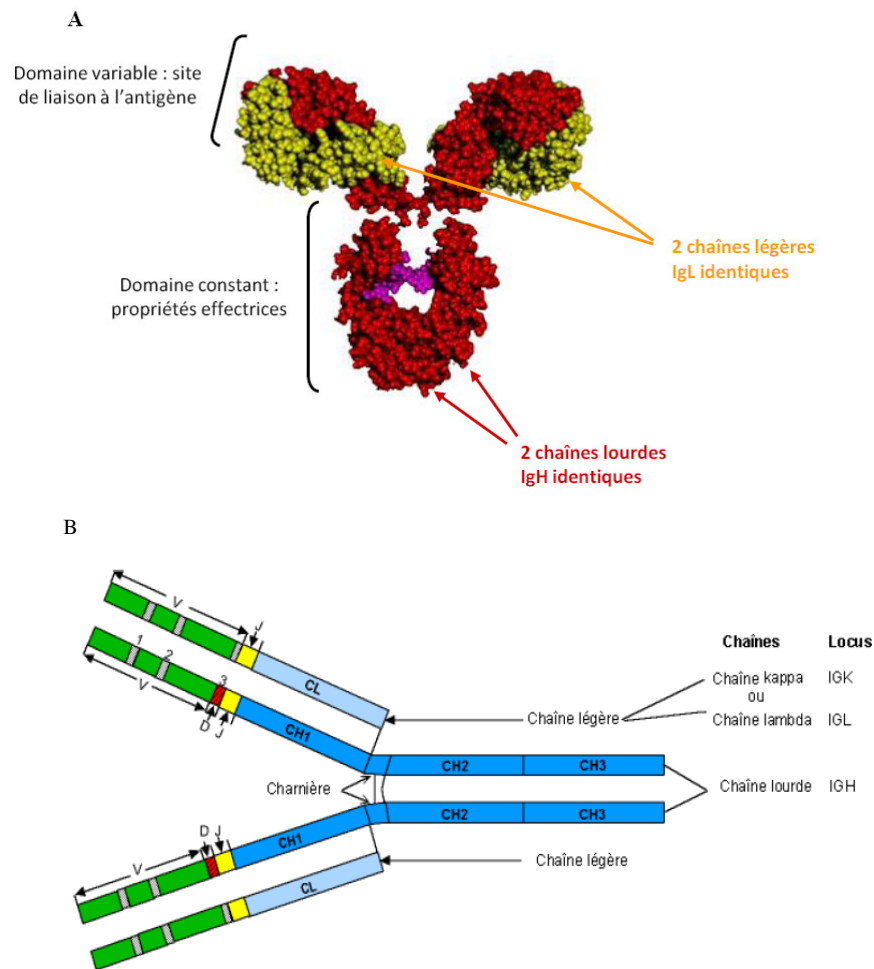


Figure 1 : Structure des immunoglobulines.

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. Remarque : la région située entre les domaines CH1 et CH2 des chaînes H ou région charnière assure la flexibilité de l'anticorps dont les 2 bras, portant les paratopes, sont mobiles dans l'espace.

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 (« niche antigénique ») tandis que les domaines constants des chaînes lourdes confèrent ses propriétés effectrices à l'immunoglobuline. Chacun des domaines variables VL et VH possède trois zones hypervariables ou « régions déterminant la complémentarité » (CDR) séparées par des régions plus conservées (régions « charpente » ou FR pour « framework ») et la juxtaposition de ces zones CDR forme le paratope (site de liaison). **Figure 2.**

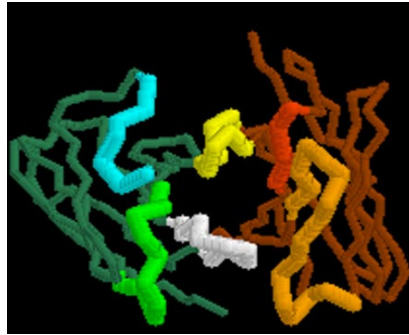


Figure 2 : Juxtaposition des régions hypervariables CDR en « 3D »

L'homme et la souris possèdent deux types de chaînes légères, appelés κ et λ , qui peuvent s'associer à chacune des cinq classes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , ϵ et α) définissant respectivement les IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Les IgG sont subdivisées en 4 sous-classes : IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 chez la souris et IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4 chez l'homme. Les IgA existent en outre chez l'homme comme deux sous-classes IgA1 et IgA2.

Il est à noter que les Ig sécrétées n'existent pas uniquement sous des formes monomériques mais peuvent se présenter sous formes dimériques (IgA) voir multimériques (pentamériques pour IgM) grâce à l'association avec un petit polypeptide de 16 kDa appelé chaîne J. Dans le cas des IgA sécrétoires retrouvées dans les compartiments muqueux, les IgA dimériques s'associeraient secondairement avec un composant sécrétoire (polyIgR) de 70 kDa synthétisé par les cellules épithéliales des muqueuses.

Le récepteur de la cellule B (BCR) est constitué tout d'abord d'une Ig possédant à l'extrémité C-terminale des deux chaînes lourdes, une région transmembranaire d'une vingtaine d'acides aminés hydrophobes permettant l'ancrage des Ig de membrane, suivie d'une courte région cytoplasmique qui semble jouer un rôle (encore très mal connu) dans l'internalisation des

antigènes et dans la transduction du signal. Les capacités les plus évidentes et les mieux explorées de transduction de signal viennent en fait non pas directement de l'immunoglobuline membranaire mais de son association avec des modules de transduction du signal $Ig\alpha/Ig\beta$ contenant des motifs ITAMs (Immunoreceptor Tyrosine Based Activation Motif) dans leur domaine intracytoplasmique (Hombach et al., 1988; Schamel and Reth, 2000a; Schamel and Reth, 2000b). **Figure 3.**

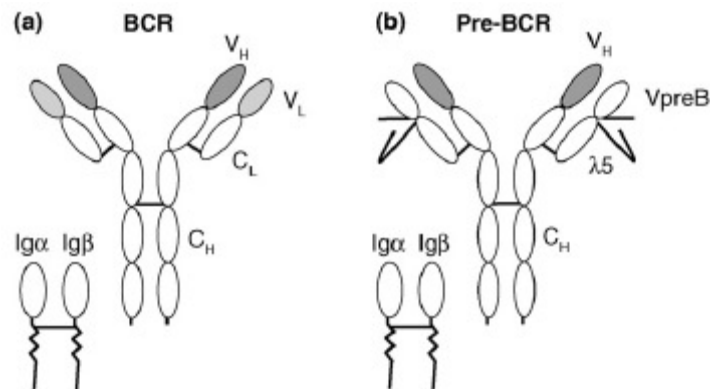


Figure 3 : Les Récepteurs de la cellule B (BCR) et de la cellule préB (préBCR) sont associés aux deux molécules de signalisation $Ig\alpha$ et $Ig\beta$.
Schéma de Martenson et al., 2007.

I. Organisation et expression des gènes d'immunoglobuline

La formation des chaînes lourdes et des chaînes légères des Ig résulte de l'association de plusieurs segments de gènes qui sont organisés en loci sur des chromosomes différents.

Les régions variables des chaînes lourdes sont obtenues par l'association, dans un premier temps, d'un segment de jonction JH avec un segment de diversité DH (induisant la délétion de l'ADN compris entre ces segments) puis le réarrangement de cette association D-JH avec un segment variable VH, le tout aboutissant à la formation d'un exon VDJ. Les régions variables des chaînes légères sont quant à elles, générées seulement par jonction des segments VL et JL. Les parties comprises entre les différents segments sont délétées lors de ces réarrangements sous forme d'un ADN circulaire ou épisome. Les segments géniques codant les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères sont ensuite associées aux exons codant la région constante des chaînes correspondantes par épissage, formant ainsi des ARN messagers matures prêts à être traduits en protéines. De plus, les exons V sont précédés d'une petite séquence de 60 à 90 paires

de bases (pb), l'exon signal ou leader (L), codant la majeure partie (N-terminale) du peptide signal de la protéine (Huber et al., 1993; Weichhold et al., 1993; Zachau, 1993). Le passage de la forme membranaire à la forme sécrétée des Ig s'effectue par épissage alternatif d'un même transcrit primaire de chaîne lourde (Early et al., 1980; Maki et al., 1981; Rogers et al., 1981; Rogers et al., 1980).

1.1 Le locus des chaînes lourdes (IgH)

Le locus des chaînes lourdes est situé sur le chromosome 12 chez la souris et sur le chromosome 14 chez l'homme. Il comprend chez la souris 97 segments VH (dont environ 55 pseudogènes), regroupés en 15 sous-familles, 12 à 14 segments DH (DQ52 étant le segment DH localisé le plus en 3'), regroupés en 4 sous-familles, et 4 segments JH suivis de huit gènes codant les régions constantes des 8 classes et sous-classes d'immunoglobulines, répartis selon l'ordre suivant: μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$, ϵ , et α (**Figure 4**). Chez l'homme, le locus des chaînes lourdes comprend 38 à 46 segments VH regroupés en 7 sous-familles, 23 segments DH, 6 segments JH suivis de neuf gènes codant les régions constantes des 9 classes et sous-classes d'immunoglobulines, répartis selon l'ordre suivant: μ , δ , $\gamma 3$, $\gamma 1$, $\alpha 1$, $\gamma 2$, $\gamma 4$, ϵ , et $\alpha 2$.

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 codent les régions intra-cytoplasmiques et transmembranaires pour chaque isotype.

1.2 Les loci des chaînes légères (IgL)

1.2.1 Le Locus Ig κ

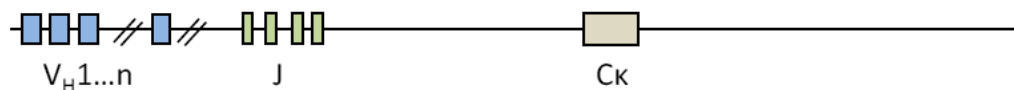
Les gènes des chaînes légères sont situés sur le chromosome 6 chez la souris et sur le chromosome 2 chez l'homme. Le locus Ig κ murin, en configuration germinale, comporte 94 à 96 segments V κ (dont environ 70 pseudogènes) et 5 segments J κ (dont seulement 4 fonctionnels) tandis que le locus Ig κ humain comporte quant à lui, 31 à 35 segments V κ fonctionnels répartis en 5 sous-familles ainsi que 5 segments J κ .

Les segments V κ et J κ codent la partie variable de la chaîne légère. Un seul segment C κ code la partie constante que ce soit chez l'homme ou la souris.

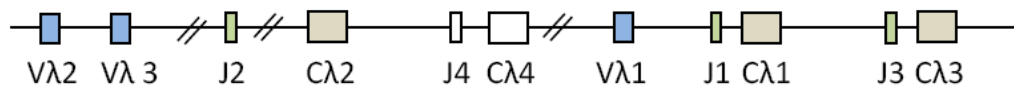
1.2.2 Le Locus Ig λ

Les gènes de chaînes légères sont situés sur le chromosome 16 chez la souris et sur le chromosome 22 chez l'homme. Ils sont répartis en 4 familles comprenant chacune une paire de segments J λ et C λ (J λ 1 à J λ 4 et C λ 1 à C λ 4). Le locus de la souris ne comporte que trois segments V λ : le segment V λ 1 s'associe préférentiellement à J λ 1 et J λ 3 tandis que les segments V λ 2 et V λ 3 s'associent préférentiellement à J λ 2 (J λ 4 et C λ 4 étant défectifs) (**Figure 4**). Le répertoire V λ très restreint de la souris explique probablement en partie le faible pourcentage de lymphocytes B exprimant une chaîne légère λ (environ 5% de cellules λ + par rapport à 95% de cellules κ + soit un rapport de 1/20). Ce rapport est largement supérieur chez l'homme (1/3) qui possède presque autant de gènes codant les régions variables λ que de gènes codant les régions variables κ (Lefranc et al., 1999).

Locus Ig κ (chromosome 6)



Locus Ig λ (chromosome 16)



Locus IgH (chromosome 12)

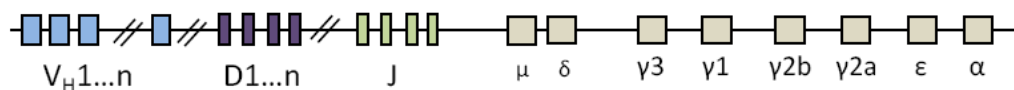


Figure 4 : Représentation schématique des loci codant les Ig chez la souris.

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.

II. Génération du répertoire des cellules B

2.1 Les recombinaisons V(D)J

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

La recombinaison V(D)J est ciblée vers de courtes séquences spécifiques RSS (Recombination Signal Sequence) non codantes et relativement conservées, qui bordent tous les segments V, D et J. Les séquences RSS sont coupées de façon précise et forment des bouts francs alors que l'autre moitié du site de coupure située du côté des segments codants, doit passer par une structure intermédiaire en épingle à cheveux qui devra être ouverte, générant une extrémité simple brin traitée secondairement. Des modifications aléatoires de ces extrémités simple brin, avant leur jonction, vont générer des imprécisions jonctionnelles majeures (mutations, délétions ou insertions nucléotidiques). Les mécanismes de réarrangement demeurent relativement identiques pour les gènes variables des chaînes lourdes et légères (ou des gènes du TCR) (Cobb et al., 2006; Tonegawa, 1983; Yancopoulos and Alt, 1986).

Chaque RSS est constituée d'un motif consensuel très conservé de sept nucléotides (heptamère 5'-CACAGTG) et d'un autre de neuf nucléotides (nonamère 5'-ACAAAACC). Ces deux motifs sont séparés par une séquence peu conservée de 12 ou 23 nucléotides (Tonegawa, 1983) nommée « espaceur ». Selon la longueur de ce motif, deux classes de RSS sont définies : les 12-RSS et les 23-RSS. Ces séquences sont présentes en 3' des gènes V, en 5' des gènes J et flanquent les gènes D. 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 VH-JH ou VH-D-D-JH (Meek et al., 1989). De même, tous les segments V d'un même locus étant flanqués de la même RSS, il ne peut survenir de réarrangement V-V. **Figure 5.** Dans des locus comme ceux du TCR, où l'arrangement des RSS ne suffirait théoriquement pas à

empêcher des recombinaisons illégitimes, on observe en outre qu'au-delà de la règle 12/23, les séquences mêmes de certains RSS influencent fortement l'ordre des réarrangements en favorisant notamment DJ avant VD (règle « beyond 12/23 »)(Bassing et al., 2000).

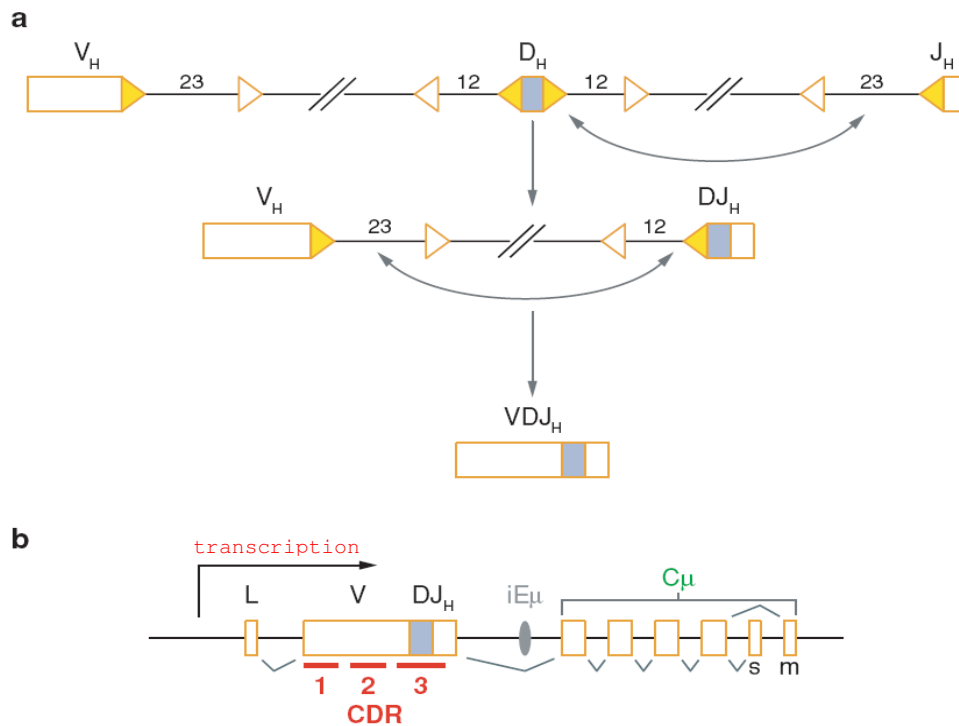


Figure 5 : Les séquences signal de recombinaison (RSS)

a. Règle 12/23. La recombinaison V(D)J n'est initiée qu'entre deux segments géniques bordés par des RSS portant des espaceurs de longueur différente. Une coupure double brin génère la fusion des segments codants.

Les heptamères sont indiqués par un triangle jaune. Les nonamères, par un triangle blanc.

b. Localisation des trois régions hypervariables (CDR) au niveau de l'exon assemblé VDJ.

Schéma de (Jung et al., 2006).

Les réarrangements des segments V(D)J mettent en jeu une machinerie enzymatique composée des protéines RAG1 et RAG2 (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), des protéines Ku70, Ku80, DNA-PKcs, Artémis, XRCC4 et la ligase IV. Les inactivations géniques de ces différents gènes chez la souris conduisent à des phénotypes plus ou moins sévères. Les souris RAG-1^{-/-} ou RAG-2^{-/-} présentent un blocage complet de la différenciation lymphoïde au stade précoce du développement (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992). De plus des mutations au sein de ces gènes entraînent des immunodéficiences sévères (de Villartay et al., 2003). L'inactivation génique des molécules DNA-PKcs, Ku70, Ku80, Artémis, XRCC4 ou ligase IV conduit à des phénotypes plus sévères (sensibilité aux radiations ionisantes, aberrations chromosomiques) car ces

molécules sont impliquées de façon ubiquitaire dans les mécanismes de réparation de l'ADN (Rooney et al., 2004).

L'expression des gènes RAG-1 et RAG-2 lors du développement lymphocytaire B est un processus strictement contrôlé de façon spatio-temporelle: 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, sans oublier une intervention dans l'édition du BCR des cellules immatures. **Figure 6.**

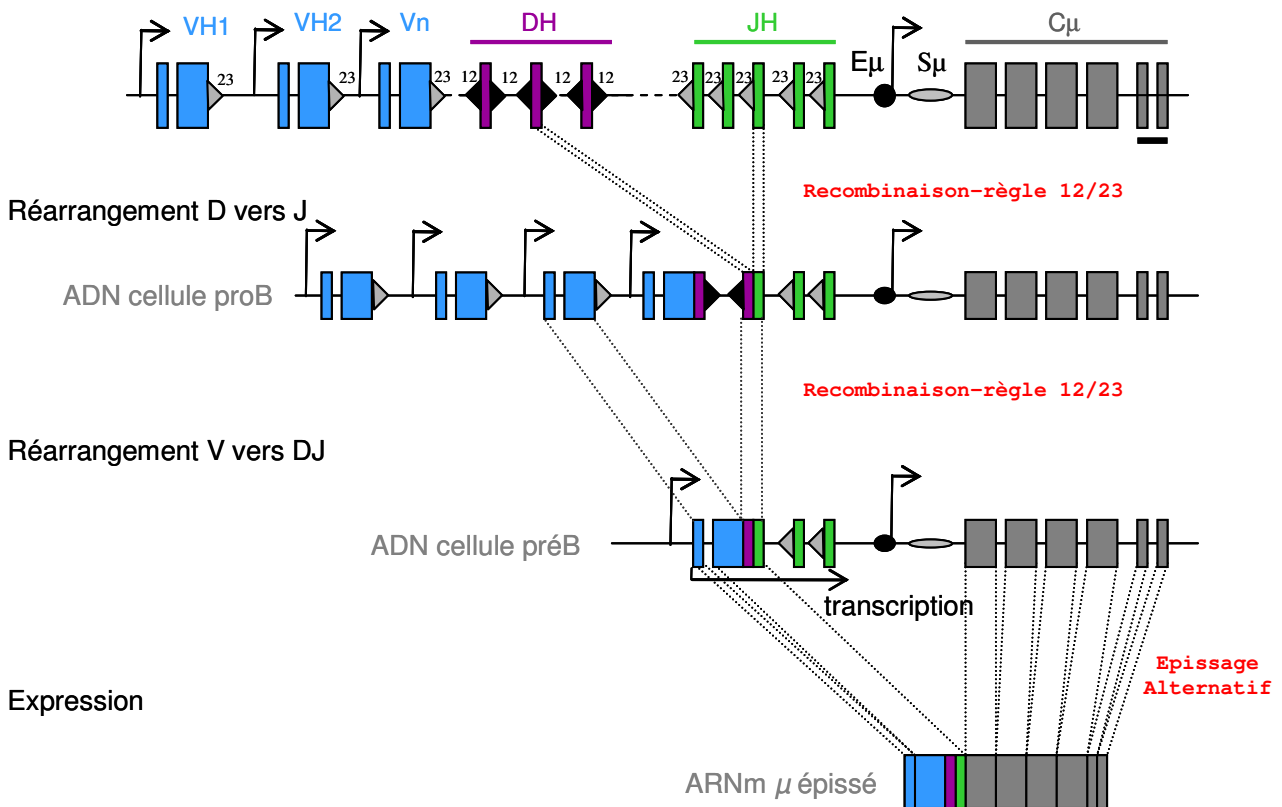


Figure 6 : Réarrangements des gènes variables du locus IgH.

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. D'après (Dudley et al., 2005).

Pendant les premières étapes de la réaction de recombinaison, le complexe RAG-1/ RAG-2 s'associe à une séquence RSS (12 ou 23) et induit, en présence de cations divalents métalliques, une coupure endonucléolytique précisément à l'extrémité de l'heptamère. Grâce à une courbure de l'ADN, la deuxième séquence RSS (23 ou 12) est rapprochée de la première séquence RSS et forme ainsi le complexe synaptique. C'est au niveau de ce complexe que la coupure double brin

de l'ADN est réalisée par les protéines RAG1 et RAG2. Les molécules HMG1 et HMG2, exprimées de façon ubiquitaire, participent à cette réaction en améliorant l'efficacité du clivage par les RAG (Gellert, 2002). La coupure génère quatre extrémités libres intermédiaires : deux extrémités « codantes » en épingle à cheveux et deux extrémités « signal » phosphorylées en 5' (**Figure 7**).

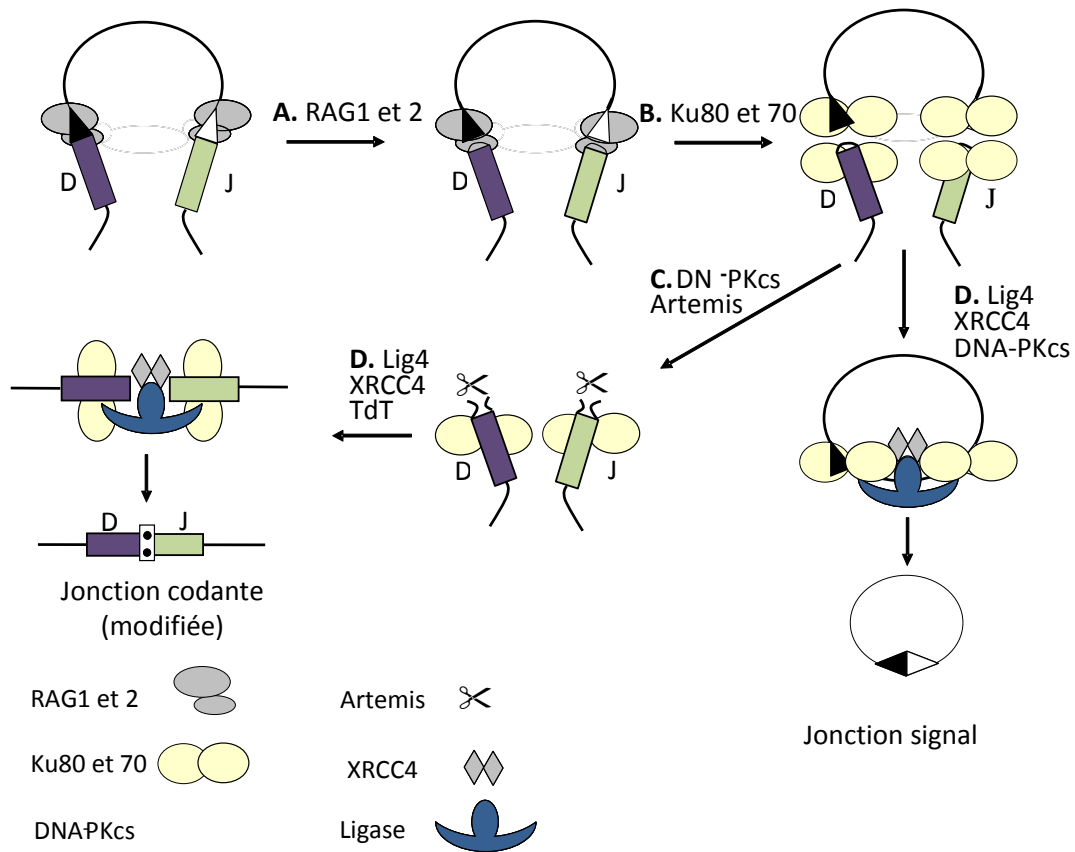


Figure 7 : Résolution des coupures double brin induites par les enzymes RAG.

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. D'après (Dudley et al., 2005).

La résolution des extrémités fait appel à la voie de jonction NHEJ (« Non Homologous End Joining »), voie prédominante de réparation des cassures double brin de l'ADN dans les cellules de mammifères. A ce jour, au moins sept protéines sont impliquées dans cette voie : Ku70, Ku80, DNAPKcs, Artemis, DNA ligase IV, XRCC4 et Cernunnos-XLF (Bassing et al., 2002; Sekiguchi and Ferguson, 2006). D'autres acteurs généraux du phénomène de NHEJ, tels Mre11, Rad50,

γ H2AX ou Nbs1, ont également une implication dans le processus particulier de NHEJ que représente la recombinaison VDJ (Chen et al., 2000; Clatworthy 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. L'hétérodimérisation des protéines Ku70 et Ku 80 produit une structure en anneau dont la partie centrale forme un canal qui encercle les extrémités d'ADN libre (Walker et al., 2001). La protéine DNA-PKcs représente la sous-unité catalytique qui constitue, avec les protéines Ku70 et Ku80, les composants de la protéine kinase dépendante de l'ADN, la DNA-PK. La DNA-PKcs va recruter et former un complexe avec Artemis facilitant l'ouverture des structures en épingle à cheveux (Ma et al., 2002). La protéine XRCC4 s'associe avec la DNA ligase IV, complexe qui sera recruté aux sites de cassures par des interactions avec la DNA-PK (Drouet et al., 2005). Cernunnos, protéine récemment identifiée, va interagir avec ce complexe et relier les extrémités codantes (Ahnesorg et al., 2006; Buck et al., 2006). **Figure 7.**

La jonction codante est imprécise et peut comporter de courtes délétions, additions de duplications palindromiques (appelées « P ») ou de courtes insertions GC-riches (appelées « N ») ajoutées par la terminal désoxynucléotidyltransférase (TdT) avant la ligation des extrémités. La TdT insère des nucléotides de manière aléatoire et ne nécessite pas de matrice (Alt and Baltimore, 1982). Cette cascade de réactions aboutit à la fusion des segments recombinants avec une importante variabilité jonctionnelle (et donc des boucles CDR3) augmentant ainsi la diversité du répertoire (Schlissel, 2003; Sekiguchi and Ferguson, 2006). **Figure 8.**

La recombinaison V(D)J permet donc *in fine* de générer un vaste répertoire d'Ig à partir d'un nombre restreint de gènes. En effet, grâce à l'utilisation des différents gènes, des coupures de l'ADN quelquefois imprécises, ainsi que la « P et la N diversité », il est possible de générer théoriquement jusqu'à 10^9 Ig différentes (Tonegawa, 1983). Cependant, le tribut à payer pour cette variabilité particulièrement importante, est la répercussion aléatoire sur le cadre de lecture des protéines, avec seulement une jonction codante sur trois en phase correcte de lecture et pouvant coder une protéine fonctionnelle.

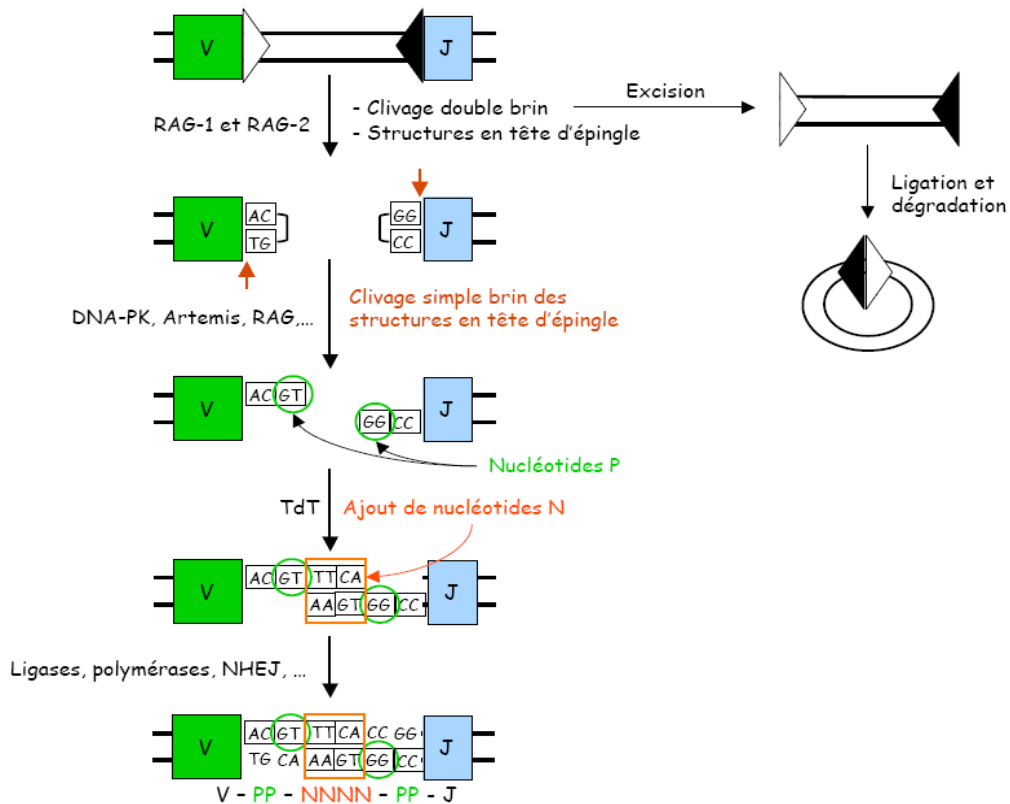


Figure 8 : Les nucléotides N et P.

Ils sont présents en nombre aléatoire et contribuent à la diversité jonctionnelle. Ils peuvent conduire à des réarrangements non-productifs (incapacité à produire une chaîne d'Ig fonctionnelle).

2.2 La régulation de la recombinaison V(D)J

L'existence de séquences de recombinaison (RSS) où d'enzymes (RAG) spécifiques aux lignées lymphoïdes B et T n'explique pas à elle seule le haut niveau de régulation des réarrangements V(D)J.

2.2.1 Modèle ou théorie de l'accessibilité

Il a été établi que le ciblage spécifique de la recombinase RAG vers les séquences RSS s'exerçait grâce à des modifications de l'accessibilité des différents loci à la recombinaison des différents segments géniques (Yancopoulos and Alt, 1985). Les mécanismes physiques et biochimiques de cette accessibilité mettent en jeu plusieurs phénomènes entre lesquels tous les liens n'ont pas encore été clairement établis. On parle ainsi de remodelage chromatinien par hyper-acétylation et méthylation des histones, de repositionnement et ouverture des nucléosomes (Roth and Roth, 2000). **Figure 9.**

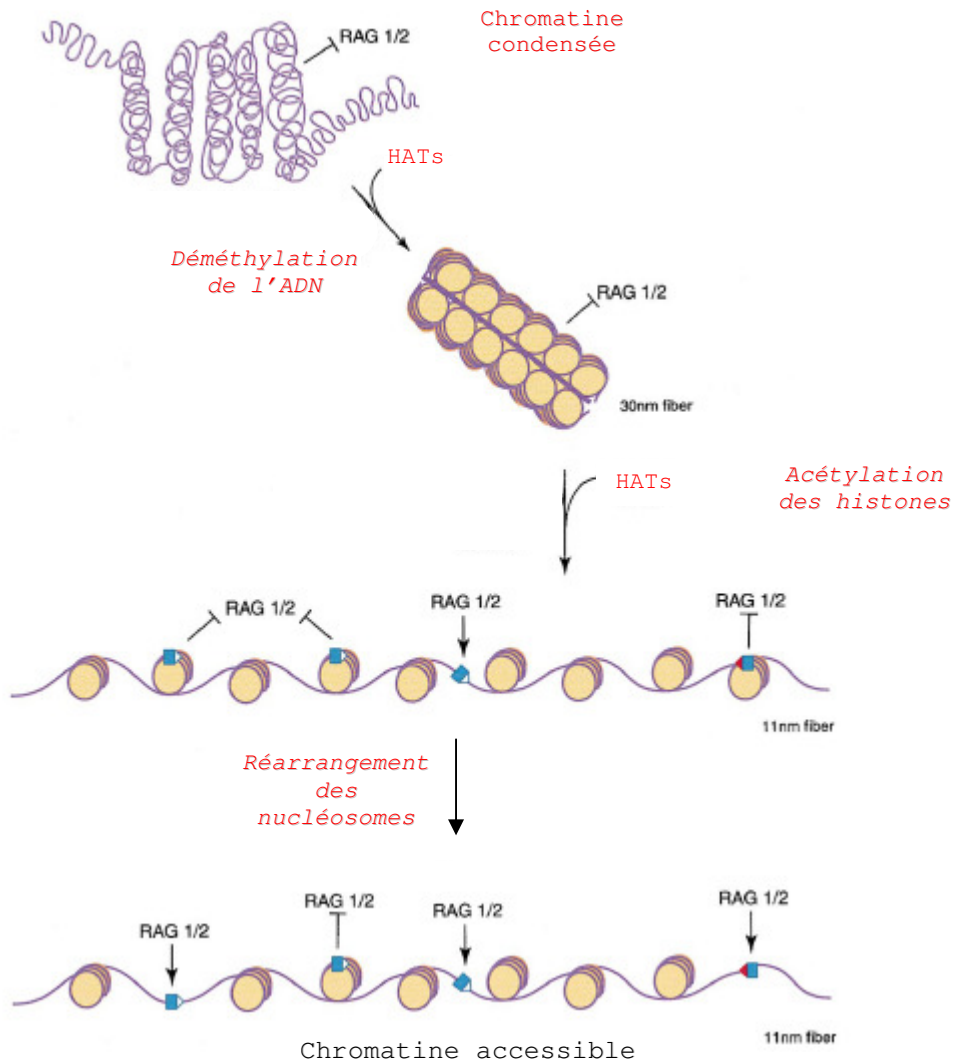


Figure 9 : L'accessibilité du locus des gènes d'Ig lors des réarrangements V(D)J par remodelage de la chromatine.

HAT : histones acétyltransférases. Modifié à partir de (Roth and Roth, 2000).

La structure de la chromatine n'est pas figée. Elle est soumise à un remodelage qui permet le passage entre formes condensée et décondensée. Le degré de condensation est faible dans l'euchromatine définie comme ouverte et accessible aux protéines agissant directement sur l'ADN : polymérase, enzymes diverses et facteurs de transcription, et est élevé dans l'hétérochromatine définie comme fermée et inaccessible (Felsenfeld, 1992; Kadonaga, 1998). Il a été démontré que la méthylation des histones réprimait les réarrangements des gènes d'Ig : l'analyse du profil de méthylation des gènes des chaînes lourdes et légères montre que les loci sont méthylés dans les tissus non lymphoïdes et que l'initiation de la recombinaison V(D)J au cours du développement des précurseurs lymphocytaires est associée à une déméthylation des

séquences Ig (Goodhardt et al., 1993; Mather and Perry, 1983; Mostoslavsky et al., 1998; Storb and Arp, 1983).

Remodelage chromatinien et accessibilité transcriptionnelle sont liés : il a longtemps été admis que la présence de transcrits germinaux reflétait l'ouverture des loci des Ig et donc leur accessibilité aux enzymes de la recombinaison (Sleckman et al., 1996). Enfin des modifications d'interactions avec la matrice nucléaire mais aussi le regroupement des loci accessibles dans des compartiments nucléaires (foci) spécialisés contribuent à l'accessibilité des loci et donc aux réarrangements V(D)J (Sen, 2005).

2.2.2 La théorie de l'exclusion allélique

Afin que chaque lymphocyte B généré exprime un récepteur unique pour l'antigène, il est nécessaire de contrôler/surveiller la recombinaison V(D)J au sein du locus. Ce mécanisme, appelé « exclusion allélique » apparaît comme essentiel dans la génération de cellules B fonctionnelles. Il implique que pour chaque composant des chaînes d'Ig (HC et LC) ne soit exprimé qu'un seul allèle. Trois modèles ont été proposés afin d'expliquer ce phénomène :

- le modèle de « toxicité » postulant que la présence de chaînes lourdes d'Ig différentes dans une même cellule induirait un signal d'apoptose – modèle infirmé par les travaux de Sonoda et al. (Sonoda et al., 1997).

- le modèle « stochastique » postulant que la probabilité de deux réarrangements productifs est très faible (Coleclough et al., 1981).

- le modèle « régulé » qui avance que lorsqu'un réarrangement est productif, permettant la transcription d'un ARNm en phase, non aberrant, codant une chaîne lourde μ (ou plus tard une chaîne légère κ ou λ), va induire un rétrocontrôle négatif bloquant les réarrangements sur les autres allèles. **Figure 10.** Ce modèle s'expliquerait par une perte de l'accessibilité du deuxième allèle (mécanismes épigénétiques cités ci-dessus) (Mostoslavsky et al., 2001).

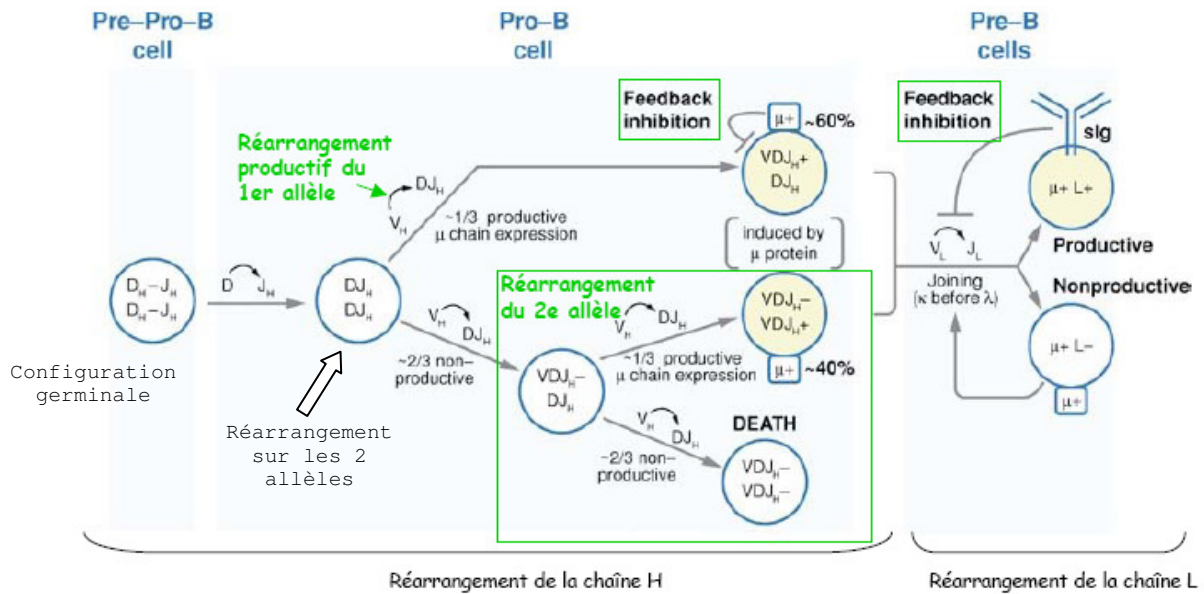


Figure 10 : L'exclusion allélique.

L'inhibition par rétroaction (feedback inhibition) : l'expression d'une chaîne μ fonctionnelle (ou L) va inhiber les réarrangements du second allèle. Schéma de (Jung et al., 2006).

Ce modèle est fortement remis en cause au regard du processus d'édition du BCR où une cellule B immature mais exprimant un BCR autoréactif (chaîne lourde et chaîne légère déjà réarrangées mais induisant un signal fort), va continuer d'exprimer les RAG, donc réaliser des réarrangements secondaires des gènes des chaînes légères afin de remplacer la chaîne autoréactive (Gay et al., 1993; Tiegs et al., 1993). Ce mécanisme d'induction de la tolérance montre qu'aux loci des chaînes légères (particulièrement le locus κ), la théorie de l'exclusion allélique est sérieusement mise à mal de même que la théorie de la sélection clonale de Burnet, selon laquelle chaque cellule B présenterait un récepteur défini dont l'autoréactivité serait sanctionnée par une délétion clonale. En fait, il semble aujourd'hui que les cellules B subissent un apprentissage du soi au cours duquel elles vont pouvoir modifier la spécificité de leur récepteur. Le processus d'édition et/ou révision du BCR peut être vu comme un moyen important de limiter les pertes occasionnées par cette autoréactivité en donnant des « secondes chances » à la cellule avant d'induire sa délétion.

En conclusion, l'exclusion allélique est un processus complexe mettant en jeu de nombreuses régulations qui vont aboutir à la monospécificité des cellules B impliquées dans la réponse immune. Ce phénomène est très efficace puisque malgré les nombreux réarrangements successifs que peuvent subir les gènes d'immunoglobulines lors du développement des cellules

B, le nombre de cellules exprimant plusieurs BCR distincts en périphérie est extrêmement faible. Nos travaux suggèrent en fait qu'une part importante de ce phénomène repose sur l'avantage sélectif que représente pour un clone B l'expression d'une seule chaîne et donc d'un BCR clonotypique, sans que pour autant il n'existe d'interdiction mécanique absolue à une inclusion allélique (Sirac et al., 2006).

2.2.3. La régulation transcriptionnelle

La régulation de la transcription des gènes d'Ig est similaire à celle d'autres gènes, et fait intervenir principalement des séquences nucléotidiques *cis*-régulatrices et des protéines se fixant à ces séquences (éléments *trans* régulateurs). Les interactions multiples entre ces différents éléments sont complexes et permettent un contrôle rigoureux de l'expression et de la spécificité cellulaire B des gènes d'Ig. Plusieurs types d'éléments *cis*-régulateurs ont été identifiés : les promoteurs (responsables de la transcription appropriée et efficace de ces gènes), les activateurs transcriptionnels (« enhancers »), les atténuateurs (« silencers ») et les régions d'ancrage à la matrice (« MAR : Matrix Association Region ») (Ernst and Smale, 1995) **Figure 11**. Toutes ces séquences régulatrices comportent des sites de fixation pour les facteurs de transcription et agissent de façon concertée. La majorité de ces facteurs de transcription ne sont pas spécifiques de la lignée lymphoïde B mais l'action synergique de plusieurs d'entre eux peut, elle, s'avérer B-spécifique.

a. Les promoteurs

Les promoteurs des gènes de chaînes lourdes et légères d'Ig se situent en amont de chaque région V et assurent un niveau basal de transcription. Leur activité est comprise dans une région d'environ 250 pb en amont du site d'initiation de la transcription. L'ensemble des promoteurs des gènes d'Ig possèdent une séquence octamérique très conservée en amont de la TATA box : ATGCAAAT dans les promoteurs des gènes de chaînes lourdes (pVH), ou la séquence inversée ATTTGCAT dans les promoteurs de chaînes légères (Falkner and Zachau, 1984; Parslow et al., 1984).

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., 2006; Pierani et al., 1990). Cependant, des souris déficientes en Oct-2 et OCA-B ont un développement B précoce normal (Schubart et al., 2001).

En plus de l'octamère, chez la souris, les promoteurs pVH contiennent une séquence heptamérique, 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 μ E3. Chez l'homme, l'heptamère n'est présent que dans le promoteur des régions VH appartenant à la famille VH1 (Kemler et al., 1989).

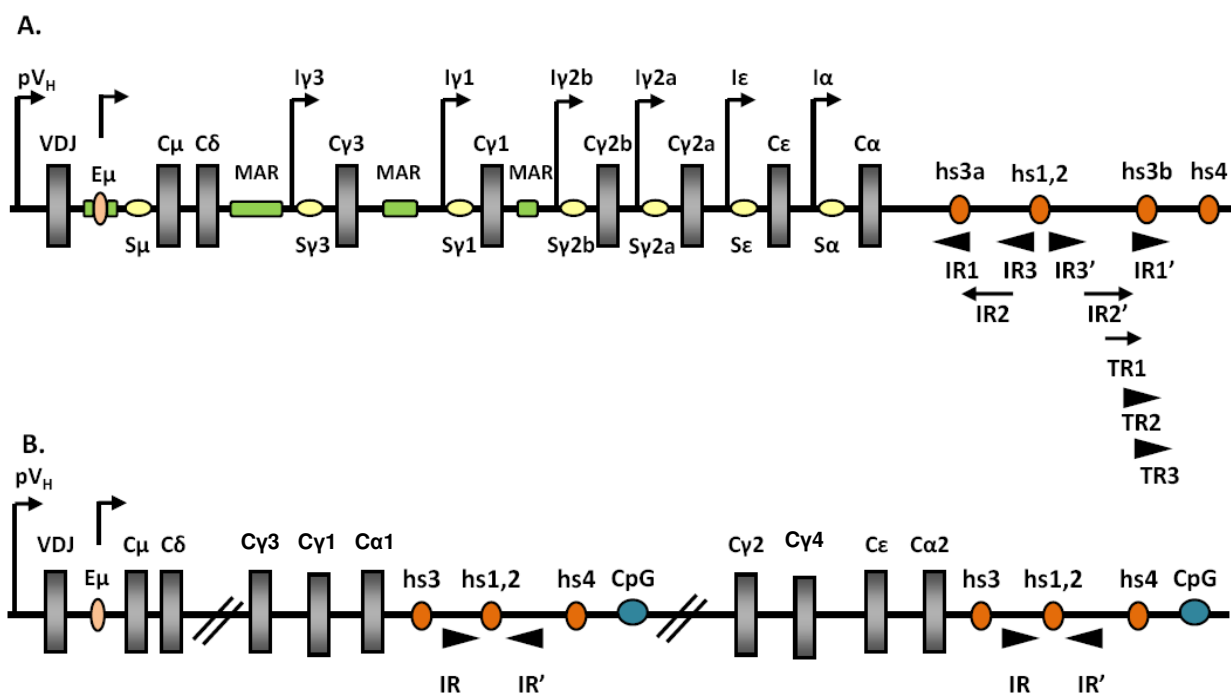


Figure 11 : Structure des loci IgH chez la souris et l'homme.

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 α .

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).

Des promoteurs ont également été décrits en amont de chaque gène des régions constantes des chaînes lourdes d'Ig, à l'exception de C δ . 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.

b. Les enhancers introniques (E μ , DQ52, E κ)

L'activateur intronique E μ fut le premier découvert au sein du locus IgH. Il est localisé dans l'intron entre le dernier segment JH et le gène C μ (Banerji et al., 1983). Il est entouré par deux régions d'attachement à la matrice (MAR : « Matrix Associated Region »). Cet élément semble actif tout au long du développement B. Sa localisation en amont de S μ lui permet d'être préservé de tous les événements de recombinaisons survenant dans le locus. E μ 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). On retrouve au sein de cette séquence, une séquence octamérique identique à celles des promoteurs VH ainsi qu'un noyau dur « core E μ », responsable de l'essentiel de l'activité de l'enhancer, contenant les sites μ E5, μ E2, μ A, μ E3 et μ B. E μ fixe de nombreux facteurs parmi lesquels Oct-1 et Oct-2 (Ernst and Smale, 1995) mais aussi les protéines activatrices de la famille « hélice-boucle-hélice » dont les produits du gène E2A (Murre et al., 1989). Ces derniers sont essentiels dans la lymphopoïèse B, les animaux E2A $-/-$ présentant un blocage précoce de l'ontogenèse B (avant même les premiers réarrangements D-JH) (Bain et al., 1994). On peut remarquer que des sites consensus pour la fixation des produits du gène E2A sont présents sur de nombreux éléments *cis*-régulateurs du locus IgH (E μ , DQ52 et la LCR en 3') de même que dans d'autres loci B-spécifiques.

DQ52 présente plusieurs caractéristiques qui font de lui un segment de gène particulier. Il est préférentiellement utilisé lors des premiers réarrangements DJ au cours de l'ontogénie (Bangs et al., 1991; Tsukada et al., 1990) et est le seul segment D à être transcrit bien avant la survenue des premiers réarrangements V(D)J (Alessandrini and Desiderio, 1991).

Il a été longtemps considéré que les transcrits germinaux (μ 0) étaient des indicateurs les plus précoces de l'engagement vers la lignée B et que leur transcription pouvait être un préalable nécessaire à l'accessibilité de la région D-J à la recombinaison V(D)J (Thompson et al., 1995). L'activateur situé en 5' de DQ52 constitue un promoteur-activateur synergique de E μ (Kottmann et al., 1994) impliqué dans l'activation des réarrangements précoces aux stades initiaux de

l'ontogenèse B. Sa délétion, chez la souris, n'inhibe pas le réarrangement DJH et ne bloque pas la transcription $\mu 0$. En revanche, une diminution des réarrangements impliquant JH3 et JH4 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 DJH 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 DJH et la transcription.

Des régions stimulatrices introniques ou « amont » ont également été caractérisées au niveau du locus κ comme par exemple : les éléments en 5' des $J\kappa$ et l'enhancer intronique κ ($EI\kappa$).

c. Les enhanceurs 3' (3'IgH, 3'kappa et 3' lambda)

Différents groupes ont identifié, chez la souris, quatre activateurs transcriptionnels en 3' du locus IgH (**Figure 11**), nommés hs1,2 (Lieberson et al., 1991), hs3a (Matthias and Baltimore, 1993), hs3b (Giannini et al., 1993) et hs4 (Michaelson et al., 1995) – « hs » pour site hypersensible à la DNase I. Cette région régulatrice présente une structure palindromique contenant de longues séquences répétées inversées qui flanquent hs1,2, centre de cet immense palindrome. Les activateurs hs3a et hs3b présentent 97% d'homologies entre eux mais sont en orientation opposée dans le locus (Chauveau et al., 1998). La région 3' du locus IgH humain est assez similaire dans sa structure, sauf en ce qui concerne hs3b qui n'a pas d'homologue chez l'homme. De plus, il existe, suite à une duplication ancestrale du locus IgH, deux gènes α ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) et donc deux régions *cis*-activatrices en 3'.

L'activité de la région 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 hs1,2 était actif aux stades B tardifs (Lieberson et al., 1991). Les éléments hs3a et hs3b sont décrits comme des activateurs plus faibles en expression transitoire ; leur activité n'est détectée qu'aux stades B mature et plasmocyte (Madisen and Groudine, 1994; Matthias and Baltimore, 1993) Hs4 est également considéré comme assez faible mais son activité se retrouve tout au long de l'ontogénie B, depuis le stade pro-B jusqu'au stade plasmocyte (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995). Considérés séparément, ces quatre activateurs sont faibles. Cependant, leur combinaison conduit à une forte activité de transcription. Des études de transfections transitoires combinant $E\mu$ et les différents activateurs 3' murins ont montré des effets synergiques dépendant du stade de

maturation : aux stades précoces, E μ et hs4 semblent prépondérants ; hs3a, hs1,2 et hs3b sont actifs aux stades tardifs, mais leurs effets continuent d'être accentués par E μ et hs4 jusqu'au stade plasmocytaire, au cours duquel l'efficacité des séquences régulatrices semble être optimale (Chauveau et al., 1998). Par ailleurs, il a été suggéré que la combinaison de ces quatre éléments leur conférait les propriétés d'une LCR (Locus Control Region) (Chauveau et al., 1999; Madisen and Groudine, 1994). 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 (Ernst and Smale, 1995). Le rôle *in vivo* de la LCR en 3' du locus IgH n'est pas encore totalement élucidé. En effet, la redondance des séquences activatrices complique considérablement l'évaluation de leur implication individuelle dans les processus touchant le locus IgH (réarrangements, transcription, etc...). Ainsi, le remplacement, par recombinaison homologue, de hs1,2 par le gène de résistance à la néomycine induit une forte diminution de la commutation de classe (Cogne et al., 1994; Manis et al., 1998). L'inactivation individuelle de hs3a et hs1,2 par le système Cre-*loxP* n'a pas révélé de phénotype remarquable (Manis et al., 1998). Ce n'est que récemment que l'action redondante de ces différents activateurs a été mise en évidence dans une expérience de délétion où deux de ces éléments étaient éliminés du locus. Ces travaux ont clairement démontré le rôle essentiel des deux éléments les plus distaux dans la transcription germinale des gènes constant de chaînes lourdes et dans la commutation isotypique (Pinaud et al., 2001).

En 3' du locus κ existe en outre un activateur « 3' κ », qui fonctionne en synergie avec l'activateur intronique afin de permettre l'expression et les réarrangements normaux au niveau du locus Ig κ (Inlay et al., 2002). Plus loin encore en 3', un enhancer « downstream » (« Ed ») a été récemment identifié chez la souris et chez l'homme, avec une activité spécifique du stade plasmocytaire (Liu et al., 2002). Il existe également en 3' du locus λ , un enhancer intronique « 3' λ » qui va permettre l'expression et les réarrangements au niveau du locus lambda de même que l'hypermutation somatique (Popov et al., 1999).

d. Les éléments atténuateurs « silencers » et les « MAR »

Ils ont notamment été caractérisés dans les régions intervenantes entre segments V et J, ainsi que dans les régions d'ancrage à la matrice nucléaire (régions MAR). Comme les promoteurs et les enhancers, ils possèdent des sites de liaison à des facteurs de régulation *trans* (Liu et al., 2002).

En ce qui concerne les MAR, elles semblent avoir une certaine dualité et leur fonction précise à proximité des enhancers introniques reste controversée : il semblerait qu'elles soient inhibitrices dans les cellules non B et participent à la spécificité cellulaire B (Kadesch et al., 1986; Pierce et al., 1991) ; en contrepartie dans la lignée B, elles modifieraient la structure de la chromatine pour amplifier la propagation d'un état d'accessibilité du locus au voisinage de l'activateur (Forrester et al., 1994). Probablement du fait de redondances biologiques, la délétion ciblée des MARs flanquant l'enhancer E μ n'a révélé aucun phénotype (Sakai et al., 1999).

2.3 L'épissage des transcrits d'Ig

Les gènes de chaînes lourdes d'Ig incluent des exons susceptibles de subir un épissage alternatif et codant soit des régions d'ancrage membranaire soit des peptides spécifiques des chaînes sécrétées. La régulation de cet épissage alternatif des ARN pré-messagers est donc capitale pour la maturation des lymphocytes B. Elle intervient d'une part lors de la différenciation des lymphocytes B immatures (exprimant une IgM membranaire sans IgD associée) en cellules B matures co-exprimant alors IgM et IgD membranaires. Cette régulation est aussi impliquée dans la maturation des cellules en plasmocytes excréteurs.

Dans les cellules B immatures, il semble que le gène δ soit méthylé et que la transcription initiée à partir du promoteur VH ne s'étende pas au-delà du gène μ , donnant lieu à un transcrit mature qui est épissé de façon à ne coder que la forme membranaire de la chaîne μ (Maki et al., 1981). La situation devient plus complexe dans les cellules B matures, où un seul transcrit primaire inclut l'ensemble des séquences μ s, μ m, δ m et δ s (m pour membranaire et s pour sécrété) (Wall and Kuehl, 1983). Les mécanismes exacts de la régulation post-transcriptionnelle des ARN pré-messagers μ/δ ainsi que des formes membranaires et sécrétées des Ig restent encore mal connus. L'épissage alternatif des formes membranaires semble être orienté par le clivage ou le non-clivage préalable des ARNm au niveau du site de polyadénylation « de type sécrété », mais semble aussi contrôlé par une structure spécifique des introns, capables de promouvoir l'une ou l'autre forme d'épissage indépendamment et avant même la polyadénylation (Bruce et al., 2003; Danner and Leder, 1985; Peterson and Perry, 1986). Pour la régulation μ/δ , la terminaison de transcription qui survient en 3' du site de polyadénylation de C μ pourrait jouer un rôle, mais il a été montré que sa délétion, tout en favorisant la production de transcrits primaires longs allant

jusqu'à C δ , ne supprime pas pour autant la production exclusive de transcrits épissés μ plutôt que δ dans les cellules immatures (Yuan et al., 1996).

Par ailleurs, la stabilité des ARNm augmente lors de la différenciation terminale des cellules B, et la synthèse importante de ribosomes au sein du plasmocyte ralentit probablement la dégradation enzymatique des ARNm des Ig, s'accompagnant d'une augmentation de la demi-vie des ARNm qui codent les formes sécrétées des chaînes lourdes (Jack and Wabl, 1988; Mason et al., 1988). Enfin, il a été montré que l'équipement global en facteurs régulateurs d'épissage variait entre le stade lymphocytaire et le stade plasmocytaire, avec un effet s'exerçant même sur des transcrits primaires non-Ig (Bruce et al., 2003).

III. L'ontogenèse B

Les gènes d'immunoglobulines sont spécifiquement exprimés dans la lignée lymphocytaire B. Spontanément non fonctionnels dans leur disposition germinale, ils devront d'abord subir au cours du développement B, une série de réarrangements somatiques ordonnés. Codées par ces réarrangements, des chaînes d'Ig membranaires fonctionnelles pourront s'associer de manière non covalente à deux molécules transmembranaires : Ig α (CD79a ou mb-1) et Ig β (CD79b ou B29), et former successivement les récepteurs pré-BCR puis BCR, clés de la maturation, de l'activation et de la survie de la lignée B. On peut séparer l'ontogenèse des lymphocytes B en deux phases principales :

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

Une phase d'activation et de différenciation finale dépendante des antigènes du soi d'abord puis du non-soi en « périphérie » au niveau des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions lymphatiques et formations lymphoïdes associées aux muqueuses MALT pour Mucosae Associated Lymphoid Tissue). Elle aboutit à la formation de plasmocytes et de cellules B mémoires spécifiques d'un antigène étranger.

Les différentes étapes de ce processus de différenciation vont amener les cellules à exprimer où à ne plus exprimer un ensemble de récepteurs (marqueurs de surface) et à répondre à divers médiateurs directement impliqués dans le processus ordonné aboutissant à l'expression à la surface et/ou la sécrétion d'une immunoglobuline spécifique d'un antigène (**Figure 12**).

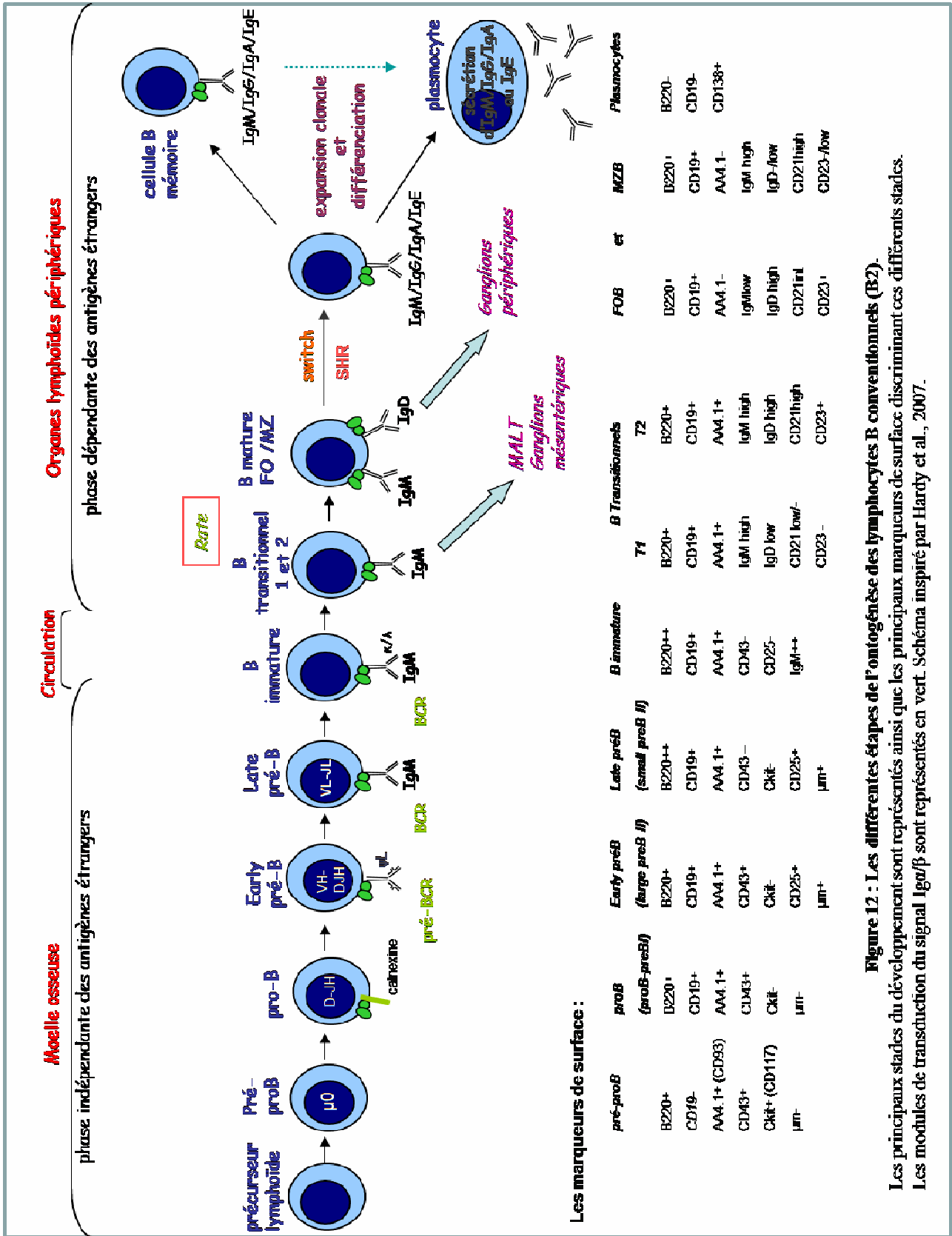


Figure 12 : Les différentes étapes de l'ontogénèse des lymphocytes B conventionnels (B2).
 Les principaux stades du développement sont représentés ainsi que les principaux marqueurs de surface discriminant ces différents stades. Les modules de transduction du signal Igα/β sont représentés en vert. Schéma inspiré par Hardy et al., 2007.

3.1 La phase indépendante des antigènes

La différenciation B débute dès le stade embryonnaire et se poursuit tout au long de la vie. Les mammifères ne possèdent pas d'organe spécialisé dans la lymphopoïèse B et celle-ci se déroule au sein des tissus hématopoïétiques. Les cellules B se développent ainsi à partir des cellules souches lymphoïdes dans le tissu hématopoïétique du foie fœtal à partir de 8 à 9 semaines de gestation chez l'homme et vers le 14^{ème} jour chez la souris. Le foie fœtal est ensuite relayé par la moelle osseuse, qui conserve cette fonction chez l'adulte.

La phase indépendante des antigènes se déroule dans la moelle osseuse et correspond à la différenciation de cellules précurseurs hématopoïétiques en cellules B matures immunocompétentes. Cette étape implique les réarrangements des gènes d'immunoglobulines, respectant le plus souvent un ordre précis (le modèle " ordonné " décrit par Alt et Baltimore (Alt et al., 1984) : d'abord dans le locus IgH puis dans le locus Ig κ ou Ig λ . Ces réarrangements séquentiels se produisent en l'absence d'antigène exogène et caractérisent les divers stades de la maturation.

Le stade *pré-proB* est caractérisé par la forte expression du transcrite germinale $\mu 0$ (ou JH1) (Li et al., 1996). Ces cellules n'ont pas encore engagé de réarrangements et expriment faiblement les enzymes RAG. Elles présentent à leur surface le marqueur de la lignée B, B220 (Hardy et al., 1991). Différents facteurs de transcription sont précocement impliqués dans la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques en progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) puis en cellules B (Fuxa and Skok, 2007; Nutt and Kee, 2007).

C'est au stade *proB* que débutent les réarrangements des gènes d'Ig par le rapprochement d'une région DH vers une région JH sur les deux allèles (les enzymes RAG et la TdT sont fortement exprimés). Vient ensuite se recombiner sur cet assemblage DJ un gène VH afin de former l'exon codant la région variable de la chaîne lourde. Pax-5, l'interleukine 7 (IL-7) et E2A jouent un rôle dans le maintien du lignage B. Le facteur de transcription Pax5 (BSAP) activerait les gènes spécifiques du lignée B et inhiberait simultanément les gènes spécifiques des autres populations médullaires (Cobaleda et al., 2007). **Figure 13.** Durant la lymphopoïèse B précoce, la recombinaison V(D)J est régulée de différentes façons dont le repositionnement du locus IgH en périphérie du noyau (accessibilité du locus). Pax5 jouerait un rôle dans la contraction du locus et permettrait la recombinaison des VH les plus distaux sur le DJH déjà assemblé (Fuxa et al., 2004). Il aurait également un rôle transactivateur dans la recombinaison V_H-DJ_H en se liant au niveau des régions codantes des VH (mais seulement sur certaines familles de VH, ce qui

pourrait influencer la diversification du répertoire) et en interagissant physiquement avec le complexe RAG1/RAG2 pour faciliter la recombinaison V(D)J (Zhang et al., 2006). Si ces réarrangements permettent l'expression d'un ARN messager fonctionnel (sans codons stop, et avec une phase de lecture correcte), la chaîne lourde μ est alors synthétisée et exportée à la membrane en association avec d'une part la " pseudo-chaîne légère " (composée de deux protéines invariantes $\lambda 5$ et VpreB chez la souris ou SLC pour Surrogate Light Chain chez l'homme) et d'autre part, les molécules de transduction du signal intracellulaire Ig- α et Ig- β , formant ainsi le pré-BCR (*stade pre-B*).

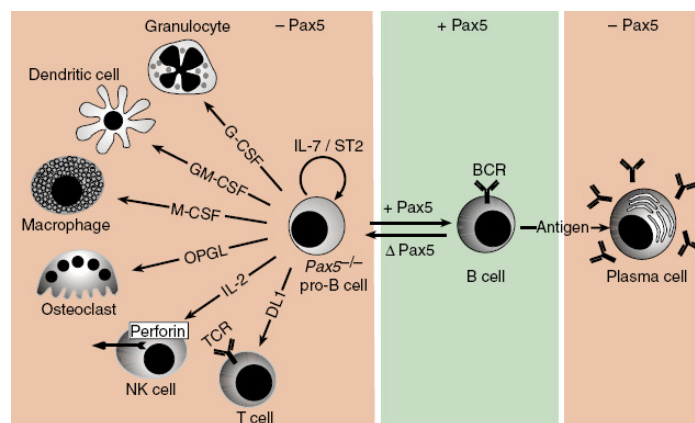


Figure 13 : PAX5 et lineage B

L'engagement vers la lignée B est encore réversible jusqu'au stade proB. La cellule est capable de se différencier, in vitro, en présence de cytokines choisies, en différents types cellulaires et in vivo après transplantation dans des souris receveuses. La délétion de PAX5 induit une rétrodifférenciation des B en précurseurs lymphoïdes. Schéma de (Cobaleda et al., 2007).

Contrairement au stade pro-B où les réarrangements D-J ont lieu sur les deux chromosomes, les réarrangements V-DJ ne se produisent de façon fonctionnelle que sur un seul allèle («exclusion allélique»). Le rôle de ce pré-BCR est indispensable au bon déroulement du développement des cellules B et a, en particulier, été souvent considéré comme essentiel dans l'induction des réarrangements des gènes des chaînes légères. Il est en effet très habituel que les gènes des chaînes légères soient réarrangés après ceux des chaînes lourdes et de façon séquentielle, gènes κ d'abord puis gènes λ , lorsque les réarrangements κ n'ont pas permis d'aboutir à un exon VJ fonctionnel (Brauninger et al., 2001; Hieter et al., 1981; Korsmeyer et al., 1982). Cependant, de nombreuses exceptions sont venues en partie infirmer cette théorie du modèle ordonné, qui ne semble en fait correspondre qu'à une préférence stochastique. En particulier, il a été démontré que certains réarrangements κ pouvaient avoir lieu avant la formation d'une chaîne lourde fonctionnelle (Chen et al., 1993; Ehlich et al., 1993;

Novobrantseva et al., 1999) et que des réarrangements des gènes λ pouvaient avoir lieu en même temps, ou même avant les gènes κ . (Berg et al., 1990; Hauke et al., 1988; Liu et al., 1997; Oberdoerffer et al., 2003; Pauza et al., 1993). Le pré-BCR fournit surtout un signal prolifératif qui va permettre la multiplication des cellules (« small » pré-B) avant qu'elles n'engagent les réarrangements au niveau des loci des chaînes légères (réinduction des enzymes de recombinaison RAG1 et RAG2 mais cette fois sans expression de la TdT), poursuivant ainsi la différenciation B (Melchers et al., 1999). La question des ligands du pré-BCR est aussi un point-clé. Même si certains travaux montrent qu'un certain degré de différenciation B est possible en l'absence d'association chaîne lourde - $\lambda 5/V_{\text{préB}}$ ou en substituant aux pseudo-chaînes légères des chaînes légères normales (by-passant ainsi le stade pré-B), cette différenciation B perd en efficacité de par la diminution de la prolifération du stade pré-BI (Corcos et al., 1995; Corcos et al., 1991; Ohnishi and Melchers, 2003; Shaffer and Schlissel, 1997). La différenciation précoce se fait au contraire de façon optimale lorsque l'expression d'un pré-BCR normal (incluant « l'extra-boucle de la molécule $\lambda 5$), permet aux cellules pré-B d'interagir physiquement avec les niches des cellules stromales et d'y recevoir un signal prolifératif. Les ligands du pré-BCR exprimés à la surface des cellules stromales sont notamment des intégrines, dont la liaison au pré-BCR se fait grâce à une molécule de couplage soluble, la galectine-1 (Gauthier et al., 2002; Rossi et al., 2006). Un rôle de ligand stromal non confirmé à ce jour a aussi été évoqué pour les héparansulfate protéoglycannes (HSPGs) chez la souris (Bradl et al., 2003). Dans tous les cas, l'expression des gènes recombinés des chaînes lourdes et légères aboutit *in fine* à l'expression à la membrane de la cellule B d'une IgM composée de la chaîne lourde μ et d'une chaîne légère κ ou λ (stade B immature). Toute cellule incapable d'assembler son pré-BCR ou d'associer et de transporter à la membrane une chaîne lourde μ avec une chaîne légère sera éliminée, et la sélection des lymphocytes B implique un taux très élevé d'apoptose tout au long de leur développement. A cette sélection positive, s'ajoute un processus de sélection négative selon lequel les cellules immatures possédant des Ig membranaires spécifiques pour les antigènes du soi (autoréactifs – induisant un signal fort) seront également éliminées (de 40 à 60% des cellules) (Melchers et al., 1993). Des réarrangements secondaires produisant de nouvelles chaînes légères pourront aussi au stade B immature sauver un clone B en le dotant d'un BCR qui ne soit plus autoréactif (Hertz and Nemazee, 1997; Melamed and Nemazee, 1997; Pelanda et al., 1997; Tiegs et al., 1993). Une cellule immature conservant son autoréactivité malgré l'editing peut encore entrer en anergie (diminution de la prolifération, désensibilisation et sous-expression du BCR (Goodnow et al., 1988; Pike et al., 1982; Vilen et al., 1997) ou être éliminée par apoptose

(Hartley et al., 1993; Norvell et al., 1995). Il faut noter que si ce système de prévention de l'autoréactivité vaut pour le compartiment principal des cellules B périphériques (dites B2), un autre compartiment plus minoritaire dit B1 ou CD5+ (se localisant préférentiellement dans le péritoine et dans la zone marginale de la rate), est au contraire sélectionné positivement lors de sa maturation via l'expression de BCRs auto-réactifs (Cariappa and Pillai, 2002).

Les cellules qui survivent quittent la moelle osseuse vers les organes lymphoïdes périphériques où elles pourront subir les dernières étapes de maturation.

Par recombinaison homologue (délétion partielle ou complète de certains gènes), on a pu mettre en évidence un certain nombre de blocages à différentes étapes de la maturation B qui sont récapitulés dans la **figure 14**.

3.2 La phase dépendante des antigènes

Les cellules B immatures, qui ont quitté la moelle osseuse, passent par un stade intermédiaire, le *stade B transitionnel* durant lequel vont avoir lieu des modifications de la réponse induite par le BCR. Ce stade constitue la dernière étape avant la rencontre avec des antigènes exogènes. Les cellules B transitionnelles font donc le lien entre les cellules B immatures de la moelle osseuse et les cellules B matures périphériques. Elles représentent une étape importante de la maturation B puisque c'est à ce stade que la cellule va perdre sa sensibilité à la sélection négative par le BCR, gagner les follicules de la rate et devenir sensible aux signaux induits par les lymphocytes T (Chung et al., 2003). Loder et al., en 1999, ont été les premiers à montrer que le compartiment B immature de la rate pouvait se subdiviser en deux populations bien distinctes : les B transitionnelles de type 1 (T1) et les B transitionnels de type 2 (T2) exprimant toutes les deux fortement HSA (Loder et al., 1999). Le phénotype des cellules T1 est très proche de celui des cellules immatures de la moelle avec pas ou peu d'IgD membranaire, une forte expression d'IgM membranaire et une absence d'expression des récepteurs CD21, CD23 et de la molécule anti-apoptotique Bcl2. La population des cellules T2 est quant à elle un intermédiaire phénotypique entre les cellules T1 et les cellules matures folliculaires. Elles expriment IgD ainsi que CD21 et CD23 (marqueurs utilisés comme témoin d'activation des cellules B) (Rolink et al., 2004).

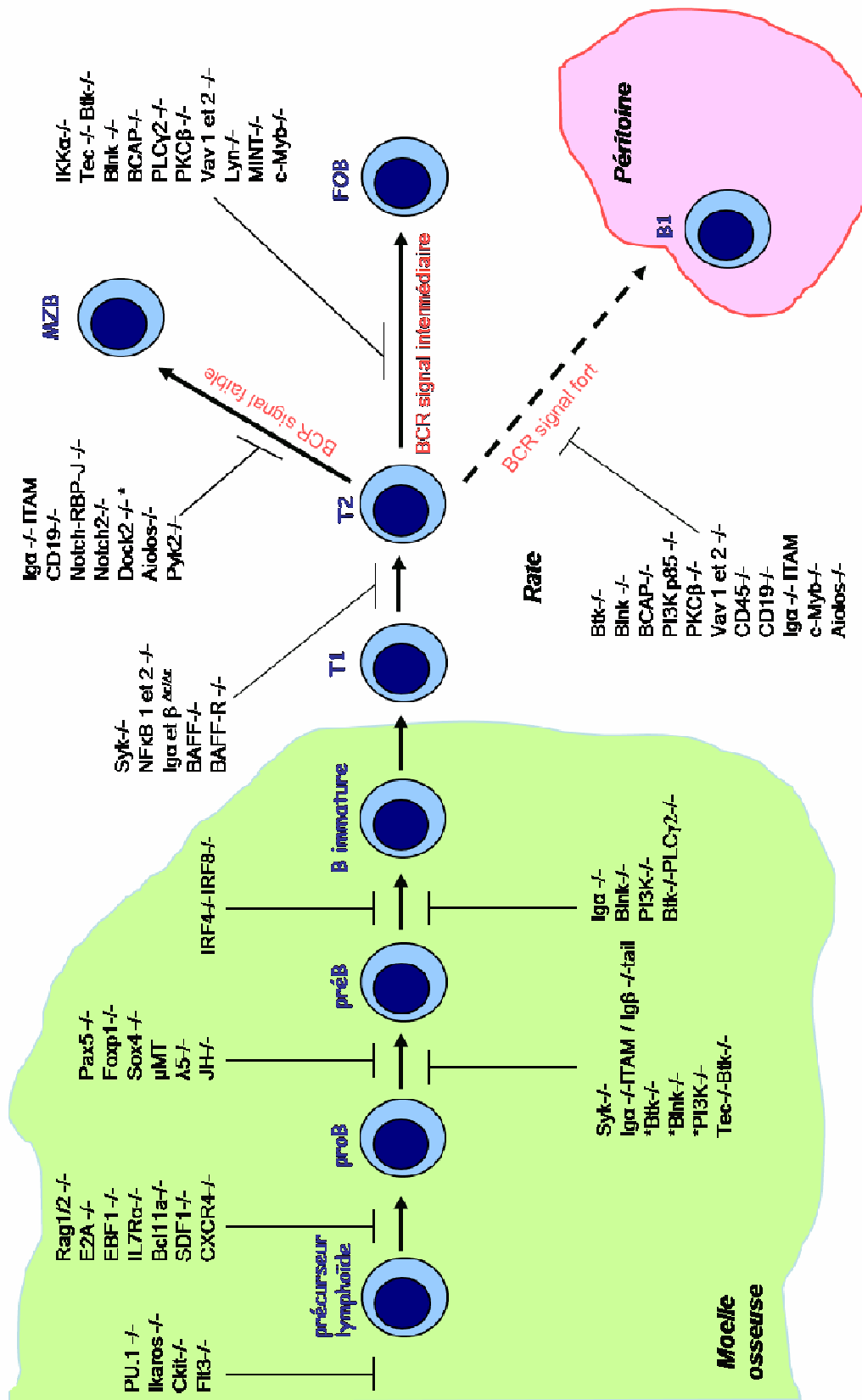


Figure 14 : Bilan des blocages partiels ou complets de la différenciation B causés par des défauts de gènes codant des facteurs de transcription mais également des protéines de la machinerie de transduction du signal

*Blocage partiel

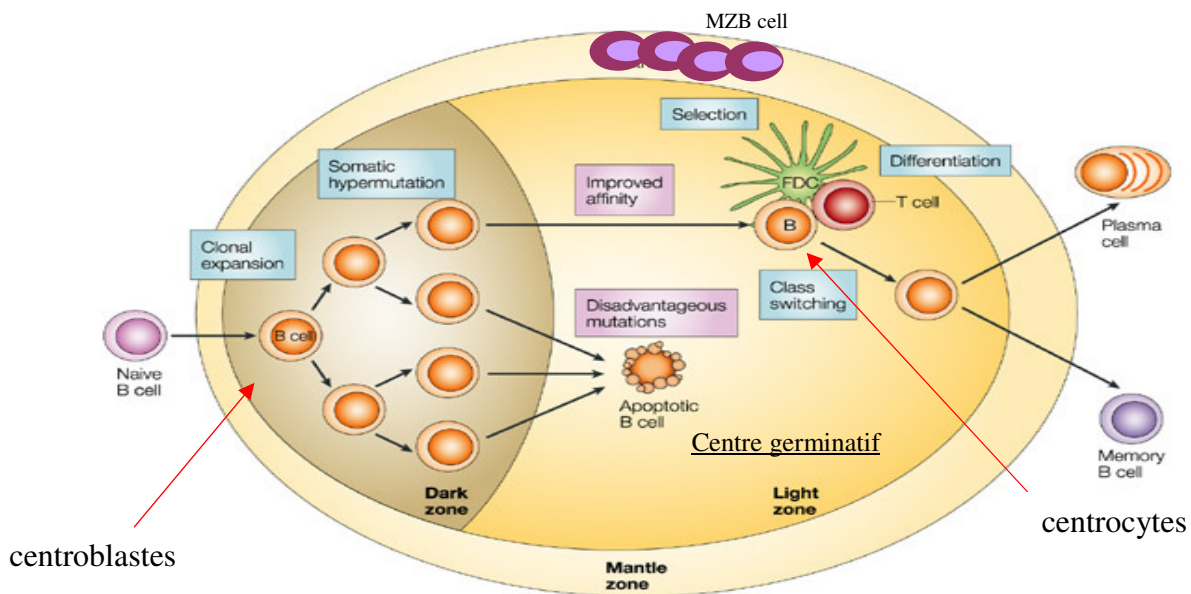
(Conley et al., 2000; schiff et al., 2000 ; Melire et Nussenzweig , 2002; Niuro et Clark , 2002; Doody et al., 2001, Nutt and Kee , 2007 ; Casola , 2007)

Au sein de la lignée B une marque distinctive de l'ensemble des cellules transitionnelles, T1 comme T2, est l'expression de CD93 (une lectine transmembranaire qui lie le facteur C1q du complément), couramment reconnue par l'anticorps monoclonal AA4.1. Allman et al., en 2001 ont subdivisé la population T2 en deux selon l'expression de l'IgM membranaire (les T2 sont IgM^{high} alors que les T3 sont IgM^{int}) (Allman et al., 2001). Cette nouvelle population T3, caractérisée tout d'abord comme transitionnelle, pourrait en fait correspondre à une population anergique indépendante (compartiment An1) qui serait maintenue dans son état anergique par la présence d'autoantigènes dans la rate (Merrell et al., 2006).

Les cellules T1 circulent dans le sang et se situent dans la partie externe des manchons lymphoïdes péri-artériolaires (PALS) de la rate tandis que les T2 sont uniquement retrouvées dans la rate aussi bien dans les PALS que dans les follicules où ont lieu la présentation des antigènes exogènes et l'activation T-dépendante des cellules B matures. A la différence des T1, les cellules T2 sont capables de proliférer suite à la stimulation par le BCR (Petro et al., 2002; Su and Rawlings, 2002) et d'intégrer les signaux de costimulation par les lymphocytes T (Chung et al., 2002). La population T1 est la cible de la sélection négative en périphérie : seulement un petit pourcentage de cellules T1 se différenciera en cellules T2 (délétion clonale et anergie). BAFF (B cell activating factor) jouerait un rôle crucial dans l'homéostasie des B périphériques. Les B transitionnels qui reçoivent un signal de BAFF via BAFF-R, sont sauvées de la mort cellulaire et peuvent se différencier pour devenir des B matures (Sasaki et al., 2004; Schiemann et al., 2001). La différenciation des cellules transitionnelles semble également être dépendantes des signaux délivrés par le BCR. L'étude de nombreux modèles de souris transgéniques où des mutations affectent la signalisation par le BCR a permis de montrer qu'une altération du signal empêche soit le passage du stade T1 au stade T2 soit le passage du stade T2 au stade B mature (**Figure 14**). Ces cellules semblent en outre pouvoir s'orienter vers plusieurs « destins » (cellules B1, B2 folliculaires ou cellules de la zone marginale). Casola et al. en 2004 ont développé la théorie de « la force du signal » (signal strength) en utilisant des souris dépourvues de BCR et qui expriment à la place la protéine de latence du virus d'Epstein Barr LMP2A. Il apparaît que des signaux faibles, intermédiaires et forts favorisent la formation de cellules B de la zone marginale, de cellules B folliculaires et de cellules B1 respectivement.

Les cellules T2 vont finir d'émigrer dans les zones centrales des follicules où vont leur être présentés des antigènes exogènes dans un micro-environnement constitué notamment par des lymphocytes T helpers (T_H) et des cellules présentatrices d'antigènes, les FDC (pour « Follicular

Dendritic Cells »). Elles deviennent des *B matures folliculaires*. Après stimulation antigénique, ces cellules B seront activées et vont initier la formation de centres germinatifs (CG).



Nature Reviews | Immunology

Figure 15 : Maturation des B périphériques au niveau des centres germinatifs

Les B folliculaires représentent 80% des cellules B de la rate murine adulte et possèdent, de part leur expression de CD62L, la capacité de coloniser les ganglions lymphatiques. Les CG apparaissent quelques jours après la stimulation antigénique et persistent de quelques jours à quelques semaines. Ils sont associés à l'expansion clonale des cellules B blastiques et sont le siège de l'hypermutation somatique (SHM pour « somatic hypermutation »), de la commutation isotypique (CSR pour « class switch recombination ») toujours dans le cadre d'une réponse T-dépendante, deux processus supplémentaires de diversification du répertoire B et de maturation de l'affinité. Ils sont également le siège 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 15**). Les centroblastes sont localisés dans la zone sombre, siège d'une prolifération massive, et sont la cible de l'hypermutation somatique. Ces cellules vont ensuite se différencier en centrocytes exprimant à leur surface des BCR potentiellement mutés. Les centrocytes sont séparés de leurs progéniteurs dans la zone claire du GC où ils seront à nouveau confrontés à l'antigène complexé à la surface des cellules dendritiques folliculaires (FDC) (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 (coopération B/T). De plus ces cellules rentrent en compétition pour une interaction la plus affine possible avec les FDC (Berek et al., 1991; Jacob et al., 1991; Kuppers et al., 1993).

Les cellules B folliculaires vont accumuler des mutations somatiques au niveau des séquences de leur domaine variable modifiant ainsi leur affinité pour l'antigène (processus d'« hypermutation somatique »). Ces cellules expriment faiblement la protéine anti-apoptotique bcl-2 et fortement le récepteur Fas (CD95) (Yoshino et al., 1994) et semblent donc destinées à mourir sauf si des signaux de survie leur sont adressés par les lymphocytes T_H (H pour Helpers) reconnaissant le même antigène (Liu and Arpin, 1997). Ainsi, si les mutations accumulées améliorent l'affinité pour l'antigène, les cellules seront sauvées et pourront proliférer avant d'entrer dans les compartiments B mémoires ou plasmocytes (Liu et al., 1991). Au contraire, si les mutations ne changent pas, voire diminuent l'affinité, ou si les interactions avec les lymphocytes T_H n'ont pas lieu (cas d'anticorps autoréactifs), ces cellules sont alors éliminées par apoptose (MacLennan, 1994).

Les cellules B mémoires, exprimant fortement le gène bcl-2, constituent un groupe minoritaire de cellules à longue durée de vie, capable de persister à l'état quiescent sans proliférer (de plusieurs mois à plusieurs dizaines d'années chez l'homme). Elles n'expriment en général plus d'IgD, ont commutées et peuvent avoir des localisations préférentielles (telles que les muqueuses pour les cellules ayant « switché » vers IgA) (Liu et al., 1995). Elles ont la faculté de répondre très rapidement à des pathogènes externes. En effet, elles peuvent présenter rapidement et efficacement l'antigène aux lymphocytes T lors d'une réponse secondaire et se différencier en plasmocytes. Cette différenciation peut se faire en dehors des centres germinatifs (Liu et al., 1991) bien que les cellules B mémoires puissent aussi recommencer de nouveaux cycles de sélection et d'hypermutation dans les centres germinatifs, permettant ainsi d'optimiser la mémoire immunitaire de l'individu (Berek and Milstein, 1988). Par ailleurs, il a été montré que des cellules B mémoires pouvaient se développer en l'absence de CG, notamment celles portant des IgM et des IgG1 dépourvues de mutations somatiques (Toyama et al., 2002).

Les plasmocytes, exprimant le récepteur de surface CD138 (syndecan-1), sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale. Ce sont de vraies usines de production et de sécrétion d'anticorps à destination de l'ensemble de l'organisme. La durée de vie de ces cellules

sécrétrices est controversée. Deux sortes de plasmocytes peuvent être générés : à durée de vie longue ou à durée de vie courte en fonction de l'antigène et des signaux reçus suite à la stimulation antigénique. Certains pourraient également naître de la transformation rapide d'une cellule B mémoire suite à une stimulation antigénique (Ochsenbein et al., 2000). La mise en place du programme de différenciation plasmocytaire est dépendante de deux facteurs de transcription : Blimp-1 et Xbp-1 (Calame et al., 2003; Lin et al., 2003). La délétion conditionnelle du gène *Prdm1* (codant Blimp-1) dans les cellules B provoque un blocage sévère de la différenciation plasmocytaire qui se traduit par un défaut de sécrétion d'Ig et par l'absence de plasmocytes de vie longue et courte (Shapiro-Shelef et al., 2003). Le mode d'action de Blimp-1 consiste à réprimer plusieurs autres facteurs de transcription indispensables à la voie B tels que Pax5 et Bcl6 (Shaffer et al., 2002) **Figure 16.** Le facteur de transcription IRF4 est également requis pour la génération de plasmocytes. Son KO conditionnel dans les B du CG montre un défaut en plasmocytes post-CG et montre également que les B mémoires sont incapables de se différencier en plasmocytes. De plus, les B des souris *IRF4*^{-/-} perdent l'expression d'AID et ne peuvent plus « switcher » (Klein et al., 2006). Benson et al. en 2007, ont montré qu'une expression forte d'IRF4 dans les cellules B des CG orienterait ces cellules vers une différenciation en plasmocytes à longue durée de vie et non pas en B mémoires (Benson et al., 2007).

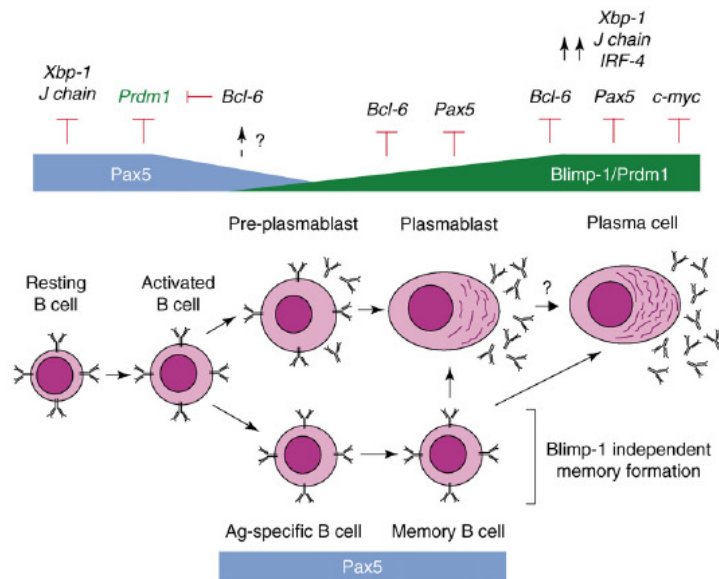


Figure 16 : BLIMP-1 contrôle la différenciation plasmocytaire

Schéma de Kallies and Nutt, 2007. Blimp-1 exprimé dès le stade pré-plasmablast va réprimer les facteurs de transcription du lignage B, Bcl6 et pax5 et permettre l'expression de Xbp-1 et IRF-4.

D'autres cellules B périphériques interviennent dans les réponses immunes T-indépendantes. Leurs origines restent encore controversées mais leur action est essentielle puisque ce sont ces cellules qui vont constituer la première ligne de défense contre les micro-organismes (Hardy, 2006) : ce sont les cellules B de la zone marginale folliculaire (MZ) de la rate et les cellules B1 présentes notamment dans la cavité péritonéale. Ces cellules B périphériques présentent l'originalité d'être positivement sélectionnées par des antigènes du soi, indiquant que des différences dans le niveau de signalisation du BCR en réponse à ces antigènes peuvent déterminer la localisation des cellules B et leur rôle en périphérie (Cariappa and Pillai, 2002). Elles sont à l'origine des autoanticorps « naturels » polyréactifs de faible affinité dont les fonctions sont multiples : élimination des débris cellulaires, transports de cytokines ou encore formation des complexes antigènes/anticorps présentés aux cellules B folliculaires par les FDC dans les centres germinatifs (Coutinho et al., 1995; Stall et al., 1996).

Les cellules B MZ expriment fortement IgM et CD21, faiblement IgD et CD23 et ne montrent chez la souris aucun signe de maturation de l'affinité, ce qui les différencie des autres populations de cellules B présentes dans la rate (transitionnelles, matures folliculaires et mémoires) (Dammers et al., 2000). Elles ne semblent pas nécessiter la présence de lymphocytes T pour être sélectionnées et activées puisqu'elles sont présentes chez les souris nues ou thymectomisées (Kumararatne and MacLennan, 1982). Elles sont aussi caractérisées par un état d'activation élevé leur permettant de répondre rapidement à un antigène T-indépendant par différenciation en cellules sécrétrices d'anticorps (Oliver et al., 1997; Oliver et al., 1999). La voie Notch et notamment Notch2 jouerait un rôle important dans la formation de cette population (Hozumi et al., 2004; Kuroda et al., 2003; Saito et al., 2003; Tanigaki et al., 2002). Il est important de signaler que la physiologie des cellules B MZ semble radicalement différente chez l'homme puisque cette fois les cellules B IgM+ IgD+ y portent majoritairement le marqueur B mémoire CD27 et expriment un BCR muté. Une partie des cellules B mémoires (CD27+) du sang périphérique humain semble d'ailleurs être un équivalent circulant de ces B MZ. A la différence des cellules B folliculaires, les B MZ humains mutent leur BCR de façon indépendante de l'interaction CD40-CD40L et ont un rôle dans la réponse aux antigènes polysaccharidiques (capsules bactériennes notamment) (Weller et al., 2005).

Les cellules B1 sont, elles, situées en dehors de tout organe lymphoïde dans les cavités péritonéales. Leur origine est controversée : il semblerait qu'elles dérivent de précurseurs issus du foie foetal mais de récentes études tendent à montrer qu'elles pourraient dériver aussi des précurseurs médullaires ou des cellules B périphériques « classiques » (B2) chez l'adulte (Arnold

et al., 2000; Chumley et al., 2000; Wortis and Berland, 2001). Elles expriment, pour la plupart, le marqueur de surface CD5 qui les différencie des autres populations de cellules B.

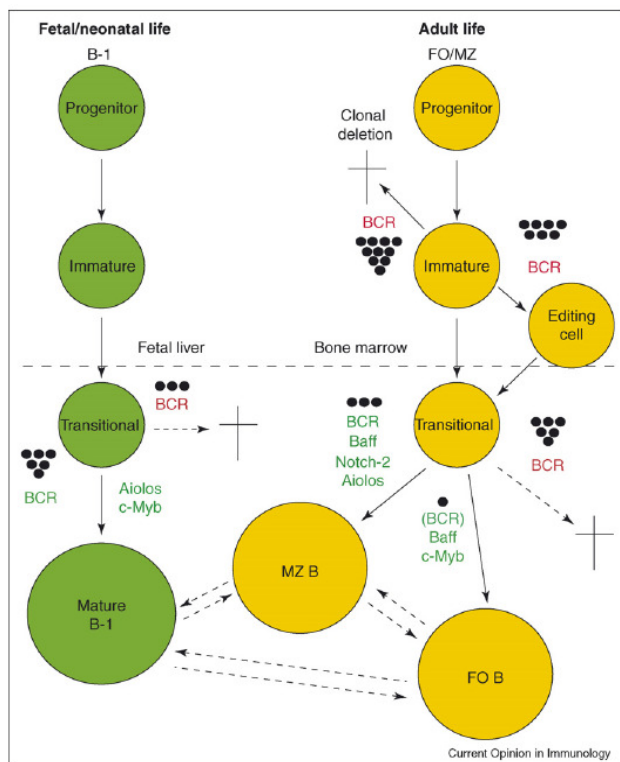


Figure 17 : Schéma récapitulatif de la maturation des B périphériques

Ce modèle proposé par Casola et al., en 2007, montre 2 voies de maturation partant de deux progéniteurs différents (foie fœtal et moelle osseuse) et aboutissant à la génération de cellules B1 dans un cas et de cellules B2/conventionnelles dans un autre (Casola, 2007).

3.3 Le mécanisme de la commutation de classe

La spécificité antigénique des Ig est déterminée par les régions variables des chaînes lourdes et des chaînes légères des Ig. Les fonctions effectrices, en revanche, dépendent des régions constantes des chaînes lourdes et varient selon les isotypes. Les IgM sont majoritairement produites au cours de la réponse primaire, alors que les IgG, IgA ou IgE sont majoritairement produites au cours d'une réponse secondaire ou tertiaire. Au cours du changement d'isotype ou commutation de classe, un même gène réarrangé VDJ (éventuellement remanié par l'hypermutation somatique) va se rapprocher d'un nouveau segment constant de classe différente par un processus de recombinaison somatique. Les cellules B matures peuvent alors exprimer et sécréter des IgG, IgA ou IgE spécifiques de l'antigène. Ce processus se révèle donc primordial pour la diversité fonctionnelle des réponses anticorps.

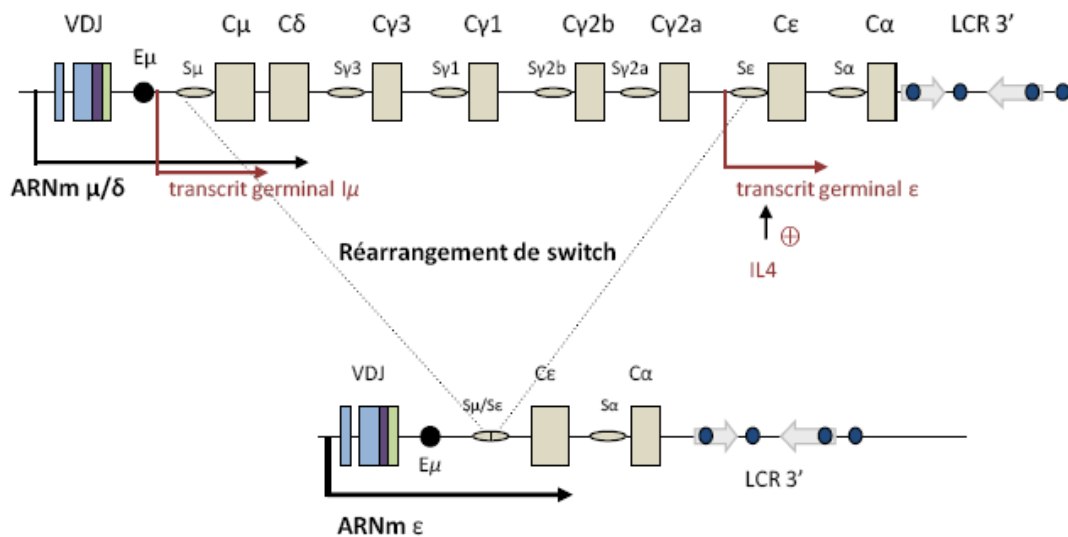


Figure 18 : Exemple de « switch » (commutation de classe) vers IgE.

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.

L'IgG est l'isotype prédominant dans le sang et la lymphe. Les différentes sous-classes d'IgG ont des fonctions effectrices différentes dues à leur capacité variable à lier les différents récepteurs Fc (Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII and Fc γ RIV), à induire l'ADCC (Antibody-Dependant cell-mediated Cytotoxicity) et/ou à activer le complément (Nimmerjahn and Ravetch, 2005). Les IgG3 jouent un rôle important dans la réponse antibactérienne et sont très efficaces dans la phagocytose. Les IgG2a sont prédominantes dans les réponses antivirales. Dans les réponses T-dépendantes, les IgG1 représentent 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 IgA mucosales sécrétées dans la lumière intestinale protégeraient l'organisme contre les virus et les bactéries à tropisme muqueux.

Les IgE sont impliquées dans la défense parasitaire, mais peuvent également médier les réactions d'hypersensibilité. Les mastocytes (tissus) et basophiles (circulation) expriment des récepteurs à haute affinité pour IgE (Fc ϵ RI) qui peuvent lier les IgE monomériques en absence d'Ag. Les Ag spécifiques induisent l'agrégation des complexes IgE-Fc ϵ R entraînant la sécrétion d'histamine impliquée dans les réactions d'hypersensibilité. Il existe en revanche une voie d'hypersensibilité indépendante d'IgE. Chez des souris délétées pour C ϵ , on note la persistance d'une réaction anaphylactique en l'absence d'IgE (Oettgen et al., 1994).

La commutation isotypique, permettant à une cellule d'exprimer une chaîne lourde différente d'IgM est un mécanisme complexe et hautement régulé. Elle cible des points chauds de recombinaisons appelés région « switch » ou S, situées en amont de tous les domaines constants à l'exception de C δ . Plusieurs éléments *cis*-régulateurs du locus IgH sont également impliqués dans le contrôle ce processus. Alors que les éléments situés les plus en 5' et notamment l'activateur transcriptionnel intronique E μ , semblent n'avoir que peu de rôle ou un rôle redondant (Perlot et al., 2005), les promoteurs germinaux situés en amont des régions switch jouent un rôle majeur et les activateurs transcriptionnels qui les contrôlent semblent pour l'essentiel regroupés en aval du locus IgH, où ils constituent la « région régulatrice 3'IgH » (éléments pour la plupart détaillés dans le chapitre 2).

a. Les régions S

Les régions S ou régions « switch » sont des sites de recombinaison composés de motifs répétés, riches en G, situés dans l'intron qui précède chacun des gènes constants, à l'exception de C δ (**Figure 18**). Elles sont composées de répétitions de courtes séquences en tandem (les pentamères GAGCT, GGGGT ou GGGCT) en aval d'un court exon I précédé de son promoteur. Les répétitions courtes peuvent elles-même s'organiser en motifs se répétant sous la forme d'unités plus longues, comme par exemple dans les régions S γ caractérisées par des motifs répétés de 49 pb. La longueur des régions S varie de 1 kb (S ϵ) à 10 kb (S γ 1) (Dunnick et al., 1993).

La recombinaison a lieu de façon imprécise entre différents sites localisés dans ou au voisinage des régions S. Les étapes de reconnaissance et de clivage des régions S 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., 2001b), et de fréquentes mutations, stigmates de l'intervention d'AID, sont retrouvées au voisinage des points de cassures (Kenter, 2003; Manis et al., 2002a; Manis et al., 2002b). 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 non répliquative ne subsiste que transitoirement sous forme d'épisome et se perd au cours de la division cellulaire, tandis que la réparation chromosomique place la région constante cible à proximité de la région VDJ.

La délétion quasi complète de S μ aboutit à un blocage sévère mais incomplet de la commutation de classe vers tous les domaines constants en aval (Khamlichi et al., 2004; Luby et al., 2001). Par contre, la délétion de S γ 1 aboutit à un blocage quasi-complet de la commutation vers IgG1 mais

pas vers les gènes constants en aval (Shinkura et al., 2003). L'inversion de la région S γ 1, diminue son efficacité en tant que cible du switch, de même que toute amputation de sa longueur et il est donc clair que ces longues séquences répétées contribuent par leur orientation, leur longueur et leur caractère répétitif à cibler les recombinaisons, sans qu'elles soient pour autant indispensables à ces recombinaisons (Zarrin et al., 2005). Le caractère GC-riche des régions switch de mammifères ne semble pas fondamental pour la mécanique du switch et on a pu leur substituer avec efficacité une région S μ AT-riche provenant de *Xenopus laevis* (Zarrin et al., 2004) au sein de laquelle le processus de recombinaison s'est révélé cibler des motifs AGCT.

b. La transcription germinale et le rôle des cytokines

Avant la commutation, les cellules B activées expriment un ou plusieurs ARN appelés transcrits germinaux codés par l'un ou l'autre gène constant. Le caractère obligatoire de cette transcription préalable au switch a permis de considérer très tôt qu'une grande partie de la régulation du switch portant sur l'accessibilité des gènes cibles, pouvait être ramenée pour l'essentiel à une régulation de la transcription germinale (Lutzker et al., 1988). Ce phénomène de transcription germinale se déroule aussi bien sur l'allèle exprimé que sur l'allèle exclu et il est fréquent que les deux allèles recombinent vers le même gène constant (Delpy et al., 2003). Tous les transcrits germinaux ont une structure analogue présentant un site d'initiation de la transcription localisé en 5' de chaque région S, appelé promoteur I. Après initiation, la transcription se poursuit à travers un exon I non traductible puis à travers la région S et les différents exons constants CH 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 (Chaudhuri and Alt, 2004; Goodman et al., 1993).

Différents modèles d'études ont mis en évidence le contrôle de la production des différents isotypes par les cytokines et différents mitogènes (Stavnezer, 2000). Pour les principaux, l'addition d'interleukine 4 (IL-4) à des cellules activées par le LPS induit la commutation de classe vers IgG1 et IgE tandis que l'addition d'interféron- γ (IFN- γ) induit la commutation vers IgG2a. Le « transforming growth factor » (TGF- β) induit quant à lui la commutation de classe 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. Le signal médié *via* CD40 induit la commutation de classe vers la majorité des isotypes.

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 ou l'activité de facteurs transcriptionnels souvent multiples et capables de former des complexes activateurs en se liant à leurs promoteurs germinaux cibles (Delphin and Stavnezer, 1995; Warren and Berton, 1995). Par exemple, la stimulation *in vitro* des cellules B par le l'IL-4 en présence de LPS induit la transcription germinale de $\gamma 1$ et ϵ par le recrutement de Stat6, NF- κ B, PU.1, BSAP(Pax5), C/EBP et AP-1 (Geha et al., 2003).

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 que non seulement leur existence mais encore leur épissage correct sont nécessaires au mécanisme de commutation isotypique. La transcription en elle-même n'est pas suffisante pour obtenir la commutation de classe, puisque le remplacement de l'exon Ie par un promoteur fort mais non inductible par l'IL4 ($E\mu$ associé au promoteur pVH) conduit à une transcription germinale forte, mais diminue cependant 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 leur remodelage chromatinien et à la transcription germinale qui lui est associée, les régions S deviendraient accessibles à des facteurs agissant en *trans* (Stavnezer-Nordgren and Sirlin, 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 (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 se liant à l'ADN simple brin et impliquée dans la réplication et la réparation) (Chaudhuri et al., 2004). **Figure 19.** De ces quatre structures, seul le modèle de la boucle R simple brin a été démontré *in vivo*. 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.

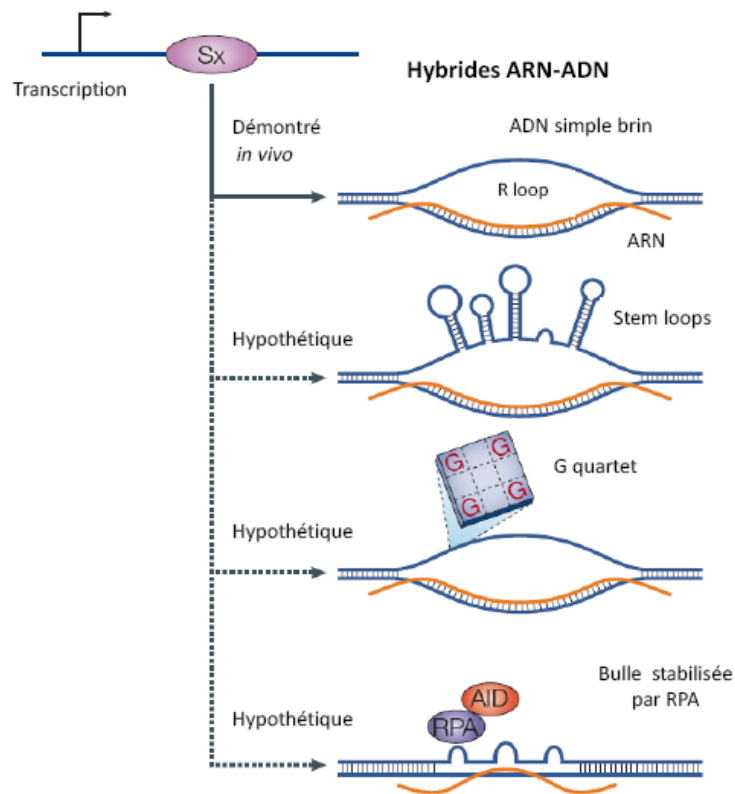


Figure 19 : Structures générées par la transcription lors de la commutation de classe.

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. Schéma de (Chaudhuri and Alt, 2004).

c. Le rôle de AID dans la commutation de classe

AID (« Activation-induced cytidine deaminase ») a été découverte par criblage soustractif de banques d'ADNc, dans une lignée B (CH12-F3) pouvant commuter *in vitro*. Cette protéine de 24kDa est exclusivement exprimée dans les centres germinatifs *in vivo*, ou après stimulation de splénocytes *in vitro* (Muramatsu et al., 1999). AID est absolument indispensable pour la SHM et la CSR. En cas de déficit en AID, le développement B est normal (expression d'IgM et d'IgD) mais on peut voir un blocage complet de la commutation de classe (souris déficientes pour tous les autres isotypes malgré induction de la transcription germinale) et de l'hypermutation somatique (Muramatsu et al., 2000; Revy 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 de l'ADN au cours de

l'hypermutation (Muramatsu et al., 1999). Ce modèle est encore aujourd'hui soutenu par l'équipe d'Honjo. Cependant, un autre courant et des données solides suggèrent plutôt qu'AID agit 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).

AID est essentiellement localisée dans le cytoplasme des cellules B, probablement pour limiter son effet mutagène. Après activation des cellules B, elle est transloquée dans le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire présent dans sa partie N-terminale puis est exportée du noyau grâce à une séquence-signal d'export localisée dans sa partie C-terminale (Ito et al., 2004; McBride et al., 2004). Le mécanisme qui régule le ratio nucléaire/cytoplasmique est inconnu mais certaines données suggèrent une corrélation avec la phosphorylation de AID par la protéine kinase A (PKA) dépendante de l'AMPc (Basu et al., 2005). L'analyse mutationnelle de AID a révélé que la protéine avait une structure bipartite au regard de son activité mutagénique. Les mutations affectant sa partie N-terminale bloquent la SHM mais pas la CSR alors que les mutations affectant sa partie C-terminale bloquent la CSR mais pas la SHM suggérant fortement l'existence de cofacteurs distincts pour la SHM et la CSR, mais leur identité reste pour l'instant inconnue (Shinkura et al., 2004).

AID semble intervenir dans l'initiation de la commutation de classe en générant une déamination des cytosines (dC) en uraciles (dU) au niveau des régions S riches en motifs AGCT considérés comme des « hot spots » de déamination, comparables à ceux de l'hypermutation somatique (Chaudhuri and Alt, 2004; Zarrin et al., 2004). La génération d'ADN simple brin au cours de la transcription germinale des régions S semble être impliquée dans le ciblage de l'action d'AID vers les régions riches en GC (**Figure 20**). A la suite de la déamination des cytosines par AID, l'action de l'uracile glycosylase (UNG) (et peut-être du complexe Msh2-Msh6) est d'éliminer la mutation entraînant ainsi la formation d'un site abasique (gap) : processus pré-requis dans le modèle de réparation des « mismatch » par la voie de réparation BER (« Base Excision Repair »). Il est à noter que les souris déficientes en UNG montrent un blocage sévère dans la commutation de classe (Rada et al., 2002; Schrader et al., 2005). APE1, endonucléase apurinic/aprimidique ayant un rôle majeur dans cette voie, 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 (Petersen et al., 2001; Reina-San-Martin et

al., 2007; Shiloh, 2003; Ward et al., 2004). La commutation de classe est complètement achevée lorsque les deux régions S fusionnent selon un processus faisant intervenir la voie NHEJ.

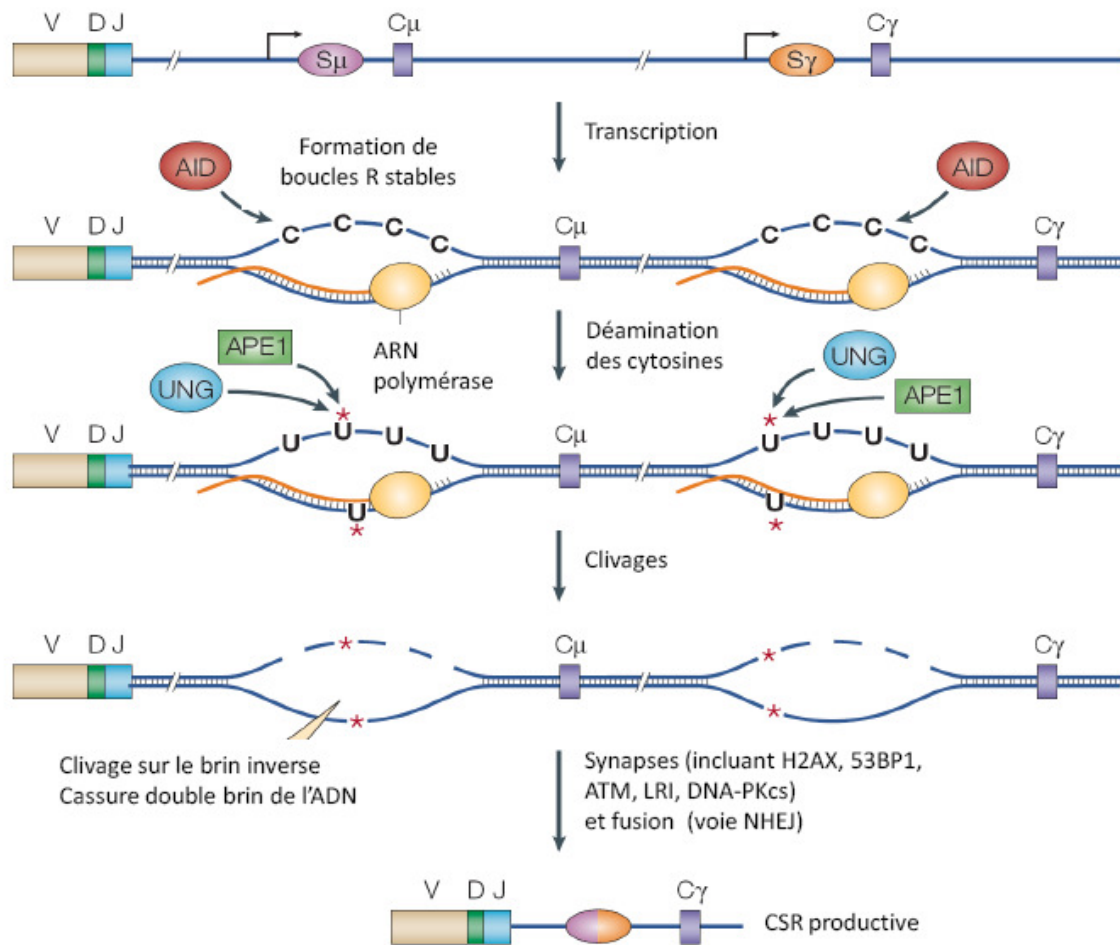


Figure 20 : Rôle de AID dans la commutation isotypique.

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. Schéma de (Chaudhuri and Alt, 2004).

IV. L'activation des lymphocytes B où la signalisation via le BCR

4.1. La signalisation par le BcR et sa modulation

La liaison de l'antigène au BCR (B cell antigen Receptor) permet l'activation de la cascade des signaux de transduction, l'internalisation et l'apprêtement ("processing") des complexes BCR/antigènes. Le complexe BCR, identifié pour la première fois en 1970 (Raff et al., 1970), est un complexe multimérique. Il comprend une immunoglobuline membranaire (mIg), structure de reconnaissance de l'antigène, un hétérodimère associé de manière stable, non covalente, $Ig\alpha$ (CD79A) et $Ig\beta$ (CD79B), élément de transduction du signal.

$Ig\alpha$ et $Ig\beta$ sont des glycoprotéines de 22kDa et de 26kDa codées respectivement par le gène mb1 (Hombach et al., 1988; Sakaguchi et al., 1988) et par le gène B29 (Hombach et al., 1990; Parkhouse, 1990), appartenant à la superfamille des immunoglobulines et composées chacune d'un domaine extracellulaire (114 et 132 acides aminés), d'un domaine transmembranaire (22 acides aminés) et d'un domaine cytoplasmique (61 et 48 acides aminés) (Wang and Clark, 2003). Le domaine extracellulaire de $Ig\alpha$ comporte deux cystéines et un tryptophane qui sont retrouvés dans les protéines de la super-famille des Ig. Ces deux cystéines semblent permettre la formation d'un pont di-sulfure intra-chaîne et une troisième cystéine serait probablement engagée dans la liaison di-sulfure interchaîne entre $Ig\alpha$ et $Ig\beta$. La protéine $Ig\beta$ est quant-à elle, dotée de 5 cystéines dont 3 seraient engagées dans des liaisons analogues à $Ig\alpha$, et les deux dernières pourraient former un autre pont di-sulfure intra-chaîne (Williams and Barclay, 1988). Tout comme les Ig de surface, les séquences murines et humaines de ces deux protéines révèlent une très grande conservation dans les domaines transmembranaires (100% pour $Ig\alpha$ et 85% pour $Ig\beta$) et intra-cytoplasmiques (87% pour $Ig\alpha$ et 90% pour $Ig\beta$) mais faible dans la partie extracellulaire (56% d'identité pour $Ig\alpha$ et 59% pour $Ig\beta$). Le pourcentage élevé d'identité de séquence des domaines transmembranaires suggère un rôle fonctionnel très important, lié à l'interaction avec les mIg et/ou avec d'autres protéines membranaires.

Cet hétérodimère est indispensable à la transduction du signal grâce à l'existence, au niveau de leurs queues cytoplasmiques, de motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) qui servent de substrat pour des protéines tyrosine kinases (PTKs). Décrit pour la première fois en 1989 (Reth, 1989), le cœur de ce motif très conservé, (D/E(X)₇D/EXXYXXI/L(X)₇YXXI/L), comprend deux tyrosines séparées par onze résidus et suivies chacune par une leucine(L) ou isoleucine (I) en position +3.

Le profil de glycosylation d'Ig α et Ig β varie en fonction du stade de différenciation. Ig α se trouve sous 3 formes différentes de glycosylation aux stades pro-B, pré-B et B mature, alors que Ig β se trouve sous une seule forme. La différence de forme pourrait également dépendre de l'isotype avec lequel elle entre en association (Batista et al., 1996; Chen et al., 1990).

L'aggrégation des BCR suite à la reconnaissance de l'antigène entraîne leur translocation dans des micro-domaines membranaires spécifiques appelés « rafts » (ou radeaux lipidiques) et la phosphorylation des ITAMs d'Ig α et d'Ig β par les PTKs. Les rafts agissent comme une plateforme de signalisation et de trafic : structure rigide qui évolue dans la « mosaïque fluide » qu'est la membrane plasmique (Simons and Toomre, 2000) et permet ainsi la stabilisation spatiale du complexe BCR. Ils sont riches en sphingolipides et cholestérol. Il a été montré que l'association du BCR avec les micro-domaines lipidiques variait au cours du développement et serait donc un mécanisme efficace dans le contrôle de la signalisation en régulant la rencontre du récepteur avec d'autres partenaires tels que les protéines kinases, le substrat PIP2... Le pré-BCR est en majorité localisé dans les micro-domaines d'où il transmet un signal de survie (Guo et al., 2000) tandis que le BCR de cellules B au repos y serait exclu (Cheng et al., 1999).

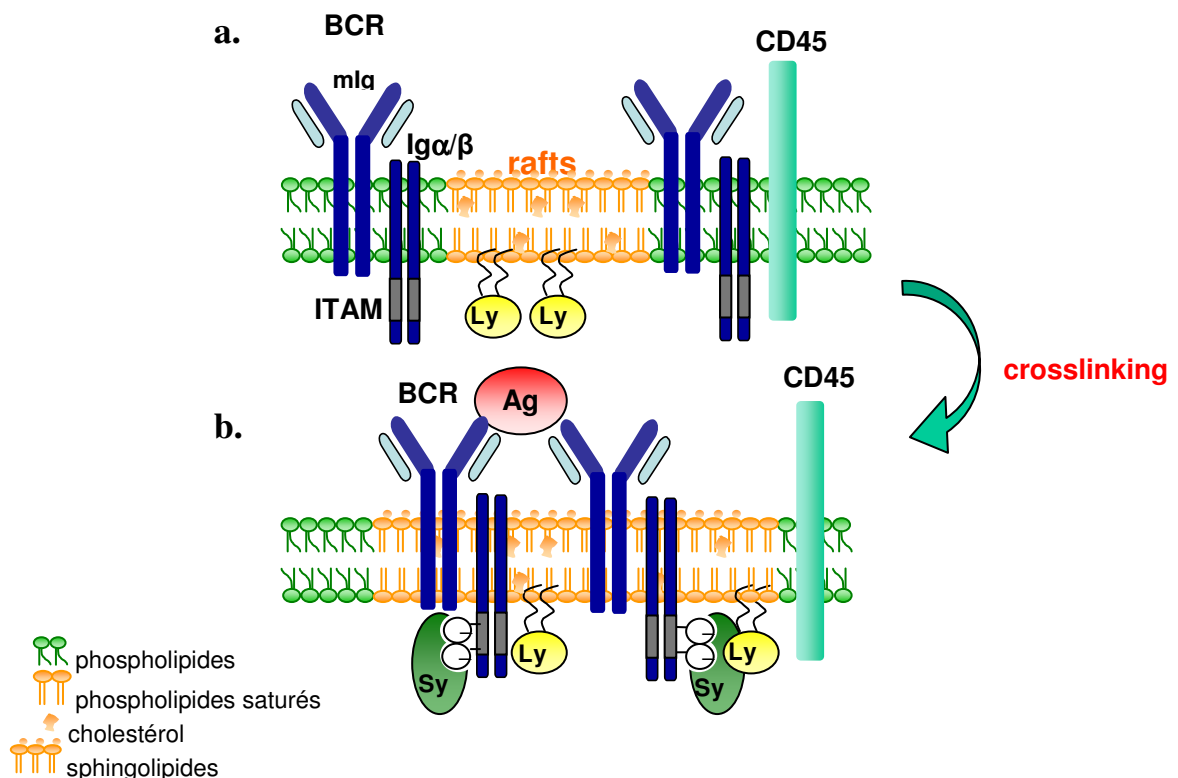


Figure 21 : Translocation des BCR dans les rafts après crosslinking avec un antigène.

La translocation du BCR après pontage antigénique, est donc la première étape dans la signalisation du BCR où une cascade d'activation de protéines tyrosines kinases peut avoir lieu. On distingue trois familles de PTKs engagées dans la transduction du signal : la famille Src (p59Fyn, p53/p56Lyn, p55Blk, p59Fyn, p56Lck), la famille Syk/ZAP 70, et la famille Tec (tel que Btk) (Burkhardt et al., 1991; Yamanashi et al., 1992).

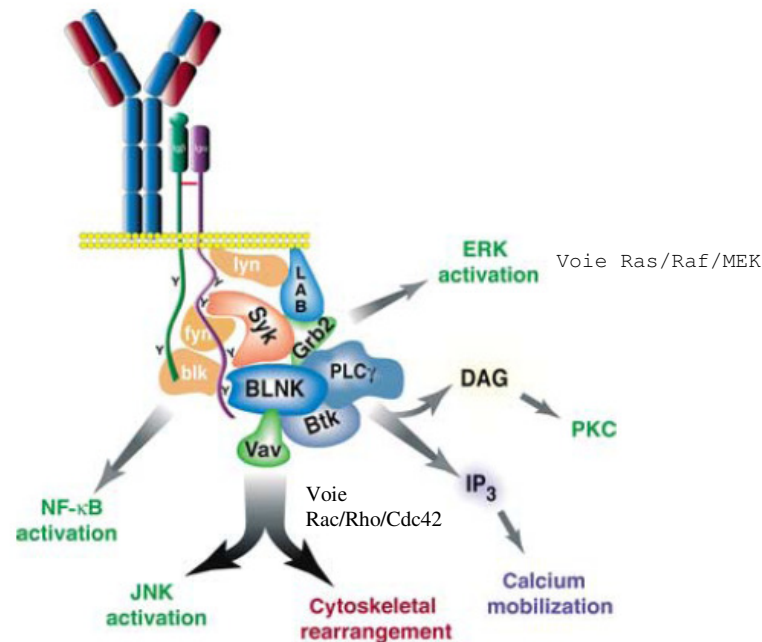
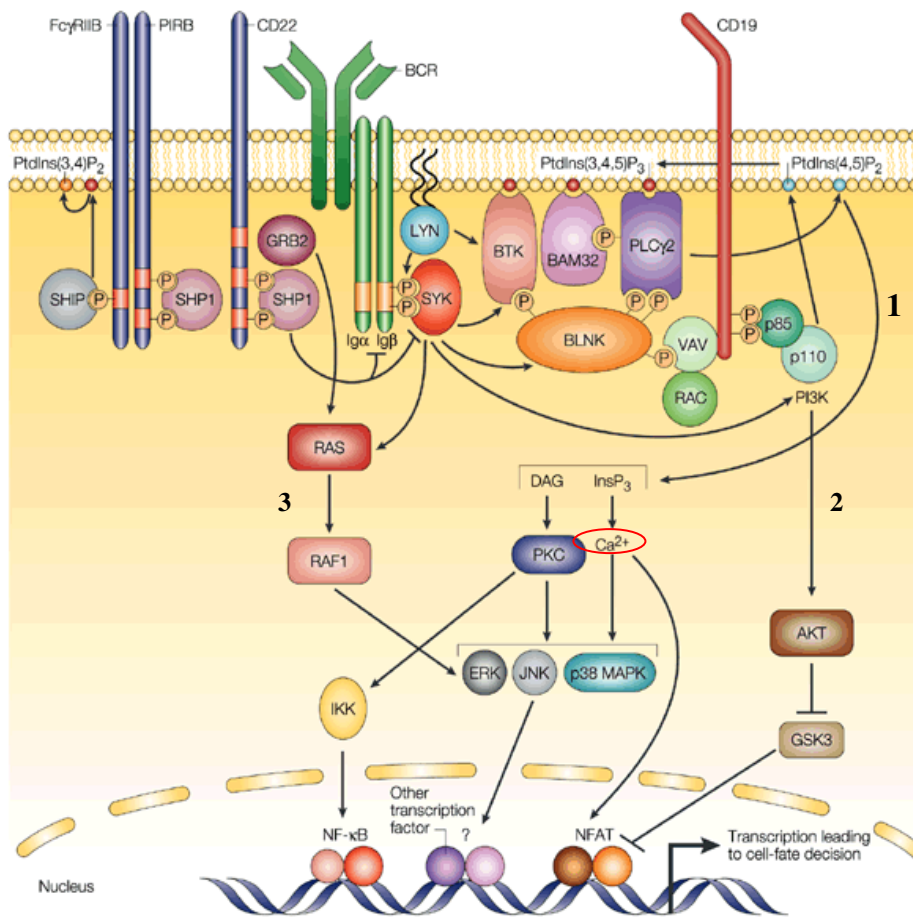


Figure 22 : Signalisation médiée par le BCR.

PKC : protein kinase C ; ERK : extracellular signal-regulated kinase ; JNK : c-Jun N-terminal protein kinase ; NF- κ B : Nuclear factor- κ B ; BTK : Bruton's tyrosine Kinase. Schéma de (Wang and Clark, 2003).

La liaison du BcR (ou "cross-linking") induit préférentiellement la phosphorylation des résidus Tyrosyl conservés des ITAMs de l'hétérodimère Iga/ β par des tyrosine kinases de la famille Src, elles-mêmes préalablement maintenues déphosphorylées (et donc activables) par le récepteur membranaire à activité phosphatase CD45. CD45 est une PTPase (Protein Tyrosine phosphatase) transmembranaire qui régule positivement la signalisation par le BcR en déphosphorylant les résidus tyrosine « inhibiteurs » de la région C-terminale des kinases Src, favorisant ainsi le passage de ces effecteurs à une conformation active (déphosphorylée), et donc permettant leur activité tyrosine kinase. Les souris CD45 $^{-/-}$ n'ont pas ou très peu de lymphocytes T périphériques matures et les lymphocytes B ont un défaut de signalisation.

Lyn a été reconnue comme la première kinase responsable de la phosphorylation des tyrosines des motifs ITAMs de l'hétérodimère Iga/ β , mais il existe une redondance fonctionnelle entre les kinases de la famille Src puisque l'absence de l'une d'entre elles n'entraîne pas de déficit majeur dans la lignée B (Chan et al., 1997; Hibbs et al., 1995).



Nature Reviews | Immunology

Figure 23 : Représentation schématique de la transduction du signal par le BCR.

Les voies de la PLCγ2 -1- (Ca²⁺ et PKC), de la PI3K -2- (Ca²⁺ et AKT) et des MAP kinases -3- (ERK, JNK, p38MAPK) sont représentées dans ce schéma. Schéma de (Niiro and Clark, 2002).

La phosphorylation des motifs ITAMs va permettre le recrutement et l'activation de Syk. Cette protéine kinase est donc également associée au BCR (ZAP 70 au TCR) et est phosphorylée sur une tyrosine conservée entre ces domaines SH2 (Src-Homology 2) et SH1 (Src-Homology 1). Elle est indispensable à la transmission du signal aux effecteurs secondaires. Il a été démontré que le recrutement et l'activation de Syk ne sont possibles que dans le cas où les deux tyrosines de l'hétérodimère Igα/β sont phosphorylées (Pao et al., 1998). Syk est essentielle à la transduction du signal qui initie le programme de maturation de la cellule B (Cornall et al., 2000). Elle permet l'augmentation du taux de calcium intracellulaire et régule en aval, l'expression de facteur de transcription important dans la maturation B. Les souris Syk^{-/-} présentent un défaut du développement B (blocage précoce au stade proB CD43^{high}, B220⁺) (Cheng et al., 1995; Turner et al., 1995). Si un rôle critique de la protéine Syk a été mis en évidence grâce à ce modèle, la présence de quelques cellules ayant dépassé le stade pro-B suggère l'implication d'autres

protéines. La protéine ZAP-70 était décrite comme étant exclusivement exprimée dans les cellules T et dans les cellules NK (Chan et al., 1992), mais son implication dans la transduction du signal des cellules B a récemment été démontrée (Schweighoffer et al., 2003). En effet, les cellules déficientes à la fois pour Syk et ZAP-70 présentent un blocage complet au stade Pré-B. ZAP-70 semble donc être exprimée pendant le développement B et interviendrait dans la transduction du signal.

Syk participe à la *voie de la PLC- γ 2*. Elle va former un complexe avec la PLC- γ 2 (phospholipase C gamma2), isoforme prédominante dans les lymphocytes B, par l'association de la tyrosine phosphorylée de Syk au domaine SH2 de la PLC- γ 2. Syk phosphoryle la Tyrosine 783 de la PLC- γ 2 ce qui va aboutir, au final, à l'augmentation de la concentration du Ca²⁺ cytosolique. La PLC- γ 2 est recrutée à la membrane cellulaire par l'interaction de son domaine PH (phospholipid-binding pleckstrin-homology domain) et réalise l'hydrolyse du PIP2 (Phosphatidyl Inositol 4-5 biphosphate) en IP3 (inosito 1-4-5 triphosphate) et DAG (diacylglycérol). L'IP3 permet la libération dans le cytosol du Ca²⁺ stocké dans les vésicules intra-cytoplasmiques. L'augmentation du niveau de la concentration intracellulaire du calcium est nécessaire à l'activation de facteurs de transcription comme NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) et NFAT (Nuclear Factor of activated T-cells). Le DAG active quant à lui, la protéine kinase C (PKC) qui peut ainsi être transloquée dans le cytoplasme où elle pourra phosphoryler les résidus sérine/thréonine d'autres protéines. Les phosphoprotéines devront agir ensuite comme des facteurs de transcription de différents gènes, tels que les oncogènes c-fos et c-myc. Les PKC semblent également participer à l'activation de la voie Ras par le BCR, que l'on décrira plus loin, puisque un inhibiteur des PKC bloque la voie de l'activation des MAP (Microtubule Associated Protein) kinases au cours de l'activation des cellules immatures (Gold et al., 1992). Les GTPases de la famille Vav jouent également un rôle crucial dans la signalisation via le BCR, notamment dans l'activation de rac1, la réorganisation du cytosquelette après l'engagement du BCR et la mobilisation du Ca²⁺ (Tedford et al., 2001). Néanmoins, l'activation de PLC- γ 2 et le flux de Ca²⁺ intracellulaire sont insuffisants pour déclencher la prolifération des lymphocytes B. L'influx de Ca²⁺ extracellulaire apparaît indispensable pour entraîner la prolifération et la synthèse de cytokines induites par le BcR. C'est sous l'action de la tyrosine kinase de la famille Tec, Btk pour Bruton agammaglobulinemia Tyrosine Kinase (Hashimoto et al., 1999) (Itk et Rlk dans les lymphocytes T), relayée par la molécule adaptatrice Blnk/SLP-65 (pour B-cell linker protein) que se fera cet influx de Ca²⁺ extracellulaire. Des mutations de Btk sont la cause de déficits

immunitaires : XLA (X-linked agammaglobulinemia ou Bruton agammaglobulinemia) chez l'homme et XID (X-linked immunodeficiency) chez la souris. Il a été également montré que Btk se liait directement à Ig α au niveau de sa queue cytoplasmique et jouerait certainement un rôle dans l'initiation de l'activation du signal (Kabak et al., 2002).

La deuxième voie de signalisation est la *voie de la PI3-Kinase*. On distingue 3 groupes dans cette famille : PI3KI, PI3KII, et PI3KIII. Le mode d'action des acteurs de cette voie reste controversé, mais son importance a été validée par l'utilisation d'inhibiteurs de PI3K (Beckwith et al., 1996). La PI3K est impliquée dans de nombreux processus biologiques cellulaires comme la différenciation, la survie, la migration ou le métabolisme. Dans le système immunitaire, des dérèglements de la signalisation de la PI3K entraînent des immunodéficiences ou leucémies et des maladies auto-immunes dans le cas d'une hyperactivation de la PI3K. Elle régule le développement et la différenciation des précurseurs de la moelle osseuse ainsi que l'activation et la prolifération des cellules B matures. Les souris déficientes pour la sous-unité régulatrice p85 α présentent des défauts profonds dans le fonctionnement des cellules B : prolifération diminuée et survie altérée avec un blocage partiel au stade pro-préB accompagné d'un nombre de B matures diminué en périphérie (Fruman et al., 1999; Suzuki et al., 2003).

Le co-récepteur CD19 semble jouer un rôle important dans cette voie. En effet, au cours de l'engagement du BCR, il peut y avoir co-ligature avec plusieurs autres récepteurs, tel que CD19, entraînant la phosphorylation de leurs parties cytoplasmiques. CD19 pourrait alors recruter la PI3K. Cette association se fait grâce au domaine SH2 de la sous-unité p85, ce qui entraîne la phosphorylation de tyrosines impliquées dans l'activation de cette protéine (Fearon and Carter, 1995). Cette protéine voit également son activité augmenter par la liaison de sa sous-unité avec le domaine SH3 des PTK, Fyn et Lyn (Yamanashi et al., 1991). Il y aurait donc formation d'un complexe multiprotéique après l'engagement du BCR, dans lequel PI3K serait liée simultanément avec CD19 et Fyn ou Lyn (DeFranco, 1997). Activée, la PI3K va phosphoryler en position 3' les phosphatidylinositol 4-5 biphosphate (PIP2) pour générer les phosphatidylinositol 3-4-5 triphosphate (PIP3). La production de PIP3 est un élément central dans la signalisation du BCR car beaucoup d'effecteurs impliqués dans la cascade, contiennent des domaines PH pouvant se lier aux PIP3. Dans la signalisation du BCR, une des cibles de la PI3K activée est la sérine/thréonine kinase Akt, également appelée protéine kinase B (PKB) (Franke et al., 1997; Klippel et al., 1997). Une fois recrutée et activée, Akt est transloquée dans le noyau. Elle favorise la survie cellulaire en régulant par phosphorylation des facteurs de transcription de « survie »

comme NF- κ B (Krappmann et al., 2001) et E2-F mais peut aussi transmettre un signal anti-apoptotique en phosphorylant Bad, protéine de la famille Bcl-2 (del Peso et al., 1997) ou en inhibant GSK-3 (glycogen synthase kinase-3). L'activation rapide et transitoire de NF- κ B en réponse à tout type de stimuli, implique généralement la phosphorylation de I κ B par le complexe kinase IKK, qui permet la libération de NF- κ B et sa translocation dans le noyau afin d'initier les transcriptions.

Une autre voie initiée après l'engagement du BCR est *la voie des MAP-kinases* qui regroupe trois membres : ERK (Extracellulaire signal-regulated kinase), JNK/SAPK (c-Jun NH2-terminal kinase) et p38 MAPK (Johnson and Lapadat, 2002). Après leur activation en cascade, ces kinases vont jouer leur rôle dans la signalisation en phosphorylant différents groupes de facteurs de transcription : Elk-1 et c-Myc (pour ERK), c-jun et ATF-2 pour activating transcription factor 2 (pour JNK) et ATF-2 et MAX (pour p38 MAPK) qui pourront se fixer sur les régions promotrices des gènes impliqués dans l'activation B.

Des enzymes ayant une activité GTPasique comme Ras et Rac-1 vont intervenir en amont de cette voie de signalisation. Par exemple, Ras contrôle la cascade Raf-1/MEK/ERK. L'activation de cette voie est essentielle au développement des cellules B matures (Iritani et al., 1997). La phosphorylation des ITAMs va permettre le recrutement indirect de la molécule adaptatrice Shc qui va former un complexe d'activation de Ras avec les molécules Grb2 et SOS : passage de la forme Ras-GDP à la forme Ras-GTP induisant ainsi la voie classique des MAP kinases.

La signalisation du BCR est donc une voie régulée par :

- la concentration de l'antigène et la force de liaison entre l'antigène et le récepteur (Casola et al., 2004; Pillai et al., 2004).
- l'auto-régulation du BCR : la phosphorylation de l'hétérodimère I α / β peut dicter la qualité et la quantité du signal (Choquet et al., 1994; Luisiri et al., 1996).
- la présence de co-récepteurs membranaires.

On peut détailler une partie des corécepteurs membranaires du BCR jouant un rôle dans la régulation de la signalisation tout en sachant que cette régulation est sans doute encore plus vaste et plus complexe...

CD19, co-récepteur, associé au BCR, favorise son entrée dans les rafts. Il contribue positivement à la signalisation induite par I α /I β en favorisant le recrutement de Lyn, Fyn, PI3K (Buhl and Cambier, 1999; Cherukuri et al., 2001) mais également de Vav. CD19 forme un

complexe avec les récepteurs CD81 et CD21, le récepteur du C3d (Otero et al., 2001). Ce complexe collabore avec le BCR pour permettre aux lymphocytes B de répondre à de faibles concentrations d'antigènes. CD45 n'est jamais recruté dans les rafts après l'engagement du BCR et son absence permet une signalisation du BCR via une phosphorylation de Lyn plus importante (Cheng et al., 1999; Katagiri et al., 1999).

CD22 est une glycoprotéine transmembranaire de type I spécifique des lymphocytes B qui lie des résidus acides sialiques liés en $\alpha 2,6$. Elle appartient à la famille des Siglecs (Sialic acid-binding Ig-like lectins). Cette molécule est exprimée très tôt au cours du développement B (transition pro-B/pré-B) et son taux d'expression à la surface des cellules B augmente durant la maturation, atteignant un maximum au stade B mature (Moyron-Quiroz et al., 2002) et disparaissant au stade plasmocyte. Ce récepteur est aussi retrouvé à la surface de lymphocytes B isolés des différents compartiments lymphoïdes. Il est associé au BCR et est connu pour réguler plutôt négativement la transduction du signal (Nitschke et al., 1997), constituant une boucle de rétro-contrôle. Il a été démontré que les 3 motifs ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs) de son domaine cytoplasmique sont phosphorylés par Lyn au niveau de leur tyrosine juste après l'engagement du BCR. Ceci permettrait l'accrochage de plusieurs protéines (contenant des domaines SH2) telles que les tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 qui auraient alors une activité inhibitrice sur le BCR (Nitschke, 2005). Les souris déficientes en CD22 répondent fortement à une stimulation du BCR par une augmentation du taux de Ca^{2+} et par une forte prolifération cellulaire (O'Keefe et al., 1996) : « hyper-réponse » des cellules B. De plus, cette réponse exagérée est associée à une production importante d'auto-anticorps (O'Keefe et al., 1999). Les substrats de SHP-1 regroupent entre autre, Syk, Blnk, CD22 lui-même (Mizuno et al., 2000). La déphosphorylation de Blnk par SHP-1 empêche le recrutement de la PLC- $\gamma 2$ et la déphosphorylation de Syk et des PTKs de la famille Src diminue leur activité et empêche la phosphorylation des motifs ITAMs du BCR. Donc en conclusion, l'activation de Lyn va jouer deux rôles : activateur, en initiant la signalisation du BCR via la phosphorylation des ITAMs de l'hétérodimère $Ig\alpha/\beta$ et inhibiteur par phosphorylation des motifs ITIMs de CD22 aboutissant au recrutement de SHP-1. Le phénotype « hyper-immun » des souris CD22 $^{-/-}$ est proche de celui observé chez les souris déficientes pour la phosphatase SHP-1 de même que l'étude de plusieurs lignées B déficientes en CD22 conforte la thèse du rôle inhibiteur de CD22. Dans ces lignées, une réponse exagérée est également observée à la suite d'une stimulation antigénique avec un flux calcique augmenté de manière significative (Nadler et al., 1997). Razi et Varki (1998) ont

démontré que CD22 était continuellement « masquée » par des ligands en *cis* présents à la surface des lymphocytes B et qu'il pouvait être « démasqué » suite à une stimulation avec un anticorps anti-IgM/CD40 (Razi and Varki, 1998). Les interactions avec les ligands en *cis* peuvent dominer d'autres interactions avec des ligands en *trans* ce qui modulerait l'activité de CD22. La structure sialoside terminale reconnue par CD22 est synthétisée *in vivo* par l'enzyme ST6GalI (sialyltransférase). Les souris déficientes en ST6GalI suggèrent un rôle complexe ou double de CD22 puisqu'elles ont une immunodépression B (après immunisation avec des antigènes T-dépendants ou T-indépendants), présentent de faibles taux sériques d'IgM, et une prolifération B diminuée (Collins et al., 2002), alors que le double KO CD22/ST6gal1 a montré une restauration de la réponse B (flux calcique et prolifération après pontage du BCR) (Collins et al., 2006b). CD22 est localisé préférentiellement au niveau des domaines riches en clathrine et est exclu des rafts après activation et translocation du BCR mais, se rapprocherait du BCR (pour jouer son rôle de régulateur négatif) lors de la fusion rafts avec les domaines riches en clathrine pour l'internalisation (Collins et al., 2006a). Il a été montré que dans les souris ST6Gal1^{-/-}, CD22 était associé avec des IgM de surface dans les B au repos. On peut donc suggérer que la suppression du signal B dans les souris ST6Gal1^{-/-} est médiée par une colocalisation ou un rapprochement de CD22 avec le BCR. Le domaine lectine de CD22 et sa liaison à des ligands glycosylés ne semblent donc pas à ce jour être clairement associés à sa fonction inhibitrice de l'activation (Poe et al., 2004).

Le récepteur de faible affinité pour les fragments Fc des IgG, appelé FcγRIIB ou CD32 peut également exercer un effet négatif sur la signalisation du BCR et inhibe la prolifération. De façon similaire à CD22, le signal inhibiteur est assuré par Lyn qui va également phosphoryler les motifs ITIMs de FcγRIIB favorisant le recrutement des tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2. Ces dernières agissent directement en hydrolysant les PIP3 en PIP2 ou indirectement en déphosphorylant CD19 bloquant le recrutement et l'activation de la PI3K (Fong et al., 2000; Hippen et al., 1997).

Le récepteur membranaire CD40, quant à lui, appartient à la famille des récepteurs de TNF. Il induit un signal mitogénique par interaction avec son ligand CD40L (CD154) exprimé par les lymphocytes T activés.

Dernièrement, un nouveau récepteur membranaire inhibiteur spécifique des cellules B1 a été caractérisé (Hoffmann et al., 2007). Siglec-G (orthologue de la siglec-10 humaine) est un membre de la famille des siglec tout comme CD22 mais plutôt relié à la sous-famille de CD33

(siglec3). Siglec-G ne serait exprimé que dans les cellules B avec une plus forte expression dans les cellules B1. Les souris Siglec-G^{-/-} présentent une expansion du compartiment B1 dans la cavité péritonéale, une plus forte mobilisation du calcium intracellulaire après pontage avec un anti-IgM dans les cellules B1 et un fort taux d'IgM sérique.

CD72 est également un co-récepteur membranaire inhibiteur du BCR, du fait de la présence d'un motif ITIM dans son domaine cytoplasmique. En réponse à une stimulation antigénique, CD72 régulerait négativement toute la voie de transduction du signal en aval du BCR incluant NF-AT, NF- κ B, ERK, JNK, MAPK mais aussi AKT ce qui aboutirait à un arrêt du cycle cellulaire et à la mort des cellules primaires B matures (Li et al., 2006).

Les mécanismes de transduction du signal semblent être partagés par les récepteurs pré-B et B compte tenu des différents blocages démontrés dans les souris déficientes en Syk, Btk, Blnk, PI3K, Lyn, CD19.... récapitulés dans la Figure 14 du chapitre II.

4.2. La signalisation en fonction des différents isotypes du BCR

Quelqu'en soit l'isotype, la présence d'un BCR à la membrane du lymphocyte B est indispensable à sa survie (Lam et al., 1997). La signalisation *via* le BCR ne se limite cependant pas à la survie mais contrôle au contraire de multiples choix (notamment entre apoptose, anergie, prolifération et différenciation) tout au long de l'ontogénie B. En contraste avec cette complexité et cette variété des choix cellulaires, la description d'une structure univoque du BCR, associant toujours une molécule d'immunoglobuline membranaire à un hétérodimère Ig α /Ig β , et l'identification des motifs de signalisation ITAM portés par les régions intracellulaires de ces deux peptides (Venkitaraman, Reth, etc...) pourraient donner à penser que toutes les immunoglobulines membranaires transduisent le même type de signal « limité » à une signalisation α/β lors de leur pontage par un ligand. Une comparaison des différentes classes de chaînes lourdes entre elles et au cours de l'évolution suggère cependant que la structure des trois domaines (extra-cellulaire / transmembranaire et intra-cellulaire) de l'immunoglobuline elle-même pourrait moduler cette signalisation.

Human Mouse			
M60193	, IGHAI	(G) SCSVADWQMPPPYVWLPLPQETLEETIPGANLMPPTTITFLFLLSLFYSTALTVTIS	VRGPSGNREGPQY
M60194	, IGHAI2	(G) ---C	-----K
K00691	, IGHA	(E) R-E-LS--L-QSQDI--A-S	----F-SK-V----
X57331	, IGHM	(E) GEVSADDEEGHENLWATASTFVLEFLLSLFYSTVITLTK	VK
V00816	, IGHM	(E) ---N-E	-----
K02881	, IGHD	(Y) LAMTPLLPSKDNSSDDYTTDDWGS--T-L--VA--F-T-L--GL--FI	----
J00450	, IGHD	(G) IVNTIQHSCLMDEQSDSYMDLEENG--P-MC--VA--L-T-L--GF--FI	----
X63693	, IGHE	(E) LDVCFEEAEGE..APWTTWGLGIFVALEFLLSVSYSAALTIILM	VQRF LSATRQGRPQTSLDYINVLQPHA
X03624	, IGHE	(E) LDLLQ-L-I-V----ELEE--SI-V-IT-----TV-V-K	KWVW--TPM-DT----FQ--A-I--TR-
X52847	, IGHG1	(E) LQLEESCAFAQDGLDGLWTTITITITLLELLSVCSAIVTEFK	VKWI FSSWDLKQTLIP DYNMIGOGA
AB006775	, IGHG2	(E) -----L	-----V-----R
D78345	, IGHG3	(E) -----	-----
J00454	, IGHG1	(G) --D-T	--E--LV--E-K--AP
J00471	, IGHG2A	(G) -D-DDV	--E--K-S
J00462	, IGHG2B	(G) -D-DDI	--E--K-S
X00915	, IGHG3	(E) -E-NET	--QV--A
		CONNECTING-REGION	---CYTOPLASMIC-REGION
			M2
			M1


(-) = identité au sein d'un isotype
 () = gap
 Conservé (entre isotypes)
 Semi-conservé

Figure 24 : Comparaison des régions spécifiques aux mIg


La partie transmembranaire des immunoglobulines membranaires est très conservée au cours de l'évolution, ce qui témoigne de son importance fonctionnelle (Bensmana and Lefranc, 1990; Rogers and Wall, 1984). Elle est quasiment identique entre la souris, le lapin, et l'homme (**Figure 24**). Cette conservation se retrouve également entre les différents isotypes (Rogers and Wall, 1984; Yamawaki-Kataoka et al., 1982) et il semble donc vraisemblable que ce domaine transmembranaire ait une fonction unique d'une espèce à l'autre et d'un isotype à l'autre. Sur les 25 acides aminés composant le domaine transmembranaire, 10 sont des résidus Sérine/Thréonine ou Tyrosine. Ces résidus hydrophiles sont impliqués dans l'interaction avec les domaines transmembranaires d'autres molécules, notamment l'hétérodimère Iga/Igβ.

À l'inverse, une importante variabilité inter-isotypes, suggestive de variations fonctionnelles, apparaît au niveau des domaines intra-cytoplasmiques. Leur taille varie en fonction des isotypes : IgM et IgD comptent seulement trois résidus dans cette partie, IgA 14, IgG et IgE en comptent 28. La taille des isotypes commutés, nettement plus importante, peut donc suggérer que cette queue intra-cellulaire serait d'une façon ou d'une autre gênante pendant le développement précoce de la cellule B et serait donc absente des deux isotypes qui s'expriment à ces stades précoces. De plus, on note la présence d'une tyrosine conservée dans un motif commun à γ et ε.

IgM	--- VTLF	KVK
IgD	--- VTFI	KVK
IgG1	--- LTVT	KVKWIFSSVVELKQTLVPEYKNMIGQAP
IgG2a	--- LTVT	KVKWIFSSVVELKQKISPDYRNMIGOGA
IgG2b	--- VTLF	KVKWIFSSVVELKQKISPDYRNMIGOGA
IgG3	--- VTLF	KVKWIFSSVQVKQTAIPDYRNMIGOGA
IgA	--- LTVT	TVRGPFGSKEVPQY
IgE	--- LTVT	KVKWVLS TPMQDTPQTFQDYANILQTRA



domaines transmembranaires



domaines cytoplasmiques

Figure 25 : Séquences des domaines cytoplasmiques.

Au cours du développement B, le premier isotype à être exprimé est l'IgM. Le domaine cytoplasmique de cet isotype, ainsi que celui d'IgD est court et n'est composé que de 3 aa. IgM et IgD sont donc entièrement dépendantes de l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ pour assurer les fonctions de transduction du signal. L'intérêt pour des cellules matures au repos (resting B cells) d'exprimer à la fois deux isotypes différents de même spécificité antigénique, IgM et IgD, n'est pas encore bien compris. Comme tous les isotypes, le cross-linking d'IgM et d'IgD entraîne l'activation des PTK et la phosphorylation de leurs substrats. Mais on sait que l'intensité du signal d'activation est dépendante de l'isotype. La réponse médiée *via* IgD est plus intense et plus durable que celle médiée *via* IgM et cette différence serait due à son extrémité C-proximale ainsi qu'à un profil de phosphorylation différent (Kim and Reth, 1995). La similitude de leurs domaines cytoplasmiques leur permet de se remplacer l'un l'autre. Des souris déficientes pour IgM (délétion de $C\mu$ et de l'intron μ - δ) présentent un développement B quasi-normal avec expression membranaire et sécrétée d'IgD. Les différents compartiments B de la moelle et des organes lymphoïdes secondaires (compartiments B conventionnels - B2) sont normaux. On note une légère différence dans le péritoine où le nombre de cellules B1 (B220+ CD5+) est diminué dans les souris IgM-/- par rapport aux souris WT. Après stimulation antigénique (T-dépendante ou T-indépendante), il y a formation de centres germinatifs, commutation de classe et réponse spécifique à l'antigène. La seule anomalie rapportée est un retard des réponses antigène-spécifiques. IgD est donc capable de se substituer en grande partie à IgM (Lutz et al., 1998). C'est en fait l'expression conjointe d'IgM et d'IgD qui semble présenter un certain degré de redondance non indispensable aux réponses immunes mais capable de les optimiser. En effet et réciproquement, les souris déficientes pour IgD (Roes and Rajewsky, 1993), ont un nombre normal de cellules B (conventionnels B2 ou les B1), une expression membranaire des deux récepteurs CD23 et CD22 (marqueurs d'activation) et une réponse quasiment aussi efficace que chez les souris sauvages aux antigènes T-dépendants ou T-indépendants. Par contre, les IgD-/- ont un retard dans la maturation d'affinité après stimulation avec un Ag T-dépendant. IgD semblerait être important pour accélérer, optimiser le recrutement de cellules B hautement spécifiques dans les étapes précoces d'une réponse primaire T-dépendante. En conclusion, l'expression précoce de μ ou de δ est suffisante (mais non optimale) pour induire le développement B. La formation du pré-BCR semble possible que ce soit avec la chaîne μ ou avec la chaîne δ . Ceci est certainement dû à la présence du court domaine cytoplasmique identique que ce soit pour IgM ou IgD. IgM comme IgD peut médier l'activation (Sieckmann et al., 1982), et les deux récepteurs semblent transduire le signal par le même mécanisme (Cambier et al., 1987).

L'absence conjointe de μ et δ aboutit à un phénotype bien plus délétère pour la lignée B. Elle est observée chez les souris μ MT où un codon stop (suivi d'une cassette NéoR) a été inséré dans le premier exon de membrane μ M1 de $C\mu$ (Kitamura et al., 1991). Ces souris présentent lorsqu'elles sont sur fond génétique mixte C57Bl6/129 un blocage complet au stade préB. Aucune expression membranaire d'IgM et d'IgD n'est détectée. Il n'y a pas de B matures, de plasmocytes ni d'Ig dans le sérum. L'étude des réarrangements des chaînes lourdes a montré que de nombreuses cellules possédaient des réarrangements VDJ productifs sur les deux allèles et que les cellules B sécrétrices d'anticorps issues d'animaux hétérozygotes exprimaient deux chaînes lourdes (Kitamura and Rajewsky, 1992). Une étude plus approfondie de ces animaux a en fait permis de montrer qu'au bout de plusieurs mois, ils finissaient par peupler leur tractus digestifs de cellules commutées vers la synthèse d'IgA, qui avaient pu quitter la moelle osseuse sous forme de progéniteurs B et bénéficier ensuite d'un milieu cytokinique propice à la commutation de classe IgA pour récupérer de cette façon l'expression d'un BCR fonctionnel (Macpherson et al., 2001). Au-delà, Hasan et al en 2002 puis Orinska et al, en 2002, ont montré, chez les souris μ MT sur fond génétique BALB/c, la présence d'une petite population B à IgG, IgA ou IgE de membrane, capable de reconnaître spécifiquement des antigènes et de se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (Hasan et al., 2002; Orinska et al., 2002). Les auteurs ont émis l'hypothèse qu'une petite partie des précurseurs μ -/- s'échappait de la moelle (en échappant à la sélection « positive » pour l'expression d'un BCR fonctionnel) et pouvait switcher en périphérie vers les différents isotypes (avec le risque que ce chemin alternatif de différenciation ne laisse émerger des clones auto-réactifs potentiellement responsables de maladies auto-immunes...).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 3, lors d'une réponse secondaire, la commutation de classe permet l'expression d'un nouvel isotype chez la souris : IgG3, IgG1, IgG2b, IgG2a, IgE ou IgA. La taille des domaines cytoplasmiques de ces isotypes est plus grande que celle d'IgM et d'IgD et comporte notamment une tyrosine conservée. Sans que son rôle dans un BCR complet assemblé ne soit clarifié, un motif commun à toutes les IgG et aux IgE a pu être défini autour de cette tyrosine (motif Tyr-X-X-Met/Ile) comme jouant un rôle dans l'internalisation du BCR IgG en l'absence d'association à $Ig\alpha/Ig\beta$ (Knight et al., 1997; Weiser et al., 1997). Le rôle de ces domaines cytoplasmiques et leur degré de dépendance vis-à-vis de l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ sont mal connus mais on sait que tous les isotypes sont normalement exprimés à la surface de la cellule en association avec l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$, même si une stabilité du récepteur

membranaire s'avère possible expérimentalement pour les IgG en absence de l'hétérodimère (Abney et al., 1978; Knight et al., 1997; Venkitaraman et al., 1991; Weiser et al., 1994).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons voulu savoir si un BCR commuté à IgA ou à IgE pouvait permettre un développement B normal chez la souris, ainsi qu'une réponse spécifique à l'antigène. Avant d'aborder la partie plus expérimentale de mon travail, je vais vous détailler dans ce chapitre, les différents modèles de souris transgéniques (KO, KI et transgénèse) déjà établis dans le but de substituer à l'expression d'un BCR normal IgM/IgD celle d'un BCR muté, commuté ou pas.

Roth et al., en 1993, ont montré qu'une chaîne lourde transgénique $\gamma 2b$ bloquait partiellement le réarrangement et l'expression de la chaîne μ endogène mais ne pouvait ensuite se substituer à cette chaîne μ . Les souris porteuses du transgène $\gamma 2b$ présentent donc un déficit en cellules B. Les jeunes souris n'ont pratiquement pas de cellules B. A 4 semaines, les souris ont environ 10% de B dans la rate et n'arrivent à accumuler un nombre normal de cellules B qu'à partir de 16 semaines. Toutes les cellules B qui se développent dans ces conditions expriment la chaîne μ endogène (comme c'est le cas dans les souris transgéniques human $\gamma 1$ qui n'ont pas de cellules B exprimant uniquement le transgène $\gamma 1$ (Yamamura et al., 1986)). $\gamma 2b$ ne peut donc pas promouvoir la maturation B et ceci ne serait pas dû à un effet toxique du transgène puisqu'un croisement avec des souris transgéniques μ restaurerait la maturation B et un croisement avec les souris μ -membrane KO, ne restaurerait pas le compartiment B. L'expression d'IgG2b est retrouvée dès les stades précoces du développement et induirait un fort « feed-back » négatif sur l'expression des gènes des chaînes lourdes endogènes (Denis et al., 1990; Roth et al., 1993; Shen et al., 1999). Une fois ce stade dépassé, le rôle anti-apoptotique d'IgM ainsi que le signal de différenciation cellulaire ne pourraient donc être assurés par cette chaîne $\gamma 2b$ transgénique. Ces différents résultats ont été montrés dans plusieurs lignées transgéniques fondatrices différentes, porteuses du même transgène. Une seule lignée transgénique (« C line »), exprimant le même transgène $\gamma 2b$, permettrait un développement normal après croisement avec les souris μ -membrane KO). Le site d'intégration et/ou le niveau d'expression du transgène semblent donc moduler ce phénotype. On ne peut pas exclure non plus dans ces expériences de transgénèse, un rôle de la région variable, la restriction du répertoire à un VHDJH particulier pouvant peut-être avoir des effets imprévisibles sur la maturation B. Mais si la maturation B dans ces souris (« C line ») ne nécessite pas l'expression d'IgM, elle semble dépendante de l'expression de la chaîne $\lambda 5$ en association avec un facteur inconnu (Kurtz et al., 1997; Roth et al., 1995).

Certains auteurs (Achatz et al., 1997; Kaisho et al., 1997; Martin and Goodnow, 2002) ont suggéré l'implication de certains domaines cytoplasmiques d'Ig commutées dans la mémoire immunologique. Achatz et al. en 1997 ont établi deux lignées de souris différentes portant des mutations au niveau des domaines constant ϵ . La lignée $\Delta M1M2$ est déléetée des domaines transmembranaires et cytoplasmiques d'IgE alors que la lignée $KVK\Delta tail$ est quant à elle déléetée du domaine cytoplasmique ϵ et a, à la place, le domaine cytoplasmique d'IgM/d'IgD « KVK ». Dans les deux cas la réponse spécifique après immunisation est fortement compromise. En effet, la sécrétion d'IgE spécifique est négligeable dans les souris sans domaine transmembranaire/cytoplasmique ϵ . Lorsque seul le domaine cytoplasmique est absent, la production d'IgE sérique est diminuée de moitié. On observe une nette diminution de la réponse secondaire à l'Ag chez ces souris. Cette baisse de production d'IgE sérique est le résultat d'une baisse de l'activité biologique associée à l'absence du domaine transmembranaire/cytoplasmique d'IgE et non à un défaut de la commutation isotypique vers IgE.

Une autre étude (Kaisho et al., 1997) s'est intéressée au domaine cytoplasmique d'IgG1. A partir de lignées de souris où le gène $\gamma 1$ a été amputé des exons codant pour le domaine d'ancrage membranaire de l'IgG1, elle montre la dépendance de l'expression membranaire de l'Ig pour obtenir une réponse primaire et secondaire IgG1. Ces souris sont naturellement incapables de produire des cellules B mémoires $IgG1^+$. Comme pour les IgE, il est donc établi que le passage par un stade d'expression membranaire de l'IgG1 est indispensable pour la production efficace de plasmocytes sécréteurs de cette IgG1, en particulier en réponse secondaire.

Puisque, grâce à la commutation de classe, les cellules B vont exprimées un BCR commuté à Ig contenant une queue intra-cytoplasmique que les cellules naïves ne possèdent pas (IgM), la question qui reste en suspens est celle d'un rôle régulateur spécifique, modifiant le « destin » des cellules commutées, pour cette région additionnelle du BCR commuté.

Cette question a d'abord été abordée par l'étude de trois lignées de souris transgéniques exprimant des BCR spécifiques pour un même antigène (HEL : Hen-Egg Lysozyme), et mettant en avant l'implication du domaine cytoplasmique d'IgG1 dans le développement B et dans la mémoire immunologique. Sur ces 3 lignées exprimant une même région variable, une exprime le transgène IgM, une autre le transgène IgG1, et une troisième un récepteur chimérique dont la partie extracellulaire est celle de l'IgM et les parties transmembranaires et cytoplasmiques, celles d'IgG1. Il est à noter qu'une chaîne légère anti-HEL kappa a également été co-transfectée. En croisant ces différentes lignées transgéniques (comportant de faibles nombres de copies du transgène) avec des souris $RAG2^{-/-}$, comme ça a déjà été réalisé pour de simples transgènes

IgM/IgD (Brink et al., 1992; Spanopoulou et al., 1994), dans les 3 cas, il y a restauration du développement B et maturation B complète (population mature CD21+ en périphérie). Dans ce cas, IgG1 pourrait donc se substituer à IgM non seulement pour médier l'exclusion allélique (pas ou peu de cellules co-exprimant IgM et IgG1) mais aussi pour assurer les signaux de maturation des cellules B (Pogue and Goodnow, 2000). De plus, il apparaît que, dans ce cas, ce transgène IgG1 anti-HEL *via* son domaine cytoplasmique, permettrait d'augmenter significativement l'expansion clonale, la production d'Ac ainsi que le nombre de plasmocytes au cours d'une réponse T-dépendante. Le domaine cytoplasmique d'IgG1 interviendrait certainement dans la survie des cellules au cours des divisions cellulaires successives. Les auteurs suggèrent que pour obtenir une réponse secondaire efficace, la présence de quelques cellules spécifiques de l'antigène et exprimant de l'IgG membranaire suffit (Martin and Goodnow, 2002). Après initiation et transduction du signal, l'activation doit cesser. Le signal médié par IgM est régulé négativement, en partie par le co-récepteur inhibiteur CD22 comme nous l'avons vu dans le sous-chapitre ci-dessus. La présence d'un BCR à IgG n'induirait pas la phosphorylation des motifs ITIMs de CD22, ne permettrait donc pas le recrutement et l'activation de la phosphatase SHP-1 et donc l'inactivation de protéines de signalisation. La queue cytoplasmique d'IgG serait donc responsable à la fois de l'inhibition du signal médié *via* CD22 et de l'augmentation de la transduction du signal observée dans les cellules IgG⁺. Ce qui a amené à proposer le modèle selon lequel IgG serait indépendante du rétro-contrôle inhibiteur du signal par la phosphorylation de CD22 afin de rendre l'IgG membranaire plus sensible à la stimulation antigénique, et obtenir une réponse secondaire plus forte que celle obtenue avec IgM (Wakabayashi et al., 2002). Cette hypothèse très séduisante a conduit à proposer l'existence de 2 catégories de BCR : un BCR « affecteur » IgM exprimé précocément et très efficace pour la mise en place du répertoire, la sélection négative et la maturation précoce de la lignée B, et un BCR « effecteur » (notamment IgG) hyper-excitabile et capable de contribuer à la forte réactivité du système immunitaire et à la génération rapide de cellules sécrétrices d'anticorps de haute affinité lors des réponses secondaires à l'antigène (Manser, 2002).

Sato et al., (2007) ont également montré, en établissant différents transfectants exprimant chacun un BCR commuté (IgM, IgG, IgA et IgE) que, comme IgG, après pontage du BCR-IgE, il y avait augmentation du taux de calcium intracellulaire associée à une plus forte phosphorylation de ERK, évènements qui ne sont pas retrouvés après pontage d'un BCR à IgA ou IgM. Ils ont également montré que CD22 jouerait son rôle de co-récepteur membranaire inhibiteur du signal de prolifération, d'une manière isotype -dépendant. Il régulerait le signal médié par un BCR IgA

alors qu'il n'aurait pas d'effet inhibiteur sur un BCR IgE, du à une mauvaise association de CD22 avec la queue cytoplasmique de l'IgE, générant ainsi une augmentation de signal. Par contre, ils montrent que CD72 a un même effet inhibiteur que ce soit un BCR IgM, IgG, IgE ou IgA. Ils ont par la suite montré que le motif conservé Tyr-X-X-(Met/Ile) commun à toutes les IgG et aux IgE, n'intervenait pas dans cette augmentation du signal.

Si ces hypothèses sont séduisantes pour rendre compte de la physiologie des réponses humorales, elles ont cependant, récemment, été remises en cause par Horikawa et al. et Waisman et al., en avril 2007. L'augmentation du taux de calcium intracellulaire et de la réponse antigénique dans les cellules B à BCR IgG ne serait pas due à une diminution de la phosphorylation de CD22 ou à une diminution de sa fonction inhibitrice. Horikawa et al., ont montré que le signal médié par la queue cytoplasmique de l'IgG n'induisait pas l'expression de certains gènes retrouvés beaucoup plus exprimés dans des B à IgM de membrane (ces gènes seraient plutôt inducteurs d'une différenciation MZ) et ils montrent que c'est cette absence ou ce faible signal qui induirait une réponse B mémoire augmentée et orienterait les cellules vers la différenciation plasmocytaire (théorie du « less is more ») (Horikawa et al., 2007). Waisman et al., quand à eux, ont démontré en réalisant une lignée de souris $\gamma 1$ KI, qu'un BCR IgG pouvait se substituer à un BCR IgM et permettre un développement B normal. Ils montrent quand même, un léger blocage au stade pro-préB mais n'identifient ni hyper-différenciation plasmocytaire (non explorable dans leur modèle), ni indépendance par rapport à CD22 (Waisman et al., 2007).

V. « Glycannes et glycoconjugués »

Le dogme central de la biologie moderne a quelque temps reposé sur le concept d'un flux d'informations biologiques se déplaçant de l'ADN vers l'ARN puis vers la protéine. Il est cependant maintenant clair que la compréhension des mécanismes de biogenèse d'un organisme ne repose pas uniquement sur la colinéarité de ces 3 molécules, mais aussi notamment sur 2 autres types de structures majeures que sont les lipides et les sucres, en particulier dans le cadre des modifications post-traductionnelles des protéines. Polyosides et lipides servent de réserves énergétiques, de signaux transducteurs, ou encore d'éléments structuraux. Toutes les cellules vivantes portent sur leurs lipides ou leurs protéines un réseau complexe et dense d'oligosaccharides (ou glycannes) formant ainsi des glycoprotéines et des glycolipides (dont nous ne ferons pas état dans ce manuscrit). Localisés pour la plupart à la surface cellulaire, les glycannes jouent un rôle fondamental dans les interactions "cellule-cellule" et "cellule-matrice extracellulaire", cruciales pour le développement d'organismes multicellulaires complexes. Ils se trouvent également dans une position privilégiée pour l'établissement d'interactions avec différents pathogènes. Ainsi, au cours des dernières décennies, les chercheurs ont par exemple mis en évidence, leur importance dans la détermination des groupes sanguins (Kabat, 1956), leurs rôles dans les interactions cellulaires (Roseman, 1970), leurs implications dans la fécondation (Jego et al., 1980) et la différenciation erythrocytaire (Liu et al., 1981)...

La grande complexité des structures glycanniques, ajoutée au fait que leur séquence n'est pas déterminable simplement en décodant une matrice d'acide nucléique, a considérablement freiné les recherches, et ce n'est que depuis ces vingt dernières années que de nouvelles technologies, destinées à étudier de façon approfondie ces molécules, ont permis l'essor d'une nouvelle discipline connue sous le nom de « glycobiologie ». La glycobiologie allie les fondements de la biochimie et de la biologie moléculaire des glucides. Son but est donc de décoder le sens de ce troisième alphabet des sucres, qui s'ajoute à celui des protéines et des acides nucléiques. Ainsi, bien que l'activité biologique des glycoprotéines soit généralement portée par la partie protéique, les glycannes détiennent des informations supplémentaires permettant notamment de moduler la fonction biologique des glycoprotéines, déterminer leur durée de vie, et signaler leur adressage aux différents compartiments cellulaires.

5.1. La glycosylation

La glycosylation, généralement définie comme le principal événement de maturation post-traductionnelle des protéines et des lipides, consiste en une succession de réactions enzymatiques se déroulant, chez les eucaryotes, principalement dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi. Les glycoprotéines sont constituées d'une chaîne peptidique sur laquelle sont greffés des sucres. Il est à noter que plusieurs résidus d'une même chaîne polypeptidique peuvent être substitués par des sucres. Les enzymes impliquées, les glycosyltransférases, font preuve, à l'image de leurs nombreux substrats, d'une très grande diversité fonctionnelle. Leur action principale consiste à greffer des mono- ou des polysaccharides sur différents substrats (monosaccharides, polysaccharides, lipides, ou peptides), en des sites bien définis. Les substrats donneurs sont utilisés sous une forme énergétique (ou activée) de nucléotide-sucre (GDP-fucose, UDP-galactose...), et plus rarement sous une forme lipide-sucre (dolichol-P-Glc) (Kleene and Berger, 1993). Les glycosyltransférases eucaryotes sont en très grande majorité des glycoprotéines membranaires de type 2, associées aux compartiments cellulaires exocytosomiques, en particulier le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Paulson and Colley, 1989). Après un court domaine cytoplasmique N-terminal (≈ 10 acides aminés) et une portion transmembranaire unique (≈ 15 acides aminés), se déploie la portion luminale de la protéine formée d'un domaine intermédiaire flexible de longueur très variable (70 à 320 acides aminés), assurant la liaison avec un domaine catalytique globulaire dont la taille varie de 200 à 250 résidus. Les glycosyltransférases sont nommées selon le sucre qu'elles transfèrent, par exemple « mannosyltransférase » s'il s'agit du mannose, ou « fucosyltransférase », s'il s'agit du fucose, mais aussi et surtout en fonction de la liaison formée (α ou β) entre le sucre transféré et le substrat accepteur, ce dernier restant, dans la majorité des cas de nature mono- ou polysaccharidique (**Tableau 1**). Dans les cellules animales, de nombreux travaux soulignent l'importance de la régulation spatio-temporelle de l'expression de ces enzymes dans la définition des épitopes glycaniques. Grâce au séquençage des génomes, nous savons aujourd'hui qu'environ 1% des gènes d'un organisme leur est dédié (Lowe and Marth, 2003).

Groupe d'enzymes	Sucre transféré	Substrat donneur	Liaisons formées entre sucre donneur et sucre accepteur
Sialyltransférase	Acide <i>N</i> -acétylneuraminique	CMP-NeuAc	α 2,3 ; α 2,6 ; α 2,8
Fucosyltransférase	Fucose	GDP-Fuc	α 1,2 ; α 1,3 ; α 1,4 ; α 1,6
Galactosyltransférase	Galactose	UDP-Gal	β 1,3 ; β 1,4 ; α 1,3
<i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase	<i>N</i> -acétylglucosamine	UDP-GlcNac	β 1,2 ; β 1,4 ; β 1,6
<i>N</i> -acétylgalactosaminyltransférase	<i>N</i> -acétylgalactosamine	UDP-GalNac	α 1,3 ; β 1,4
Mannosyltransférase	Mannose	GDP-Man	α 1,2 ; α 1,3 ; α 1,4 ; α 1,6 ; β 1,4

Tableau 1 : Les principales glycosyltransférases de vertébrés greffant des sucres monosaccharidiques sur des substrats mono- ou polysaccharidiques.

A la série d'enzymes « classiques » s'ajoutent des enzymes plus singulières, telle que l'oligosaccharidyltransférase, qui utilise comme substrat donneur un oligosaccharide lié à une molécule de dolichol-phosphate, ultérieurement transféré sur une protéine au cours des premières étapes de la biosynthèse des *N*-glycannes, ou encore telles que les mannosyltransférases et glucosyltransférases, utilisant du mannose ou du glucose liés également au dolichol-phosphate (Kornfeld and Kornfeld, 1985). Il existe aussi des glycosyltransférases d'origine procaryote qui transfèrent des sucres liés à l'undecaprényl-phosphate (Shaper and Shaper, 1992). Enfin, certaines glycosyltransférases sont en mesure de lier des monosaccharides à des résidus Thr ou Ser, la protéine servant alors directement de substrat accepteur. C'est le cas pour certaines *N*-acétylgalactosaminyltransférases, qui initient la synthèse des *O*-glycannes, ainsi que pour des enzymes plus récemment caractérisées, que sont les *O*-fucosyltransférases ou les *O*-*N*-acétylglucosaminyltransférases (Van den Steen et al., 1998).

Pour les glycoprotéines, deux grandes familles de glycannes ont donc été définies selon la nature de la liaison covalente établie entre le glycanne et la partie peptidique : les *N*- et les *O*-glycannes. Les protéines *N*-glycosylées portent un glycanne sur l'atome d'azote de la chaîne latérale d'une asparagine comprise dans un motif consensus de type N-X-S/T (X pouvant être n'importe quel résidu autre que la proline). Les protéines *O*-glycosylées portent un monosaccharide ou un glycanne fixé par l'intermédiaire de l'atome d'oxygène de la chaîne latérale d'une sérine ou d'une thréonine. Ces deux types de glycosylation peuvent se retrouver simultanément sur une même protéine (comme par exemple, les récepteurs de la famille Notch).

5.1.1. La N-glycosylation des protéines

Les N-glycoprotéines représentent la classe la plus abondante de glycoprotéines (Vijay, 1998). La N-glycosylation des protéines chez les Eucaryotes est un processus métabolique hautement conservé. En effet, on retrouve des N-glycannes aussi bien chez les organismes unicellulaires (Levures, Trypanosomes, etc.) que chez les organismes pluricellulaires (Plantes, Insectes, Mammifères, etc.) (Spiro, 2002). Pour tous les Eucaryotes, cette modification post-traductionnelle est indispensable au bon fonctionnement des cellules (Kukuruzinska and Lennon-Hopkins, 1999). Ainsi, un défaut dans la machinerie de la N-glycosylation peut conduire, chez l'Homme, à un syndrome de type CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) (Freeze and Aebi, 2005; Lowe and Marth, 2003).

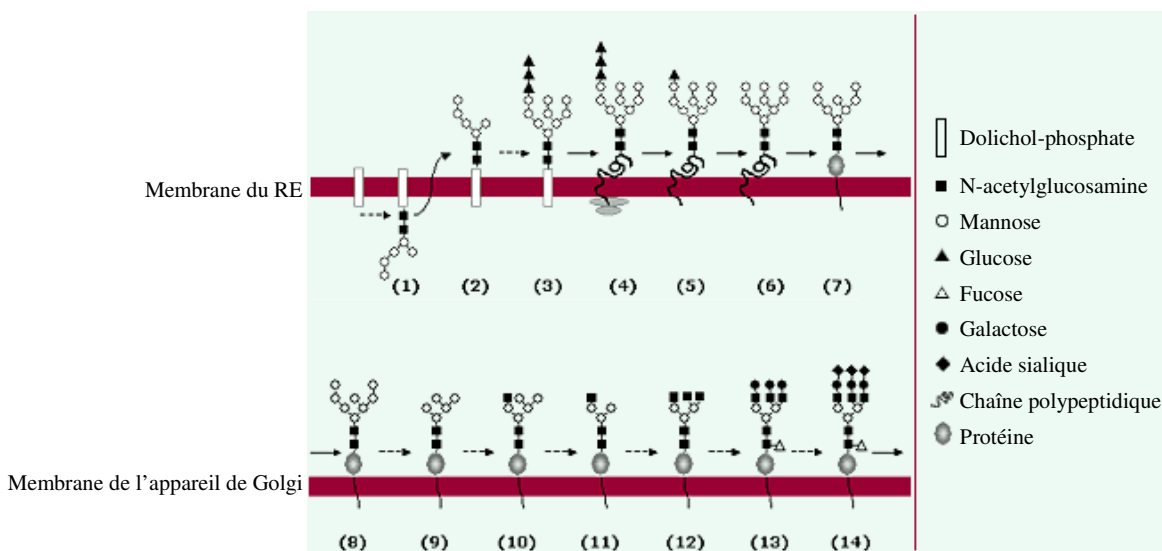


Figure 26 : Synthèse des N-glycoprotéines

La synthèse des N-glycoprotéines (**Figure 26**) est un processus très complexe qui se déroule dans trois compartiments cellulaires : le cytoplasme, le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et le Golgi. Le nombre et la taille des branchements varient en fonction de la protéine, du tissu et de l'espèce considérée (Kornfeld and Kornfeld, 1985).

La translocation co-traductionnelle des protéines dans la lumière du RER constitue la première étape du transport intracellulaire des protéines N-glycosylées (Roth, 2002). A leur arrivée dans le réticulum, les protéines subissent de nombreuses modifications, dont la glycosylation. Une fois leur maturation achevée, au sein de l'appareil de Golgi, les glycoprotéines non résidentes de ce compartiment sont triées puis prises en charge par des vésicules golgiennes afin d'assurer leur transport vers leurs zones d'activité (Roth, 2002).

L'édification d'une structure polymannosylée, préalable à la *N*-glycosylation des protéines, débute sur la face cytosolique du RER par l'addition séquentielle de deux résidus *N*-acétylglucosamine et de cinq résidus mannose sur le dolichol-phosphate (1), un lipide membranaire. Par un mécanisme de flip-flop (Vishwakarma and Menon, 2005), ce complexe est déplacé vers la face luminale de la membrane du RER (2), où quatre mannoses et trois autres glucoses sont ajoutés (3). L'oligosaccharide de 14 résidus (Glc₃Man₉GlcNAc₂), structure consensuelle à tous les *N*-glycannes, est ensuite transféré « en bloc » du dolichol-phosphate vers un résidu asparagine d'une chaîne polypeptidique naissante (4) via une liaison β -*N*-glycosidique, si et seulement si ce dernier est inclus dans la séquence consensuelle Asn-X-Ser/Thr (X désignant tout acide aminé excepté la proline) (Pan and Elbein, 1990). Cette réaction est catalysée par un complexe enzymatique membranaire appelé oligosaccharyltransférase (OST) (Silberstein and Gilmore, 1996). Il a été estimé que 90% de ces asparagines consensuelles sont glycosylées (Gavel and von Heijne, 1990). Alors que la protéine acquiert sa structure native, trois glucoses et un mannose sont éliminés par différentes enzymes de déglycosylation (5, 6, 7). La glycoprotéine, est ensuite adressée, *via* des vésicules de transport, vers le Golgi (8) afin d'y poursuivre sa maturation (dans le sens *cis-trans*). Après quelques démannosylations et transfert de trois résidus *N*-acétylglucosamine (9, 10, 11, 12), la synthèse du glycanne est achevée par divers ajouts de molécules de fucose à sa base, de galactose et d'acides sialiques à sa périphérie (13, 14).

Au cours de leur maturation golgienne, les *N*-glycannes évoluent structurellement en 3 groupes (**Figure 27**) (Geisow, 1991). Les *N*-glycannes riches en mannoses ou *oligomannosidiques*, qui pourront éventuellement se diversifier dans les différents compartiments golgiens et acquérir une structure *hybride*, car conservant des branches mannosidiques et présentant de nouvelles substitutions par des GlcNAc. Enfin, le dernier niveau de diversification aboutit à des glycannes *complexes*, ne possédant plus aucune branche mannosidique. Quelle que soit leur structure, ces glycannes possèdent un noyau pentasaccharidique commun GlcNAc₂Man₃.

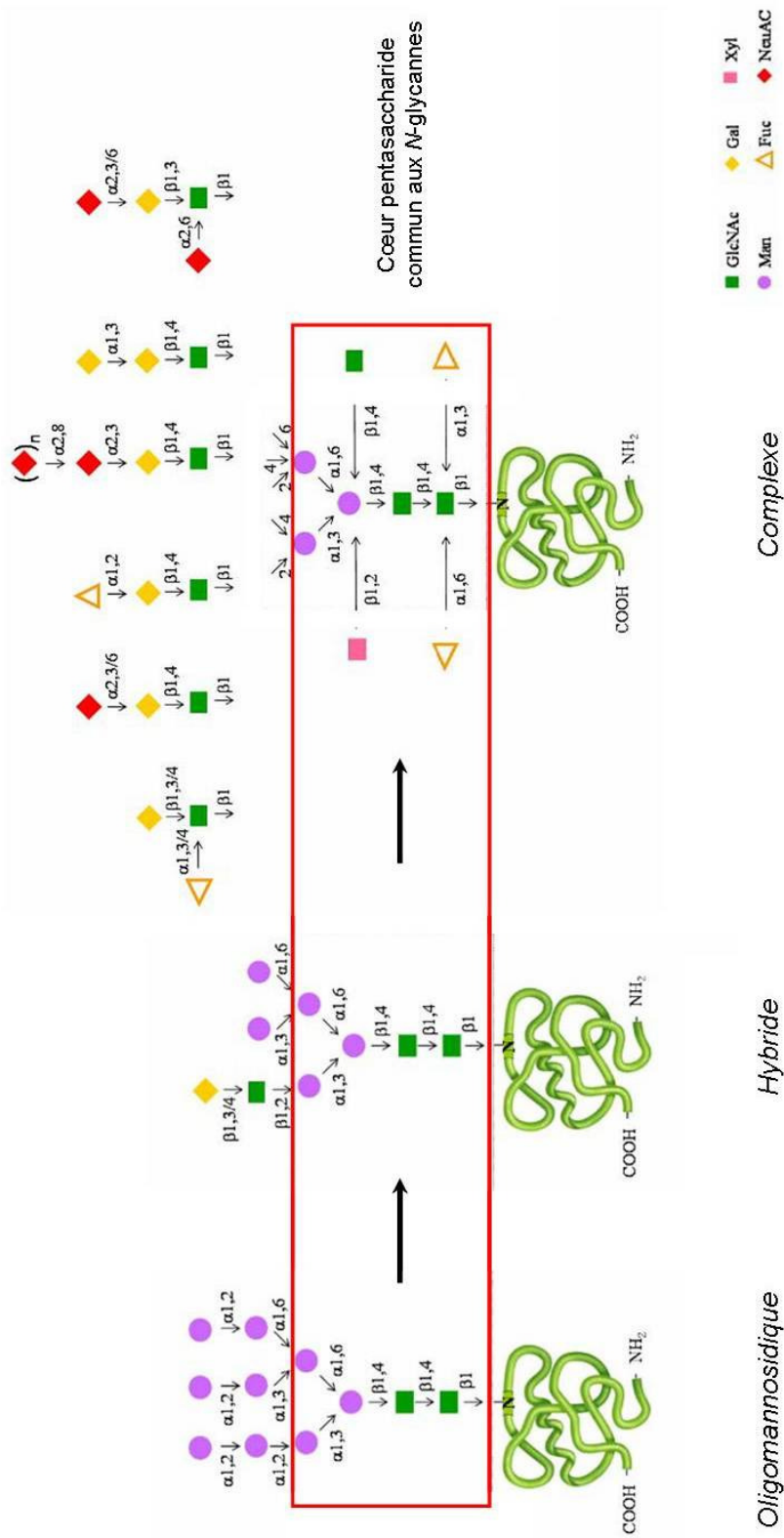


Figure 27 : Les trois types de N-glycannes présents chez les Eucaryotes.

Les N-glycannes oligomannosidiques ne possèdent, en plus du pentasaccharide commun, que des mannoses. Les levures produisent typiquement ce type de N-glycannes (Tanner et al., 1987) ainsi que le poisson zèbre *Danio rerio* (Guérardel et al., 2006). Cette hypermannosylation peut engendrer une immunogénicité de la protéine porteuse chez l'Homme. Les N-glycannes hybrides sont des structures intermédiaires entre les glycannes oligomannosidiques et complexes. Ils sont constitués de deux antennes saccharidiques de nature différente. L'antenne issue du résidu mannose lié en $\alpha 1,3$ au niveau du noyau est de type complexe alors que celle portée par le mannose lié en $\alpha 1,6$ est de type oligomannosidique (Chen et al., 1998). Le noyau pentasaccharidique peut, quant à lui, subir les mêmes modifications que les N-glycannes complexes. Les N-glycannes complexes sont dépourvus de toute branche mannosidique mais possèdent un noyau dont les deux résidus mannose sont allongés par une N-acétylglucosamine liée en $\beta 1,2$. Différentes ramifications sont retrouvées chez les N-glycannes complexes. Ils peuvent être tri-, tétra- (Mammifères, Plantes, Insectes), voire penta-antennés (Oiseaux, Poissons) (Sakamoto et al., 2000). De plus, un résidu de fucose peut être lié en $\alpha 1,3$ (Plantes et Insectes) ou en $\alpha 1,6$ (Mammifères et Insectes) sur la GlcNAc proximale du noyau (Oriol et al., 1999). On peut également trouver un résidu xylose greffé en $\beta 1,2$ (Plantes) (Olczak et Watorek, 2000) ou une GlcNAc en $\beta 1,4$ (Mammifères et Insectes) (Oguri et al., 1997) sur le premier mannose du noyau. D'après Kornfeld, 1985.

5.1.2. La *O*-glycosylation des protéines

Contrairement à la *N*-glycosylation qui débute par l'assemblage d'un oligosaccharide dans le RER qui sera ensuite transféré en bloc sur la protéine naissante, la *O*-glycosylation se fait par additions successives de monosaccharides sur un acide aminé hydroxylé d'une protéine (Brockhausen et al., 1995). Elle est initiée dans la lumière du RER et se poursuit dans les compartiments de l'appareil de Golgi. Le lieu de synthèse des *O*-glycannes reste à ce jour très controversé, se situant dans une zone allant du RE au Golgi proximal, en passant par le compartiment intermédiaire de ces 2 organites, appelé ERGIC, « ER-Golgi compartiment » (Roth et al., 1994). Dans une grande majorité des cas, l'acide aminé impliqué est un résidu sérine ou thréonine, mais on rencontre également l'hydroxyproline et l'hydroxylysine (dans le cas du collagène) (Yamauchi et al., 1982) ou la tyrosine (dans le cas de la glycopéine) (Kao et al., 1999).

Les principaux monosaccharides constituant les *O*-glycannes sont la *N*-acétylgalactosamine, la *N*-acétylglucosamine, le galactose, le glucose, le xylose, le mannose, le fucose et l'acide sialique. Alors que pour les *N*-glycoprotéines, la liaison entre glycanne et squelette peptidique est unique (liaison d'une asparagine à un GlcNAc), il existe différents types de liaisons pour les *O*-glycoprotéines en fonction de la nature du glycanne et de l'acide aminé engagé (**Figure 28**).

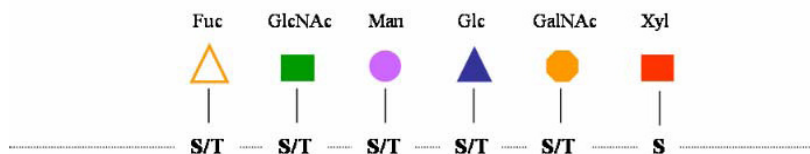


Figure 28 : Représentation schématique des principaux monosaccharides *O*-liés sur des résidus Sérine et Thréonine.

Les signaux qui déterminent quel acide aminé sera *O*-glycosylé ne sont pas encore bien connus. Le site de *O*-glycosylation ne fait pas forcément intervenir un acide aminé compris dans une séquence peptidique consensus, sauf dans les cas de la *O*-glucosylation et de la *O*-fucosylation. Dans le domaine de la glycobiochimie, la *O*-glycosylation est un thème de recherche relativement récent (fin des années 70) par rapport à l'intérêt porté à la *N*-glycosylation (début des années 60), les données disponibles sur les *O*-glycannes sont donc beaucoup moins conséquentes. Les structures *O*-glycanniques sont extrêmement variées et présentent de nombreuses différences,

aussi bien au niveau de leurs synthèses qu'au niveau de leurs rôles biologiques. On peut les classer en différentes « famille » :

- La *O*-glycosylation de type mucine est la plus répandue. Elle est initiée par l'ajout d'un GalNac (par des ppGaNtases) sur les résidus Ser/Thr de protéines transmembranaires ou sécrétées. Le résidu GalNac peut rester sous la forme de monosaccharide ou être allongé par d'autres enzymes (ajout de GlcNAc et/ou de Gal, de Fuc et de NeuAc). Un glycanne de type mucine peut contenir jusqu'à 15 sucres. Les mucines sont des macromolécules recouvrant les cellules en contact avec le milieu extérieur et protégeant les épithéliums contre toutes sortes d'agressions d'origine endogène ou exogène (sucs digestifs, micro-organismes, polluants, toxines...). Elles représentent une grande famille de protéines fortement glycosylées. L'"enrobage sucré" dense des mucines les rend plus résistantes à la protéolyse assurant ainsi la protection de nos épithéliums digestifs ou respiratoires. Les *O*-glycannes de type mucine se retrouvent majoritairement sur des protéines de l'épithélium, de l'endothélium vasculaire et à la surface des globules rouges (tel que CD43 (leukosialin), CD45RA ; CD34, glyCAM-1, MadCAM-1 qui sont des ligands de la L-selectine exprimée sur les leucocytes...). Ces structures sucrées définissent différents types d'antigène : elles constituent les déterminants des groupes sanguins (A, B, O) et tissulaires (Lewis). Le dissaccharide Gal β 1,3GalNac appelée antigène T et le simple résidu GalNac, appelé antigène Tn sont présents à la surface de nombreuses cellules (la « Peanut Agglutinin » pour PNA, serait connue pour se lier à l'antigène T). Cette *O*-glycosylation permet également la synthèse des ligands des galectines.
- la *O*-mannosylation, qu'on retrouve sur des glycoprotéines du cerveau, du système nerveux et des muscles squelettiques. La plupart des structures *O*-mannosylées comportent le « core glycanne » Gal β 1,4GlcNAc β 1,2Man1-O-S/T (Haltiwanger and Lowe, 2004)
- la *O*-*N*-acétylglucosaminylation, qui est catalysée par l'enzyme OGT (O-GlcNAc Transférase). Cette modification, par un seul sucre, est fréquemment retrouvée sur des protéines telles que l'ARN polymérase II, les protéines des pores nucléaires, les facteurs de transcription (SP1- specificity protein-1 et SRF –Serum response Factor), le récepteur aux oestrogènes, les protéines de proto-oncogènes (*c-myc*, *c-fos*, *c-jun*...), les protéines « supprimeurs de tumeur » (p53), et les protéines du cytosquelette (Tau, Vinculine, Ankyrine, Clathrine...). Une délétion du gène OGT provoque l'apoptose des cellules ES murines (Shafi et al., 2000).

- la *O*-glucosylation qui a lieu sur les domaines EGF (Epidermal growth factor) et EGF-like que comportent de nombreuses protéines de surface (Harris and Spellman, 1993).
- la *O*-fucosylation affecte également les domaines EGF mais aussi les domaines TSR (Thrombospondin type I repeat) et dépend respectivement de deux enzymes. Celle responsable de la *O*-fucosylation des EGF est Pofut1 (Protein *O*fucosyltransferase 1) (Wang et al., 1996a) alors que celle greffant le fucose sur les TSR est Pofut2 (Protein *O*-fucosyltransferase 2) (Luo et al., 2006). Notch et ses ligands seraient régulés par *o*-fucosylation.
- et enfin la *O*-Glycosylation de type Glycosaminoglycane (GAG) que je développerai plus particulièrement dans ce chapitre.

5.1.3. La *O*-Glycosylation de type Glycosaminoglycane (GAG)

Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée aux GAGs, auxquels je vais donc dédier un paragraphe indépendant afin d'être le plus exhaustif possible.

Les GAGs sont de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées d'unités disaccharidiques répétées, généralement un hexosamine (glucosamine GlcN ou *N*-acétylgalactosamine GalNAc) suivi d'un acide hexuronique (acide D-glucuronique GlcA ou acide L-iduronique IdoA) d'où la dénomination actuelle : glyco pour l'acide hexuronique, amino pour l'hexosamine, et glycane pour signifier qu'il s'agit de chaînes glucidiques en général greffées sur une protéine. Les GAGs sont généralement sulfatés de façon variable. Ces longues chaînes polysaccharidiques sont liées par liaison covalente à une protéine centrale (ou « core protein ») par l'intermédiaire d'un résidu sérine, formant ainsi les protéoglycannes, qui constituent une famille hétérogène de macromolécules (**Figure 29**). Il est difficile d'établir une classification des protéoglycannes. On distingue toutefois selon leur localisation cellulaire des protéoglycannes intracellulaires, membranaires et extracellulaires.

Proteoglycan Superfamily

Localization	Family	Core protein	GAG (nb of chains)	Expression
cell surface				
syndecan family (transmembrane HSPG)		syndecan-1 (syndecan) syndecan-2 (fibroglycan) syndecan-3 (N-syndecan) syndecan-4 (ryudocan)	HS, CS, DS HS HS HS	epithelial cell fibroblast nervous system
glypican family (GPI-anchored HSPG)		glypican (glypican) glypican-2 (cerebroglycan) glypican-3 (OCI-5) glypican-4 (k-glypican) glypican-5 (GCP5) glypican-6	HS HS HS HS HS HS	bone, marrow, kidney nervous system ovary, lung, kidney kidney, brain, lung brain, kidney, limb, liver liver, kidney, ovary
others		betaglycan NG2 CD44	CS, DS, HS CS, DS CS, DS, HS	fibroblasts cartilage, nervous tissue, neural cells lymphocytes
extracellular matrix (ECM)				
leucine-rich repeat (LRR) family		biglycan (PG-I) decorin (PG-II) fibromodulin lumican PRELP keratocan osteoaderin epiphycan (PG-Lb) osteolectin (mimecan)	CS, DS CS, DS KS KS KS KS KS KS CS, DS KS	cartilage, bone connective tissue cartilage, tendon, skin cornea, muscle, kidney, lung cartilage cornea bone cartilage cornea, brain, liver
aggrecan/versican family		aggrecan (PG-H) versican (PG-M) neurocan brevican	CS, KS (~100) CS, DS (10-15) CS, DS (1-2) CS (0-4)	cartilage, brain, aorta, tendon fibroblast brain, retina brain, nervous system
collagen family		type IX collagen type XII collagen type XIV collagen	CS CS, DS CS, DS	cartilage
others		perlecan bamacan agrin serglycin	HS CS HS HP, CS	basement membrane basement membrane neuromuscular junction mast cell, myeloid cells

Figure 29 : Liste non exhaustive des CSPGs et HSPGs.

Les protéoglycannes peuvent varier considérablement par leur composition protéique, leur taille moléculaire ainsi que le nombre et le type de chaînes GAGs par molécule. On ne connaît pas encore le mécanisme qui dicte à la cellule la glycosylation d'une protéine donnée par une chaîne de GAGs. Ceci est d'autant plus vrai que certaines protéines existent temporairement, soit sous forme de protéoglycannes, soit sous forme de protéines sans chaînes GAGs, et sont appelées ainsi des « protéoglycannes à temps partiel ». Il semble que toutes les cellules diploïdes possèdent un système de synthèse de GAGs, mais on ignore encore si la synthèse de composants polysaccharidiques constitue pour la cellule une condition nécessaire à sa survie bien que chez le nématode, *Caenorhabditis elegans*, il ait été récemment démontré que les CSPGs (pour Chondroitin Sulfate Proteoglycans) étaient nécessaires à la survie et à la division cellulaire (Hwang et al., 2003; Mizuguchi et al., 2003).

Bien qu'il existe toujours un motif disaccharidique de base, la longueur et la composition des chaînes de GAGs sont extrêmement variables, tout comme l'arrangement spatial des groupements latéraux hydroxyle, sulfate et carboxyle, le long des chaînes. Les chaînes de GAGs étant parfois fortement sulfatées, les protéoglycannes ont donc généralement une assez forte charge anionique. Leur polarité, trait physicochimique le plus marquant, les fait implicitement participer à certaines fonctions biologiques comme l'hydratation des tissus, la fixation des cations ou le rôle de barrière à filtration ionique. Les chaînes polysaccharidiques ont tendance à adopter des conformations très étirées, repliées au hasard qui occupent un volume considérable par rapport à leur masse.

a. Les différentes sous-familles de GAGs

La nature des sucres formant le motif disaccharidique tout comme la nature et le degré de sulfatation permettent de classer les différents GAGs en sous familles (Perrimon and Bernfield, 2001). **Figure 30 :**

- les *galactosaminoglycannes* comprennent les Chondroïtines Sulfate (CS) et les Dermatans Sulfates (DS), caractérisés par une Galactosamine N-Acétylée (GalNAc) attachée à GlcA (pour CS) ou à GlcA/IdoA (pour DS).

o Le DS est en fait un isomère du CS où le résidu D-glucuronate est remplacé par un épimère, le L-iduronate. La quantité d'acide iduronique dans la chaîne de DS peut varier de 0 à 90%. De plus, l'épimérisation se fait en « bloc », ce qui donne des régions riches en L-iduronate et d'autres riches en D-glucuronate dans la même chaîne de DS. Le DS est associé principalement à la peau et aux tissus non cartilagineux.

o Les chondrocytes sont les cellules spécialisées dans la synthèse des CS. Les groupements sulfates se trouvent en général sur les carbones C-4 et C-6 de la galactosamine et sur les carbones C-2 des iduronates, pour les DS. Les C4S et C6S sont liés aux protéoglycannes du cartilage, du matériel squelettique, de la peau et de la cornée. Ces GAGs assurent au cartilage une fonction protectrice. Alors que le C4S est un composant important pour les processus de calcification, le C6S serait responsable de l'intégrité des surfaces articulaires.

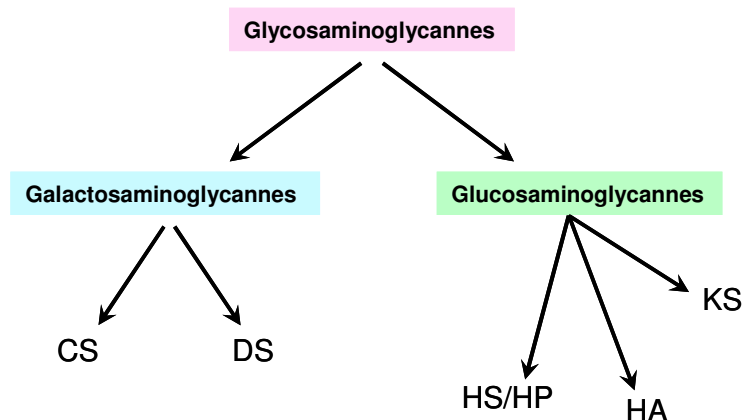


Figure 30 : La famille des glycosaminoglycannes

- les *glucosaminoglycannes*, qui sont eux-même divisés en trois catégories :

o L'acide hyaluronique ou hyaluronane (HA) est le seul GAG non fixé à une protéine porteuse et non sulfaté (Iozzo, 1998). Il possède une structure homogène d'unités répétées GlcA-GlcNAc et est beaucoup plus long que les autres GAGs. L'HA est un composant très représenté dans l'organisme (tissu conjonctif, peau, cartilage, fluide synovial). Du fait de son haut degré d'hydratation, l'HA est probablement responsable de la grande teneur en eau de certains tissus. Ce polysaccharide gigantesque (masse moléculaire moyenne voisine de 1000 kDa...) possède une viscosité intrinsèque très élevée, assurant l'hydratation et l'assemblage des différents éléments du tissu conjonctif par formation de complexes supramoléculaires et donnant au liquide synovial sa viscosité.

o Le Keratane Sulfate (KS) n'est pas considéré comme un GAG à part entière car il est dépourvu d'acides hexuroniques mais étant combiné à une protéine porteuse de la même manière que les proteoglycannes, il est communément classé parmi les GAGs. Il est constitué d'une alternance de galactose et de N-acétylglucosamine. Les groupes sulfates se situent généralement en C-6 de la glucosamine et occasionnellement en C-6 du galactose. Le KS est représenté dans le cartilage, le matériel squelettique et la cornée.

o L'Héparane Sulfate (HS) et l'Héparine (HP, notamment produite dans les granulations des mastocytes et basophiles). Ils font partie d'une même sous-famille. Ce sont les formes les plus complexes et les plus sulfatées de la famille des GAGs dans le cas de l'héparine. La distribution des groupements sulfates le long des chaînes osidiques va déterminer si le produit final est classé parmi les héparines (très fortement sulfatées – 80% des glucosamines) ou les HS (moins sulfatées- 40 à 50% des glucosamines). Ils ont été énormément étudiés à cause de leur implication dans de multiples fonctions biologiques proteoglycans (Gallagher et al., 1986; Salmivirta et al., 1996), les HS étant retrouvés dans le milieu extracellulaire de nombreux tissus, et de l'application thérapeutique majeure de l'HP comme anticoagulant (Bourin and Lindahl, 1993).

b. La biosynthèse des GAGs

La biosynthèse des GAGs (Lindahl et al., 1998; Perrimon and Bernfield, 2000) est un processus multi-étapes qui a lieu dans l'appareil de Golgi. La première étape implique l'attachement d'un tétrasaccharidique unique, commun à tous les GAGs, au niveau du groupement hydroxyle d'une sérine d'une « core protein » (**Figure 31**). Le tétrasaccharide toujours rencontré est GlcA β (1,3)-Gal β (1,3)-Gal β (1,4)-Xyl β 1-0-Ser. Ce processus est catalysé par quatre enzymes qui ajoutent les monosaccharides de manière séquentielle à l'extrémité non réductrice de la chaîne en croissance.

Il y a ensuite, élongation de la chaîne par ajout d'unités saccharidiques puis modification de la chaîne polysaccharidique par N-déacétylation, N et O-sulfatations, épimérisation... faisant intervenir un large répertoire d'enzymes spécifiques : N-desacétylase/N-sulfotransférase (NDST), C5-épimérase, 6-O-sulfotransférase, 3-O-sulfotransférase.... Les enzymes ne modifient pas toutes les unités saccharidiques de la chaîne ce qui crée un degré d'hétérogénéité structurale. Les GAGs sont modifiés variablement en fonction des conditions cellulaires (Sugahara and Kitagawa, 2002). Le degré de sulfatation semble lui être déterminé par le type de cellules et leur état physiologique (Tumova et al., 2000). La variabilité de ces modifications le long du polymère crée la diversité structurale et fonctionnelle des chaînes de GAGs (Zimmermann and David, 1999). Il est à noter que dans le cas des HS, la réaction d'initiation, catalysée par la xylosyltransférase, a lieu au niveau d'une région d'ancrage spécifique définie par deux ou trois séquences consécutives de résidus « Serine-Glycine » (Esko and Zhang, 1996) encadrées par des résidus hydrophobes et acides. Le nombre de sites d'attachement de chaînes varie en fonction de la nature de la « core protein », mais typiquement, il y en a entre deux et quatre pour HS et beaucoup plus pour HP.

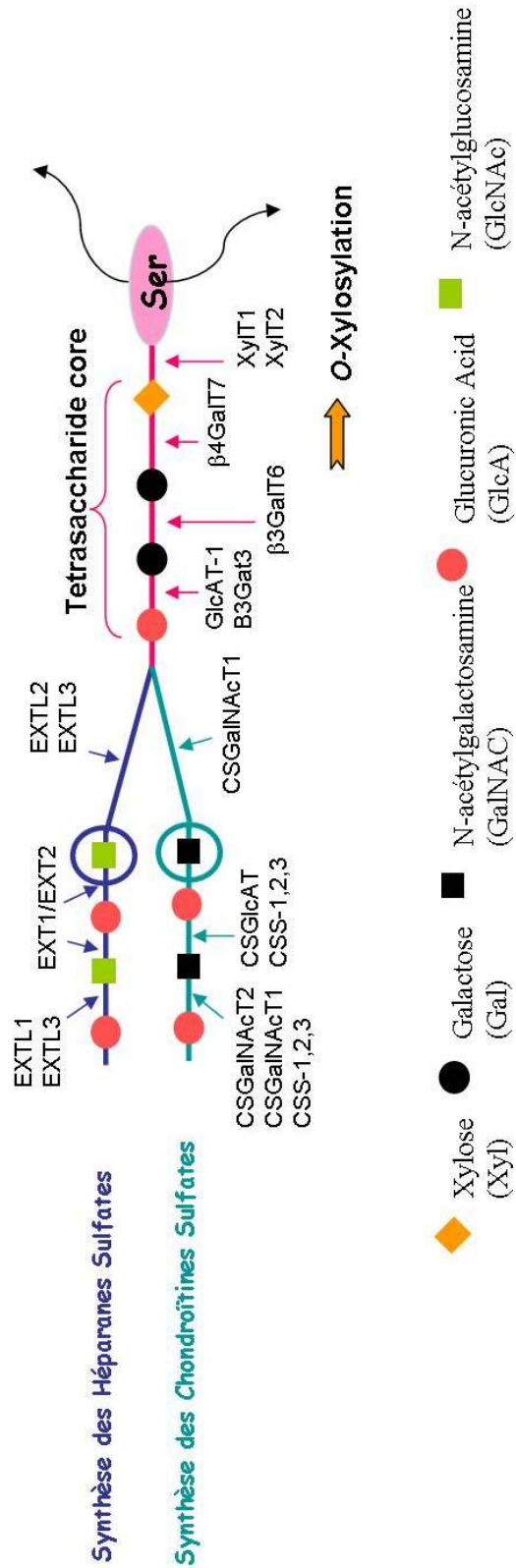


Figure 31 : Biosynthèse des HS et des CS.

Six glycosyltransférases sont impliquées dans la synthèse du tétrasaccharide commun aux GAGs. XylT1 et XylT2 : xylosyltransférase 1 et 2 ; β 4GalT7 : β 1,4-galactosyltransférase 7 ; β 3GalT6 : β 1,3-galactosyltransférase 6 ; GlcAT-1 : galactose- β 1,3-glucuronyltransférase I et B3Gal3 : β 1, 3-glucuronyltransférase (Okajima et al., 1999 ; Almeida et al., 1999 ; Kuhn et al., 2001 ; Kitagawa et al., 1998)

A ce jour, six glycosyltransférases sont impliquées dans la biosynthèse des CS. CSS-1,2,3 : chondroïtine sulfate synthase-1,2 et 3 respectivement (Kitagawa et al., 2001 ; Kitagawa et al., 2003 ; Yada et al., 2003 ; Yada et al., 2003) qui sont des CS polymérisés et qui possèdent les 2 activités β 1,3-glucuronyltransférase et β 1,4-N-acétylgalactosaminyltransférase ; CSGlcAT, chondroïtine sulfate glucuronyltransférase (Gotoh et al., 2002) qui ne possède que l'activité β 1,3-glucuronyltransférase ; CsGalNAcT-1 et 2 : chondroïtine sulfate N-acétylgalactosaminyltransférase 1 et 2 respectivement (Gotoh et al., 2002 ; Uyama et al., 2003 ; Sato et al., 2003) qui possèdent l'activité β 1,4-N-acétylgalactosaminyltransférase. Toutes ces enzymes ont des domaines transmembranaires N-terminaux et sont localisées dans le Golgi.

Cinq membres de la famille EXT (pour Exostosines) sont impliqués dans la biosynthèse des HS. EXT1 et EXT2, identifiés comme des gènes suppresseurs de tumeurs. Chez l'homme, des mutations dans leurs séquences induisent une maladie autosomale dominante, HME (pour « Hereditary Multiple Exostose »). EXT1 et EXT2 codent des HS copolymérisés qui possèdent les 2 activités β 1,4-glucuronyltransférase et α 1,4-N-acétylgalactosaminyltransférase (Sugahara et al., 2000 ; Sugahara et al., 2002). Les souris EXT1-/- présentent un blocage complet de la synthèse des HS. Les homozygotes meurent *in utero* au stade gastrulation (Lin et al., 2000). Les enzymes EXT-like : EXT1 à EXT3, ne possèdent que l'activité α 1,4-N-acétylgalactosaminyltransférase (Kim et al., 2001 ; Kitagawa et al., 1999 ; Senay et al., 2000).

C'est le premier hexosamine greffé sur l'extrémité non-réductrice du tétrasaccharide d'attachement (dans ce cas, l'acide glucuronique) qui va déterminer la nature de la chaîne de GAG. Si c'est un *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), il y aura alors biosynthèse de glucosaminoglycane (HS ou HP) et si c'est un *N*-acétylgalactosamine (GalNAc), il y aura alors biosynthèse de galactosaminoglycane (CS ou DS). Il a été suggéré que les motifs de la séquence peptidique proche du site d'attachement du tétrasaccharide jouaient un rôle de signal pour l'addition de l'un ou l'autre des monosaccharides (Zhang et al., 1995). De plus la modification du tétrasaccharide commun aux GAG par phosphorylation et sulfatation pourrait avoir un rôle important dans l'assemblage des ces chaînes. Effectivement, la phosphorylation du résidu xylose est retrouvée pour les chaînes HS et CS alors que la sulfatation du deuxième galactose n'est visible que pour les chaînes CS. Cette sulfatation semble donc dicter à la cellule la synthèse de chaînes CS spécifiquement.

Après le premier saccharide attaché, un transfert alternatif de GlcA et de GlcNAc (pour HS) ou GalNAc (pour CS), à partir de leurs nucléotides UDP-sucres correspondants, forme le reste de la chaîne GAG. Approximativement, 20 à 300 monosaccharides sont additionnés au polysaccharide linéaire avant la fin de synthèse. Cette hétérogénéité de longueur crée un premier niveau de complexité. Une fois la chaîne formée, les disaccharides subissent une série de modifications. On estime qu'environ 10% des disaccharides constituant les chaînes HS subissent des modifications contre 80% pour les chaînes héparines (Salmivirta et al., 1996).

Dans le cas des glucosaminoglycannes, la modification du polymère est initiée par une *N*-désacétylation/*N*-sulfatation des GlcNAc par une enzyme la *N*-désacétylase/*N*-sulfotransférase. Les étapes suivantes ont lieu de façon séquentielle sur les résidus adjacents des *N*-sulfoglucosamines (GlcNS) qui sont reconnus par la C5-épimérase qui va alors catalyser la transformation de certains acides D-glucuroniques (GlcA) en acides L-iduroniques (IduA) (Salmivirta et al., 1996). Ensuite a lieu une O-sulfatation des acides iduroniques en position C-2 par une 2-O-sulfotransférase. Cette sulfatation est suivie par l'action d'une glucosamine-6-O-sulfotransférase, qui va alors transférer un groupe O-sulfate sur la position C-6 de GlcNAc ou du GlcNS. Des sulfatations peuvent également avoir lieu en position C3 de certains GlcNS6S (Tumova et al., 2000).

Dans le cas des galactosaminoglycannes, des groupements ester-sulfates peuvent être greffés sur les galactosamines. La place de ces groupements détermine la nature des chondroïtines sulfates. Si ce dernier est fixé à l'alcool porté par le C-4 du GalNAc, il s'agit de

chondroïtine-4-sulfate (C4S) ; s'il est fixé sur le C-6, il s'agit de chondroïtine-6-sulfate (C6S) (**Tableau 2**).

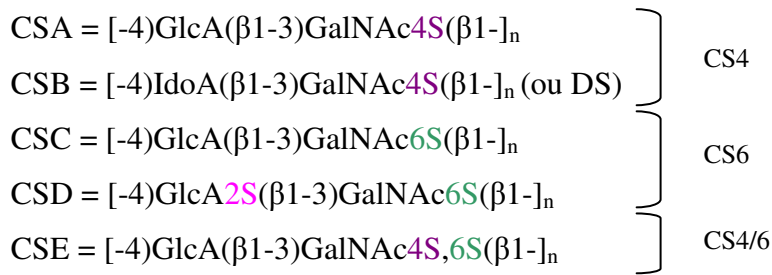


Tableau 2 : Les différents motifs des CS

La fixation des sulfates n'est pas d'une régularité absolue, certains résidus des chaînes HS et CS peuvent donc en être dépourvus. On a donc une alternance de domaines hautement sulfatés de séquences variables (appelés domaines S ou NS) avec des domaines peu ou pas sulfatés de séquences d'unités saccharidiques de base (appelés domaines NA). Toutes ces réactions de sulfatation font intervenir des sulfotransférases qui utilisent le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) comme donneur de groupements sulfates. D'une manière générale, les chaînes CS sont plus sulfatées donc plus chargées négativement que les chaînes HS. De plus, les chaînes HS (co-polymères) possèdent des résidus IduA. Elles présentent donc, contrairement aux chaînes CS (polymères simples), une très grande flexibilité conformationnelle qui leur permet de s'auto-associer et d'interagir avec de multiples molécules extracellulaires et cellulaires. La structure dans l'espace des CS est celle d'une simple hélice, les groupements sulfates chargés étant dirigés vers l'extérieur de l'hélice. Il est également à noter qu'il existe des enzymes de dégradation comme les héparitinases et les chondroïtinases qui éliminent certains groupements sulfates et contribuent de ce fait à la formation de domaines plus ou moins sulfatés adoptant ainsi des structures 3D différentes.

5.2. Les « sucres » et leur implication dans le système immunitaire

5.2.1. La glycosylation des Ig

Toutes les IgG possèdent un site de *N*-glycosylation situé sur l'asparagine 297 du domaine CH₂ de la chaîne lourde d'Ig et 20% d'entre elles possèdent un site potentiel de *N*-glycosylation sur la région variable. Nous nous contenterons ici d'évoquer la glycosylation de la

région constante. L'analyse des différentes structures oligosaccharidiques rencontrées sur l'IgG humaine (Jefferis, 2005; Raju et al., 2001) nous révèle la présence d'une structure bi-antennée de type complexe GlcNAc2Man3GlcNAc2 présentant un haut degré d'hétérogénéité quant à la présence de certains sucres terminaux comme le galactose, fucose, l'acide sialique et un résidu GlcNAc intercalaire (**Figure 32**). Ces différentes glycoformes rencontrées constituent une microhétérogénéité tout en sachant que la présence de ce *N*-glycane est déterminante, et capable de fortement moduler l'activité de l'anticorps notamment au niveau de fonctions effectrices comme l'activation du complément et l'ADCC.

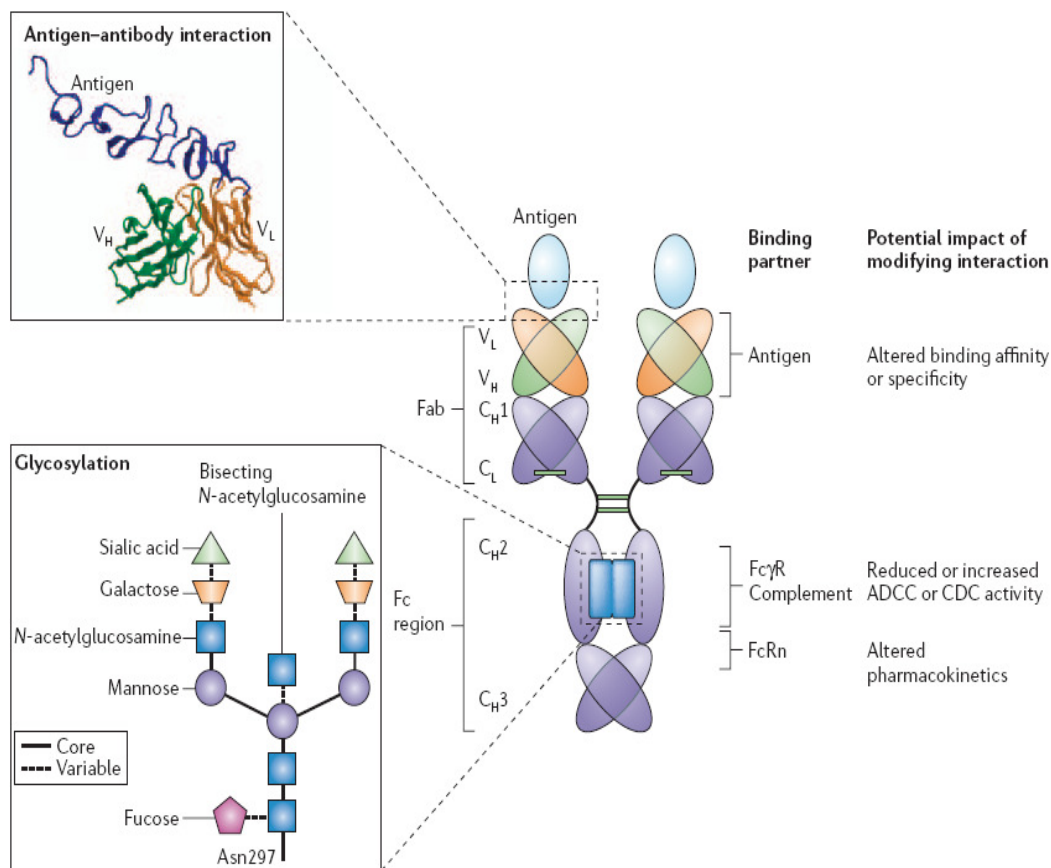


Figure 32 : Structure et fonction d'une IgG.
Schéma de Carter et al., 2006.

L'absence anormale de structure *N*-glycosylée au niveau de la région Fc des Ig est ainsi capable d'altérer sa conformation et de perturber les liaisons Fc / facteur C1q du complément ou Fc / récepteurs FcγR (FcγRI ou CD64, FcγRIIa ou CD32a ou FcγRIIIa ou CD16a) exprimés à la surface des cellules cytotoxiques communément appelées « tueuses » (NK, monocytes, macrophages).

L'ADCC est une réaction de cytotoxicité dans laquelle des cellules cytotoxiques porteuses de récepteurs Fc γ R reconnaissent les cellules cibles recouvertes d'un anticorps spécifique. La lyse est induite seulement si l'oligosaccharide greffé sur l'asparagine 297 de l'anticorps humain est correctement glycosylé. De la même manière, il a été montré que la présence de sucres sur l'Asparagine 297 était indispensable à la fixation au complément, le complément étant constitué d'un groupe de protéines sériques (C1q, C1r et C1s) impliqué dans l'inflammation, l'activation de cellules phagocytaires et la lyse cellulaire (on parle également d'activité CDC pour Complement-Dependent Cytotoxicity).

Un grand nombre d'études ont montré qu'un anticorps non glycosylé aurait une affinité de liaison aux récepteurs Fc γ R très fortement diminuée (Lund et al., 1995; Mimura et al., 2001; Radaev and Sun, 2001; Watt et al., 2003). Par contre, l'absence de fucose à la base du *N*-glycane du Fc des IgG (ARNi ou Fut8^{-/-}) améliore nettement l'affinité pour le Fc γ RIIIa et augmente fortement l'ADCC (sans modifier l'activation du complément) (Niwa et al., 2005; Shields et al., 2002; Shinkawa et al., 2003; Yamane-Ohnuki et al., 2004). L'addition d'un résidu *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) intercalaire, catalysée par la Gnt-III, qui réduirait le niveau de fucosylation, augmenterait également la fixation au récepteur Fc γ RIIIa et donc la lyse par ADCC (Umana et al., 1999). Ces observations prennent de l'importance à la lumière de travaux montrant qu'un variant du récepteur Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIa-158V qui lie fortement l'IgG1, est associé à une meilleure réponse à l'anticorps thérapeutique Rituximab (IgG1 chimérique anti-CD20 utilisée dans le traitement des lymphomes B) comparé à des patients qui ont l'allotype Fc γ RIIIa-158F ayant une faible affinité de liaison pour l'IgG1 (Cartron et al., 2002). D'autres modifications de la structure du pentasaccharide greffé sur l'Asn²⁹⁷ peuvent avoir des effets sur la lyse. Par exemple, une diminution de la galactosylation entraînerait une diminution de la CDC (Boyd et al., 1995; Hodoniczky et al., 2005). Par contre, un fort degré de sialylation diminuerait l'ADCC du fait d'une faible affinité de liaison pour le récepteur Fc γ RIIIa sur les cellules NK (Scallon et al., 2007). En parallèle, il a également été démontré que la présence d'acide sialique sur ce *N*-glycane du Fc des IgG donnait des propriétés anti-inflammatoires à l'Ig, dépendantes de l'expression accrue de Fc γ RIIB à la surface des cellules effectrices, et qu'après un challenge antigénique, les IgG spécifiques de l'antigène pouvaient passer d'un état sialylé à un état hyposialylé afin de générer une réponse adaptative pro-inflammatoire (Kaneko et al., 2006).

L'ingénierie des anticorps monoclonaux, désormais utilisés en clinique humaine, peut ainsi permettre le développement d'une nouvelle génération d'anticorps, dont les propriétés fonctionnelles ont été optimisées, permettant des avancées significatives dans le traitement de

pathologies pour lesquelles l'arsenal thérapeutique est limité. L'ingénierie du profil de glycosylation de la région Fc des IgG1 humaines (l'isotype utilisé dans la très grande majorité des anticorps monoclonaux commercialisés) est donc une stratégie importante, utilisée pour optimiser les fonctions effectrices de ces anticorps.

5.2.2. Les galectines, les voies Notch et Wnt : importance de la glycosylation.

a. Les galectines

Les galectines appartiennent à une famille de lectines très conservée à travers les espèces, qui comprend 15 membres chez les mammifères. Ce sont des lectines de type S (thiol-dépendantes) capables de lier les galactoses ou les *N*-acétylgalactosamines de nombreuses protéines *N* ou *O*-glycosylées intra- ou extra-cellulaires. Ces lectines, molécules solubles, ne requièrent pas la présence de calcium pour leur activité de liaison. Les différentes galectines ont un profil d'expression spécifique, hautement régulé (les galectines 1, 3, 7 et 9 sont connues comme s'exprimant dans les cellules de l'immunité). Ces protéines peuvent être exprimées dans le noyau et dans le cytoplasme. Certaines sont sécrétées et interagissent avec de nombreuses molécules glycosylées (appelées « contre-récepteurs ») exprimées à la surface des cellules (Hughes, 1999). Les galectines peuvent interagir avec des intégrines, des molécules de la matrice extra cellulaire (telles que la laminine et la fibronectine), le ganglioside GM1 et avec des molécules exprimées par les lymphocytes comme CD3, CD7, CD43 et CD45... (Fukumori et al., 2003; Gu et al., 1994; Hadari et al., 2000; Moiseeva et al., 2003; Pace et al., 1999; Sturm et al., 2004). La famille des galectines peut se diviser en 3 sous-groupes selon le nombre de domaines de reconnaissance aux hydrates de carbone qu'elles possèdent. Ces CRD pour Carbohydrate Recognition Domain, sont longs d'environ 130 acides aminés et sont donc responsables de la liaison aux résidus β -galactosides. Les galectines prototypes (galectines 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 et 15) contiennent un CRD mais existent soit sous forme monomérique, soit sous forme homodimérique. Les galectines chimériques ne sont représentées que par un seul membre, la galectine 3 qui est composée de courtes répétitions proline-glycine d'environ 120 acides aminés, fusionnées au CRD. Les galectines tandem (galectines 4, 6, 8, 9 et 12) contiennent 2 CRD connectés par l'intermédiaire d'un « linker » d'environ 70 acides aminés.

Des rôles variés ont été démontrés pour les galectines dans l'induction ou la protection vis-à-vis de l'apoptose : la galectine 3 serait anti-apoptotique alors que les galectines 7 et 12 induiraient l'apoptose lorsqu'elles sont surexprimées (Hoyer et al., 2004; Yang and Liu, 2003). Les galectines interviendraient dans des domaines aussi variés que la signalisation cellulaire et la stabilisation des microdomaines lipidiques, l'adhésion cellulaire, la régulation de la prolifération, la différenciation cellulaire, la migration et la transformation cellulaire (Honjo et al., 2001; Lagana et al., 2006; Liu and Rabinovich, 2005). L'expression des galectines est un facteur pronostic clé dans de nombreux cancers (estomac, foie, colon, reins, sein, prostate, ovaires, thyroïde et système nerveux central).

La fonction des galectines est dépendante des contre-récepteurs sur lesquels elles peuvent se fixer. Un certain nombre de glycosyl-transférases ont déjà été identifiées pour leurs capacités à synthétiser les galactosides reconnus par les galectines. Ainsi dans les lymphocytes T, l'expression de la core 2 beta-1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase (core2GnT) est à l'origine d'une structure *O*-liée qui peut-être allongée et présenter de multiples résidus lactosaminiques permettant la liaison de la galectine-1, qui joue alors un rôle pro-apoptotique pour ces cellules (Galvan et al., 2000) A l'inverse, les galactosides peuvent être spécifiquement masqués par l'addition d'acides sialiques. Des sialyltransférases telles que la ST6GalI peuvent ainsi empêcher la liaison de la galectine-1 à des glycoprotéines des cellules T immatures telles que CD45. Cette sialylation semble protéger les cellules T les plus immatures du thymus contre une apoptose et une inhibition de l'activité phosphatase de CD45 induites par la galectine-1 (Amano et al., 2003). Il a récemment été démontré que les galectines 1 et 3 induisaient la mort des cellules T en se liant à différents récepteurs membranaires comme CD45 et CD7, respectivement (Stillman et al., 2006). Mgat5 (beta1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V), enzyme de branchement qui catalyse le transfert d'un GlcNAc en $\beta(1,6)$ sur le Man lié en $\alpha(1,6)$ du pentasaccharide cœur commun à tous les N-glycannes, a également été démontrée comme capable d'augmenter le seuil d'activation du TCR des cellules T matures via l'augmentation d'expression des galactosides liés par les galectines (Demetriou et al., 2001), de telle sorte que le déficit en Mgat5 s'accompagne de réponses auto-immunes exacerbées.

Les galectines reconnaissent, via leur CRD, une famille de molécules d'adhésion cellulaire très étudiée : les intégrines. Il a récemment été démontré que la galectine-1, sécrétée par les cellules stromales, interagissait avec des contre-récepteurs glycosylés exprimés à la fois à la surface des lymphocytes préB et à la surface des cellules stromales de la moelle osseuse, formant ainsi une synapse entre les préB et les cellules stromales. Cette liaison se ferait par l'intermédiaire des

intégrines VLA-4, VLA-5 et $\alpha 4\beta 7$, la synapse permettant la re-localisation des pré-BCR et des intégrines et induisant ainsi une transduction du signal (Gauthier et al., 2002; Rossi et al., 2006).

b. Les WNTs

Les *Wnts* constituent une famille de molécules de signalisation impliquées dans le contrôle du développement. Ce sont des glycoprotéines de poids moléculaires compris entre 39 et 45kDa, riches en cystéine. Il existe 19 membres de la famille *Wnt* chez l'homme et seulement 18 chez la souris (Miller, 2002). Les *Wnts* stimulent différentes activités cellulaires : prolifération, migration et polarité cellulaire. Beaucoup de *Wnts* sont essentiels pendant l'embryogenèse, mais sont aussi actifs dans la régénération des tissus adultes tels que la peau, les follicules pileux et l'os (Alonso and Fuchs, 2003; Staal and Clevers, 2003). Chez les vertébrés, les *Wnts* activent trois voies différentes, la voie Wnt/ β -caténine, la voie Wnt/ Ca^{2+} et le mécanisme du contrôle de la polarité cellulaire (Huelsenken and Birchmeier, 2001). La voie Wnt/ β -caténine, connue sous le nom de « voie canonique », intervient dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire. La β -caténine est une molécule multifonctionnelle agissant en particulier au cours de la signalisation par Wnt et de l'adhésion cellule-cellule (Hecht and Kemler, 2000; Obara and Lesot, 2004; Willert and Nusse, 1998). Phosphorylée par la GSK-3 β (glycogène synthase kinase), elle-même associée à la protéine APC (Adenomatous Polyposis Coli), la β caténine est rapidement dégradée dans les protéasomes après ubiquitinylation. En présence d'un signal Wnt, la phosphorylation est inhibée, ce qui permet à la β -caténine de s'accumuler dans le noyau, de s'associer au complexe de transcription LEF/TCF et d'activer la transcription de gènes cibles (**Figure 33**). Lors de processus tumoraux, la β caténine va induire la transcription des gènes *c-myc*, *c-jun*, *Fra* et *cycline-D1* (Karim et al., 2004). La voie Wnt/ Ca^{2+} augmente le niveau du calcium intracellulaire par la voie d'activation de la phospholipase C, aboutissant à l'activation de la PKC et de la calcineurine. Il y aura alors accumulation de facteurs de transcription tels NF-AT dans le noyau, et donc transcription de gènes cibles (Wang and Malbon, 2003). La voie Wnt/polarité cellulaire (« PCP pathway » pour planar cell polarity) est activée par la liaison de Wnt à des petites GTPases (RhoA, Rac) permettant l'activation de JNK... ayant des effets sur la polarité cellulaire et sur l'organisation du cytosquelette (Habas et al., 2003).

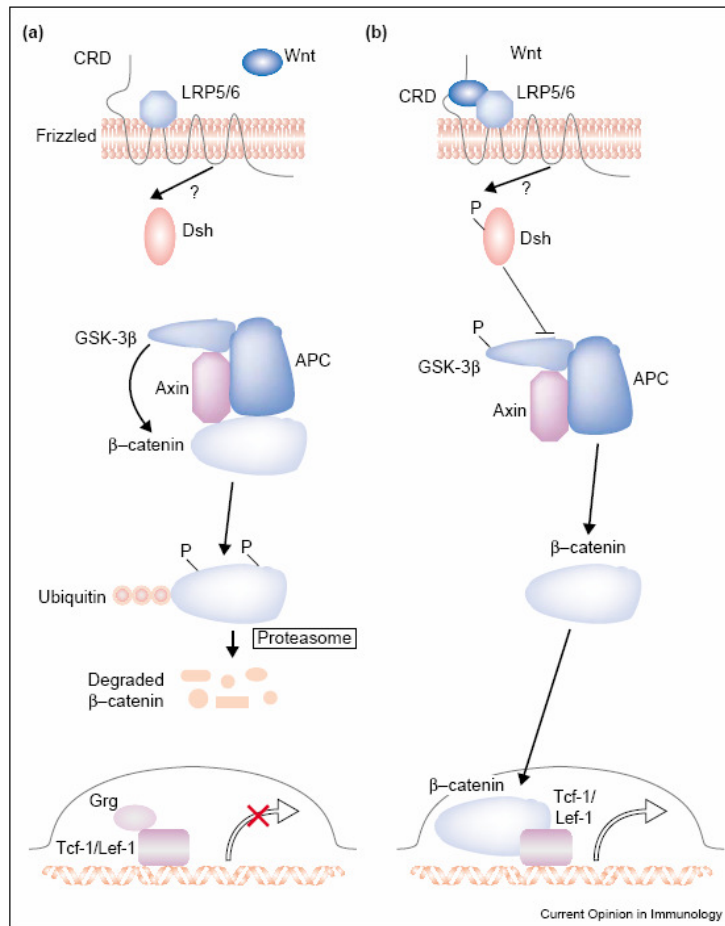


Figure 33 : Voie de signalisation Wnt.

Wnt se lie au récepteur Frizzled via un domaine riche en cystéine, CRD, faisant également intervenir les corécepteurs LRP5 et LRP6 (b). Schéma de (Staal and Clevers, 2003).

Wnt1, premier membre de la famille, a été décrit comme un proto-oncogène induisant le développement de tumeurs mammaires quand on le surexprimait chez la souris (Nusse and Varmus, 1982). De même, Wnt5a, tout d'abord décrit comme induisant la transformation cellulaire via son potentiel oncogénique, serait surexprimé dans de nombreuses tumeurs et faciliterait l'invasion des métastases. A l'opposé, il régulerait négativement la prolifération B et supprimerait les tumeurs hématopoïétiques via la voie non-canonique Ca²⁺ (Liang et al., 2003). Il est également connu que Wnt1 interagissait avec des chaînes HS à la surface cellulaire mais leur rôle n'est pas encore bien établi (Reichsman et al., 1996). Il a par ailleurs été démontré, chez la drosophile (*D.melanogaster*), que les glypicans (HSPGs) liés à la membrane cellulaire par un ancrage glycosylphosphatidylinositol - ancre GPI jouaient un rôle dans la distribution tissulaire de Wingless et Hedgehog au cours du développement (Hacker et al., 2006). Le rôle de la voie Wnt n'est pas encore bien étudié dans la lignée lymphoïde. On sait que l'absence de TCF-1 aboutit à une détérioration précoce du compartiment T (atrophie thymique avec déficit en

thymocytes double négatifs CD4⁻ CD8⁻) sans répercussion sur la fonction immune ni sur le nombre de cellules T en périphérie (Schilham et al., 1998). Un blocage complet de la maturation T est obtenu dans les double KO TCF/LEF (Galceran et al., 1999).

Les WNTs se lient à des récepteurs membranaires au nombre de 10 chez l'homme et 9 chez la souris, connues sous le nom de Frizzled (Fzds) (Wang et al., 1996b). Peu de données existent sur la spécificité ou l'affinité WNT/ligand sur leur récepteur/*frizzled*, mais il doit exister des redondances puisqu'il y a deux fois plus de membres *Wnts* que de membres *Fzds*.

De nombreuses souris KO pour les récepteurs *Frizzled* (3, 4, 5, 6, 9) ont été réalisées mais les conséquences de ces déficiences sévères (qui touchent principalement le système nerveux central) n'ont pas été regardées dans le système hématopoïétique et encore moins dans le développement B. Ranheim et al., en 2005, ont cherché vainement à reproduire le syndrome humain de Williams-Beuren (délétion de 1,4 Mb dans la région chromosomique 7 q11.23) chez la souris en réalisant le KO du gène *Frizzled 9*. Par contre, ils ont obtenu une lignée de souris présentant un phénotype sévère touchant le système lymphoïde. Les souris *Fzd9*^{-/-} présentent une splénomégalie, une atrophie thymique et une lympho-adénopathie, selon leur âge, avec accumulation de plasmocytes dans les ganglions. Elles ont un développement B immature altéré (diminution du nombre de pré-B et de B immatures mais pas d'accumulation pro-B). Par contre, elles présentent un nombre de B normal dans la rate et les ganglions. Ces données suggèrent donc un rôle pour la signalisation *wnt/fzd* dans le développement lymphoïde.

c. Notch

La voie de signalisation Notch intervient dans de nombreux processus développementaux comme la neurogénèse, la gliogénèse, la myogénèse mais également dans le développement des lymphocytes (Tanigaki and Honjo, 2007). Chez les mammifères, la famille des récepteurs transmembranaires Notch est hautement conservée et se compose de 4 membres : *Notch* 1, 2, 3 et 4. Ils peuvent interagir avec au moins 5 ligands (Serrate/Jagged 1 et 2 ; Delta-like 1, 3 et 4).

La liaison ligand-récepteur, *via* des motifs glycaniques, induit une série de clivages protéolytiques au niveau du domaine transmembranaire de Notch aboutissant à la libération de son domaine intracellulaire (ICD), qui transloqué dans le noyau, ira s'associer avec *RBP-Jκ* (aussi appelé CSL/ Rbpsuh). **Figure 34.** Il y aura alors recrutement des coactivateurs PCAF et GCN5 (ce seraient des histones acétyltransférases) et initiation de la transcription de gènes cibles comme *Hes1*, *Hes5* et *NF-κB* (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Kurooka and Honjo, 2000; Mumm and Kopan, 2000). MINT, régulateur négatif de Notch, va rentrer en compétition avec

ICD pour lier RBP-J κ et supprimait l'initiation de la transcription. Alternativement, *NIC* (Notch intracellular fragment) peut inhiber la voie de signalisation *Jnk* en s'associant avec *Deltex1* lorsqu'il ne s'associe pas avec RBP-J κ (Osborne and Miele, 1999).

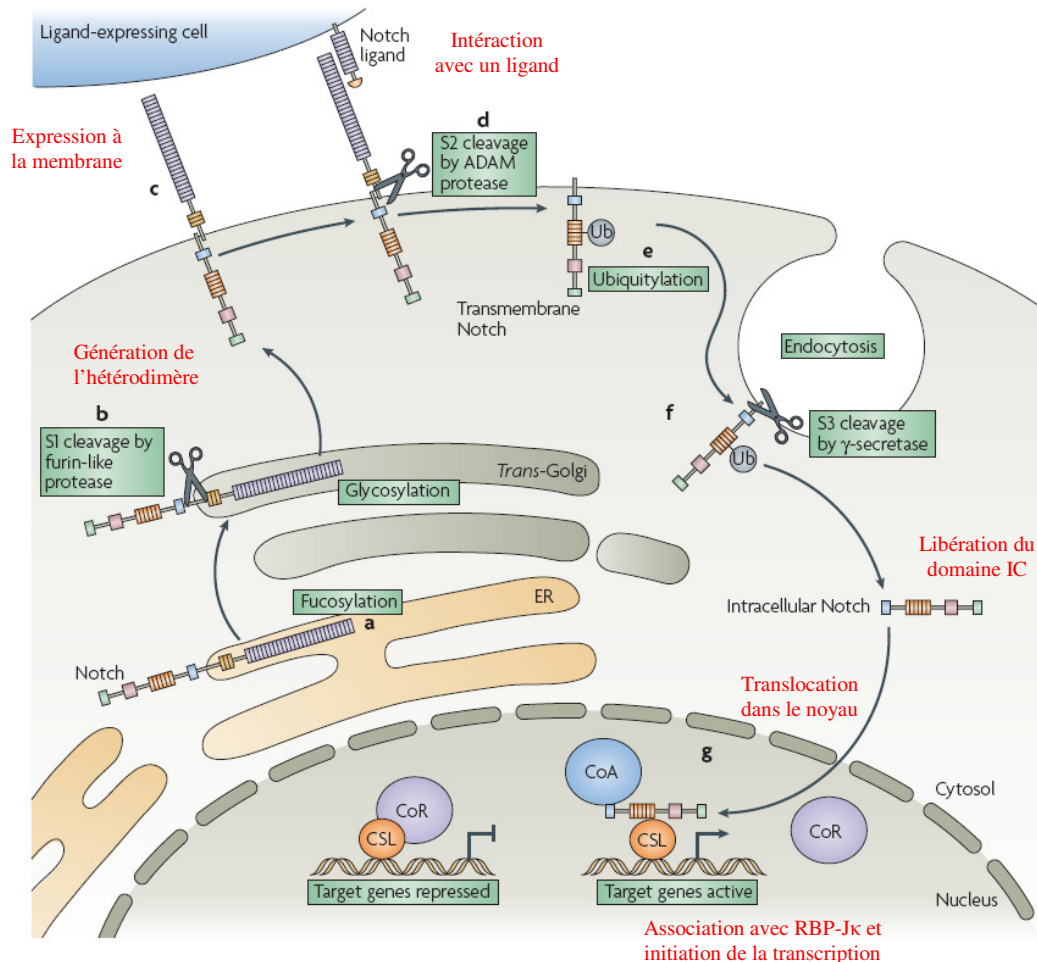


Figure 34 : Voie de signalisation Notch.

Schéma de (Osborne and Minter, 2007). CoA : Co-activateurs et CoR : Co-répresseurs.

Notch serait impliqué dans les différents « choix d'orientation » que font les cellules au cours du développement et notamment du développement lymphocytaire. Nous savons que les cellules T et B dérivent d'un même précurseur lymphoïde et qu'elles se développent dans différents micro-environnements (T, Thymus et B, moelle osseuse). Il a été démontré que l'activité de Notch-1 orienterait le développement vers la lignée T (Robey, 1999), tandis que E2A, BSAP/Pax-5 l'orienteraient vers la lignée B. Koch *et al.* (2001) ont mis en évidence que l'activation de Notch-1 serait essentielle à la formation d'un compartiment T dans le thymus car il induirait les cellules précurseurs, qui ont préalablement migré dans cet organe, à se développer en cellules T et non en cellules B (les précurseurs lymphoïdes choisiraient par défaut la voie de différenciation B...). La

délétion conditionnelle des gènes *Notch1* et *RBP-Jk* dans la moelle osseuse de souris adultes, aboutit à un défaut de développement T et induit la différenciation B (Han et al., 2002; Radtke et al., 1999; Wilson et al., 2001). De plus, une expression ectopique de *Lunatic Fringe* (*Lfng*) dans le thymus régulerait négativement l'activité de *Notch-1*, ce qui induirait les précurseurs lymphoïdes à choisir la voie de maturation B. Cette enzyme golgienne catalyse la liaison d'un GlcNAc en $\beta(1,3)$ sur un fucose *O*-lié. Sa seule activité connue à ce jour s'exerce vis-à-vis des domaines EGF-like *O*-fucosylés du récepteur Notch (Moloney et al., 2000) et de ses ligands, *Delta* et *Jagged* (Panin et al., 1997). Il est important d'ajouter que *Fringe* (et ses homologues, *manic* et *radical*) a un effet variable sur Notch, dépendant des ligands de Notch. *Fringe* activerait Notch par l'intermédiaire de *Delta* et inhiberait Notch par l'intermédiaire de *Serrate/Jagged* (Panin et al., 1997). Donc, le fait que *Lfng* régule négativement *Notch-1* dans les précurseurs lymphoïdes reflète la probable implication de *Serrate/Jagged* dans la décision T ou B. Des études structurales ont montré que les di- (GlcNAc β 1,3Fuc α 1-*O*-Ser), tri- (Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Fuc α 1-*O*-Ser) ou tétra-saccharides (NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3 Fuc α 1-*O*-Ser) construits sur le fucose *O*-lié (**Figure 35**) au niveau d'une sérine d'un domaine EGF-like modulerait l'activité de Notch (Chen et al., 2001a). L'enzyme qui réalise la liaison du fucose est la *O*-fucosyltransférase I, est une enzyme golgienne codée par le gène *POFUT1* (Wang et al., 2001). Une souris KO pour *POFUT1* meurt à l'état embryonnaire suite à de nombreux dysfonctionnements dans divers processus développementaux. Le greffage de résidus *O*-fucoses sur les domaines EGF de Notch et de ses ligands est donc un évènement incontournable dans le déclenchement des voies de signalisation, puisque c'est leur allongement (ou non) par les enzymes de la famille *Fringe* qui va moduler leurs interactions. Parmi les 6 enzymes de la même famille (β 4GalT-I à VI), seule β 4GalT-I (Zhou et al., 1998), une β -1,4-galactosyltransférase, a la capacité d'allonger le disaccharide pour former le motif Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Fuc α 1-*O*-Ser qui semble être indispensable à l'activation de la voie de signalisation de Notch (Chen et al., 2001a). Une souris mutante pour la β 4GalT-I, montre des altérations de la somitogénèse (Chen et al., 2006) bien que cette lignée soit viable. Le phénotype discret de l'adulte mutant est sans doute dû à une activité redondante des β 4GalTs. Pour compléter le motif, une β -galactoside- α -2,3-sialyltransférase, grefferait un acide sialique en $\alpha(2,3)$ sur le Gal d'un motif Gal β 1,3GalNAc (Harduin-Lepers et al., 2001).

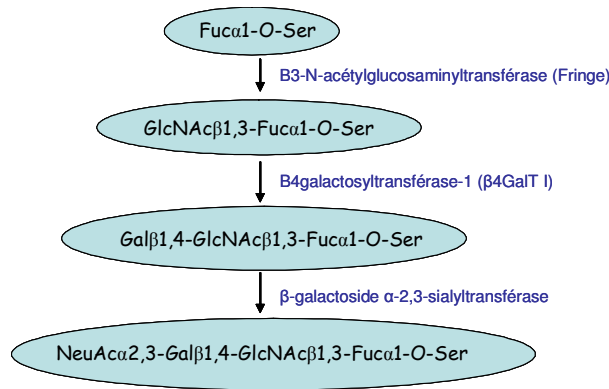


Figure 35 : Les différentes structures de glycannes O-fucosylés observées sur la protéine Notch.

La maturation du O-fucose est sous le contrôle de 2 glycosyltransférases, Fringe et β 4GalT1. Le 4^{ème} sucre greffé est un acide sialique en position $\alpha(2,3)$. D'après Moloney et al., 2000.

L'inactivation de RBP-J κ dans le lignage B aboutit à un défaut en cellules B MZ avec une augmentation du nombre de B folliculaires, indiquant que la voie Notch peut intervenir également dans le « choix d'orientation » MZB versus FOB à partir d'un même précurseur, ici : la cellule B transitionnelle 2. La délétion conditionnelle de Notch2 dans les cellules hématopoïétiques cause également la perte du compartiment B MZ (Saito et al., 2003). De plus l'inactivation du ligand *delta-like 1*, dans les cellules hématopoïétiques, aboutit également à une perte du compartiment B, ce qui n'est pas le cas lors de son inactivation B-spécifique. *Notch2* exprimé sur les cellules B pourrait interagir avec *Delta-like 1* qui serait exprimé sur les cellules dendritiques afin d'induire la différenciation des B de la zone marginale (Hozumi et al., 2004; Kuroda et al., 2003). Thomas et al., en 2007, ont montré que la co-stimulation de B folliculaires avec le ligand de *Notch*, *delta-like 1*, stimulait l'activation et la prolifération B médiées par le BCR et CD40 et augmentait le switch vers IgG1 et la production d'IgG1. La voie Notch serait donc très importante dans l'apparition et la maturation de la lignée B.

5.2.3. Les différentes fonctions associées aux GAGs

Les protéoglycannes sont des constituants majeurs de la membrane plasmique, du glycocalyx et de la matrice extracellulaire (MEC) (Vidal y Plana and Karzel, 1980). Ils peuvent interagir avec un grand nombre de molécules/macromolécules dans différents tissus et peuvent donc être associés à différentes fonctions, différents processus (Bandtlow and Zimmermann, 2000; Coombe and Kett, 2005).

Dans la MEC, les protéoglycannes forment un gel hydraté dont la taille des pores et la densité des charges varient selon la composition moléculaire des GAGs. Ils jouent ainsi un rôle dans la viscosité et la résistance aux compressions des tissus (Schonherr et al., 1995). L'existence d'un tel gel contrôle la vitesse de diffusion ainsi que la disponibilité des molécules hydrosolubles (Kolset and Gallagher, 1990). Ils facilitent la migration des cellules au cours de la morphogenèse (Lin and Perrimon, 2002; Sanes, 2003). Lors des processus tumoraux, ils sont impliqués dans la modulation des interactions cellulaires (Ma and Geng, 2000; Wegrowski and Maquart, 2004), dans la formation de plaques amyloïdes comme dans la maladie d'Alzheimer (Gupta-Bansal et al., 1995; van Horsen et al., 2003). Ils jouent également un rôle dans d'autres maladies sévères comme les arthropathies (Schwartz and Domowicz, 2002).

Les protéoglycannes de la MEC agiraient sur l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire et joueraient aussi un rôle important dans le système immunitaire en retenant du fait de leur charge et en augmentant donc la concentration locale au voisinage de la membrane plasmique de nombreux facteurs de croissance comme les fibroblast growth factors (FGFs, impliqués dans de nombreux processus physiologiques incluant la prolifération cellulaire, la différenciation, la morphogenèse et l'angiogenèse) (Nishimura et al., 2000; Ornitz et al., 1992), ou encore les HGFs (Hepatocyte Growth Factor), les TGFs (Transforming Growth Factor), les membres de la famille TNFs (Tumor necrosis Factor) notamment APRIL et GM-CSF en initiant des cascades de signalisation intracellulaire (Haltiwanger and Lowe, 2004; Ingold et al., 2005). Par exemple, les FGFs en s'associant fortement avec les HS des protéoglycannes de la membrane cellulaire, induiraient la dimérisation de leurs récepteurs FGFR initiant ainsi un signal de transduction (Guerrini et al., 2002; Thompson et al., 1994). Très récemment, Sakurai et al. (2007), ont démontré que TACI, membre de la famille des récepteurs TNF régulerait la production d'IgA dans les cellules B par APRIL via son association avec des HSPGs. Les protéoglycannes présents à la surface cellulaire et dans la MEC interagiraient également avec des interleukines (IL3, IL-6, IL8, IL7, IFN γ ...) et des chimiokines (CXCL4 ou facteur plaquettaire 4, SDF-1 pour Stromal cell-Derived Factor, RANTES...) souvent produites au niveau des sites inflammatoires (Ashikari et al., 1995; Proudfoot et al., 2001; Spillmann et al., 1998; Stringer and Gallagher, 1997; Tanaka et al., 1998). Ils retiendraient ces molécules à la surface cellulaire augmentant de ce fait leur concentration effective (gradient) au voisinage des récepteurs (**Figure 36**). Les CSPGs sont également connus pour jouer des rôles importants dans l'adhésion cellulaire et la migration cellulaire mais surtout au niveau des cellules neuronales et/ou au niveau du cartilage.

Enfin, leurs multiples fonctions peuvent être exploitées à des fins thérapeutiques. Par exemple, l'héparine est depuis longtemps utilisée pour son activité anticoagulant (Petitou et al., 1988) grâce à son interaction avec l'antithrombine III stabilisant la liaison avec la thrombine, les chondroïtines sulfates sont, quant à elles, testées pour tenter de ralentir voire stopper le développement de l'arthrose (Leeb et al., 1996).

Il a été démontré que le profil de sulfatation des unités disaccharidiques constituant les chaînes GAGs et surtout CS influençait les propriétés de liaison des GAGs et donc la fonction des CSPGs. Les monocytes/macrophages sécrètent spécifiquement des CSPGs et 80 à 90% de ces CSPGs seraient des C4S (CSA ou CSB) (Laskin et al., 1991; Uhlin-Hansen et al., 1993). Rachmilewitz et Tykocinski, en 1998 ont regardé les effets des C4S sur des PBMC (Human Peripheral Blood Mononuclear Cell) et ont montré que CSA activerait les monocytes qui alors, sécrèteraient de l'IL-1 β (cytokine pro-inflammatoire) quand à CSB, il activerait les cellules B (pas les T) par le biais de CD44 (prolifération qui peut-être inhibée en présence de TGF β et d'anti-CD44). Il a en outre été démontré que HA induit la production d'IL-1 β (de même que TNF α et IGF-1) par les macrophages et la différenciation/prolifération des cellules B dépendant de son interaction avec CD44 (Noble et al., 1993; Rafi et al., 1997). De plus, Aoyama et al. 2005, ont montré que CSB induit la prolifération des B murins dépendants de la voie de la PKC et PI3K, induisant la phosphorylation de Akt mais pas de ERK. La serglycine est un CSPG (C4S), sécrétée par les cellules hématopoïétiques. On en retrouve dans les granules de sécrétions des mastocytes, des basophiles et des cellules NK (Natural Killer). Elle serait également un ligand de CD44 et contribuerait à activer les T cytotoxiques (Toyama-Sorimachi et al., 1995). Elle serait également constitutivement sécrétée dans des cellules plasmiques myélomateuses (Theocharis et al., 2006). Akiyama et al, en 2004, ont montré que la présence de CS dans les cultures cellulaires en présence d'ovalbumine, induisait la sécrétion de cytokines de type TH1 (IFN γ , IL2 et IL12) et supprimait ou diminuait fortement la sécrétion de cytokines de type TH2 (IL5 et d'IL10) par des splénocytes préalablement sensibilisés à l'ovalbumine. Cette activité semble être renforcée lorsqu'ils utilisent des dissaccharides CSA (sulfate en position 4 et pas d'IdoA) et CSE comparés aux autres séquences. Le degré de sulfatation ainsi que la position des sulfates semblent donc être importants dans l'activité des CS. De plus, l'association de CSA avec la L-selectin exprimée à la surface des lymphocytes T jouerait également un rôle important. Il a également été montré que le Versican (CSPG contenant des chaînes CS et DS) interagirait avec la L-, la P-selectin (acteurs moléculaires de l'adhésion cellulaire qui, en reconnaissant leurs différents ligands, vont autoriser un contact transitoire des leucocytes avec la couche monocellulaire

endothéliale, de façon à permettre leur attachement, leur déplacement, puis en dernier lieu leur migration trans-endothéliale) (McEver et al., 1995), mais également avec certaines chemokines comme SLC, IP-10 et SDF-1 β grâce à des motifs disaccharidiques hautement sulfatés (CSE). Par contre l'interaction Versican-CD44 requiert des motifs disaccharidiques moins voir pas du tout sulfatés comme peut l'être, HA (Kawashima et al., 2002). Vander Voort et al. (2000) ont démontré, chez l'homme, que les lymphocytes B d'amygdales fraîchement isolés, exprimaient peu de HSPGs et qu'après activation du BCR et/ou du CD40, il y avait une forte augmentation de l'expression des HSPGs membranaires comme par exemple, CD44 qui *via* ses chaînes HS, allait interagir avec HGF et induire la transduction d'un signal (phosphorylation de Met, Akt/PKB). Les HSPGs peuvent donc être considérés comme des co-récepteurs fonctionnels intervenant dans la régulation B spécifique de l'antigène. Il a également été démontré que différents mitogènes induisaient la synthèse de GAGs (CS et HS) que ce soit dans le milieu de culture ou à la surface cellulaire dans 3 lignées humaines Jurkat (lignée T), Daudi (lignée B) et THP-1 (Makatsori et al., 2001).

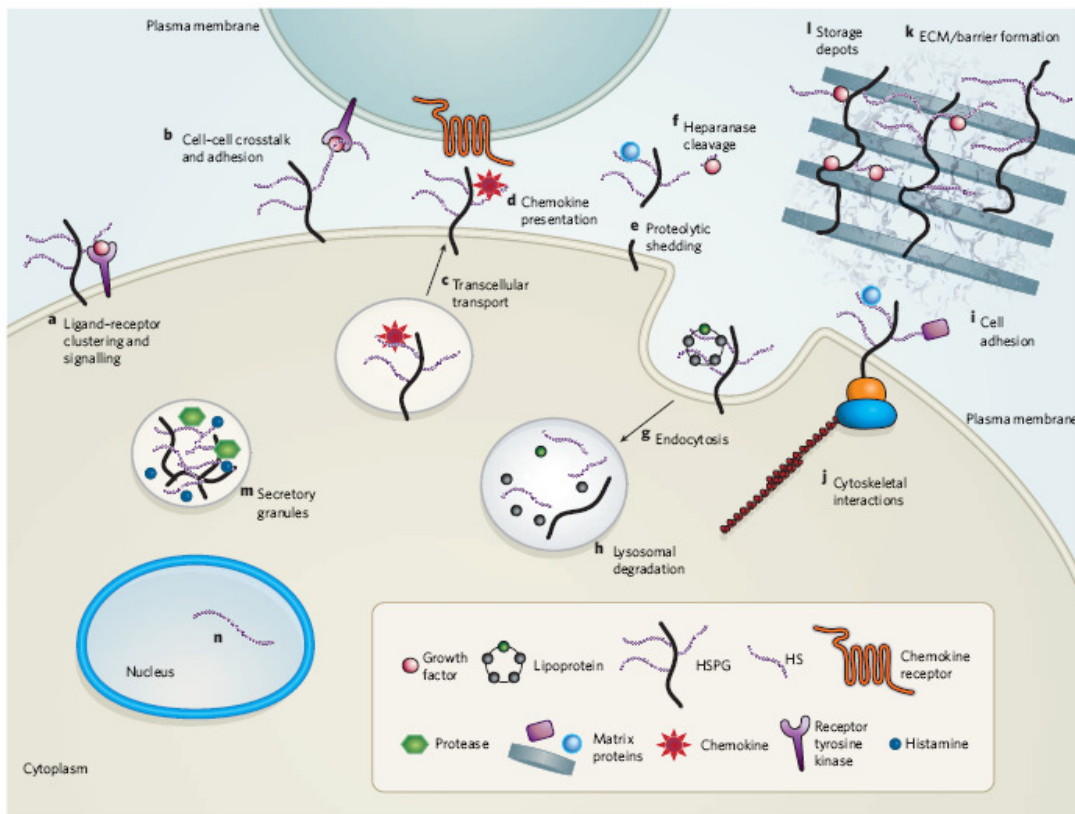


Figure 36 : Les HSPGs jouent de nombreux rôles dans la physiologie cellulaire.
Schéma de Bishop et al. Nature 2007.

Résultats - Discussion

Première partie : les BCR modifiés

Article 1

“Premature expression of α Ig heavy chains delays B cell differentiation and promotes plasma cell maturation but not mucosal homing”

Sophie Raynal-Duchez, Rada Amin, Nadine Cogné, Christophe Sirac, Laurent Delpy, Micael Bardel, Blaise Corthesy and Michel Cogné.

(Manuscrit soumis à Journal of Experimental Medecine)

Cet article est consacré à l'étude par un modèle de *knock-in* chez la souris, de la fonction d'un BCR commuté à IgA afin de savoir si une chaîne α peut se substituer et promouvoir un développement B ainsi qu'une réponse B-spécifique à l'antigène comme le fait normalement une chaîne lourde μ . On sait en effet, qu'une chaîne lourde δ peut fonctionner de façon quasi-identique à μ (Lutz et al., 1998) alors qu'une chaîne γ se comporte au contraire, de façon spécifique, moins efficace que μ pour la différenciation B précoce mais hyperstimulatrice dans les cellules B matures en cas de pontage du BCR IgG même si les modalités moléculaires précises de cette hyper-réactivité restent l'objet de controverses (Horikawa et al., 2007; Pogue and Goodnow, 2000; Waisman et al., 2007; Wakabayashi et al., 2002). Alors que de nombreuses études ont été consacrées au BCR IgG, très peu ont exploré la fonction du BCR IgA (Leduc and Cogne, 1996; Sato et al., 2007) et nous avons donc décidé d'aborder cette question dans un modèle de knock-in où le gène $C\alpha 1$ humain a été intégré par recombinaison homologue au niveau de la région *switch* μ afin d'obtenir une lignée de souris transgéniques n'exprimant que des IgA. Nous avons choisi le gène constant humain pour être en mesure de distinguer l'expression de notre transgène de celle du gène $C\alpha$ endogène, en particulier chez les hétérozygotes, mais aussi chez les homozygotes puisque nous savions d'expérience que la délétion de $S\mu$ ne bloque que partiellement le switch sur le locus muté (Khamlichi et al., 2004).

Cette étude nous permet de dire que la chaîne lourde α est capable de jouer un rôle similaire à celui d'une chaîne lourde μ pendant les étapes précoces de la différenciation, à savoir son expression à la membrane et son association avec les modules de signalisation $Ig\alpha/Ig\beta$ afin de permettre un développement B. Mais on note certaines différences qui permettent de dire que, comme pour la chaîne γ , le pré-BCR α est moins efficace qu'un pré-BCR μ car on observe un blocage partiel à la transition pro/préB ainsi qu'une augmentation de l'édition du BCR

manifestée par un ratio κ/λ plus élevé. Malgré ce blocage partiel, une population B à IgA de membrane est retrouvée dans tous les compartiments B périphériques. Ces B peuvent être activés après rencontre avec un antigène et être à l'origine d'une réponse spécifique. On remarque également la présence d'anticorps murins d'isotypes différents dans le sérum de ces animaux, indiquant que les cellules à IgA de membrane forcée peuvent subir la commutation de classe en l'absence de $S\mu$, comme des B à IgM dans le cas de la délétion isolée de $S\mu$.

Le trait phénotypique le plus marqué reste l'hyperprolifération plasmocytaire. Ces B à IgA de membrane seraient beaucoup plus activables à l'état basal et ont une grande facilité à se transformer en plasmocytes après stimulation avec un mitogène d'où l'abondance de plasmocytes observés dans les différents compartiments lymphoïdes périphériques. Ce trait constitue un point commun avec le BCR IgG lui aussi hyperactivable (même si l'hyperdifférenciation plasmocytaire dans tous les modèles d'expression forcée d'un BCR IgG est apparue comme un trait inconstant). L'IgA rejoindrait donc selon notre étude l'IgG parmi les BCR surtout effecteurs (c'est-à-dire très efficaces dans les cellules matures stimulées), tandis que la chaîne μ comme la chaîne δ semblent les plus efficaces composants des pre-BCR et BCR affecteurs qui sous-tendent la maturation B précoce et permettent à chaque clone B de valider son paratope et de rejoindre, en fonction du niveau de stimulation que lui confère ce paratope, l'un ou l'autre des compartiments B.

Un dernier point important de notre équipe concerne l'absence d'effet positif de l'expression d'une IgA membranaire sur le homing muqueux des lymphocytes B alors que les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses sont pourtant le lieu préférentiel de résidence des cellules B normales à IgA, validant donc l'hypothèse que le homing muqueux des cellules B normales est initialement réalisé par des cellules à IgM membranaires, qui commutent ensuite sur place vers la classe IgA.

Contribution personnelle à ce travail :

Ma part de cette étude, en collaboration avec Rada Amin, a consisté en un phénotypage très détaillé (cytométrie de flux, immunisations, stimulations, tris cellulaires et préparation d'ARN, d'ADNc, PCR quantitative...) d'animaux préalablement établis au laboratoire mais caractérisés de façon très préliminaire.

Article 2

“B cells carrying an IgE BCR are intrinsically short-lived”

Sophie Raynal-Duchez, Hezhong Liu, Nadine Cogné, Claire Carrion, Yves Denizot, Jean Sainte-Laudy and Michel Cogné.

(Manuscrit en préparation)

Cet article préliminaire et encore « en travaux », est consacré à l'étude, par des modèles de transgénèse et de transfection, de la fonction des IgE de forme membranaire. Il rapporte deux conclusions principales :

- la chaîne lourde ϵ des IgE n'est pas capable de jouer un rôle similaire à celui d'une chaîne μ pendant les étapes précoces de la différenciation, malgré ses homologies de structure avec les chaînes μ (en particulier pour ce qui concerne l'ancrage membranaire et l'association avec les modules de signalisation $Ig\alpha/Ig\beta$ du BCR)
- lors de son expression dans une lignée B de phénotype B mature, cette chaîne lourde ϵ assemblée au sein d'un BCR, est à l'origine d'un signal constitutif pro-apoptotique.

Ces observations suggèrent fortement que les propriétés mêmes de l'IgE membranaire sont à l'origine de la quasi-absence des cellules à BCR IgE *in vivo* chez l'individu sain. Cette absence est d'autant plus surprenante que *in vitro* et sur des cultures à court terme, des taux élevés de cellules à IgE membranaire (voisin des taux de cellules à IgG1 membranaire) peuvent être induits en présence d'activateurs B polyclonaux et d'IL4.

L'idée que l'expression d'un BCR IgE ne soit possible que de façon transitoire et puisse aboutir à une différenciation plasmocytaire mais non à une différenciation B mémoire cadre donc bien avec les observations faites chez l'homme comme chez la souris, et **place l'IgE membranaire dans le rôle d'une molécule auto-régulatrice de la réponse IgE.**

Un certain nombre d'expériences restent en cours pour compléter cet article en préparation, avec en particulier :

- *la détermination de la voie d'apoptose en cause dans les transfectants (en particulier en vérifiant sa sensibilité aux inhibiteurs des caspases)*

- *la décontamination de la lignée ϵ KI par transfert d'embryons afin de pouvoir élever des animaux homozygotes de façon stable (alors qu'ils meurent actuellement très vite du fait de déficit immunitaire)*
- *le croisement des animaux dans un fond p53^{-/-}, pour tester la possibilité de lever ainsi le blocage de différenciation précoce*
- *l'établissement de lignées d'animaux transgéniques porteuses de « la construction ϵ réarrangée » déjà utilisée pour transfecter la lignée A20.*

Le résultat attendu de ces deux expériences serait l'obtention de deux types de lignées : celles ayant réussi à bloquer l'expression du transgène et possédant donc un système immunitaire normal, et celles exprimant fortement le transgène IgE dont nous prédirions qu'il devrait alors induire une importante attrition de l'ensemble des compartiments B.

Contribution personnelle à ce travail :

Ma part de cette étude a été le suivi des animaux ϵ KI depuis le stade F1 et la caractérisation complète du phénotype, ainsi que la réalisation des constructions utilisées dans la lignée A20, l'obtention et l'étude des transfectants.

Demande de dépôt de brevet

Etablissement et caractérisation d'une lignée de souris transgéniques homozygotes pour la mutation *gamma*prim (introduction du gène de chaîne lourde d'immunoglobuline γ 1 humaine au sein du locus IgH murin)

Inventeurs : Michel Cogné, Sophie Raynal-Duchez, Eric Pinaud, Nadine Cogné.

Une partie de mon travail de recherche a été la mise au point d'une lignée de souris portant un BCR modifié codant une chaîne lourde γ 1 humaine (criblage des clones ES, suivi des animaux chimériques puis F1, caractérisation phénotypique complète). Un gène C γ 1 humain a été intégré par recombinaison homologue au niveau de la région switch μ du locus IgH endogène. L'obtention de cette lignée présente un intérêt biotechnologique en permettant de produire des IgG1 humanisées monoclonales chez la souris, la souris étant un modèle idéal pour la production ultérieure d'hybridomes (Linenberger et al., 2002). L'avantage de ces souris « modifiées » réside dans la conservation de leur répertoire B, et de leur capacité à générer des réponses spécifiques de forte affinité vis-à-vis d'antigènes choisis. Les souris « IgG1 » permettront de produire des anticorps monoclonaux humanisés de classe IgG1 dont les applications seront multiples : par exemple dans le domaine des bioréactifs (réactifs de diagnostic) et surtout dans des applications thérapeutiques et pharmacologiques (synthèse d'anticorps thérapeutiques destinés à la prévention et au traitement de maladies infectieuses, de cancers). Les anticorps humanisés présentant une très bonne tolérance chez l'homme constituent à l'heure actuelle une voie thérapeutique en plein essor.

Même s'il existe d'autres voies pour produire des IgG1 humaines actuellement (humanisation *in vitro* de monoclonaux murins, utilisation de la « xenomouse »), l'un des intérêts majeurs de notre modèle réside dans la possibilité d'obtenir d'emblée, dès le stade hybridome, des anticorps dont la chaîne lourde est une chaîne γ 1 humaine. Ils permettent donc, devant un pool d'anticorps, de choisir d'emblée celui qui est le plus efficace dans les tests (alors que lors d'une humanisation *in vitro*, prévoir si un anticorps donné restera actif ou sera le plus actif d'un groupe, relève de la divination...)

B Cell Design, start-up en cours de création, rattachée au laboratoire, valorise déjà la lignée de souris productrices d'IgA monoclonales humanisées (Cogné M. et al., 2003) et se propose de valoriser cette lignée de souris transgéniques IgG1.

Ma contribution personnelle à ce travail :

Ma contribution à ce travail a été la transfection de la construction $\gamma 1$ KI dans les cellules ES, le criblage des clones positifs et le phénotypage complet des animaux.

L'aspect biotechnologique mis de côté, il est intéressant de regarder le phénotype de ces souris sous l'aspect immunologique fondamental. Bien que la question de la capacité d'un BCR IgG à se substituer à un BCR IgM lors du développement B ait déjà été posée par plusieurs équipes décrivant des souris transgéniques ou knock-in... elle reste en suspens... Il y a quelques années, les travaux de Tsubata et Goodnow avaient démontré une fonction hyper-activatrice du BCR IgG, avec hyperplasmocytose accompagnée d'un fort taux d'IgG sérique, suggérant la notion d'un BCR IgG « effecteur ». Il avait alors été démontré que ce BCR IgG transgénique n'était pas sensible à la régulation négative de CD22 *via* la phosphatase SHP-1... mais ces données viennent d'être contestées par Waisman et al., début 2007, n'identifiant ni hyper-différenciation plasmocytaire, ni indépendance par rapport à CD22 dans des cellules B « knock-in pour l'IgG1 murine » qui cette fois sont, en plus, capables de construire un vrai répertoire B diversifié car les autres modèles étaient des modèles transgéniques utilisant un VDJ déjà réarrangé. Il faut cependant noter que le modèle de Waisman est biaisé car le gène $\gamma 1$ utilisé est délété de son site de polyadénylation « de type sécrété... »... on peut donc imaginer que cette délétion est assez indigeste pour des cellules voulant se différencier en plasmocytes !!! Les travaux d'Horikawa (2007) vont cependant dans le même sens que ceux de Waisman alors que la mutation qu'ils étudient, ne s'accompagne pas d'une délétion du site polyA de type sécrété. Dans leur modèle, il s'agit d'un simple remplacement de la partie trans-membranaire et intracellulaire de l'IgM par celle d'une IgG1 dans un modèle de transgène anti-lysozyme. On peut cependant noter que ce modèle présente un autre biais : celui de présumer que la spécificité de signal d'une IgG par rapport à une IgM se résume au rôle de sa queue intra-cellulaire (dans notre modèle, nous avons l'avantage de travailler avec une chaîne $\gamma 1$ complète !). Même s'il n'est pas inducteur de plasmocytose et s'il est soumis à l'inhibition par CD22, le BCR IgG1 pour Waisman et Horikawa apparaît plus activateur qu'une IgM (en matière de flux calciques) et pouvant lui être substitué précocément pendant la différenciation des progéniteurs B dans la moelle osseuse mais avec un ralentissement de la transition proB vers pré-B.

Le modèle KI IgG1 humaine que nous avons décrit dans cette thèse, avec une application potentiellement plutôt biotechnologique, est encore partiellement étudié et nécessite des explorations poussées pour qu'on puisse l'opposer aux précédents et comprendre de quels

mécanismes relèvent les différences observées. Quoi qu'il en soit, ce modèle manifeste clairement une hyper-différenciation plasmocytaire attestée par un ratio d'expression Blimp-1 (ou Xbp-1) / CD79a d'environ 30 dans la rate des animaux homozygotes pour la mutation, et de 75 dans les ganglions drainants et pouvant atteindre des records de 130 après immunisation des souris. Par ailleurs, un blocage sévère de la maturation B à la transition pro-B/pre-B est observé mais malgré l'absence d'expression d'IgM/d'IgD, un compartiment B périphérique reste capable de se différencier chez ces animaux et représente environ 6% des splénocytes totaux. Ces B peuvent donc être activés après rencontre avec un antigène et être à l'origine d'une réponse spécifique. Comme pour les souris α KI, on remarque la présence d'anticorps murins endogènes d'isotypes variés dans le sérum, indiquant que les B IgG1 peuvent subir la commutation de classe en l'absence de $S\mu$.

Les différences notables entre les deux lignées γ 1KI (Waisman et la nôtre) restent 1) à notre désavantage, l'utilisation dans notre cas d'une région constante humaine qui peut donc compliquer la réflexion même si on sait que les régions transmembranaires et cytoplasmiques IgG murines et humaines sont fortement homologues... (Figure n°24, chapitre IV) et 2) à notre avantage, l'utilisation d'un gène complet capable de participer à une différenciation plasmocytaire. En réponse aux doutes que peut susciter le point 1), il est en tout cas frappant de retrouver dans notre modèle l'hyper-différenciation plasmocytaire d'abord décrite avec des transgéniques γ 1 murine.

Il est à noter que les double-hétérozygotes α/γ , issues de croisement entre souris γ 1KI et α KI, après immunisation antigénique présentent une réponse spécifique IgG1 et IgA à des taux élevés. La réponse IgA est identique à celle obtenue dans des souris homozygotes α KI mais on obtient après immunisation une meilleure réponse IgG1 spécifique des souris α/γ par rapport aux souris homozygotes γ 1KI.

De plus amples manipulations doivent donc être réalisées pour comprendre les différences de phénotypes dans les différents modèles de transgénèse et de knock-in IgG1 mais également comprendre pourquoi les doubles hétérozygotes α/γ répondent mieux à une stimulation antigénique que les simples homozygotes γ 1... (la capacité de ces cellules, non seulement à se différencier, mais aussi à présenter l'antigène aux cellules T et à bénéficier alors de leur aide est sans doute à cet égard un point qui méritera une attention particulière).

**Etablissement et caractérisation d'une lignée de souris transgéniques
homozygotes pour la mutation *gamma*prim
(introduction du gène de chaîne lourde d'immunoglobuline γ 1 humaine au sein du locus
IgH murin)**

**A. METHODOLOGIE POUR L'OBTENTION DES ANIMAUX MUTANTS ET LEUR
CARACTERISATION**

1) Construction du vecteur de ciblage de la recombinaison homologue

Les constructions plasmidiques ont été réalisées à partir du plasmide bluescript SK (pSK) (Stratagene, LaJolla, CA, USA) et de la souche bactérienne *E. coli* TG1 (Stratagene, LaJolla, CA, USA), en utilisant les protocoles classiques de préparation, de clonage et d'analyse de l'ADN tels que ceux décrits dans Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

Le vecteur de recombinaison homologue ou vecteur de ciblage dérivé de pSK, dénommé p-gamma1KI, comprend : i) un fragment de 6860 pb du gène d'immunoglobuline gamma 1 humain incluant plusieurs exons codant pour les domaines constants CH1, *hinge*, CH2 et CH3 et les exons dits « de membrane » (m1 et m2) de la chaîne lourde d'immunoglobuline γ 1 ii) une cassette néo (fragment de 1,6 kb), iii) des séquences flanquantes homologues à une portion du locus murin des chaînes lourdes d'immunoglobulines, avec en amont un fragment d'environ 5 kb correspondant à la région JH-E μ (fragment DQ 52/JH) en aval d'un autre fragment d'environ 5 kb correspondant au gène C μ (fragment C μ).

De manière plus précise, les différents fragments ont été insérés dans le plasmide bluescript SK, selon les étapes suivantes :

- Dans une première étape, le fragment C μ a été cloné au site Xho1 de pSK pour donner le plasmide pA.
- Dans une seconde étape, le fragment DQ 52/JH a été cloné en 5' du fragment C μ dans le plasmide B, aux sites EcoRV- Cla I, pour donner le plasmide pB.
- Dans une troisième étape, une cassette néo a été insérée au site Sal1 entre DQ52/JH et C μ , pour donner le plasmide pC.
- Enfin, dans une dernière étape, le fragment C γ 1 de 6860 pb flanqué d'adaptateurs Cla1 et contenant le gène gamma 1 humain a été inséré entre le fragment JH et la cassette néo au site Cla I du plasmide pC pour donner le vecteur de ciblage dénommé p-gamma1KI.

Les amorces utilisées pour amplifier le gène $C\gamma 1$ humain sont :

- *Gam1 CH1-5'F* : 5' CAATCGATGCCCGTGAGCCCAGACGAGCCCAGAC 3'
- *Gam1 CH1-3'R* : 5' GCTTCCAGCAGAGACACCCT 3'
- *Gam1 CH2-5'F* : 5' CAGCTCGGACACCTTCTC 3'
- *Gam1 CH2-3'R* : 5'CCGGCCTCTGTCCATGTG 3'
- *Gam1 CH3-5'F* : 5'CACATGGACAGAGGCCGG 3'
- *Gam1 CH3-3'R* : 5' CTGACCCGTGGAAAGAAC 3'
- *Gam1 mbexon-5'F* : 5' AGCTGACCTCAGGACATT 3'
- *Gam1 mbexon-3'R* : 5' GCTCCCATCACGAAGTACAA 3'

La séquence de p-gamma1KI a été vérifiée par séquençage automatique et par analyse de restriction avec les enzymes *ClaI* et *Xho I*, confirmant que le vecteur était apte à permettre une recombinaison homologe telle que schématisée (**Figure 1**).

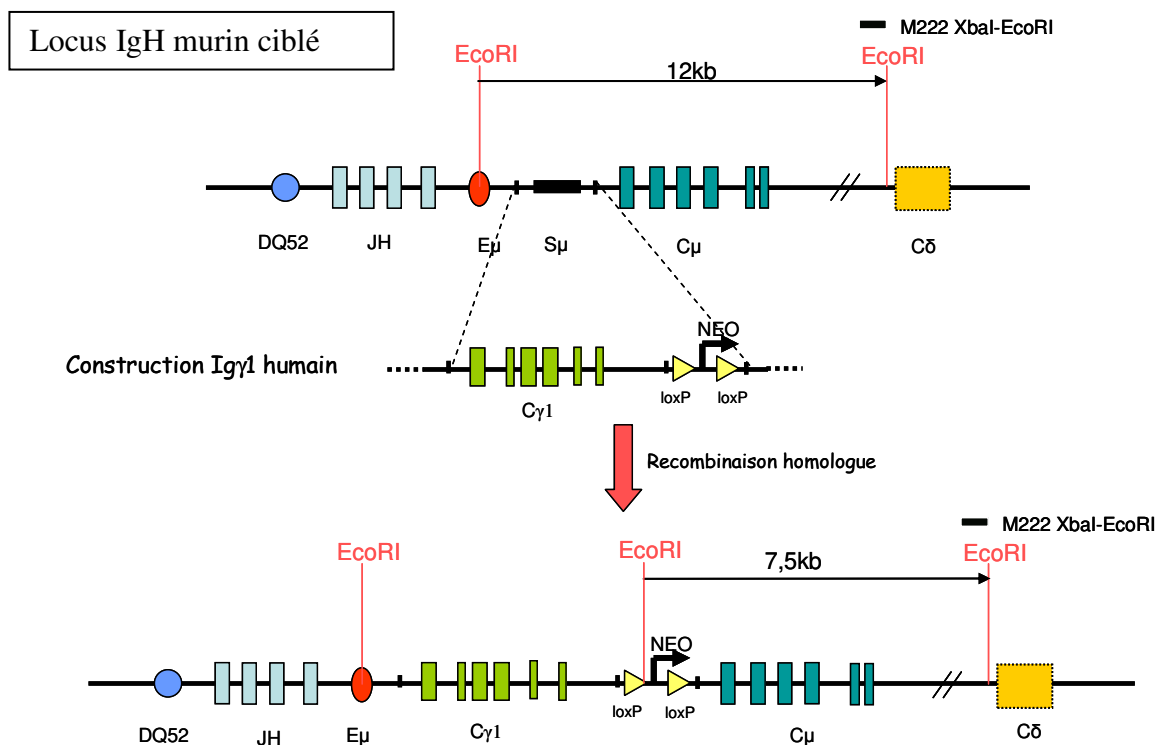


Figure 1 : Représentation schématique de l'évènement de recombinaison homologue obtenu.

2) Transfection de cellules ES et injection dans des blastocystes

Les clones de cellules ES ont été isolés, analysés puis injectés dans des blastocystes de souris C57/Black 6, en utilisant les protocoles classiques de transgénèse et d'analyse de l'ADN génomique, tels que ceux décrits dans Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M.

AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). De manière plus précise, des cellules ES ont été transfectées par électroporation de l'ADN de p-gamma1KI linéarisé au site Not I. Les clones sélectionnés en présence de généticine ont été prélevés et leur ADN digéré par EcoRI puis analysé par Southern Blot à l'aide d'une sonde radioactive s'hybridant en dehors du site de recombinaison homologue, en 5' du gène constant IgH Delta (δ) et de son site EcoR I.

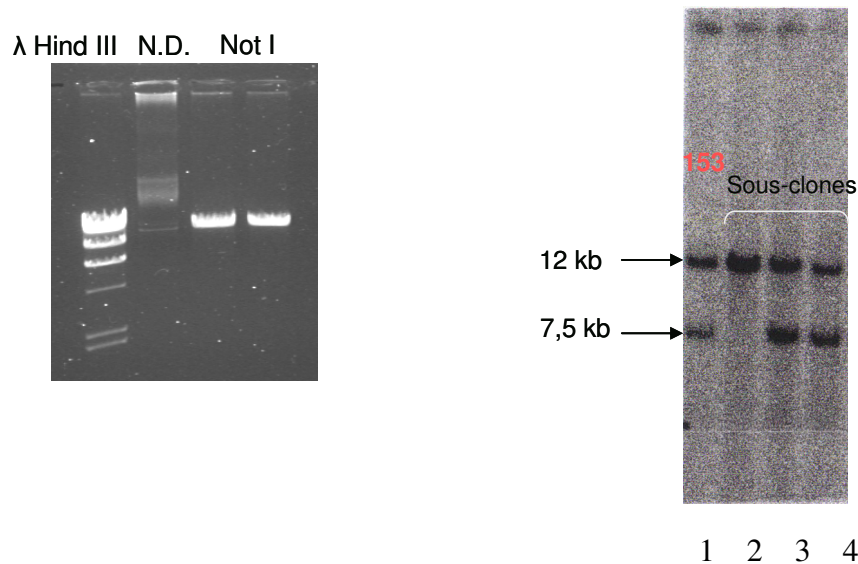
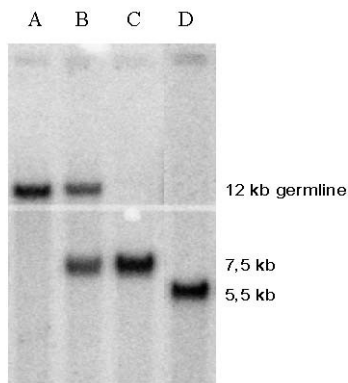


Figure 2 : A. linéarisation du vecteur avant transfection (ND, non digéré ; NotI, linéarisé par l'enzyme NotI); B. Southern blot d'un clone mutant (1) et de ses sous-clones (3 et 4) par comparaison à un ADN non muté (2)

La présence d'un allèle recombinant est visualisée par un fragment d'environ 7,5 kb (représentant le fragment μ murin et la cassette néo) alors que l'allèle sauvage correspond à un fragment de 12 kb. Dans ces conditions, sur 192 clones analysés, 1 s'est révélé positif (n°153).

La vérification du caryotype n'a montré aucune anomalie chromosomique (aneuploïdie).

Ce clone a été injecté dans des blastocystes de souris C57/Black 6 en utilisant les protocoles classiques de transgénèse tels que ceux décrits dans Transgenic Mouse: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), V. 209.). Un ♂ chimère, présentant un degré de chimérisme élevé, a été obtenu et mis en accouplement avec des ♀ C57/Black 6 afin d'obtenir des animaux hétérozygotes qui ont été analysés par PCR et ELISA. Une lignée de souris homozygotes pour le locus IgH recombiné, dénommée ci-après lignée gamma 1 *knock-in* ou γ 1KI, a ensuite été obtenue par croisement des animaux hétérozygotes.



**Figure 3: Southern Blot sur ADN génomique de queue de souris WT (piste A)
hétérozygote $\gamma 1$ -KI (piste B)
homozygote $\gamma 1$ -KI (piste C)
homozygote $\gamma 1$ -KI floxé (piste D)**

3) Détection du locus IgH recombiné portant le gène C γ 1 humain (allèle gamma 1 *knock-in* ou $\gamma 1$ KI) et du locus IgH sauvage (allèle μ sauvage) par PCR

L'ADN génomique d'un échantillon de queue d'animaux homozygotes obtenus comme précisé ci-dessus, a été analysé par PCR à l'aide des deux couples d'amorces suivants :

- couple spécifique du locus IgH murin non muté (allèle μ sauvage) :

- **amorce UpstreamSpe I Smu** : 5' GAG TAC CGT TGT CTG GGT CAC 3'

- **amorce SacI-3'Imu** : 5' GAG CTC TAT GAT TAT TGG TTA AC 3'

La réaction d'amplification a été réalisée avec une température d'hybridation de 61°C. Cette PCR amplifie en 30 cycles un fragment de 91 paires de bases-encadrant le site Spe I-spécifique du locus IgH murin non muté.

- couple spécifique du locus IgH recombiné portant le gène C γ 1 humain (allèle gamma1 *knock-in* ou $\gamma 1$ KI) :

- **amorce Neo1** : 5' GCA TGA TCT GGA CGA AGA GCA T 3'

- **amorce Neo2** : 5' TCC CCT CAG AAG AAC TCG TCA A 3'

La réaction d'amplification a été réalisée avec une température d'hybridation de 55°C. Cette PCR amplifie en 30 cycles un fragment de 120 paires de bases spécifique du locus IgH recombiné portant le gène C γ 1 humain.

Une lignée de souris homozygotes pour la mutation $\gamma 1$ KI, dénommée ci-après lignée gamma 1 *knock-in* ou *gamma prim* a été établie ; les animaux de cette lignée sont systématiquement et simultanément négatifs en PCR avec les amorces spécifiques de l'allèle μ sauvage et positifs en PCR avec les amorce spécifiques de l'allèle gamma 1 *knock-in*.

4) Dosage du taux des IgG1 sériques totales en néphélométrie et en ELISA

Les IgG1 humaines sériques ont été dosées par néphélométrie sur un automate BNII de la société Behring en utilisant le kit Behring IgG1 selon les recommandations du fournisseur.

Ces résultats ont été confirmés en ELISA suivant la technique suivante :

- coating de plaques 96 puits (Maxisorb, NUNC) par incubation une nuit à 4° avec un anticorps non marqué anti-IgG humaine (monoclonal anti-human IgG, Sigma) dilué au 1/1000^{ème} en tampon Carbonate 0,1 M pH 8,3 (100 microlitres/puits)
- 3 lavages en PBS Tween 0,1%
- saturation des plaques en milieu complet {PBS, 3% BSA}(100 microlitres/puits)
- 3 lavages en PBS Tween 0,1%
- distribution des sérums à tester dilués au 1/100^{ème} et au 1/1000^{ème} en tampon {PBS, 1% BSA}(100 microlitres/puits)
- incubation 3 heures à 37°C
- 3 lavages en PBS Tween 0,1%
- distribution d'un antisérum anti-IgG humaines marqué à la phosphatase alcaline (monoclonal anti-human IgG-AP, SIGMA) dilué au 1/1000^{ème} (100 microlitres/puits)
- 3 lavages en PBS Tween 0,1%
- réaction enzymatique de révélation par addition de PNP en tampon TRIS 0,2M (Sigma)
- blocage de la réaction par addition de soude 3N (30 microlitres/puits)
- lecture en spectrométrie à une longueur d'onde d'absorption de 405 nm.

5) Recherche de l'expression d'un récepteur membranaire de la classe des IgG humaines à la surface des lymphocytes périphériques des animaux mutants

Préparation des cellules lymphoïdes : La rate, organe lymphoïde secondaire, a été choisie pour cet expérimentation. Cet organe a été prélevé chez différents animaux mutants homozygotes γ /KI puis dilacéré en tampon VERSENE (Invitrogen), et filtré sur tamis (40 microns) afin d'obtenir une suspension de cellules individuelles débarrassée des agégats cellulaires. Les cellules spléniques ont alors été centrifugées et soumises à une étape supplémentaire de choc osmotique afin d'obtenir la lyse des globules rouges par reprise du culot cellulaire dans 1 ml d'eau distillée. Les cellules ont ensuite été immédiatement reprises en milieu complet (RPMI + 10% sérum de veau foetal), numérees et conservées sur glace.

Marquage à l'aide d'anticorps fluorescents :

- 10^5 cellules ont été incubées pendant 30 minutes à 4° avec une dilution au 1/100^{ème} d'un anticorps anti-IgM de souris marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (Southern Biotechnologies) et un anticorps anti-IgG humain couplé Alexa 633.
- Les cellules ont ensuite été lavées dans 5ml de PBS.
- Le surnageant a été décanté et les cellules ont été reprises dans 100 microlitres de PBS, 0,5% BSA, 0,1 mM EDTA

Analyse en cytofluorimétrie : sur un cytomètre de flux COULTER XL.

6) Immunisation des animaux

Les animaux ont été immunisés une première fois par injection intra-péritonéale de 20 microgrammes d'antigène P24 (protéine de la pepside VIH-1) diluée dans 200 microlitres de sérum physiologique et mise en émulsion avec 200 microlitres d'adjuvant complet de Freund (SIGMA)

Toutes les 2 semaines, les animaux ont subi un rappel vaccinal par injection intra-péritonéale de 20 microgrammes d'antigène P24 diluée dans 200 microlitres de sérum physiologique et mise en émulsion avec 200 microlitres d'adjuvant incomplet de Freund (SIGMA).

7) Dosage des anticorps spécifiques de l'antigène P24

La présence d'anticorps spécifiques de l'antigène P24 a été recherchée par ELISA 2 semaines, puis 4 semaines après la deuxième injection de l'antigène suivant la technique suivante :

- coating de plaques 96 puits (Maxisorb, NUNC) par incubation une nuit à 4° avec de l'antigène P24 à la concentration de 1 microgrammes/ml en tampon Carbonate 0,1 M pH 8,3 (100 microlitres/puits)
- 3 lavages en PBS Tween 0,1%
- saturation des plaques en milieu complet {PBS, 3% BSA}(100 microlitres/puits)
- 3 lavages en PBS Tween 0,1%
- distribution des sérums à tester dilés au 1/100^{ème} et au 1/200^{ème} en tampon {PBS, 1% BSA}(100 microlitres/puits)
- incubation 3 heures à 37°C
- 3 lavages en PBS Tween 0,1%

- distribution d'un antisérum anti-IgG humaines marqué à la phosphatase alcaline (monoclonal anti-human IgG-AP, SIGMA) dilué au $1/1000^{\text{ème}}$ (100 microlitres/puits)
- 3 lavages en PBS Tween 0,1%
- réaction enzymatique de révélation par addition de PNP en tampon TRIS 0,2M (Sigma)
- blocage de la réaction par addition de soude 3N (30 microlitres/puits)
- lecture en spectrométrie à une longueur d'onde d'absorption de 405 nm.
- Le taux des anticorps IgG anti-P24 a été exprimé en unités arbitraires établies pour la moyenne des sérums dilués au $1/100^{\text{ème}}$ et $1/200^{\text{ème}}$ en fonction du rapport Densité optique sérum testé / Densité optique du sérum témoin.

B. PHENOTYPE DES ANIMAUX MUTANTS

1. Mise au point de tests PCR spécifiques de l'allèle muté et de l'allèle non muté

Une lignée homozygote pour la mutation γI -KI a d'abord été établie. Les animaux de cette lignée sont systématiquement et simultanément négatifs pour les test « PCR allèle μ sauvage » et positifs pour le test « PCR γI -KI».

2. Dosage du taux des IgM murines et des IgG « humaines » sériques totales en néphélobromométrie et en ELISA

a. Par néphélobromométrie, les dosages d'IgG1 humaines sériques ont donné des résultats totalement corrélés avec ceux du génotypage réalisé par les tests PCR :

- les animaux « contrôles « non mutants » ont un taux nul d'immunoglobulines humaines de classe IgG1
- les animaux homozygotes γI -KI ont toujours un taux significatif d'IgG1 humaines, ce taux variant entre 0,5 et 1 g/l dans le sérum. Par contre, les IgM murines sont indétectables dans le sérum de ces animaux.

b. En ELISA, des résultats très tranchés permettent également de distinguer hétérozygotes et homozygotes en ELISA avec des variations très franches : valeurs situées à 0,8 g/l d'IgG1 humaines pour les sérums d'homozygotes dilués au 1/500^{ème}; valeurs nettement plus faibles (0,03) pour les sérums d'hétérozygotes même à la dilution la plus faible (au 1/100^{ème}). A l'inverse lorsque les IgM murines sont dosées en ELISA, on observe un taux normal d'IgM murines (de l'ordre de 1 g/l) chez les souris contrôles « non mutantes » de même que chez les animaux hétérozygotes pour la mutation *gammaprim*. Par contre, le taux des IgM murines est nul chez les animaux homozygotes *gammaprim*.

3. Recherche de l'expression d'un récepteur membranaire de la classe des IgG humaines à la surface des lymphocytes B périphériques des animaux mutants

Les animaux homozygotes porteurs de la mutation γI -KI ont été phénotypés grâce à la cytométrie en flux, avec des résultats en complet accord avec ceux donnés par le dosage des immunoglobulines sériques. Chez ces animaux, on ne détecte aucune expression d'IgM murines. Pourtant en l'absence d'expression d'IgM, un compartiment de cellules B périphériques CD19+ est capable de se différencier et représente 6 % des lymphocytes spléniques. Ces cellules B

périphériques expriment pour environ 40 % d'entre elles une immunoglobuline membranaire de la classe des IgG1 humaines (**Figure 4**)

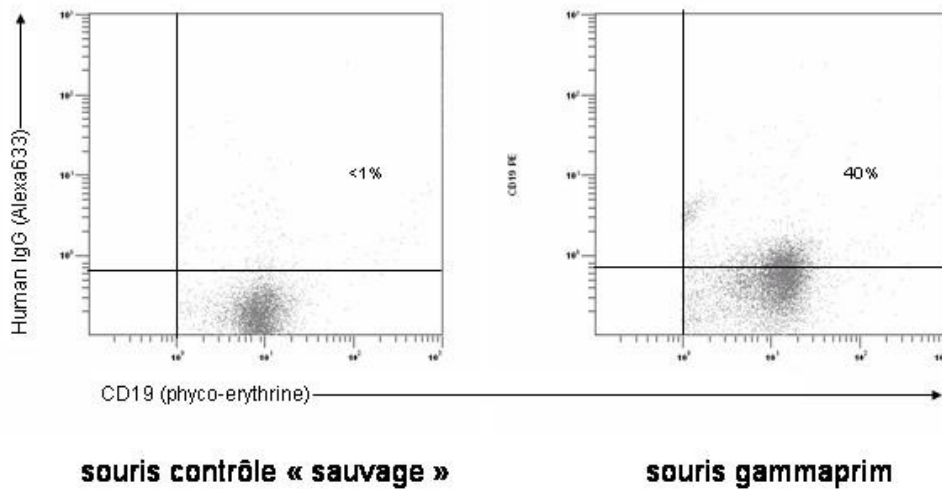


Figure 4: Expression membranaire des IgG1 humaines d'un animal de la lignée gammaprim comparé à un animal contrôle. Les lymphocytes de la rate ont été marqués avec des anticorps spécifiques de CD19 et d'IgG1. Pour l'analyse en cytométrie, une fenêtre a été établie sur les lymphocytes CD19+.

4. Réponse immune des animaux mutants à l'inoculation de l'antigène P24

La présence d'anticorps spécifiques de l'antigène P24 a été détectée par ELISA à partir de J26 (après 2 immunisations – 100 AU), et est fortement démontrées à J47 (3 semaines après la deuxième injection de l'antigène – 450 AU). En comparaison, il a été vérifié qu'en l'absence d'immunisation des animaux, le taux des anticorps IgG1 anti-P24 détectés restait inférieur à 5 unités.

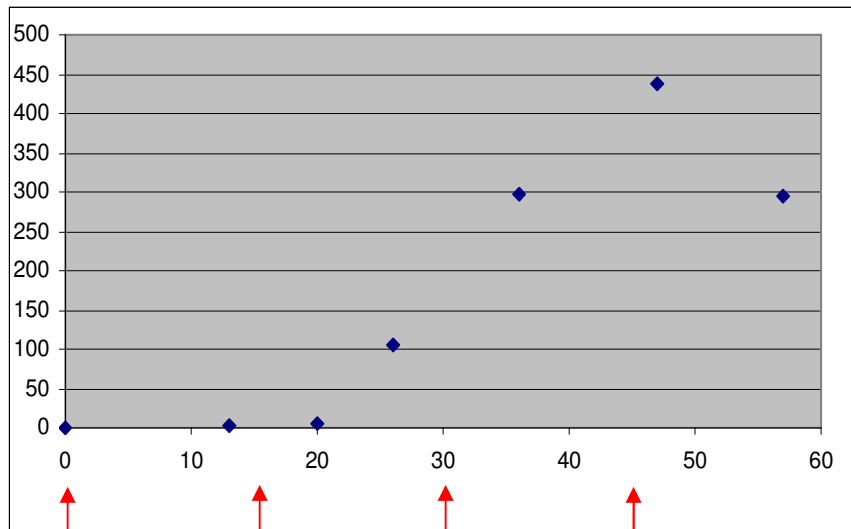


Figure 5: Taux de réponse en IgG1 humaines d'un animal de la lignée gammaprim immunisé par l'antigène VIH p24. En abscisses, le délai d'observation en jours (les flèches rouges représentent la première immunisation à J0, puis les rappels); en ordonnées, le taux des anticorps IgG1 en unités arbitraires (AU).

C. CONCLUSION

Ce travail a reposé sur la réalisation et la caractérisation d'une lignée d'animaux chez lesquels la mutation γI -KI a été introduite dans le locus IgH murin avec l'espoir que ces animaux produiraient des immunoglobulines sériques incluant une chaîne lourde humaine gamma1. L'obtention de mutants homozygotes pour l'insertion γI dans le locus IgH permet donc d'obtenir des souris produisant des lymphocytes B qui n'expriment que la chaîne $\gamma 1$ humaine à l'exclusion des chaînes lourdes murines.

Cette lignée « *gammaprim* », a été caractérisée comme capable de produire des IgG1 humanisées au niveau de la chaîne lourde et comme capable de produire des anticorps spécifiques après immunisation. Nous proposons donc de l'utiliser pour la production d'anticorps monoclonaux humanisés de classe IgG1 qui pourront trouver des applications spécifiques soit en temps que réactifs, soit en temps que moyen d'immunothérapie (anti-infectieuse ou anti-tumorale), soit enfin en temps que système de criblage rapide d'anticorps monoclonaux ayant les propriétés effectrices d'une IgG1 humaine dans des tests d'activité *in vitro* ou *in vivo*.

Deuxième partie : les glycosaminoglycannes

Article 3

“Modulation of glycotranscriptome and of glycosaminoglycan biogenesis genes along B cell lineage differentiation”

Sophie Raynal-Duchez, Virginie Pascal, Nadine Cogné, Chantal Jayat-Vignoles, Virginie Lespinet, Raymond Julien and Michel Cogné.

(Manuscrit en préparation)

Dans une autre perspective d'étude des phénomènes pouvant modifier la réactivité des récepteurs de surface de la cellule B, nous nous sommes intéressés à la modulation de la glycosylation au cours de la différenciation B par l'étude des variations de l'expression de gènes impliqués dans la glycosylation, afin d'être capables par la suite, de différencier des sous-populations B correspondant à différents états de maturation, d'activation ou de localisation.

Cette étude du glycotranscriptome, nous a notamment permis de cibler puis d'étudier d'une manière plus approfondie deux gènes d'intérêt *CsGalNacT1* et *Extl1* jouant tous deux un rôle dans la biosynthèse des glycosaminoglycannes. Ces deux gènes sont exprimés de façon plus ou moins souvent inverse dans la maturation B. *CsGalNacT1* étant absent aux stades B au repos mais exprimé aux stades immatures et B activés alors qu'*Extl1* n'est quand à lui pas exprimé aux stades B immatures, alors qu'il est exprimé au stade mature au repos avec une expression qui diminue aux stades B activés.

Dans le but de discerner si cette régulation d'expression présente un rôle fonctionnel ou pas, nous avons choisi de la compromettre et de guetter ce que seraient, s'il y en a, les effets de cette dérégulation. Alors que peu de données sont disponibles quant au rôle de ces enzymes *in vivo*, nous avons donc réalisé des lignées de souris transgéniques surexprimant de façon B-spécifique ces 2 gènes. Lors de l'amplification des ADNc respectifs de *CsGalNacT1* et *Extl1* dans le but de construire les vecteurs de transgénèse, nous avons amplifié une forme courte du transcrit *CsGalNacT1* issue d'un épissage alternatif que nous appelons *CsGalNacT1 Δ* . Ce transcrit, encore inconnu, apparaît spécifique à la lignée lymphoïde (il est seulement détecté dans la moëlle osseuse, la rate, les ganglions et le thymus) et code une protéine tronquée ayant perdu son site catalytique et pouvant donc jouer le rôle de dominant négatif.

Ces différentes souris transgéniques *CsGalNacT1_{FL}*, *Extl1* et *CsGalNacT1 Δ* ont récemment été réalisées. Deux lignées de souris transgéniques issues de deux clones ES différents pour *Extl1* et

CsGalNAcT1_{FL} ont été obtenues alors qu'on ne compte, à ce jour, qu'une seule lignée pour CsGalNAcT1_Δ. L'analyse très récente de ces animaux (CsGalNAcT1_{FL} et Ext11) sur une seule lignée montre certaines différences mais ces différentes pistes restent préliminaires et ne permettent encore pas de conclure quant à l'importance de ce phénotype, sa reproductibilité, et donc de déterminer les rôles de ces enzymes dans la lignée B.

Cet article, « en gros travaux » mérite beaucoup plus de manipulations à la paillasse afin de mettre en évidence les rôles précis et incontestables de ces enzymes *in vivo* au cours de la maturation B et donc comprendre de façon plus large, le rôle des GAGs le long de la différenciation B, du stade B immature au stade très mature, plasmocyte-sécréteur d'anticorps.

Contribution personnelle au travail :

Ma contribution à ce travail a été :

- 1) de réaliser les purifications de cellules, les préparations d'ARN et de cDNA, de créer deux « micro-fluidic cards » d'intérêt en choisissant des gènes impliqués dans la glycosylation, mais également l'analyse, le traitement et l'interprétation des données de PCR quantitative
- 2) d'effectuer les clonages et les constructions B-spécifiques permettant la surexpression des gènes *Ext11* et *CsGalNAcT1* (FL et Δ)
- 3) de transfecter ces constructions dans les cellules ES et de cribler les clones positifs
- 4) de phénotyper les animaux.

Perspectives

L'état des réflexions sur les isotypes du BCR et leur fonction :

Quelqu'en soit l'isotype, la présence d'un BCR à la membrane du lymphocyte B est indispensable à sa survie (Lam et al., 1997). La signalisation *via* le BCR ne se limite cependant pas à la survie mais contrôle au contraire de multiples choix, notamment entre apoptose, anergie, prolifération et différenciation tout au long de l'ontogénie B.

La description d'une structure univoque du BCR, associant toujours une molécule d'Ig membranaire à l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$, complexe de transduction du signal portant des motifs ITAM au niveau des deux régions cytoplasmiques, pourrait donner à penser que toutes les Ig membranaires transduisent le même type de signal « limité » à une signalisation α/β lors de leur pontage par un ligand. Une comparaison des différentes classes de chaînes lourdes entre elles et au cours de l'évolution, suggère cependant que la structure des trois domaines (extra-cellulaire / transmembranaire et intra-cellulaire) de l'Ig elle-même, pourrait moduler cette signalisation. La question du rôle spécifique des isotypes commutés du BCR reste imparfaitement résolue. C'est une question importante car l'idée d'un rôle spécialement « affecteur » de l'IgM dans la mise en place et la sélection initiale du répertoire (où à la fois des signaux positifs et négatifs sont nécessaires) cadre bien avec la physiologie des cellules immatures, alors que l'idée d'un caractère plus spécialement « effecteur » des BCR commutés apparaît comme une explication spécialement séduisante de la dualité entre des réponses humorales primaires, basales et des réponses secondaires, explosives aboutissant à la génération rapide de cellules sécrétrices d'anticorps de haute affinité (Manser, 2002). De nombreuses questions méritent cependant clairement d'être explorées plus avant.

La question du BCR « IgE » est à part, du fait de l'implication des IgE dans une pathologie très fréquente et parfois gravissime, l'anaphylaxie. Capables de susciter de fortes réactions immunitaires alors même qu'elles peuvent n'être présentes qu'à des concentrations inférieures au ng/ml, les IgE spécifiques se doivent d'être contrôlées d'une façon particulièrement stringente et aucune explication claire ne justifie à ce jour que des cellules facilement différenciables et identifiables *in vitro* en présence d'IL4 (Coffman et al., 1993), ne soient par contraste virtuellement indétectables *in vivo*. La nature et la localisation des cellules-mémoire à IgE restent ainsi obscures, alors même que leur existence est indirectement attestée par la permanence des IgE spécifiques d'allergènes dans le sérum des patients parfois même plusieurs dizaines d'années après un contact sensibilisant.

En ce qui concerne le BCR IgE, un nombre relativement limité d'études a été publié jusqu'ici, avec une cohérence imparfaite. Une première étude de transfectants associant la région constante C ϵ à un domaine variable défini (sans tester un répertoire) a montré une fonction de l'IgE similaire mais moins forte que celle de l'IgM dans la lignée immature WEHI-231 : en l'occurrence une fonction pro-apoptotique en cas de pontage du BCR comme on peut l'attendre dans une lignée pré-B ! (Batista et al., 1996). Dans une autre étude, le BCR IgE s'est révélé au contraire (comme l'IgG) insensible à l'inhibition par CD22 et pourrait donc être ainsi considéré de façon simpliste, comme « hyperactivateur » (Sato et al., 2007). Enfin, des constructions basées sur des ADNc ϵ transfectés dans la lignée A20 en association à un seul type de domaine variable (donc induisant un biais V potentiel) ont suggéré que la forme majeure de l'IgE membranaire humaine (à espaceur extracellulaire long) était modérément apoptotique en cas de pontage du BCR, alors que l'isoforme membranaire mineure (à espaceur extracellulaire court) l'était plus nettement (Poggianella et al., 2006). Nos résultats avec un fragment génomique entier libre de s'épisser naturellement vont au-delà puisqu'ils révèlent un signal tonique pro-apoptotique en l'absence même de pontage du BCR.

Même si de plus amples démonstrations sont nécessaires, l'idée qui ressort de nos travaux, dans le contexte de la littérature précédente, est que l'IgE membranaire est plutôt inductrice de différenciation plasmocytaire que de différenciation B mémoire, ce qui cadre bien avec le fait qu'on ne retrouve les cellules productrices d'IgE qu'en dehors des centres germinatifs (notamment chez des souris hyper-IgE), là où se localisent normalement les plasmocytes récemment différenciés (Erazo et al., 2007). Nous pensons donc que l'expression d'un BCR IgE est une étape transitoire nécessaire à la différenciation des plasmocytes à IgE (qui pourront constituer la mémoire des réponses anti-infectieuses IgE comme la mémoire de l'anaphylaxie), mais qu'il s'agit d'une étape forcément brève, l'IgE membranaire condamnant les cellules qui l'expriment à un suicide rapide. Nos résultats seraient alors en accord avec ceux d'Eraso qui identifient dans le compartiment mémoire, non pas des B à IgE membranaires, mais plutôt des B à IgM ou IgG1 membranaire comme capables de participer à des réponses secondaires (sans préjuger de l'existence de plasmocytes à longue durée de vie). Clairement, beaucoup est encore à attendre de l'exploitation d'autres modèles transgéniques dans une situation où les cellules primaires à IgE sont sans doute trop peu abondantes pour se prêter à une analyse *in vivo* chez l'homme ou la souris sauvage.

Bien que largement plus explorée par de nombreux articles décrivant des souris transgéniques ou *knock-in*, la question de fonction spécifique du BCR IgG n'est pas clarifiée. Les travaux des

équipes de Tsubata et Goodnow avaient, il y a quelques années, fait accepter l'idée d'une fonction hyper-activatrice du BCR IgG, clairement hyper-stimulatrice de la différenciation plasmocytaire et hors du contrôle de CD22 /SHP-1... (mais là encore, dans des modèles biaisés par l'utilisation d'un V unique et non pas d'un répertoire diversifié). Ce modèle séduisant vient de s'écrouler au début de l'année 2007 avec les travaux de Waisman n'identifiant ni hyper-différenciation plasmocytaire, ni indépendance par rapport à CD22 dans des cellules B « knock-in pour l'IgG1 murine » et cette fois capables de construire un vrai répertoire B. Le rôle de l'IgG1 dans ces travaux apparaît en fait comme quasi-identique à celui d'une IgM et pouvant lui être substitué précocément pendant la différenciation des progéniteurs B dans la moelle osseuse. Le modèle knock-in IgG1 humaine que nous avons décrit dans cette thèse avec une application potentiellement plutôt biotechnologique est encore compris de façon trop préliminaire pour qu'on puisse l'opposer aux précédents, mais il manifeste clairement une hyper-différenciation plasmocytaire attestée par la surexpression de Blimp1 et Xbp1 et un blocage précoce de maturation à la transition pro-B/pre-B.

Les points qui compliquent la réflexion peuvent être l'utilisation d'une région constante humaine dans notre cas (même si elle est hautement similaire à son homologue murine dans la région transmembranaire et intracellulaire)... on peut ainsi s'interroger quant à la bonne association de la chaîne lourde humaine avec les chaînes légères ou pseudo-légères murines et quant au risque d'une conformation anormale du récepteur en résultant et perturbant la signalisation en aval ?? la question du ligand ou des ligands du préBCR reste également posée : une mauvaise association avec la pseudo-chaîne légère pourrait empêcher l'association avec un ligand (galectine, HSPG...) tandis que la présence prématurée d'un isotype commuté possédant un long domaine cytoplasmique pourrait moduler les interactions avec des partenaires intra-cellulaires à préciser. Par delà d'hypothétiques barrières d'espèces, il est cependant frappant de retrouver dans notre modèle l'hyperdifférenciation plasmocytaire d'abord décrite avec des transgènes $\gamma 1$ d'origine murine. La diversité des phénotypes des multiples lignées transgéniques γ publiées laisse finalement perplexe puisque certaines lignées réalisent l'exclusion allélique, d'autres pas... leur niveau d'expression variable comme leur lien avec une seule région V peuvent être à l'origine de biais incontournables. Enfin, il ne faut sans doute pas sous-estimer le rôle que peuvent jouer les domaines extracellulaires CH1 à CH3/CH4 du BCR dans sa fonction en tant que récepteur de membrane. Les travaux qui ont précédemment cherché à apprécier les différences de signalisation intracellulaire d'IgM et d'IgG simplement en greffant à une IgM la région intracellulaire d'une IgG ne reflètent sans doute pas la fonction d'un vrai BCR IgG complet (la différence observée à

cet égard, entre les formes des mIgE à espaceur extracellulaire court ou long sont particulièrement illustratives de ce niveau supplémentaire de complexité du récepteur). De plus, il a été démontré que les simples KO $\lambda 5$, VpréB1, le double KO VpréB1/VpréB2 et le triple KO $\lambda 5$ /VpréB1/VpréB2 montraient un blocage au stade préBI-préBII donc les domaines extracellulaires jouent bien un rôle important dans la signalisation et donc l'induction de la maturation B (Martensson et al., 1999; Mundt et al., 2001; Shimizu et al., 2002).

Enfin, la question du BCR IgA constitue un terrain encore plus vierge que celui de l'IgE. Notre laboratoire avait montré dans le passé que les IgA membranaires humaines et en particulier l'IgA2, s'associaient moins bien que l'IgM au co-récepteur CD19 dans des expériences de co-modulation après pontage. Nos travaux sur les souris knock-in IgA vont dans le même sens et ne révèlent pas de phosphorylation de CD19. Si notre modèle IgA peut souffrir de la même critique que le modèle IgG parce qu'il est hétérologue, les éléments de réponse à cette objection se trouvent là-aussi dans la très forte identité de séquences entre l'homme et la souris en ce qui concerne les régions d'ancrage membranaire et intra-cellulaire de l'IgA. Ce modèle manifeste ainsi comme notre modèle IgG1, une tendance à l'hyperdifférenciation plasmocytaire et un blocage de maturation précoce à la transition proB/préB. Ces résultats cadrent assez bien avec ce que l'on sait de la physiologie normale du système immunitaire humain (et murin) où les cellules à mIgM dominent très nettement les cellules à mIgA (que ce soit dans le sang périphérique, la moelle, mais aussi dans les plaques de Peyer ou les amygdales), mais où pourtant, le taux de synthèse quotidien de l'IgA soluble est très supérieur à celui de l'IgM soluble (proche pour l'IgA voire supérieur à celui de l'IgG, tout en aboutissant à des concentrations plasmatiques inférieures du fait de l'exportation et de la déperdition permanente au niveau des muqueuses et de la demie vie 5 à 6 fois plus courte dans le milieu interne). Même si ces données sont très difficiles à quantifier *in vivo*, il n'est cependant pas choquant pour un histologiste ou un pathologiste de considérer que les cellules primaires à IgA observées *in vivo* chez le sujet sain sont plus souvent des plasmocytes (en particulier muqueux) et que les cellules à IgM sont plus souvent des lymphocytes à Ig de membrane. Même si les expériences basées sur des transfectants (Sato et al., 2007) n'ont pas montré pour l'IgA l'indépendance par rapport à l'inhibition que peut médier CD22 (comme cela a été clamé puis contesté pour mIgG), nous pensons donc que le BCR IgA est constitutivement hyperactivateur (*cf* l'activation constitutive de phospho-ERK dans notre modèle) et promoteur de différenciation plasmocytaire (d'où la facilité de réponses IgA T-dépendantes comme T-indépendantes).

L'ouverture d'un nouveau champ d'étude quant à l'importance des glycosaminoglycannes dans la physiologie de la lignée B :

Toutes les cellules vivantes portent sur leurs lipides ou leurs protéines un réseau complexe et dense de glycannes formant ainsi des glycoprotéines ou des lipides. Localisés pour la plupart à la surface cellulaire, les glycannes jouent un rôle fondamental dans les interactions “cellule-cellule” et “cellule-matrice extracellulaire”, cruciales pour le développement d'organismes multicellulaires complexes. Ils se trouvent également dans une position privilégiée pour l'établissement d'interactions avec différents pathogènes. Ainsi, au cours des dernières décennies, les chercheurs ont mis en évidence leur importance dans la détermination des groupes sanguins (Kabat, 1956), leurs rôles dans les interactions cellulaires (Roseman, 1970), leurs implications dans la fécondation (Jego et al., 1980), dans la différenciation erythrocytaire (Liu et al., 1981), mais également dans certaines maladies où un défaut dans la machinerie de la *N*-glycosylation peut conduire, chez l'Homme, à un syndrome de type CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) (Freeze, 2006)...

Bien que la glycosylation soit un vaste domaine, peu de choses sont encore connues dans la maturation B. Nous savons par exemple, que les B activés des centres germinatifs deviennent PNA high, que certaines molécules B-spécifiques, comme par exemple les lectines de la famille des Siglecs, CD22 et récemment Siglec-G sont connues pour moduler le signal du BCR après activation, que certains glycosaminoglycannes greffés sur des core-protéiques (syndécan comme CD138 exprimé à la surface des plasmocytes) ou ancrés à la membrane (glypican) interviennent dans l'adhésion cellulaire, la migration, que d'autres sont connus pour intervenir dans la signalisation en jouant un rôle dans l'oligomérisation des récepteurs de surface (TNF R)... Il est également connu que les différents isotypes d'Ig sont glycosylés (*O* et/ou *N*-glycosylation) permettant ainsi le repliement et l'assemblage correct des Ig, améliorant leur transport intracellulaire et les protégeant de la dégradation intracellulaire (pour revue : Wall et Kuehl, 1983). Par des expériences d'inhibition de la glycosylation, il a été montré que la glycosylation n'était pas nécessaire pour l'expression des Ig à la membrane des cellules B mais qu'elle était obligatoire pour la sécrétion par les plasmocytes de certains isotypes. De plus, il est maintenant clairement établi que les sucres présents dans la région Fc des Ig participent directement à certaines fonctions effectrices des anticorps comme la fixation du complément, l'ADCC ou les interactions avec les récepteurs Fc. Des anomalies de glycosylation des Ig sont également associées à certaines pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde ou certaines néphropathies

(néphropathies à IgA, amylose AL, syndrome de Randall) (Allen et al., 1999; Preud'homme et al., 1994; Stevens, 2000).

Dans une perspective d'étude des phénomènes pouvant modifier la réactivité des récepteurs de surface de la cellule B, nous nous sommes intéressés à la modulation de la glycosylation au cours de la différenciation B par l'étude des variations de l'expression de certains gènes ciblés, impliqués dans la glycosylation, afin d'être capables par la suite, de différencier des sous-populations B correspondant à différents états de maturation, d'activation ou de localisation. Cette étude du glycotranscriptome au cours de la maturation B, nous a notamment permis de cibler puis d'étudier d'une manière plus approfondie deux gènes d'intérêt *CsGalNacT1* et *Ext11* jouant tous deux un rôle dans la biosynthèse des glycosaminoglycannes et étant exprimés différemment au cours de l'ontogénie B. Dans le but de discerner si cette régulation d'expression présente un rôle fonctionnel ou pas, nous avons choisi de la compromettre et de regarder les effets éventuels de cette dérégulation en réalisant des lignées de souris transgéniques qui surexpriment de façon B-spécifique ces 2 gènes. Ces résultats encore très préliminaires nous montrent certaines pistes d'intérêts mais demandent de plus amples manipulations. Nous nous attendons à ce que la surexpression des enzymes intervenant directement dans la biosynthèse des GAGs (que ce soit *CsGalNAct1* et *Ext11*) au cours de la maturation B induise une plus forte expression de GAGs à la surface des cellules. L'identification des glycoprotéines porteuses de ces GAGs et de leurs fonctions serait alors l'objectif majeur suivant. Au moins en théorie, un accroissement d'expression des GAGs à la surface de nos cellules pourrait avoir des conséquences sur la signalisation/l'oligomérisation de certains récepteurs induisant une signalisation trop forte ou au contraire masquant des sites d'interactions avec différents ligands. Les GAGs étant connus pour être des éponges à facteurs de croissance et chimiokines, le fait de moduler leur présence pourrait avoir un impact sur la concentration de ces différents facteurs au voisinage des cellules et donc avoir un impact sur la signalisation, les interactions cellulaires... que les GAGs soient membranaires ou sécrétés. Il est déjà connu que les GAGs joueraient un rôle dans la différenciation B précoce. Des HSPGs sécrétés par les cellules stromales ont été mis en évidence en tant que potentiels ligands du pré-BCR chez la souris (Bradl et al., 2003) mais une seule étude a cependant été réalisée et reste sans suite à ce jour.

La caractérisation des patrons d'expression du « glycotranscriptome B » correspondant aux différents états d'activation, de localisation ou de maturation B a non seulement un intérêt fondamental, mais aussi « valorisable ». Ainsi, dans le cadre d'une collaboration avec le groupe

«Lymphomagenèse» dirigé par le professeur J. Feuillard au sein de notre UMR CNRS, nous essayons de déterminer selon les patrons d'expression de différentes sous-populations B humaines, quels sont les équivalents normaux de différents types de lymphomes B (folliculaires, LLC, plasmocytomes) dans la perspective de mettre au point des outils diagnostiques, pronostiques et de suivi thérapeutique. Pour l'instant une sélection de 27 gènes dont les produits auraient un rôle dans l'établissement du microenvironnement cellulaire ont été identifiés et permettent de séparer ces trois types de proliférations (extrêmement différentes et déjà très étudiées mais intéressantes ici pour valider le pouvoir discriminant du glycotranscriptome). Ces différents patrons d'expression B normaux peuvent également servir de comparaison à d'autres pathologies de l'immunité B comme la maladie de Berger qui est une néphropathie à dépôt d'IgA (où les IgA seraient volontiers hyposialylées et hypogalactosylées).

Annexes

Article 4

“RNA surveillance down-regulates expression of nonfunctional κ alleles and detects premature termination within the last κ exon”

Laurent Delpy, Christophe Sirac, Emmanuelle magnoux, Sophie Raynal-Duchez and Michel Cogné.

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0305586101

(Manuscrit accepté le 22 Mars 2004 à Proceedings of the National Academy of Sciences, USA)

La recombinaison V(D)J peut induire l'addition ou la délétion de nucléotides de façon aléatoire. Dans certains cas, ces réarrangements génèrent un décalage du cadre de lecture pouvant induire la présence de codons stop prématurés (PTC pour Premature Termination Codon) et par conséquence, la possibilité de produire une chaîne d'immunoglobuline tronquée. Bien qu'une forte proportion de lymphocytes matures périphériques possède un allèle non fonctionnel aux loci IgH et/ou IgL, l'expression de chaînes tronquées n'est pas observée dans les cellules B normales. Laurent Delpy et Christophe Sirac ont voulu montré que les transcrits de chaînes légères κ possédant des décalages du cadre de lecture provoqués par les recombinaisons V-J (et induisant ainsi des mutations non-sens) étaient sujets à un processus de surveillance des ARN pouvant engendrer leur élimination ou l'inhibition de leur épissage et ainsi, permettre le maintien de l'exclusion allélique des chaînes légères dans des cellules possédant deux allèles réarrangés dont l'un « hors-phase ».

Contribution personnelle à ce travail :

Ce travail, initié lors de mon stage de maîtrise et achevé au début de ma première année de thèse a consisté en l'amplification par PCR des jonctions V κ -J κ , leur clonage dans des vecteurs PCRII-TOPO puis le séquençage et l'analyse de ces différents produits de PCR.

Article 5

“Light chain inclusion permits terminal B cell differentiation and does not necessarily result in autoreactivity”

Christophe Sirac, Claire Carrion*, Sophie Raynal-Duchez*, Isabelle Comte and Michel Cogné.

(* *contribution égale*)

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0509121103

(Manuscrit accepté le 23 Mars 2006 à Proceedings of the National Academy of Sciences, USA)

Lors du développement des cellules B, l'assemblage du BCR se fait normalement selon un processus ordonné de réarrangement (détailé dans le chapitre II) aboutissant à ce que chaque cellule B ne possède qu'un seul type de récepteur à sa surface grâce au phénomène d'exclusion allélique, essentiel dans la génération du répertoire B. Cependant, plusieurs travaux ont démontré l'existence d'un faible taux de cellules B périphériques exprimant deux chaînes lourdes distinctes (Barreto et Cumano, 2000) ou, plus fréquemment, deux chaînes légères, une κ et une λ (Giachino et coll., 1995). Dans ce travail, nous avons étudié les effets de l'insertion génique d'un gène $V\kappa J\kappa$ humain réarrangé en lieu et place des domaines $J\kappa$ du locus endogène de la souris. Cette étude a démontré l'apparition de cellules « incluses » dans les animaux hétérozygotes et homozygotes pour le transgène, c'est-à-dire exprimant une chaîne légère λ endogène et la chaîne chimérique κ . Ces cellules participent normalement aux réponses immunitaires et peuvent se différencier en cellules B mémoires commutées ou en plasmocytes sécréteurs d'anticorps hybrides κ et λ non-autoréactifs. Cela indique que l'exclusion allélique des chaînes légères n'est pas un pré-requis au développement de cellules B normales et que la sélection négative des BCR auto-réactifs peut s'effectuer même sous des conditions d'inclusion.

Contribution personnelle à ce travail :

J'ai essentiellement participé à cette étude lors des révisions demandées pour l'acceptation de ce papier alors que Christophe avait quitté le laboratoire pour son stage post-doctoral. Mon travail a en particulier consisté en la mise au point de RT-PCR Quantitative-sybrGreen sur des échantillons d'ARN de cellules B matures que j'ai préalablement triées afin de quantifier l'expression des transcrits κ et μ dans les souris hétérozygotes et homozygotes pour la mutation.

Références Bibliographiques

- Abney, E. R., Cooper, M. D., Kearney, J. F., Lawton, A. R. and Parkhouse, R. M.** (1978). Sequential expression of immunoglobulin on developing mouse B lymphocytes: a systematic survey that suggests a model for the generation of immunoglobulin isotype diversity. *J Immunol* **120**, 2041-9.
- Achatz, G., Nitschke, L. and Lamers, M. C.** (1997). Effect of transmembrane and cytoplasmic domains of IgE on the IgE response. *Science* **276**, 409-11.
- 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.
- 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.
- Allen, A. C., Bailey, E. M., Barratt, J., Buck, K. S. and Feehally, J.** (1999). Analysis of IgA1 O-glycans in IgA nephropathy by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1763-71.
- Allman, D., Lindsley, R. C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S. A. and Hardy, R. R.** (2001). Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation. *J Immunol* **167**, 6834-40.
- Alonso, L. and Fuchs, E.** (2003). Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev* **17**, 1189-200.
- Alt, F. W. and Baltimore, D.** (1982). Joining of immunoglobulin heavy chain gene segments: implications from a chromosome with evidence of three D-JH fusions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 4118-22.
- Alt, F. W., Yancopoulos, G. D., Blackwell, T. K., Wood, C., Thomas, E., Boss, M., Coffman, R., Rosenberg, N., Tonegawa, S. and Baltimore, D.** (1984). Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *Embo J* **3**, 1209-19.
- Amano, M., Galvan, M., He, J. and Baum, L. G.** (2003). The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death. *J Biol Chem* **278**, 7469-75.
- Arnold, L. W., McCray, S. K., Tatu, C. and Clarke, S. H.** (2000). Identification of a precursor to phosphatidyl choline-specific B-1 cells suggesting that B-1 cells differentiate from splenic conventional B cells in vivo: cyclosporin A blocks differentiation to B-1. *J Immunol* **164**, 2924-30.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J.** (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**, 770-6.
- Ashikari, S., Habuchi, H. and Kimata, K.** (1995). Characterization of heparan sulfate oligosaccharides that bind to hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* **270**, 29586-93.
- 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.
- Bandtlow, C. E. and Zimmermann, D. R.** (2000). Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* **80**, 1267-90.
- 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.
- Bassing, C. H., Alt, F. W., Hughes, M. M., D'Auteuil, M., Wehrly, T. D., Woodman, B. B., Gartner, F., White, J. M., Davidson, L. and Sleckman, B. P.** (2000). Recombination signal sequences restrict chromosomal V(D)J recombination beyond the 12/23 rule. *Nature* **405**, 583-6.
- Bassing, C. H., Swat, W. and Alt, F. W.** (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109 Suppl**, S45-55.
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J. P., Manis, J. P. and Alt, F. W.** (2005). The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* **438**, 508-11.
- Batista, F. D., Anand, S., Presani, G., Efremov, D. G. and Burrone, O. R.** (1996). The two membrane isoforms of human IgE assemble into functionally distinct B cell antigen receptors. *J Exp Med* **184**, 2197-205.
- Beckwith, M., Fenton, R. G., Katona, I. M. and Longo, D. L.** (1996). Phosphatidylinositol-3-kinase activity is required for the anti-ig-mediated growth inhibition of a human B-lymphoma cell line. *Blood* **87**, 202-10.
- Bensmana, M. and Lefranc, M. P.** (1990). Gene segments encoding membrane domains of the human immunoglobulin gamma 3 and alpha chains. *Immunogenetics* **32**, 321-30.
- Benson, M. J., Erickson, L. D., Gleeson, M. W. and Noelle, R. J.** (2007). Affinity of antigen encounter and other early B-cell signals determine B-cell fate. *Curr Opin Immunol* **19**, 275-80.
- Berek, C., Berger, A. and Apel, M.** (1991). Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* **67**, 1121-9.
- Berek, C. and Milstein, C.** (1988). The dynamic nature of the antibody repertoire. *Immunol Rev* **105**, 5-26.
- Berg, J., McDowell, M., Jack, H. M. and Wabl, M.** (1990). Immunoglobulin lambda gene rearrangement can precede kappa gene rearrangement. *Dev Immunol* **1**, 53-7.
- 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.
- 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.
- Bourin, M. C. and Lindahl, U.** (1993). Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem J* **289 (Pt 2)**, 313-30.
- Boyd, P. N., Lines, A. C. and Patel, A. K.** (1995). The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. *Mol Immunol* **32**, 1311-8.
- Bradl, H., Wittmann, J., Milius, D., Vettermann, C. and Jack, H. M.** (2003). Interaction of murine precursor B cell receptor with stroma cells is controlled by the unique tail of lambda 5 and stroma cell-associated heparan sulfate. *J Immunol* **171**, 2338-48.
- 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.
- Brauninger, A., Goossens, T., Rajewsky, K. and Kuppers, R.** (2001). Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol* **31**, 3631-7.

Brink, R., Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adams, E., Eris, J., Mason, D. Y., Hartley, S. B. and Basten, A. (1992). Immunoglobulin M and D antigen receptors are both capable of mediating B lymphocyte activation, deletion, or anergy after interaction with specific antigen. *J Exp Med* **176**, 991-1005.

Brockhausen, I., Reck, F., Kuhns, W., Khan, S., Matta, K. L., Meinjohanns, E., Paulsen, H., Shah, R. N., Baker, M. A. and Schachter, H. (1995). Substrate specificity and inhibition of UDP-GlcNAc:GlcNAc beta 1-2Man alpha 1-6R beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase V using synthetic substrate analogues. *Glycoconj J* **12**, 371-9.

Bruce, S. R., Dingle, R. W. and Peterson, M. L. (2003). B-cell and plasma-cell splicing differences: a potential role in regulated immunoglobulin RNA processing. *Rna* **9**, 1264-73.

Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M. C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J. L., Hufnagel, M., le Deist, F. et al. (2006). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* **124**, 287-99.

Buhl, A. M. and Cambier, J. C. (1999). Phosphorylation of CD19 Y484 and Y515, and linked activation of phosphatidylinositol 3-kinase, are required for B cell antigen receptor-mediated activation of Bruton's tyrosine kinase. *J Immunol* **162**, 4438-46.

Burkhardt, A. L., Brunswick, M., Bolen, J. B. and Mond, J. J. (1991). Anti-immunoglobulin stimulation of B lymphocytes activates src-related protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7410-4.

Calame, K. L., Lin, K. I. and Tunyaplin, C. (2003). Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 205-30.

Cambier, J. C., Newell, M. K., Justement, L. B., McGuire, J. C., Leach, K. L. and Chen, Z. Z. (1987). Ia binding ligands and cAMP stimulate nuclear translocation of PKC in B lymphocytes. *Nature* **327**, 629-32.

Cariappa, A. and Pillai, S. (2002). Antigen-dependent B-cell development. *Curr Opin Immunol* **14**, 241-9.

Carter, P. J. (2006). Potent antibody therapeutics by design. *Nat Rev Immunol* **6**, 343-57.

Cartron, G., Dacheux, L., Salles, G., Solal-Celigny, P., Bardos, P., Colombat, P. and Watier, H. (2002). Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene. *Blood* **99**, 754-8.

Casola, S. (2007). Control of peripheral B-cell development. *Curr Opin Immunol* **19**, 143-9.

Casola, S., Otipoby, K. L., Alimzhanov, M., Humme, S., Uyttersprot, N., Kutok, J. L., Carroll, M. C. and Rajewsky, K. (2004). B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* **5**, 317-27.

Chan, A. C., Iwashima, M., Turck, C. W. and Weiss, A. (1992). ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell* **71**, 649-62.

Chan, V. W., Meng, F., Soriano, P., DeFranco, A. L. and Lowell, C. A. (1997). Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* **7**, 69-81.

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., Decourt, C. and Cogne, M.** (1998). Insertion of the IgH locus 3' regulatory palindrome in expression vectors warrants sure and efficient expression in stable B cell transfectants. *Gene* **222**, 279-85.
- Chauveau, C., Jansson, E. A., Muller, S., Cogne, 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.
- Chen, H. T., Bhandoola, A., Difilippantonio, M. J., Zhu, J., Brown, M. J., Tai, X., Rogakou, E. P., Brotz, T. M., Bonner, W. M., Ried, T. et al.** (2000). Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science* **290**, 1962-5.
- Chen, J., Lu, L., Shi, S. and Stanley, P.** (2006). Expression of Notch signaling pathway genes in mouse embryos lacking beta4galactosyltransferase-1. *Gene Expr Patterns* **6**, 376-82.
- Chen, J., Moloney, D. J. and Stanley, P.** (2001a). Fringe modulation of Jagged1-induced Notch signaling requires the action of beta 4galactosyltransferase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13716-21.
- Chen, J., Trounstein, M., Kurahara, C., Young, F., Kuo, C. C., Xu, Y., Loring, J. F., Alt, F. W. and Huszar, D.** (1993). B cell development in mice that lack one or both immunoglobulin kappa light chain genes. *Embo J* **12**, 821-30.
- Chen, J. Z., Stall, A. M., Herzenberg, L. A. and Herzenberg, L. A.** (1990). Differences in glycoprotein complexes associated with IgM and IgD on normal murine B cells potentially enable transduction of different signals. *Embo J* **9**, 2117-24.
- Chen, X., Kinoshita, K. and Honjo, T.** (2001b). 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.
- Cheng, A. M., Rowley, B., Pao, W., Hayday, A., Bolen, J. B. and Pawson, T.** (1995). Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development. *Nature* **378**, 303-6.
- Cheng, P. C., Dykstra, M. L., Mitchell, R. N. and Pierce, S. K.** (1999). A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J Exp Med* **190**, 1549-60.
- Cherukuri, A., Cheng, P. C., Sohn, H. W. and Pierce, S. K.** (2001). The CD19/CD21 complex functions to prolong B cell antigen receptor signaling from lipid rafts. *Immunity* **14**, 169-79.
- Choquet, D., Ku, G., Cassard, S., Malissen, B., Korn, H., Fridman, W. H. and Bonnerot, C.** (1994). Different patterns of calcium signaling triggered through two components of the B lymphocyte antigen receptor. *J Biol Chem* **269**, 6491-7.
- Chumley, M. J., Dal Porto, J. M., Kawaguchi, S., Cambier, J. C., Nemazee, D. and Hardy, R. R.** (2000). A VH11V kappa 9 B cell antigen receptor drives generation of CD5+ B cells both in vivo and in vitro. *J Immunol* **164**, 4586-93.
- Chung, J. B., Sater, R. A., Fields, M. L., Erikson, J. and Monroe, J. G.** (2002). CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. *Int Immunol* **14**, 157-66.
- Chung, J. B., Silverman, M. and Monroe, J. G.** (2003). Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol* **24**, 343-9.
- Clatworthy, A. E., Valencia-Burton, M. A., Haber, J. E. and Oettinger, M. A.** (2005). The MRE11-RAD50-XRS2 complex, in addition to other non-homologous end-joining factors, is required for V(D)J joining in yeast. *J Biol Chem* **280**, 20247-52.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A. and Busslinger, M.** (2007). Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* **8**, 463-70.
- Cobb, R. M., Oestreich, K. J., Osipovich, O. A. and Oltz, E. M.** (2006). Accessibility control of V(D)J recombination. *Adv Immunol* **91**, 45-109.

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

Coleclough, C., Perry, R. P., Karjalainen, K. and Weigert, M. (1981). Aberrant rearrangements contribute significantly to the allelic exclusion of immunoglobulin gene expression. *Nature* **290**, 372-8.

Collins, B. E., Blixt, O., Bovin, N. V., Danzer, C. P., Chui, D., Marth, J. D., Nitschke, L. and Paulson, J. C. (2002). Constitutively unmasked CD22 on B cells of ST6Gal I knockout mice: novel sialoside probe for murine CD22. *Glycobiology* **12**, 563-71.

Collins, B. E., Blixt, O., Han, S., Duong, B., Li, H., Nathan, J. K., Bovin, N. and Paulson, J. C. (2006a). High-affinity ligand probes of CD22 overcome the threshold set by cis ligands to allow for binding, endocytosis, and killing of B cells. *J Immunol* **177**, 2994-3003.

Collins, B. E., Smith, B. A., Bengtson, P. and Paulson, J. C. (2006b). Ablation of CD22 in ligand-deficient mice restores B cell receptor signaling. *Nat Immunol* **7**, 199-206.

Coombe, D. R. and Kett, W. C. (2005). Heparan sulfate-protein interactions: therapeutic potential through structure-function insights. *Cell Mol Life Sci* **62**, 410-24.

Corcos, D., Dunda, O., Butor, C., Cesbron, J. Y., Lores, P., Bucchini, D. and Jami, J. (1995). Pre-B-cell development in the absence of lambda 5 in transgenic mice expressing a heavy-chain disease protein. *Curr Biol* **5**, 1140-8.

Corcos, D., Iglesias, A., Dunda, O., Bucchini, D. and Jami, J. (1991). Allelic exclusion in transgenic mice expressing a heavy chain disease-like human mu protein. *Eur J Immunol* **21**, 2711-6.

Cornall, R. J., Cheng, A. M., Pawson, T. and Goodnow, C. C. (2000). Role of Syk in B-cell development and antigen-receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1713-8.

Coutinho, A., Kazatchkine, M. D. and Avrameas, S. (1995). Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* **7**, 812-8.

Dammers, P. M., Visser, A., Popa, E. R., Nieuwenhuis, P. and Kroese, F. G. (2000). Most marginal zone B cells in rat express germline encoded Ig VH genes and are ligand selected. *J Immunol* **165**, 6156-69.

Danner, D. and Leder, P. (1985). Role of an RNA cleavage/poly(A) addition site in the production of membrane-bound and secreted IgM mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8658-62.

de Villartay, J. P., Poinsignon, C., de Chasseval, R., Buck, D., Le Guyader, G. and Villey, I. (2003). Human and animal models of V(D)J recombination deficiency. *Curr Opin Immunol* **15**, 592-8.

DeFranco, A. L. (1997). The complexity of signaling pathways activated by the BCR. *Curr Opin Immunol* **9**, 296-308.

del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* **278**, 687-9.

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., Cogné, 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.

Demetriou, M., Granovsky, M., Quaggin, S. and Dennis, J. W. (2001). Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. *Nature* **409**, 733-9.

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.

Denis, K. A., Provost, S., Witte, O. N., Brinster, R. L. and Storb, U. (1990). Delay of early B-lymphocyte development by gamma 2b immunoglobulin transgene: effect on differentiation-specific molecules. *Dev Immunol* **1**, 105-12.

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.

Drouet, J., Delteil, C., Lefrancois, J., Concannon, P., Salles, B. and Calsou, P. (2005). DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* **280**, 7060-9.

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.

Early, P., Rogers, J., Davis, M., Calame, K., Bond, M., Wall, R. and Hood, L. (1980). Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin mu gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* **20**, 313-9.

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.

Ehlich, A., Schaal, S., Gu, H., Kitamura, D., Muller, W. and Rajewsky, K. (1993). Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development. *Cell* **72**, 695-704.

Engel, H., Rolink, A. and Weiss, S. (1999). B cells are programmed to activate kappa and lambda for rearrangement at consecutive developmental stages. *Eur J Immunol*, **29**, 2167-2176.

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.

Erazo, A., Kutchukhidze, N., Leung, M., Christ, A. P., Urban, J. F., Jr., Curotto de Lafaille, M. A. and Lafaille, J. J. (2007). Unique maturation program of the IgE response in vivo. *Immunity* **26**, 191-203.

Ernst, P. and Smale, S. T. (1995). Combinatorial regulation of transcription. I: General aspects of transcriptional control. *Immunity* **2**, 311-9.

Esko, J. D. and Zhang, L. (1996). Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 663-70.

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.

Fearon, D. T. and Carter, R. H. (1995). The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* **13**, 127-49.

Felsenfeld, G. (1992). Chromatin as an essential part of the transcriptional mechanism. *Nature* **355**, 219-24.

Fong, D. C., Brauweiler, A., Minskoff, S. A., Bruhns, P., Tamir, I., Mellman, I., Daeron, M. and Cambier, J. C. (2000). Mutational analysis reveals multiple distinct sites within Fc gamma receptor IIB that function in inhibitory signaling. *J Immunol* **165**, 4453-62.

Forrester, W. C., van Genderen, C., Jenuwein, T. and Grosschedl, R. (1994). Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin mu gene on nuclear matrix attachment regions. *Science* **265**, 1221-5.

- Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. and Toker, A.** (1997). Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**, 665-8.
- Freeze, H. H.** (2006). Genetic defects in the human glycome. *Nat Rev Genet* **7**, 537-51.
- Freeze, H. H. and Aebi, M.** (2005). Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 490-8.
- Fruman, D. A., Snapper, S. B., Yballe, C. M., Alt, F. W. and Cantley, L. C.** (1999). Phosphoinositide 3-kinase knockout mice: role of p85alpha in B cell development and proliferation. *Biochem Soc Trans* **27**, 624-9.
- Fukumori, T., Takenaka, Y., Yoshii, T., Kim, H. R., Hogan, V., Inohara, H., Kagawa, S. and Raz, A.** (2003). CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Res* **63**, 8302-11.
- Fuxa, M., Skok, J., Souabni, A., Salvagiotto, G., Roldan, E. and Busslinger, M.** (2004). Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes Dev* **18**, 411-22.
- Fuxa, M. and Skok, J. A.** (2007). Transcriptional regulation in early B cell development. *Curr Opin Immunol* **19**, 129-36.
- Galceran, J., Farinas, I., Depew, M. J., Clevers, H. and Grosschedl, R.** (1999). Wnt3a-/-like phenotype and limb deficiency in Lef1(-/-)Tcf1(-/-) mice. *Genes Dev* **13**, 709-17.
- Gallagher, J. T., Lyon, M. and Steward, W. P.** (1986). Structure and function of heparan sulphate proteoglycans. *Biochem J* **236**, 313-25.
- Galvan, M., Tsuboi, S., Fukuda, M. and Baum, L. G.** (2000). Expression of a specific glycosyltransferase enzyme regulates T cell death mediated by galectin-1. *J Biol Chem* **275**, 16730-7.
- Gauthier, L., Rossi, B., Roux, F., Termine, E. and Schiff, C.** (2002). Galectin-1 is a stromal cell ligand of the pre-B cell receptor (BCR) implicated in synapse formation between pre-B and stromal cells and in pre-BCR triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13014-9.
- Gavel, Y. and von Heijne, G.** (1990). Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* **3**, 433-42.
- Gay, D., Saunders, T., Camper, S. and Weigert, M.** (1993). Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *J Exp Med* **177**, 999-1008.
- Geha, R. S., Jabara, H. H. and Brodeur, S. R.** (2003). The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol* **3**, 721-32.
- Geisow, M. J.** (1991). The coming of age of glycobiology. *Trends Biotechnol* **9**, 221-5.
- Gellert, M.** (2002). V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* **71**, 101-32.
- 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.
- Gold, M. R., Sanghera, J. S., Stewart, J. and Pelech, S. L.** (1992). Selective activation of p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine B lymphoma cell lines by membrane immunoglobulin cross-linking. Evidence for protein kinase C-independent and -dependent mechanisms of activation. *Biochem J* **287 (Pt 1)**, 269-76.
- Goodhardt, M., Cavelier, P., Doyen, N., Kallenbach, S., Babinet, C. and Rougeon, F.** (1993). Methylation status of immunoglobulin kappa gene segments correlates with their recombination potential. *Eur J Immunol* **23**, 1789-95.
- 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.

Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherspoon, J. S., Loblay, R. H., Raphael, K. et al. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 676-82.

Gu, M., Wang, W., Song, W. K., Cooper, D. N. and Kaufman, S. J. (1994). Selective modulation of the interaction of alpha 7 beta 1 integrin with fibronectin and laminin by L-14 lectin during skeletal muscle differentiation. *J Cell Sci* **107** (Pt 1), 175-81.

Guerrini, M., Agulles, T., Bisio, A., Hricovini, M., Lay, L., Naggi, A., Poletti, L., Sturiale, L., Torri, G. and Casu, B. (2002). Minimal heparin/heparan sulfate sequences for binding to fibroblast growth factor-1. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 222-30.

Guo, B., Kato, R. M., Garcia-Lloret, M., Wahl, M. I. and Rawlings, D. J. (2000). Engagement of the human pre-B cell receptor generates a lipid raft-dependent calcium signaling complex. *Immunity* **13**, 243-53.

Gupta-Bansal, R., Frederickson, R. C. and Brunden, K. R. (1995). Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation. *J Biol Chem* **270**, 18666-71.

Habas, R., Dawid, I. B. and He, X. (2003). Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation. *Genes Dev* **17**, 295-309.

Hacker, H., Redecke, V., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Hsu, L. C., Wang, G. G., Kamps, M. P., Raz, E., Wagner, H., Hacker, G. et al. (2006). Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**, 204-7.

Hadari, Y. R., Arbel-Goren, R., Levy, Y., Amsterdam, A., Alon, R., Zakut, R. and Zick, Y. (2000). Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *J Cell Sci* **113** (Pt 13), 2385-97.

Haltiwanger, R. S. and Lowe, J. B. (2004). Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* **73**, 491-537.

Han, H., Tanigaki, K., Yamamoto, N., Kuroda, K., Yoshimoto, M., Nakahata, T., Ikuta, K. and Honjo, T. (2002). Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision. *Int Immunol* **14**, 637-45.

Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M. A., Samyn-Petit, B., Julien, S. and Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie* **83**, 727-37.

Hardy, R. R. (2006). B-1 B cell development. *J Immunol* **177**, 2749-54.

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.

Harris, R. J. and Spellman, M. W. (1993). O-linked fucose and other post-translational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology* **3**, 219-24.

Hartley, S. B., Cooke, M. P., Fulcher, D. A., Harris, A. W., Cory, S., Basten, A. and Goodnow, C. C. (1993). Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* **72**, 325-35.

Hasan, M., Polic, B., Bralic, M., Jonjic, S. and Rajewsky, K. (2002). Incomplete block of B cell development and immunoglobulin production in mice carrying the muMT mutation on the BALB/c background. *Eur J Immunol* **32**, 3463-71.

Hashimoto, S., Iwamatsu, A., Ishiai, M., Okawa, K., Yamadori, T., Matsushita, M., Baba, Y., Kishimoto, T., Kurosaki, T. and Tsukada, S. (1999). Identification of the SH2 domain binding protein of Bruton's tyrosine kinase as BLNK--functional significance of Btk-SH2 domain in B-cell antigen receptor-coupled calcium signaling. *Blood* **94**, 2357-64.

- Hauke, G., Epplen, J. T., Chluba, J., Hollmann, A. and Peter, H. H.** (1988). IgD/lambda plasmacytoma with immunoglobulin kappa light-chain genes in the germ-line configuration. *J Clin Immunol* **8**, 407-13.
- Hecht, A. and Kemler, R.** (2000). Curbing the nuclear activities of beta-catenin. Control over Wnt target gene expression. *EMBO Rep* **1**, 24-8.
- Hertz, M. and Nemazee, D.** (1997). BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD-bone marrow B cells in vitro. *Immunity* **6**, 429-36.
- Hibbs, M. L., Tarlinton, D. M., Armes, J., Grail, D., Hodgson, G., Maglitto, R., Stacker, S. A. and Dunn, A. R.** (1995). Multiple defects in the immune system of Lyn-deficient mice, culminating in autoimmune disease. *Cell* **83**, 301-11.
- Hieter, P. A., Korsmeyer, S. J., Waldmann, T. A. and Leder, P.** (1981). Human immunoglobulin kappa light-chain genes are deleted or rearranged in lambda-producing B cells. *Nature* **290**, 368-72.
- Hippen, K. L., Buhl, A. M., D'Ambrosio, D., Nakamura, K., Persin, C. and Cambier, J. C.** (1997). Fc gammaRIIB1 inhibition of BCR-mediated phosphoinositide hydrolysis and Ca²⁺ mobilization is integrated by CD19 dephosphorylation. *Immunity* **7**, 49-58.
- Hodoniczky, J., Zheng, Y. Z. and James, D. C.** (2005). Control of recombinant monoclonal antibody effector functions by Fc N-glycan remodeling in vitro. *Biotechnol Prog* **21**, 1644-52.
- Hoffmann, A., Kerr, S., Jellusova, J., Zhang, J., Weisel, F., Wellmann, U., Winkler, T. H., Kneitz, B., Crocker, P. R. and Nitschke, L.** (2007). Siglec-G is a B1 cell-inhibitory receptor that controls expansion and calcium signaling of the B1 cell population. *Nat Immunol* **8**, 695-704.
- Hombach, J., Leclercq, L., Radbruch, A., Rajewsky, K. and Reth, M.** (1988). A novel 34-kd protein co-isolated with the IgM molecule in surface IgM-expressing cells. *Embo J* **7**, 3451-6.
- Hombach, J., Lottspeich, F. and Reth, M.** (1990). Identification of the genes encoding the IgM-alpha and Ig-beta components of the IgM antigen receptor complex by amino-terminal sequencing. *Eur J Immunol* **20**, 2795-9.
- Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Inohara, H. and Raz, A.** (2001). Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **7**, 661-8.
- Horikawa, K., Martin, S. W., Pogue, S. L., Silver, K., Peng, K., Takatsu, K. and Goodnow, C. C.** (2007). Enhancement and suppression of signaling by the conserved tail of IgG memory-type B cell antigen receptors. *J Exp Med* **204**, 759-69.
- Hoyer, K. K., Pang, M., Gui, D., Shintaku, I. P., Kuwabara, I., Liu, F. T., Said, J. W., Baum, L. G. and Teitell, M. A.** (2004). An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Pathol* **164**, 893-902.
- Hozumi, K., Negishi, N., Suzuki, D., Abe, N., Sotomaru, Y., Tamaoki, N., Mailhos, C., Ish-Horowitz, D., Habu, S. and Owen, M. J.** (2004). Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat Immunol* **5**, 638-44.
- Huber, C., Huber, E., Lautner-Rieske, A., Schable, K. F. and Zachau, H. G.** (1993). The human immunoglobulin kappa locus. Characterization of the partially duplicated L regions. *Eur J Immunol* **23**, 2860-7.
- Huelsken, J. and Birchmeier, W.** (2001). New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 547-53.
- Hughes, R. C.** (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1473**, 172-85.

Hwang, H. Y., Olson, S. K., Esko, J. D. and Horvitz, H. R. (2003). Caenorhabditis elegans early embryogenesis and vulval morphogenesis require chondroitin biosynthesis. *Nature* **423**, 439-43.

Ingold, K., Zumsteg, A., Tardivel, A., Huard, B., Steiner, Q. G., Cachero, T. G., Qiang, F., Gorelik, L., Kalled, S. L., Acha-Orbea, H. et al. (2005). Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners. *J Exp Med* **201**, 1375-83.

Inlay, M., Alt, F. W., Baltimore, D. and Xu, Y. (2002). Essential roles of the kappa light chain intronic enhancer and 3' enhancer in kappa rearrangement and demethylation. *Nat Immunol* **3**, 463-8.

Iozzo, R. V. (1998). Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* **67**, 609-52.

Iritani, B. M., Forbush, K. A., Farrar, M. A. and Perlmutter, R. M. (1997). Control of B cell development by Ras-mediated activation of Raf. *Embo J* **16**, 7019-31.

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

Jack, H. M. and Wabl, M. (1988). Immunoglobulin mRNA stability varies during B lymphocyte differentiation. *Embo J* **7**, 1041-6.

Jacob, J., Kassir, R. and Kelsoe, G. (1991). In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *J Exp Med* **173**, 1165-75.

Jefferis, R. (2005). Glycosylation of recombinant antibody therapeutics. *Biotechnol Prog* **21**, 11-6.

Jego, P., Joly, J. and Boisseau, C. (1980). [Amphibian jelly envelopes (proteins secreted by the oviduct) and their role in fertilization]. *Reprod Nutr Dev* **20**, 557-67.

Johnson, G. L. and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-2.

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

Kabak, S., Skaggs, B. J., Gold, M. R., Affolter, M., West, K. L., Foster, M. S., Siemasko, K., Chan, A. C., Aebersold, R. and Clark, M. R. (2002). The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways. *Mol Cell Biol* **22**, 2524-35.

Kabat, E. A. (1956). Heterogeneity in extent of the combining regions of human antidextran. *J Immunol* **77**, 377-85.

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.

Kadonaga, J. T. (1998). Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines. *Cell* **92**, 307-13.

Kaisho, T., Schwenk, F. and Rajewsky, K. (1997). The roles of gamma 1 heavy chain membrane expression and cytoplasmic tail in IgG1 responses. *Science* **276**, 412-5.

Kallies, A. and Nutt, S. L. (2007). Terminal differentiation of lymphocytes depends on Blimp-1. *Curr Opin Immunol* **19**, 156-62.

Kaneko, Y., Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* **313**, 670-3.

Kao, Y. H., Lee, G. F., Wang, Y., Starovasnik, M. A., Kelley, R. F., Spellman, M. W. and Lerner, L. (1999). The effect of O-fucosylation on the first EGF-like domain from human blood coagulation factor VII. *Biochemistry* **38**, 7097-110.

Karim, R., Tse, G., Putti, T., Scolyer, R. and Lee, S. (2004). The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology* **36**, 120-8.

Katagiri, T., Ogimoto, M., Hasegawa, K., Arimura, Y., Mitomo, K., Okada, M., Clark, M. R., Mizuno, K. and Yakura, H. (1999). CD45 negatively regulates lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells. *J Immunol* **163**, 1321-6.

Kawashima, H., Atarashi, K., Hirose, M., Hirose, J., Yamada, S., Sugahara, K. and Miyasaka, M. (2002). Oversulfated chondroitin/dermatan sulfates containing GlcAbeta1/IdoAalpha1-3GalNAc(4,6-O-disulfate) interact with L- and P-selectin and chemokines. *J Biol Chem* **277**, 12921-30.

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., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Le Bert, M. and Cogne, M. (2004). Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood* **103**, 3828-36.

Kim, K. M. and Reth, M. (1995). The B cell antigen receptor of class IgD induces a stronger and more prolonged protein tyrosine phosphorylation than that of class IgM. *J Exp Med* **181**, 1005-14.

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

Kitamura, D., Roes, J., Kuhn, R. and Rajewsky, K. (1991). A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* **350**, 423-6.

Kleene, R. and Berger, E. G. (1993). The molecular and cell biology of glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta* **1154**, 283-325.

Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K. and Dalla-Favera, R. (2006). Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat Immunol* **7**, 773-82.

Klippel, A., Kavanaugh, W. M., Pot, D. and Williams, L. T. (1997). A specific product of phosphatidylinositol 3-kinase directly activates the protein kinase Akt through its pleckstrin homology domain. *Mol Cell Biol* **17**, 338-44.

Knight, A. M., Lucocq, J. M., Prescott, A. R., Ponnambalam, S. and Watts, C. (1997). Antigen endocytosis and presentation mediated by human membrane IgG1 in the absence of the Ig(alpha)/Ig(beta) dimer. *Embo J* **16**, 3842-50.

Kolset, S. O. and Gallagher, J. T. (1990). Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochim Biophys Acta* **1032**, 191-211.

Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**, 631-64.

Korsmeyer, S. J., Hieter, P. A., Sharrow, S. O., Goldman, C. K., Leder, P. and Waldmann, T. A. (1982). Normal human B cells display ordered light chain gene rearrangements and deletions. *J Exp Med* **156**, 975-85.

- 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.
- Krappmann, D., Patke, A., Heissmeyer, V. and Scheidereit, C.** (2001). B-cell receptor- and phorbol ester-induced NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase activation in B cells requires novel protein kinase C's. *Mol Cell Biol* **21**, 6640-50.
- Kukuruzinska, M. A. and Lennon-Hopkins, K.** (1999). ALG gene expression and cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 359-72.
- Kumararatne, D. S. and MacLennan, I. C.** (1982). The origin of marginal-zone cells. *Adv Exp Med Biol* **149**, 83-90.
- Kuppers, R., Zhao, M., Hansmann, M. L. and Rajewsky, K.** (1993). Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *Embo J* **12**, 4955-67.
- Kuroda, K., Han, H., Tani, S., Tanigaki, K., Tun, T., Furukawa, T., Taniguchi, Y., Kurooka, H., Hamada, Y., Toyokuni, S. et al.** (2003). Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity* **18**, 301-12.
- Kurooka, H. and Honjo, T.** (2000). Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. *J Biol Chem* **275**, 17211-20.
- Kurtz, B. S., Witte, P. L. and Storb, U.** (1997). Gamma 2b provides only some of the signals normally given via mu in B cell development. *Int Immunol* **9**, 415-26.
- Lagana, A., Goetz, J. G., Cheung, P., Raz, A., Dennis, J. W. and Nabi, I. R.** (2006). Galectin binding to Mga5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells. *Mol Cell Biol* **26**, 3181-93.
- 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.
- Laskin, J. D., Dokidis, A., Sirak, A. A. and Laskin, D. L.** (1991). Distinct patterns of sulfated proteoglycan biosynthesis in human monocytes, granulocytes and myeloid leukemic cells. *Leuk Res* **15**, 515-23.
- 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.
- Leduc, I. and Cogne, M.** (1996). Regulatory elements of the mb-1 gene encoding the Ig-alpha component of the human B-cell antigen receptor. *Mol Immunol* **33**, 1277-86.
- Leeb, B. F., Petera, P. and Neumann, K.** (1996). [Results of a multicenter study of chondroitin sulfate (Condrosulf) use in arthroses of the finger, knee and hip joints]. *Wien Med Wochenschr* **146**, 609-14.
- Lefranc, M. P., Pallares, N. and Frippiat, J. P.** (1999). Allelic polymorphisms and RFLP in the human immunoglobulin lambda light chain locus. *Hum Genet* **104**, 361-9.
- Li, D. H., Tung, J. W., Tarner, I. H., Snow, A. L., Yukinari, T., Ngermaneeponthong, R., Martinez, O. M. and Parnes, J. R.** (2006). CD72 down-modulates BCR-induced signal transduction and diminishes survival in primary mature B lymphocytes. *J Immunol* **176**, 5321-8.
- 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.
- Liang, H., Chen, Q., Coles, A. H., Anderson, S. J., Pihan, G., Bradley, A., Gerstein, R., Jurecic, R. and Jones, S. N.** (2003). Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell* **4**, 349-60.

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.

Lin, K. I., Tunyaplin, C. and Calame, K. (2003). Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. *Immunol Rev* **194**, 19-28.

Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M. and Kjellen, L. (1998). Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem* **273**, 24979-82.

Linenberger, M. L., Maloney, D. G. and Bernstein, I. D. (2002). Antibody-directed therapies for hematological malignancies. *Trends Mol Med* **8**, 69-76.

Liu, D., Jenab, J. and Rosenberg, N. (1997). Kappa and lambda rearrangement occur simultaneously in transformed pre-B cells. *J Immunol* **159**, 6061-9.

Liu, F. T. and Rabinovich, G. A. (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* **5**, 29-41.

Liu, P. I., Poon, K. C. and Liu, S. S. (1981). In vitro effect of glucan on mouse hemopoietic committed progenitor cells. *Life Sci* **29**, 1027-32.

Liu, Y. J. and Arpin, C. (1997). Germinal center development. *Immunol Rev* **156**, 111-26.

Liu, Y. J., Barthelemy, C., de Bouteiller, O., Arpin, C., Durand, I. and Banchereau, J. (1995). Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2. *Immunity* **2**, 239-48.

Liu, Y. J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y. and MacLennan, I. C. (1991). Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* **21**, 2951-62.

Liu, Z. M., George-Raizen, J. B., Li, S., Meyers, K. C., Chang, M. Y. and Garrard, W. T. (2002). Chromatin structural analyses of the mouse Igkappa gene locus reveal new hypersensitive sites specifying a transcriptional silencer and enhancer. *J Biol Chem* **277**, 32640-9.

Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M. C. and Carsetti, R. (1999). B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J Exp Med* **190**, 75-89.

Lowe, J. B. and Marth, J. D. (2003). A genetic approach to Mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem* **72**, 643-91.

Luby, T. M., Schrader, C. E., Stavnezer, J. and Selsing, E. (2001). The mu switch region tandem repeats are important, but not required, for antibody class switch recombination. *J Exp Med* **193**, 159-68.

Luisiri, P., Lee, Y. J., Eisfelder, B. J. and Clark, M. R. (1996). Cooperativity and segregation of function within the Ig-alpha/beta heterodimer of the B cell antigen receptor complex. *J Biol Chem* **271**, 5158-63.

Lund, J., Takahashi, N., Pound, J. D., Goodall, M., Nakagawa, H. and Jefferis, R. (1995). Oligosaccharide-protein interactions in IgG can modulate recognition by Fc gamma receptors. *Faseb J* **9**, 115-9.

Luo, Y., Koles, K., Vorndam, W., Haltiwanger, R. S. and Panin, V. M. (2006). Protein O-fucosyltransferase 2 adds O-fucose to thrombospondin type 1 repeats. *J Biol Chem* **281**, 9393-9.

Lutz, C., Ledermann, B., Kosco-Vilbois, M. H., Ochsenbein, A. F., Zinkernagel, R. M., Kohler, G. and Brombacher, F. (1998). IgD can largely substitute for loss of IgM function in B cells. *Nature* **393**, 797-801.

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

- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K. and Lieber, M. R.** (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* **108**, 781-94.
- Ma, Y. Q. and Geng, J. G.** (2000). Heparan sulfate-like proteoglycans mediate adhesion of human malignant melanoma A375 cells to P-selectin under flow. *J Immunol* **165**, 558-65.
- MacLennan, I. C.** (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol* **12**, 117-39.
- Macpherson, A. J., Lamarre, A., McCoy, K., Harriman, G. R., Odermatt, B., Dougan, G., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M.** (2001). IgA production without mu or delta chain expression in developing B cells. *Nat Immunol* **2**, 625-31.
- 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.
- Makatsori, E., Karamanos, N. K., Papadogiannakis, N., Hjerpe, A., Anastassiou, E. D. and Tsegenidis, T.** (2001). Synthesis and distribution of glycosaminoglycans in human leukemic B- and T-cells and monocytes studied using specific enzymic treatments and high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* **15**, 413-7.
- Maki, R., Roeder, W., Traunecker, A., Sidman, C., Wabl, M., Raschke, W. and Tonegawa, S.** (1981). The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* **24**, 353-65.
- Manis, J. P., Dudley, D., Kaylor, L. and Alt, F. W.** (2002a). IgH class switch recombination to IgG1 in DNA-PKcs-deficient B cells. *Immunity* **16**, 607-17.
- Manis, J. P., Tian, M. and Alt, F. W.** (2002b). 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.
- Manser, T.** (2002). Effector BCRs: inside information on IgG. *Nat Immunol* **3**, 114-6.
- Martensson, A., Argon, Y., Melchers, F., Dul, J. L. and Martensson, I. L.** (1999). Partial block in B lymphocyte development at the transition into the pre-B cell receptor stage in Vpre-B1-deficient mice. *Int Immunol* **11**, 453-60.
- Martensson, I. L., Keenan, R. A. and Licence, S.** (2007). The pre-B-cell receptor. *Curr Opin Immunol* **19**, 137-42.
- Martin, S. W. and Goodnow, C. C.** (2002). Burst-enhancing role of the IgG membrane tail as a molecular determinant of memory. *Nat Immunol* **3**, 182-8.
- Mason, J. O., Williams, G. T. and Neuberger, M. S.** (1988). The half-life of immunoglobulin mRNA increases during B-cell differentiation: a possible role for targeting to membrane-bound polysomes. *Genes Dev* **2**, 1003-11.
- Mather, E. L. and Perry, R. P.** (1983). Methylation status and DNase I sensitivity of immunoglobulin genes: changes associated with rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4689-93.
- 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.
- McBride, K. M., Barreto, V., Ramiro, A. R., Stavropoulos, P. and Nussenzweig, M. C.** (2004). Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *J Exp Med* **199**, 1235-44.
- McEver, R. P., Moore, K. L. and Cummings, R. D.** (1995). Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem* **270**, 11025-8.

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.

Melamed, D. and Nemazee, D. (1997). Self-antigen does not accelerate immature B cell apoptosis, but stimulates receptor editing as a consequence of developmental arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9267-72.

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.

Melchers, F., ten Boekel, E., Yamagami, T., Andersson, J. and Rolink, A. (1999). The roles of preB and B cell receptors in the stepwise allelic exclusion of mouse IgH and L chain gene loci. *Semin Immunol* **11**, 307-17.

Merrell, K. T., Benschop, R. J., Gauld, S. B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wysocki, L. J. and Cambier, J. C. (2006). Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* **25**, 953-62.

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.

Miller, J. R. (2002). The Wnts. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3001.

Mimura, Y., Sondermann, P., Ghirlando, R., Lund, J., Young, S. P., Goodall, M. and Jefferis, R. (2001). Role of oligosaccharide residues of IgG1-Fc in Fc gamma RIIb binding. *J Biol Chem* **276**, 45539-47.

Mizuguchi, S., Uyama, T., Kitagawa, H., Nomura, K. H., Dejima, K., Gengyo-Ando, K., Mitani, S., Sugahara, K. and Nomura, K. (2003). Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **423**, 443-8.

Moiseeva, E. P., Williams, B., Goodall, A. H. and Samani, N. J. (2003). Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 1010-6.

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.

Mostoslavsky, R., Singh, N., Kirillov, A., Pelanda, R., Cedar, H., Chess, A. and Bergman, Y. (1998). Kappa chain monoallelic demethylation and the establishment of allelic exclusion. *Genes Dev* **12**, 1801-11.

Mostoslavsky, R., Singh, N., Tenzen, T., Goldmit, M., Gabay, C., Elizur, S., Qi, P., Reubinoff, B. E., Chess, A., Cedar, H. et al. (2001). Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system. *Nature* **414**, 221-5.

Moyron-Quiroz, J. E., Partida-Sanchez, S., Donis-Hernandez, R., Sandoval-Montes, C. and Santos-Argumedo, L. (2002). Expression and function of CD22, a B-cell restricted molecule. *Scand J Immunol* **55**, 343-51.

Mumm, J. S. and Kopan, R. (2000). Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* **228**, 151-65.

Mundt, C., Licence, S., Shimizu, T., Melchers, F. and Martensson, I. L. (2001). Loss of precursor B cell expansion but not allelic exclusion in VpreB1/VpreB2 double-deficient mice. *J Exp Med* **193**, 435-45.

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., McCaw, P. S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Cabrera, C. V., Buskin, J. N., Hauschka, S. D., Lassar, A. B. et al. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537-44.

Nadler, M. J., McLean, P. A., Neel, B. G. and Wortis, H. H. (1997). B cell antigen receptor-evoked calcium influx is enhanced in CD22-deficient B cell lines. *J Immunol* **159**, 4233-43.

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.

Niiro, H. and Clark, E. A. (2002). Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* **2**, 945-56.

Nimmerjahn, F. and Ravetch, J. V. (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science* **310**, 1510-2.

Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M. and Itoh, N. (2000). Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta* **1492**, 203-6.

Nitschke, L. (2005). The role of CD22 and other inhibitory co-receptors in B-cell activation. *Curr Opin Immunol* **17**, 290-7.

Nitschke, L., Carsetti, R., Ocker, B., Kohler, G. and Lamers, M. C. (1997). CD22 is a negative regulator of B-cell receptor signalling. *Curr Biol* **7**, 133-43.

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.

Niwa, R., Natsume, A., Uehara, A., Wakitani, M., Iida, S., Uchida, K., Satoh, M. and Shitara, K. (2005). IgG subclass-independent improvement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by fucose removal from Asn297-linked oligosaccharides. *J Immunol Methods* **306**, 151-60.

Noble, P. W., Lake, F. R., Henson, P. M. and Riches, D. W. (1993). Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor- α -dependent mechanism in murine macrophages. *J Clin Invest* **91**, 2368-77.

Norvell, A., Mandik, L. and Monroe, J. G. (1995). Engagement of the antigen-receptor on immature murine B lymphocytes results in death by apoptosis. *J Immunol* **154**, 4404-13.

Novobrantseva, T. I., Martin, V. M., Pelanda, R., Muller, W., Rajewsky, K. and Ehlich, A. (1999). Rearrangement and expression of immunoglobulin light chain genes can precede heavy chain expression during normal B cell development in mice. *J Exp Med* **189**, 75-88.

Nusse, R. and Varmus, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **31**, 99-109.

Nutt, S. L. and Kee, B. L. (2007). The transcriptional regulation of B cell lineage commitment. *Immunity* **26**, 715-25.

O'Keefe, T. L., Williams, G. T., Batista, F. D. and Neuberger, M. S. (1999). Deficiency in CD22, a B cell-specific inhibitory receptor, is sufficient to predispose to development of high affinity autoantibodies. *J Exp Med* **189**, 1307-13.

O'Keefe, T. L., Williams, G. T., Davies, S. L. and Neuberger, M. S. (1996). Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* **274**, 798-801.

Obara, N. and Lesot, H. (2004). Subcellular localization of beta-catenin and cadherin expression in the cap-stage enamel organ of the mouse molar. *Histochem Cell Biol* **121**, 351-8.

Oberdoerffer, P., Novobrantseva, T. I. and Rajewsky, K. (2003). Expression of a targeted lambda 1 light chain gene is developmentally regulated and independent of Ig kappa rearrangements. *J Exp Med* **197**, 1165-72.

Ochsenbein, A. F., Pinschewer, D. D., Sierro, S., Horvath, E., Hengartner, H. and Zinkernagel, R. M. (2000). Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13263-8.

Oettgen, H. C., Martin, T. R., Wynshaw-Boris, A., Deng, C., Drazen, J. M. and Leder, P. (1994). Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature* **370**, 367-70.

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.

Ohnishi, K. and Melchers, F. (2003). The nonimmunoglobulin portion of lambda5 mediates cell-autonomous pre-B cell receptor signaling. *Nat Immunol* **4**, 849-56.

Oliver, A. M., Martin, F., Gartland, G. L., Carter, R. H. and Kearney, J. F. (1997). Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol* **27**, 2366-74.

Oliver, A. M., Martin, F. and Kearney, J. F. (1999). IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* **162**, 7198-207.

Orinska, Z., Osiak, A., Lohler, J., Bulanova, E., Budagian, V., Horak, I. and Bulfone-Paus, S. (2002). Novel B cell population producing functional IgG in the absence of membrane IgM expression. *Eur J Immunol* **32**, 3472-80.

Ornitz, D. M., Yayon, A., Flanagan, J. G., Svahn, C. M., Levi, E. and Leder, P. (1992). Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells. *Mol Cell Biol* **12**, 240-7.

Osborne, B. and Miele, L. (1999). Notch and the immune system. *Immunity* **11**, 653-63.

Osborne, B. A. and Minter, L. M. (2007). Notch signalling during peripheral T-cell activation and differentiation. *Nat Rev Immunol* **7**, 64-75.

Otero, D. C., Omori, S. A. and Rickert, R. C. (2001). Cd19-dependent activation of Akt kinase in B-lymphocytes. *J Biol Chem* **276**, 1474-8.

Pace, K. E., Lee, C., Stewart, P. L. and Baum, L. G. (1999). Restricted receptor segregation into membrane microdomains occurs on human T cells during apoptosis induced by galectin-1. *J Immunol* **163**, 3801-11.

Pan, Y. T. and Elbein, A. D. (1990). Control of N-linked oligosaccharide synthesis: cellular levels of dolichyl phosphate are not the only regulatory factor. *Biochemistry* **29**, 8077-84.

Panin, V. M., Papayannopoulos, V., Wilson, R. and Irvine, K. D. (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* **387**, 908-12.

Pao, L. I., Famiglietti, S. J. and Cambier, J. C. (1998). Asymmetrical phosphorylation and function of immunoreceptor tyrosine-based activation motif tyrosines in B cell antigen receptor signal transduction. *J Immunol* **160**, 3305-14.

Parkhouse, R. M. (1990). Three B-cell surface molecules associating with membrane immunoglobulin. *Immunology* **69**, 298-302.

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.

Paulson, J. C. and Colley, K. J. (1989). Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* **264**, 17615-8.

Pauza, M. E., Rehmann, J. A. and LeBien, T. W. (1993). Unusual patterns of immunoglobulin gene rearrangement and expression during human B cell ontogeny: human B

cells can simultaneously express cell surface kappa and lambda light chains. *J Exp Med* **178**, 139-49.

Pelanda, R., Schwers, S., Sonoda, E., Torres, R. M., Nemazee, D. and Rajewsky, K. (1997). Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity* **7**, 765-75.

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.

Perrimon, N. and Bernfield, M. (2000). Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* **404**, 725-8.

Perrimon, N. and Bernfield, M. (2001). Cellular functions of proteoglycans--an overview. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 65-7.

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.

Petersen, S., Casellas, R., Reina-San-Martin, B., Chen, H. T., Difilippantonio, M. J., Wilson, P. C., Hanitsch, L., Celeste, A., Muramatsu, M., Pilch, D. R. et al. (2001). AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* **414**, 660-5.

Peterson, M. L. and Perry, R. P. (1986). Regulated production of mu m and mu s mRNA requires linkage of the poly(A) addition sites and is dependent on the length of the mu s-mu m intron. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8883-7.

Petitou, M., Lormeau, J. C. and Choay, J. (1988). Interaction of heparin and antithrombin III. The role of O-sulfate groups. *Eur J Biochem* **176**, 637-40.

Petro, J. B., Gerstein, R. M., Lowe, J., Carter, R. S., Shinnars, N. and Khan, W. N. (2002). Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J Biol Chem* **277**, 48009-19.

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.

Pierce, J. W., Gifford, A. M. and Baltimore, D. (1991). Silencing of the expression of the immunoglobulin kappa gene in non-B cells. *Mol Cell Biol* **11**, 1431-7.

Pike, B. L., Boyd, A. W. and Nossal, G. J. (1982). Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2013-7.

Pillai, S., Cariappa, A. and Moran, S. T. (2004). Positive selection and lineage commitment during peripheral B-lymphocyte development. *Immunol Rev* **197**, 206-18.

Pinaud, E., Khamlichi, A. A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M. and Cogne, M. (2001). Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* **15**, 187-99.

Poe, J. C., Fujimoto, Y., Hasegawa, M., Haas, K. M., Miller, A. S., Sanford, I. G., Bock, C. B., Fujimoto, M. and Tedder, T. F. (2004). CD22 regulates B lymphocyte function in vivo through both ligand-dependent and ligand-independent mechanisms. *Nat Immunol* **5**, 1078-87.

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.

Pogue, S. L. and Goodnow, C. C. (2000). Gene dose-dependent maturation and receptor editing of B cells expressing immunoglobulin (Ig)G1 or IgM/IgG1 tail antigen receptors. *J Exp Med* **191**, 1031-44.

Popov, A. V., Zou, X., Xian, J., Nicholson, I. C. and Bruggemann, M. (1999). A human immunoglobulin lambda locus is similarly well expressed in mice and humans. *J Exp Med* **189**, 1611-20.

Preud'homme, J. L., Aucouturier, P., Touchard, G., Striker, L., Khamlichi, A. A., Rocca, A., Denoroy, L. and Cogne, M. (1994). Monoclonal immunoglobulin deposition disease (Randall type). Relationship with structural abnormalities of immunoglobulin chains. *Kidney Int* **46**, 965-72.

Proudfoot, A. E., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J. P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P. R. and Wells, T. N. (2001). The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J Biol Chem* **276**, 10620-6.

Rada, C., Williams, G. T., Nilsen, H., Barnes, D. E., Lindahl, T. and Neuberger, M. S. (2002). Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol* **12**, 1748-55.

Radaev, S. and Sun, P. D. (2001). Recognition of IgG by Fc gamma receptor. The role of Fc glycosylation and the binding of peptide inhibitors. *J Biol Chem* **276**, 16478-83.

Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R. and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* **10**, 547-58.

Raff, M. C., Sternberg, M. and Taylor, R. B. (1970). Immunoglobulin determinants on the surface of mouse lymphoid cells. *Nature* **225**, 553-4.

Rafi, A., Nagarkatti, M. and Nagarkatti, P. S. (1997). Hyaluronate-CD44 interactions can induce murine B-cell activation. *Blood* **89**, 2901-8.

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

Raju, T. S., Briggs, J. B., Chamow, S. M., Winkler, M. E. and Jones, A. J. (2001). Glycoengineering of therapeutic glycoproteins: in vitro galactosylation and sialylation of glycoproteins with terminal N-acetylglucosamine and galactose residues. *Biochemistry* **40**, 8868-76.

Razi, N. and Varki, A. (1998). Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7469-74.

Reichsman, F., Smith, L. and Cumberledge, S. (1996). Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. *J Cell Biol* **135**, 819-27.

Reina-San-Martin, B., Chen, J., Nussenzweig, A. and Nussenzweig, M. C. (2007). Enhanced intra-switch region recombination during immunoglobulin class switch recombination in 53BP1^{-/-} B cells. *Eur J Immunol* **37**, 235-9.

Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue. *Nature* **338**, 383-4.

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.

Robey, E. (1999). Regulation of T cell fate by Notch. *Annu Rev Immunol* **17**, 283-95.

- Roes, J. and Rajewsky, K.** (1993). Immunoglobulin D (IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells. *J Exp Med* **177**, 45-55.
- Rogers, J., Choi, E., Souza, L., Carter, C., Word, C., Kuehl, M., Eisenberg, D. and Wall, R.** (1981). Gene segments encoding transmembrane carboxyl termini of immunoglobulin gamma chains. *Cell* **26**, 19-27.
- Rogers, J., Early, P., Carter, C., Calame, K., Bond, M., Hood, L. and Wall, R.** (1980). Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain. *Cell* **20**, 303-12.
- Rogers, J. and Wall, R.** (1984). Immunoglobulin RNA rearrangements in B lymphocyte differentiation. *Adv Immunol* **35**, 39-59.
- Rolink, A. G., Andersson, J. and Melchers, F.** (2004). Molecular mechanisms guiding late stages of B-cell development. *Immunol Rev* **197**, 41-50.
- Rooney, S., Sekiguchi, J., Whitlow, S., Eckersdorff, M., Manis, J. P., Lee, C., Ferguson, D. O. and Alt, F. W.** (2004). Artemis and p53 cooperate to suppress oncogenic N-myc amplification in progenitor B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2410-5.
- Roseman, S.** (1970). The synthesis of complex carbohydrates by multiglycosyltransferase systems and their potential function in intercellular adhesion. *Chem Phys Lipids* **5**, 270-97.
- Rossi, B., Espeli, M., Schiff, C. and Gauthier, L.** (2006). Clustering of pre-B cell integrins induces galectin-1-dependent pre-B cell receptor relocalization and activation. *J Immunol* **177**, 796-803.
- Roth, D. B. and Roth, S. Y.** (2000). Unequal access: regulating V(D)J recombination through chromatin remodeling. *Cell* **103**, 699-702.
- Roth, J.** (2002). Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem Rev* **102**, 285-303.
- Roth, J., Wang, Y., Eckhardt, A. E. and Hill, R. L.** (1994). Subcellular localization of the UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-mediated O-glycosylation reaction in the submaxillary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8935-9.
- Roth, P. E., Doglio, L., Manz, J. T., Kim, J. Y., Lo, D. and Storb, U.** (1993). Immunoglobulin gamma 2b transgenes inhibit heavy chain gene rearrangement, but cannot promote B cell development. *J Exp Med* **178**, 2007-21.
- Roth, P. E., Kurtz, B., Lo, D. and Storb, U.** (1995). lambda 5, but not mu, is required for B cell maturation in a unique gamma 2b transgenic mouse line. *J Exp Med* **181**, 1059-70.
- Saito, T., Chiba, S., Ichikawa, M., Kunisato, A., Asai, T., Shimizu, K., Yamaguchi, T., Yamamoto, G., Seo, S., Kumano, K. et al.** (2003). Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* **18**, 675-85.
- Sakaguchi, N., Kashiwamura, S., Kimoto, M., Thalmann, P. and Melchers, F.** (1988). B lymphocyte lineage-restricted expression of mb-1, a gene with CD3-like structural properties. *Embo J* **7**, 3457-64.
- Sakai, E., Bottaro, A. and Alt, F. W.** (1999). The Ig heavy chain intronic enhancer core region is necessary and sufficient to promote efficient class switch recombination. *Int Immunol* **11**, 1709-13.
- Salmivirta, M., Lidholt, K. and Lindahl, U.** (1996). Heparan sulfate: a piece of information. *Faseb J* **10**, 1270-9.
- Sasaki, Y., Casola, S., Kutok, J. L., Rajewsky, K. and Schmidt-Supprian, M.** (2004). TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology. *J Immunol* **173**, 2245-52.

- Sato, M., Adachi, T. and Tsubata, T.** (2007). Augmentation of signaling through BCR containing IgE but not that containing IgA due to lack of CD22-mediated signal regulation. *J Immunol* **178**, 2901-7.
- Scallon, B. J., Tam, S. H., McCarthy, S. G., Cai, A. N. and Raju, T. S.** (2007). Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Mol Immunol* **44**, 1524-34.
- Schamel, W. W. and Reth, M.** (2000a). Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity* **13**, 5-14.
- Schamel, W. W. and Reth, M.** (2000b). Stability of the B cell antigen receptor complex. *Mol Immunol* **37**, 253-9.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A. and Baltimore, D.** (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* **59**, 1035-48.
- Schiemann, B., Gommerman, J. L., Vora, K., Cachero, T. G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E. and Scott, M. L.** (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* **293**, 2111-4.
- Schilham, M. W., Wilson, A., Moerer, P., Benaissa-Trouw, B. J., Cumano, A. and Clevers, H. C.** (1998). Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. *J Immunol* **161**, 3984-91.
- Schlissel, M. S.** (2003). Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat Rev Immunol* **3**, 890-9.
- Schonherr, E., Witsch-Prehm, P., Harrach, B., Robenek, H., Rauterberg, J. and Kresse, H.** (1995). Interaction of biglycan with type I collagen. *J Biol Chem* **270**, 2776-83.
- Schrader, C. E., Linehan, E. K., Mohegova, S. N., Woodland, R. T. and Stavnezer, J.** (2005). Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J Exp Med* **202**, 561-8.
- 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.
- Schwartz, N. B. and Domowicz, M.** (2002). Chondrodysplasias due to proteoglycan defects. *Glycobiology* **12**, 57R-68R.
- Schweighoffer, E., Vanes, L., Mathiot, A., Nakamura, T. and Tybulewicz, V. L.** (2003). Unexpected requirement for ZAP-70 in pre-B cell development and allelic exclusion. *Immunity* **18**, 523-33.
- Sekiguchi, J. M. and Ferguson, D. O.** (2006). DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey. *Cell* **124**, 260-2.
- Sen, R.** (2005). A move to exclude. *Nat Immunol* **6**, 128-30.
- 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.
- Shaffer, A. L., Lin, K. I., Kuo, T. C., Yu, X., Hurt, E. M., Rosenwald, A., Giltane, J. M., Yang, L., Zhao, H., Calame, K. et al.** (2002). Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity* **17**, 51-62.
- Shaffer, A. L. and Schlissel, M. S.** (1997). A truncated heavy chain protein relieves the requirement for surrogate light chains in early B cell development. *J Immunol* **159**, 1265-75.
- Shafi, R., Iyer, S. P., Ellies, L. G., O'Donnell, N., Marek, K. W., Chui, D., Hart, G. W. and Marth, J. D.** (2000). The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5735-9.

Shaper, J. H. and Shaper, N. L. (1992). Enzymes associated with glycosylation. *Current Opinion Structural Biology* **2**, 701-709.

Shapiro-Shelef, M., Lin, K. I., McHeyzer-Williams, L. J., Liao, J., McHeyzer-Williams, M. G. and Calame, K. (2003). Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* **19**, 607-20.

Shen, X., Bozek, G., Pinkert, C. A. and Storb, U. (1999). The C(H)1 and transmembrane domains of mu in the context of a gamma2b transgene do not suffice to promote B cell maturation. *Int Immunol* **11**, 1663-71.

Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H. and Presta, L. G. (2002). Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcgamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* **277**, 26733-40.

Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**, 155-68.

Shimizu, T., Mundt, C., Licence, S., Melchers, F. and Martensson, I. L. (2002). VpreB1/VpreB2/lambda 5 triple-deficient mice show impaired B cell development but functional allelic exclusion of the IgH locus. *J Immunol* **168**, 6286-93.

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.

Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M. et al. (2003). The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* **278**, 3466-73.

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

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

Sieckmann, D. G., Finkelman, F. D. and Scher, I. (1982). IgD as a receptor in signaling the proliferation of mouse B-lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* **399**, 277-89.

Silberstein, S. and Gilmore, R. (1996). Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *Faseb J* **10**, 849-58.

Simons, K. and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-9.

Sirac, C., Carrion, C., Duchez, S., Comte, I. and Cogne, M. (2006). Light chain inclusion permits terminal B cell differentiation and does not necessarily result in autoreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 7747-52.

Sleckman, B. P., Gorman, J. R. and Alt, F. W. (1996). Accessibility control of antigen-receptor variable-region gene assembly: role of cis-acting elements. *Annu Rev Immunol* **14**, 459-81.

Sonoda, E., Pewzner-Jung, Y., Schwers, S., Taki, S., Jung, S., Eilat, D. and Rajewsky, K. (1997). B cell development under the condition of allelic inclusion. *Immunity* **6**, 225-33.

Spanopoulou, E., Roman, C. A., Corcoran, L. M., Schlissel, M. S., Silver, D. P., Nemazee, D., Nussenzweig, M. C., Shinton, S. A., Hardy, R. R. and Baltimore, D. (1994).

Functional immunoglobulin transgenes guide ordered B-cell differentiation in Rag-1-deficient mice. *Genes Dev* **8**, 1030-42.

Spillmann, D., Witt, D. and Lindahl, U. (1998). Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate. *J Biol Chem* **273**, 15487-93.

Spiro, R. G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **12**, 43R-56R.

Staal, F. J. and Clevers, H. C. (2003). Wnt signaling in the thymus. *Curr Opin Immunol* **15**, 204-8.

Stall, A. M., Wells, S. M. and Lam, K. P. (1996). B-1 cells: unique origins and functions. *Semin Immunol* **8**, 45-59.

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

Stavnezer, J. (2000). Immunology. A touch of antibody class. *Science* **288**, 984-5.

Stevens, F. J. (2000). Four structural risk factors identify most fibril-forming kappa light chains. *Amyloid* **7**, 200-11.

Stillman, B. N., Hsu, D. K., Pang, M., Brewer, C. F., Johnson, P., Liu, F. T. and Baum, L. G. (2006). Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death. *J Immunol* **176**, 778-89.

Storb, U. and Arp, B. (1983). Methylation patterns of immunoglobulin genes in lymphoid cells: correlation of expression and differentiation with undermethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6642-6.

Stringer, S. E. and Gallagher, J. T. (1997). Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate. *J Biol Chem* **272**, 20508-14.

Sturm, A., Lensch, M., Andre, S., Kaltner, H., Wiedenmann, B., Rosewicz, S., Dignass, A. U. and Gabius, H. J. (2004). Human galectin-2: novel inducer of T cell apoptosis with distinct profile of caspase activation. *J Immunol* **173**, 3825-37.

Su, T. T. and Rawlings, D. J. (2002). Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J Immunol* **168**, 2101-10.

Sugahara, K. and Kitagawa, H. (2002). Heparin and heparan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life* **54**, 163-75.

Suzuki, H., Matsuda, S., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Ohteki, T., Asano, T., Behrens, T. W., Kouro, T., Takatsu, K., Kadowaki, T. et al. (2003). PI3K and Btk differentially regulate B cell antigen receptor-mediated signal transduction. *Nat Immunol* **4**, 280-6.

Tanaka, Y., Fujii, K., Hubscher, S., Aso, M., Takazawa, A., Saito, K., Ota, T. and Eto, S. (1998). Heparan sulfate proteoglycan on endothelium efficiently induces integrin-mediated T cell adhesion by immobilizing chemokines in patients with rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* **41**, 1365-77.

Tanigaki, K., Han, H., Yamamoto, N., Tashiro, K., Ikegawa, M., Kuroda, K., Suzuki, A., Nakano, T. and Honjo, T. (2002). Notch-RBP-J signaling is involved in cell fate determination of marginal zone B cells. *Nat Immunol* **3**, 443-50.

Tanigaki, K. and Honjo, T. (2007). Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. *Nat Immunol* **8**, 451-6.

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.

Tedford, K., Nitschke, L., Girkontaite, I., Charlesworth, A., Chan, G., Sakk, V., Barbacid, M. and Fischer, K. D. (2001). Compensation between Vav-1 and Vav-2 in B cell development and antigen receptor signaling. *Nat Immunol* **2**, 548-55.

Theocharis, A. D., Seidel, C., Borset, M., Dobra, K., Baykov, V., Labropoulou, V., Kanakis, I., Dalas, E., Karamanos, N. K., Sundan, A. et al. (2006). Serglycin constitutively secreted by myeloma plasma cells is a potent inhibitor of bone mineralization in vitro. *J Biol Chem* **281**, 35116-28.

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.

Thompson, L. D., Pantoliano, M. W. and Springer, B. A. (1994). Energetic characterization of the basic fibroblast growth factor-heparin interaction: identification of the heparin binding domain. *Biochemistry* **33**, 3831-40.

Tiegs, S. L., Russell, D. M. and Nemazee, D. (1993). Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* **177**, 1009-20.

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

Toyama-Sorimachi, N., Sorimachi, H., Tobita, Y., Kitamura, F., Yagita, H., Suzuki, K. and Miyasaka, M. (1995). A novel ligand for CD44 is serglycin, a hematopoietic cell lineage-specific proteoglycan. Possible involvement in lymphoid cell adherence and activation. *J Biol Chem* **270**, 7437-44.

Toyama, H., Okada, S., Hatano, M., Takahashi, Y., Takeda, N., Ichii, H., Takemori, T., Kuroda, Y. and Tokuhisa, T. (2002). Memory B cells without somatic hypermutation are generated from Bcl6-deficient B cells. *Immunity* **17**, 329-39.

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.

Tumova, S., Woods, A. and Couchman, J. R. (2000). Heparan sulfate chains from glypican and syndecans bind the Hep II domain of fibronectin similarly despite minor structural differences. *J Biol Chem* **275**, 9410-7.

Turner, M., Mee, P. J., Costello, P. S., Williams, O., Price, A. A., Duddy, L. P., Furlong, M. T., Geahlen, R. L. and Tybulewicz, V. L. (1995). Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* **378**, 298-302.

Uhlin-Hansen, L., Wik, T., Kjellen, L., Berg, E., Forsdahl, F. and Kolset, S. O. (1993). Proteoglycan metabolism in normal and inflammatory human macrophages. *Blood* **82**, 2880-9.

Umana, P., Jean-Mairet, J., Moudry, R., Amstutz, H. and Bailey, J. E. (1999). Engineered glycoforms of an antineuroblastoma IgG1 with optimized antibody-dependent cellular cytotoxic activity. *Nat Biotechnol* **17**, 176-80.

Van den Steen, P., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Van Damme, J. and Opdenakker, G. (1998). Cytokine and protease glycosylation as a regulatory mechanism in inflammation and autoimmunity. *Adv Exp Med Biol* **435**, 133-43.

van Horsen, J., Wesseling, P., van den Heuvel, L. P., de Waal, R. M. and Verbeek, M. M. (2003). Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol* **2**, 482-92.

Venkitaraman, A. R., Williams, G. T., Dariavach, P. and Neuberger, M. S. (1991). The B-cell antigen receptor of the five immunoglobulin classes. *Nature* **352**, 777-81.

Vidal y Plana, R. R. and Karzel, K. (1980). [Glucosamine: its value for the metabolism of articular cartilage. 1. Biochemistry of proteoglycans, studies on in-vitro cultures of embryonal mouse fibroblasts and bone germs]. *Fortschr Med* **98**, 557-62.

Vijay, I. K. (1998). Developmental and hormonal regulation of protein N-glycosylation in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **3**, 325-36.

- Vilen, B. J., Famiglietti, S. J., Carbone, A. M., Kay, B. K. and Cambier, J. C.** (1997). B cell antigen receptor desensitization: disruption of receptor coupling to tyrosine kinase activation. *J Immunol* **159**, 231-43.
- Vishwakarma, R. A. and Menon, A. K.** (2005). Flip-flop of glycosylphosphatidylinositols (GPI's) across the ER. *Chem Commun (Camb)*, 453-5.
- Waisman, A., Kraus, M., Seagal, J., Ghosh, S., Melamed, D., Song, J., Sasaki, Y., Classen, S., Lutz, C., Brombacher, F. et al.** (2007). IgG1 B cell receptor signaling is inhibited by CD22 and promotes the development of B cells whose survival is less dependent on Ig alpha/beta. *J Exp Med* **204**, 747-58.
- Wakabayashi, C., Adachi, T., Wienands, J. and Tsubata, T.** (2002). A distinct signaling pathway used by the IgG-containing B cell antigen receptor. *Science* **298**, 2392-5.
- Walker, J. R., Corpina, R. A. and Goldberg, J.** (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**, 607-14.
- Wall, R. and Kuehl, M.** (1983). Biosynthesis and regulation of immunoglobulins. *Annu Rev Immunol* **1**, 393-422.
- Wang, H. Y. and Malbon, C. C.** (2003). Wnt signaling, Ca²⁺, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. *Science* **300**, 1529-30.
- Wang, L. D. and Clark, M. R.** (2003). B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development. *Immunology* **110**, 411-20.
- Wang, Y., Lee, G. F., Kelley, R. F. and Spellman, M. W.** (1996a). Identification of a GDP-L-fucose:polypeptide fucosyltransferase and enzymatic addition of O-linked fucose to EGF domains. *Glycobiology* **6**, 837-42.
- Wang, Y., Macke, J. P., Abella, B. S., Andreasson, K., Worley, P., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nathans, J.** (1996b). A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled. *J Biol Chem* **271**, 4468-76.
- Wang, Y., Shao, L., Shi, S., Harris, R. J., Spellman, M. W., Stanley, P. and Haltiwanger, R. S.** (2001). Modification of epidermal growth factor-like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J Biol Chem* **276**, 40338-45.
- Ward, I. M., Reina-San-Martin, B., Oлару, A., Minn, K., Tamada, K., Lau, J. S., Cascalho, M., Chen, L., Nussenzweig, A., Livak, F. et al.** (2004). 53BP1 is required for class switch recombination. *J Cell Biol* **165**, 459-64.
- 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.
- Watt, G. M., Lund, J., Levens, M., Kolli, V. S., Jefferis, R. and Boons, G. J.** (2003). Site-specific glycosylation of an aglycosylated human IgG1-Fc antibody protein generates neoglycoproteins with enhanced function. *Chem Biol* **10**, 807-14.
- Wegrowski, Y. and Maquart, F. X.** (2004). Involvement of stromal proteoglycans in tumour progression. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**, 259-68.
- Weichhold, G. M., Ohnheiser, R. and Zachau, H. G.** (1993). The human immunoglobulin kappa locus consists of two copies that are organized in opposite polarity. *Genomics* **16**, 503-11.
- Weiser, P., Muller, R., Braun, U. and Reth, M.** (1997). Endosomal targeting by the cytoplasmic tail of membrane immunoglobulin. *Science* **276**, 407-9.
- Weiser, P., Riesterer, C. and Reth, M.** (1994). The internalization of the IgG2a antigen receptor does not require the association with Ig-alpha and Ig-beta but the activation of protein tyrosine kinases does. *Eur J Immunol* **24**, 665-71.

- Weller, S., Reynaud, C. A. and Weill, J. C.** (2005). Splenic marginal zone B cells in humans: where do they mutate their Ig receptor? *Eur J Immunol* **35**, 2789-92.
- Willert, K. and Nusse, R.** (1998). Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 95-102.
- Williams, A. F. and Barclay, A. N.** (1988). The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu Rev Immunol* **6**, 381-405.
- Wilson, A., MacDonald, H. R. and Radtke, F.** (2001). Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus. *J Exp Med* **194**, 1003-12.
- Wortis, H. H. and Berland, R.** (2001). Cutting edge commentary: origins of B-1 cells. *J Immunol* **166**, 2163-6.
- Yamamura, K., Kudo, A., Ebihara, T., Kamino, K., Araki, K., Kumahara, Y. and Watanabe, T.** (1986). Cell-type-specific and regulated expression of a human gamma 1 heavy-chain immunoglobulin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 2152-6.
- Yamanashi, Y., Fukui, Y., Wongsasant, B., Kinoshita, Y., Ichimori, Y., Toyoshima, K. and Yamamoto, T.** (1992). Activation of Src-like protein-tyrosine kinase Lyn and its association with phosphatidylinositol 3-kinase upon B-cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1118-22.
- Yamanashi, Y., Kakiuchi, T., Mizuguchi, J., Yamamoto, T. and Toyoshima, K.** (1991). Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science* **251**, 192-4.
- Yamane-Ohnuki, N., Kinoshita, S., Inoue-Urakubo, M., Kusunoki, M., Iida, S., Nakano, R., Wakitani, M., Niwa, R., Sakurada, M., Uchida, K. et al.** (2004). Establishment of FUT8 knockout Chinese hamster ovary cells: an ideal host cell line for producing completely defucosylated antibodies with enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Biotechnol Bioeng* **87**, 614-22.
- Yamauchi, M., Noyes, C., Kuboki, Y. and Mechanic, G. L.** (1982). Collagen structural microheterogeneity and a possible role for glycosylated hydroxylysine in type I collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7684-8.
- Yancopoulos, G. D. and Alt, F. W.** (1985). Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* **40**, 271-81.
- 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, R. Y. and Liu, F. T.** (2003). Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* **60**, 267-76.
- Yoshino, T., Kondo, E., Cao, L., Takahashi, K., Hayashi, K., Nomura, S. and Akagi, T.** (1994). Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes. *Blood* **83**, 1856-61.
- 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.
- Yuan, D., Witte, P. L., Tan, J., Hawley, J. and Dang, T.** (1996). Regulation of IgM and IgD heavy chain gene expression: effect of abrogation of intergenic transcriptional termination. *J Immunol* **157**, 2073-81.
- Zachau, H. G.** (1993). The immunoglobulin kappa locus-or-what has been learned from looking closely at one-tenth of a percent of the human genome. *Gene* **135**, 167-73.
- Zarrin, A. A., Alt, F. W., Chaudhuri, J., Stokes, N., Kaushal, D., Du Pasquier, L. and Tian, M.** (2004). An evolutionarily conserved target motif for immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* **5**, 1275-81.

Zarrin, A. A., Tian, M., Wang, J., Borjeson, T. and Alt, F. W. (2005). Influence of switch region length on immunoglobulin class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2466-70.

Zhang, L., David, G. and Esko, J. D. (1995). Repetitive Ser-Gly sequences enhance heparan sulfate assembly in proteoglycans. *J Biol Chem* **270**, 27127-35.

Zhang, Z., Espinoza, C. R., Yu, Z., Stephan, R., He, T., Williams, G. S., Burrows, P. D., Hagman, J., Feeney, A. J. and Cooper, M. D. (2006). Transcription factor Pax5 (BSAP) transactivates the RAG-mediated V(H)-to-DJ(H) rearrangement of immunoglobulin genes. *Nat Immunol* **7**, 616-24.

Zhou, D., Chen, C., Jiang, S., Shen, Z., Chi, Z. and Gu, J. (1998). Expression of beta1,4-galactosyltransferase in the development of mouse brain. *Biochim Biophys Acta* **1425**, 204-8.

Zimmermann, P. and David, G. (1999). The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *Faseb J* **13 Suppl**, S91-S100.

RESUME

La capacité des lymphocytes à répondre de manière spécifique à un grand nombre d'antigènes étrangers, est le résultat d'un processus de différenciation à l'issue duquel chaque lymphocyte exprime un récepteur unique à l'antigène. Une longue série de processus d'activation et de coopération cellulaire faisant intervenir de nombreuses protéines glycosylées ou pas, est nécessaire avant d'aboutir à la sécrétion d'un anticorps spécifique par une cellule de la lignée lymphoïde B. Cette réponse présuppose l'expression à la surface cellulaire d'une forme membranaire de l'immunoglobuline au sein du récepteur des cellules B pour l'antigène (BCR), dont la spécificité est définie pour chaque clone B.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à la fonction même du BCR et notamment du BCR commuté vers IgA et IgE afin de savoir si une chaîne lourde α ou ϵ était capable de jouer un rôle similaire à celui d'une chaîne lourde μ et de promouvoir au sein du récepteur B (soit de classe IgA soit de classe IgE) le développement des cellules jusqu'au stade final du plasmocyte sécréteur d'anticorps. Pour cela, nous avons réalisé plusieurs modèles de *knock-in* portant des BCR modifiés où le gène C α 1 humain dans un cas et C ϵ humain dans un autre, ont été intégrés par recombinaison homologue au niveau de la région *switch* μ afin d'obtenir une lignée de souris transgéniques n'exprimant que des IgA ou des IgE.

Dans une autre perspective d'étude des phénomènes pouvant modifier la réactivité des récepteurs de surface de la cellule B, nous nous sommes intéressés à la modulation au cours de la différenciation B des phénomènes de glycosylation, ceux-ci constituant les éléments majeurs de maturation post-traductionnelle des protéines et des lipides. Après une première étude glycotranscriptomique, mettant en valeur l'expression de deux gènes distincts tous deux impliqués dans la biosynthèse des glycosaminoglycannes, CsGalNacT1 et Ext11, nous avons voulu étudier d'une manière plus approfondie le rôle de ces enzymes *in vivo* au cours du développement B en réalisant des lignées de souris transgéniques surexprimant de façon B-spécifique ces deux gènes d'intérêt.