

Université de Limoges

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 524)

Faculté de Médecine

UMR CNRS 7276 - Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Biologie Sciences Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

MARIE MARQUET

Le 19 décembre 2012

Modèles murins pour l'étude d'éléments régulateurs du locus IgH :

Ciblage des régions E μ et 3' régulatrices

Directeur de Thèse : Dr. Eric Pinaud

Jury :

Président : **Pr. Michel Cogné** – Université de Limoges

Rapporteurs : **Dr. Marie-Caroline Dieu-Nosjean** – Université Pierre et Marie Curie

Pr. Jean-Christophe Bories – Université Paris Diderot

Examineurs : **Dr. Sandra Weller** – Université Paris Descartes

Dr. Claire Francastel – Université Paris 7 Diderot

-Résumé-

Lors du développement lymphocytaire B, le locus IgH subit de nombreux remaniements géniques contrôlés par différents éléments *cis* régulateurs. La première région régulatrice est constituée de l'activateur intronique $cE\mu$ et ses régions d'attachement à la matrice ($MAR_{E\mu}$). Pour nos études, nous avons réalisé les *Knock-Out* de la totalité de la région et des régions $MAR_{E\mu}$. Le premier modèle, entraînant un sévère blocage du développement B, confirme l'importance de $E\mu$ aux stades précoces. Ce modèle met également en évidence le rôle important de $E\mu$ pour l'expression de la chaîne lourde μ au stade pré-B, sa délétion entraînant un déséquilibre des compartiments B périphériques caractérisé par la diminution de la population B folliculaire à la faveur des cellules B de la zone marginale. L'étude du second modèle met en lumière un rôle important des régions $MAR_{E\mu}$ lors de l'hypermutation somatique. De façon étonnante, les $MAR_{E\mu}$ influencent ce processus en *cis* au locus IgH mais aussi en *trans*, au locus des chaînes légères κ .

La seconde région régulatrice située en 3' du locus est constituée de quatre activateurs transcriptionnels (hs3a, hs1-2, hs3b, hs4). Elle présente une structure quasi-palindromique, dont le rôle restait méconnu, incluant des séquences inversées et répétées organisées autour de hs1,2 (hs4 étant situé en dehors de cette structure). Le *Knock-Out* de ce quasi-palindrome confirme que hs4 permet l'expression optimale de la chaîne lourde μ dans les cellules B au repos ; ce modèle démontre également un rôle capital de cette région pour le processus d'hypermutation somatique couplé à la transcription.

-Summary-

During B cells development, the IgH locus undergo many genetics rearrangements regulated by several *cis*-regulatory elements. The first regulatory region is composed of the intronic enhancer $cE\mu$ and its matrix attachment regions ($MAR_{E\mu}$). In our study, we have realized the *Knock-Out* of both full length $E\mu$ and the $MAR_{E\mu}$ regions. The first model led to a drastic B cell development blockade and confirms the importance of $E\mu$ at the early stages. This model also highlights the important role of $E\mu$ for the μ heavy chain expression at the pre-B cell stage. $E\mu$ deletion results in the unbalance of peripheral B cells subsets wherein follicular B cell population is decreased in favor of marginal zone B cells. The second model revealed an important role of $MAR_{E\mu}$ for somatic hypermutation. Surprisingly, the $MAR_{E\mu}$ regions influence this process in *cis* at the IgH locus but also in *trans* at the κ light chain locus.

The second regulatory region, located at the 3' end of the locus, contains four transcriptional enhancers (hs3a, hs1-2, hs3b, hs4). It displays a "quasi-palindromic" architecture; including inverted repeated sequences organized around hs1-2 element (hs4 is outside of this structure). The function of this particular structure remains unknown. The "quasi-palindromic" *Knock-Out* confirms that hs4 allows an optimal expression of the μ heavy chain in resting B cells. This model demonstrates also a key role of this region for transcription-coupled somatic hypermutation.

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr. Eric Pinaud pour m'avoir si bien encadrée et guidée au cours de ces quatre années, merci pour tous tes précieux conseils. Il y a quand même une chose que tu n'as pas réussi à me transmettre : la patience. Et pourtant ce n'est pas faute d'avoir essayé, je crois que je n'oublierais pas ta phrase devenue culte « Il est urgent d'attendre ». Merci Eric pour ces années de thèse.

Merci au Pr. Michel Cogné de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir accepté d'être le Président de mon jury.

Ensuite, je voudrais remercier les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail. Merci au Dr. Marie Caroline Dieu-Nosjean et au Pr. Jean-Christophe Borie qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir prendre en considération ce travail en acceptant d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Merci au Dr. Sandra Weller et au Dr. Claire Francastel qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être examinatrices de cette thèse. Je tiens également à remercier le Dr. Claire Francastel pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire afin de m'enseigner la technique du FISH.

Merci au Pr. Aldigier de m'avoir permis de rédiger cette thèse en toute sérénité.

Je tiens également à remercier celles qui ont contribué à l'amélioration de ce manuscrit : Jennie, Sylvia, Anne.

Je souhaiterais également remercier tous les membres de l'UMR et à l'équipe de B-Cell Design pour les bons moments que nous avons passés. Merci à vous qui avez tous eu un petit mot de soutien au cours de ces années.

Merci à Aurore, Christophe, Laurent, Christelle, Stéphanie, Sophie, Nathalie. Bon courage aux prochains : Fabien pour qui ce sera très prochainement le tour, Aurélien, Brice, Amélie, Nicolas, Amandine, Mona, Alexis, Faten. Et à toi Armand (dit BGM), merci pour le soutien moral ainsi que pour les manips de dernières minutes et bon courage avec les souris.

Merci à Cendrine, mon ancienne camarade de paillasse, pour les bons moments que nous avons passé à manipuler ensemble.

Merci à Zéliha pour avoir su me remonter le moral quand il le fallait et me redonner du courage.

Merci à Marie B., qui passe toujours nous faire un petit coucou dans le bureau dès qu'elle en a la possibilité, merci pour ta bonne humeur et ta gaieté.

Un grand merci à Claire pour ton aide en cytométrie et en microscopie, je suis certaine que tu vas vaincre Image J. Merci pour tout ce que tu fais au laboratoire pour nous faciliter la vie.

Merci à la Denizot team de m'avoir acceptée dans leur antre. Merci à toi Pauline pour tous nos fous rires qui remontent le moral et pour nos fameuses discussions dont on a le secret... Bon courage pour ta dernière année, je serais là pour le shopping si le moral s'en fait sentir et promis tu auras un calendrier tout neuf. Merci à toi Yves pour tes petites blagues du matin qui aident à commencer la journée.

Je tiens également à remercier Christian, mon camarade creusois, pour les 3 ans ou l'on a partagé notre bureau. Merci pour ta gentillesse et pour toutes les commandes que nous te faisons passer dans l'urgence.

Merci à Cathy et Magalie pour toutes les heures que vous avez passées à trier les fameuses plaques de Peyer.

Merci également à Sylvie et Bernadette qui s'occupent si bien de toutes nos petites souris.

Merci à Makiadi, pour toutes les boites de cônes qu'il a dû remplir après mes elisas.

Bon je crois que j'ai fait le tour du labo... Mais non Sèb je ne t'ai pas oublié comme promis tu vas avoir ton paragraphe pour toi tout seul. Tu aurais pu être dans tous les remerciements cités précédemment, tu concours dans toutes les catégories tellement tu auras été présent à mes côtés durant ces quatre années. Merci pour tous ce que tu as pu faire pour m'aider, je m'excuse pour les petites sautes d'humeur que tu as supportées dernièrement mais comme tu me l'as dit j'ai des circonstances atténuantes... Tu es devenu au fil de ces années bien plus qu'un collègue et notre amitié ne va pas s'arrêter à la fin de cette thèse.

Enfin, je tiens à remercier ma famille et plus particulièrement mes parents qui m'ont soutenue tout le long de mes études peu importe les directions que je prenais. Merci d'avoir toujours été présents dans les bons comme dans les mauvais moments.

Mes derniers remerciements seront pour toi, Nico. Merci d'avoir été présent à mes côtés, tu as toujours su trouver les mots justes pour m'encourager et me remonter le moral quand il le fallait. Tu auras tout supporté sans te plaindre (ou presque). Tu as même été un super assistant, n'oublies pas que tu es le roi des « flusheurs » et ce n'est pas moi qui l'ai dit. Il est difficile de dire ici à quel point je te remercie mais je pense que tu le sais déjà...

Ma dernière pensée sera pour celui qui me manquera le plus le jour de la soutenance, mon grand-père. Tu es celui qui a toujours cru en moi, cette thèse est pour toi qui as laissé un si grand vide dans ma vie.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
A) Organisation des gènes des immunoglobulines :	2
1) Les loci des chaînes légères des immunoglobulines	2
2) Le locus des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH)	2
B) Ontogénèse des lymphocytes B	4
1) Phase indépendante de l'antigène.....	4
2) Phase dépendante de l'antigène.....	8
3) Les mécanismes des recombinaisons secondaires	15
C) La régulation de l'expression du locus IgH	22
1) Les promoteurs.....	22
2) Les activateurs transcriptionnels ou enhancers.....	23
3) Les isolateurs de la chromatine.....	34
D) Accessibilité du locus IgH	37
1) Contrôle de l'accessibilité lors des recombinaisons VDJ.....	37
2) Epigénétique et réarrangements secondaires CSR/SHM.....	43
RESULTATS	45
DISCUSSION-PERSPECTIVES	60
Etude de la région E μ	60
Etude de la région régulatrice 3'	64
ANNEXES	69
BIBLIOGRAPHIE	73

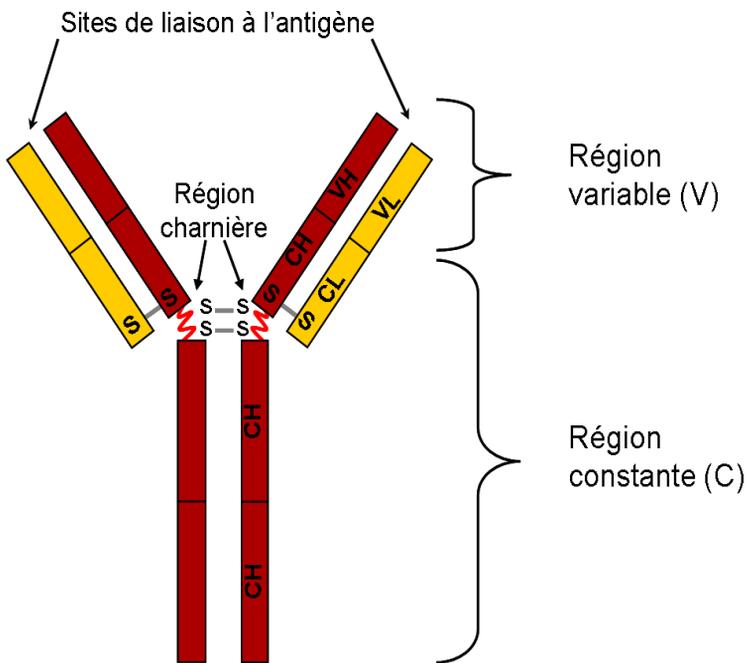


Fig.1 : Représentation schématique d'une immunoglobuline, exemple d'une IgG : les immunoglobulines sont constituées de 2 chaînes lourdes (rouge) et de deux chaînes légères (jaune) qui possèdent une région variable (V_H et V_L) et une région constante définie par différents domaines (C_H et C_L).

INTRODUCTION

Le système immunitaire a pour fonction d'assurer la défense de l'organisme contre des agents pathogènes (bactériens, viraux ou parasitaires) et de contrôler certains dérèglements cellulaires aboutissant à la formation de tumeurs. Il possède une capacité d'apprentissage permettant la tolérance des antigènes du soi et l'élimination des antigènes du non soi. Au sein de ce système, les lymphocytes assurent la reconnaissance spécifique des pathogènes et déclenchent des réponses immunitaires adaptatives en conséquence. Les lymphocytes B sont les cellules effectrices de l'immunité humorale grâce à leurs récepteurs de surface spécifiques d'un antigène particulier, les immunoglobulines membranaires. La reconnaissance d'un antigène par ces immunoglobulines entraîne l'activation des cellules B qui se multiplient et se différencient jusqu'au stade final du lignage B : les plasmocytes. À ce stade, ces cellules spécialisées ont la capacité de sécréter la forme soluble des immunoglobulines : les anticorps. Les anticorps peuvent lier spécifiquement un antigène dans le but de le neutraliser ou de l'éliminer.

Les immunoglobulines sont constituées par l'assemblage de deux chaînes lourdes identiques associées par des ponts disulfures à deux chaînes légères identiques (**fig 1**). Chaque chaîne comprend une région constante et une région variable. L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères forme le site de fixation à l'antigène ; le domaine constant confère les propriétés effectrices de l'immunoglobuline. Chez la souris comme chez l'homme, on distingue deux types de chaînes légères (κ et λ) et 5 classes de chaînes lourdes (μ , δ , γ , ϵ et α) définissant respectivement les IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Chez la souris, il existe quatre sous-classes d'IgG : IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3.

Les gènes codant les immunoglobulines ne sont pas fonctionnels dans leur configuration germinale. Les cellules précurseurs de la lignée lymphoïde B subissent des réarrangements intragéniques aux loci des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines qui peuvent conduire à l'expression de chaînes fonctionnelles capables de s'assembler pour former une immunoglobuline.



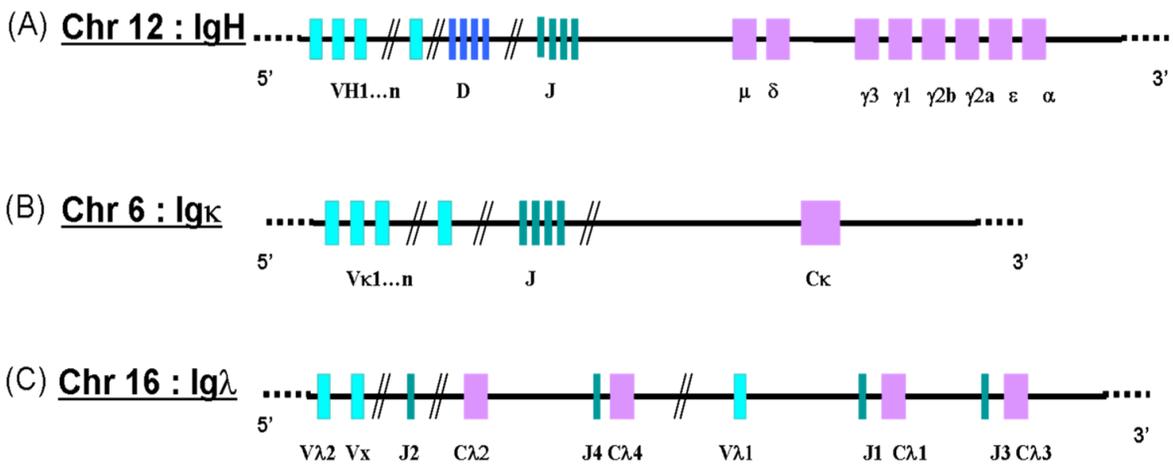


Fig.2 : Représentation schématique des loci des gènes d'Ig de souris :

(A)-Le locus IgH situé sur le chromosome 12 possède plus de 200 segments de variabilité (V), une douzaine de segments de diversité (D) et 4 segments de jonction (J). A la suite, des segments codant pour la partie variable des chaînes lourdes se situent les 8 blocs d'exons μ , δ , γ_3 , γ_1 , γ_{2a} , γ_{2b} , ϵ et α codant les régions constantes.

(B)-Le locus Igκ sur le chromosome 6 comprend 174 segments V_{κ} , 5 segments J_{κ} et un seul segment C_{κ} .

(C)-Le locus Igλ sur le chromosome 16 possède 4 paires de segments J_{λ} - C_{λ} et 3 segments V_{λ} .

A) Organisation des gènes des immunoglobulines :

Les gènes des immunoglobulines sont spécifiquement exprimés dans la lignée lymphoïde B et leur expression dépend du stade de développement. Ils sont groupés en loci et situés sur trois chromosomes différents chez l'homme comme chez la souris. Nous détaillerons plus particulièrement l'organisation des gènes d'immunoglobulines de souris.

1) Les loci des chaînes légères des immunoglobulines

a) Le locus $Ig\kappa$

Il se situe sur le chromosome 6 de la souris. La région variable de la chaîne kappa est codée par les segments $V\kappa$ et $J\kappa$. Ce locus comporte 174 segments $V\kappa$ (93 sont fonctionnels et 47 sont des pseudogènes) répartis en 18 familles et 5 segments $J\kappa$. La région constante est codée par un seul segment $C\kappa$ (fig 2).

b) Le locus $Ig\lambda$

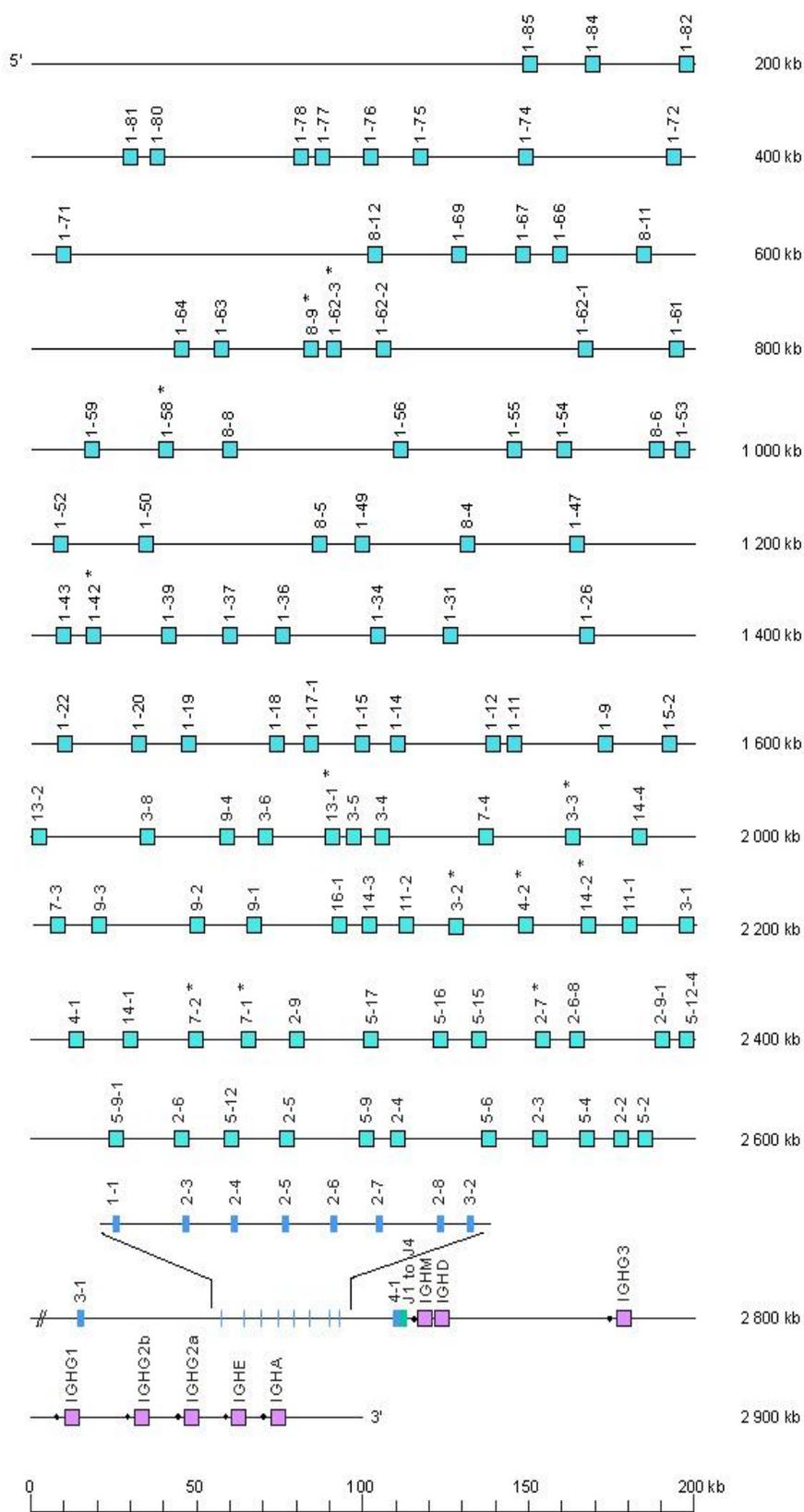
Les gènes codant les chaînes légères lambda sont situés sur le chromosome 16 de la souris. Ces gènes sont répartis en 4 familles comportant chacune une paire de segments $J\lambda$ et $C\lambda$ ($J\lambda 1$ à $J\lambda 4$ et $C\lambda 1$ à $C\lambda 4$) (fig 2). Le locus murin ne contient que trois segments $V\lambda$; $V\lambda 1$ s'associant préférentiellement à $J\lambda 1$ et $J\lambda 3$ tandis que $V\lambda 2$ et $V\lambda 3$ s'associent à $J\lambda 2$ ($J\lambda 4$ et $C\lambda 4$ étant défectifs). Les lymphocytes B exprimant une chaîne légère λ sont minoritaires chez la souris: environ 5% contre 95% exprimant κ .

2) Le locus des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) (fig 2 et 3)

Le locus des IgH est situé sur le chromosome 12 de la souris où il s'étend sur plus de 3 mégabases. Il peut être divisé en deux régions principales :

Une première région « amont » du locus contient les segments codant les régions variables des chaînes lourdes : dans l'ordre, du télomère vers le centromère, on trouve les segments variables V_H , de diversité D_H et de jonction J_H . Il existe plus de 200 segments géniques (V_H) regroupés en 15 familles à l'extrémité 5' du locus. En aval de ces segments, se situe une douzaine de segments de diversité (D_H) puis un groupe de 4 segments de jonction J_H .

La seconde région « aval » du locus contient les gènes codant la partie constante des chaînes d'immunoglobulines. Ces gènes constants sont au nombre de 8, ils codent les huit



Nomenclature IMGT	Nomenclature avant 2005
IGHV1	Vh558
IGHV2	VhQ52
IGHV3	Vh36-60
IGHV4	VhX24
IGHV5	Vh7183
IGHV6	VhJ606
IGHV7	VhS107
IGHV8	Vh3609P
IGHV9	VhGam3-8
IGHV10	Vh10
IGHV11	Vh11
IGHV12	Vh12
IGHV13	Vh3609N
IGHV14	VhSm7
IGHV15	Vh15
IGHD1-1	DFL16.1
IGHD2-3	D-SP2.9
IGHD2-4	DSP2.2
IGHD2-5	DSP2.x
IGHD2-6	DSP2.x
IGHD2-7	DSP2.3
IGHD2-8	DSP2.5
IGHD3-1	DST4.2
IGHD3-2	DST4
IGHD4-1	DQ52

Fig.3: Représentation schématique des loci des gènes des chaînes lourdes de souris et nomenclature des gènes de diversité et variables (d'après IMGT)

classes et sous-classes d'immunoglobulines. Chaque gène constant est composé de multiples exons codant les domaines structuraux propres à chaque chaîne lourde, les régions charnières spécifiques à certaines classes d'immunoglobuline et les domaines transmembranaires et intra-cytoplasmiques des immunoglobulines de surface.

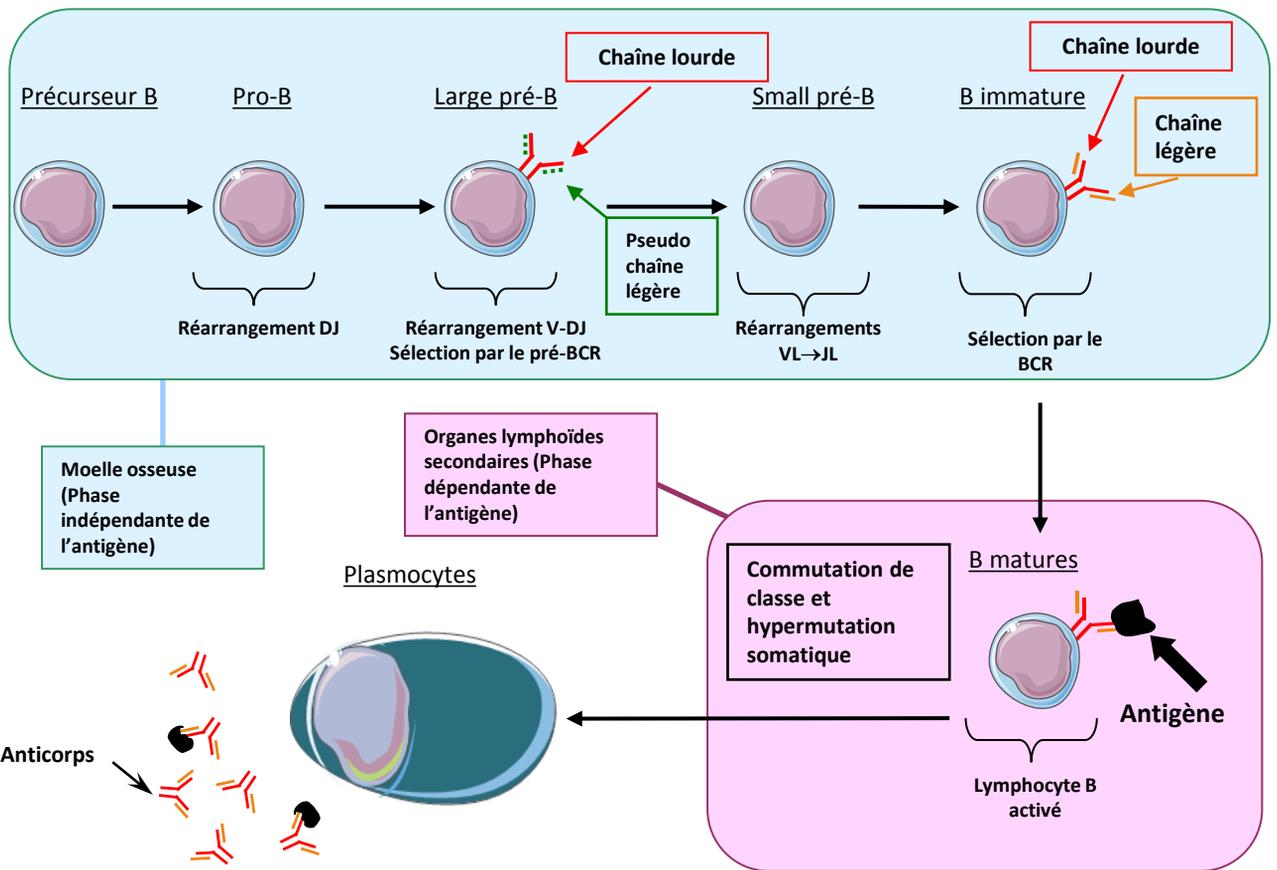


Fig.4 : Représentation schématique de l'ontogénie des lymphocytes B

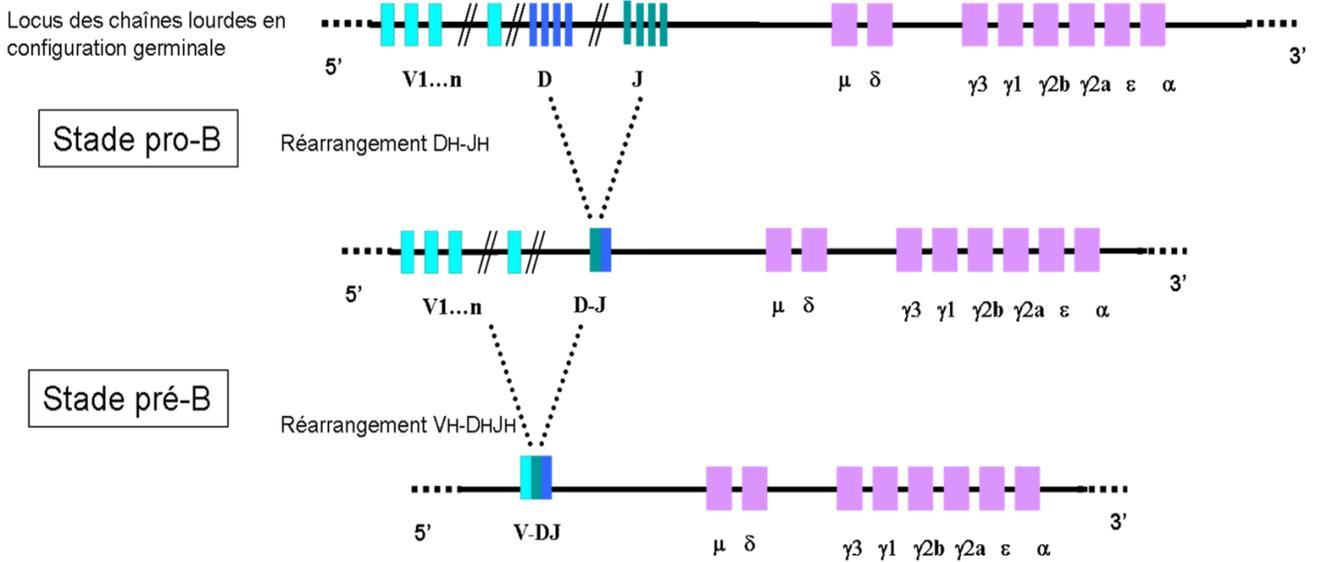


Fig.5 : Recombinaisons VDJ du locus IgH

B) Ontogénèse des lymphocytes B (fig 4)

L'ontogénèse des lymphocytes B comprend deux phases successives : une phase précoce qui s'opère indépendamment de l'antigène, s'effectuant dans la moelle osseuse chez l'adulte (dans le foie fœtal) suivie d'une phase tardive qui dépend des stimuli antigéniques prenant place dans les organes lymphoïdes périphériques (rate, ganglions, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses).

1) Phase indépendante de l'antigène

a) Les stades précoces du développement B

Les cellules B ont pour origine les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse chez l'animal adulte. Dans ces cellules précurseurs du lignage B, les gènes d'immunoglobuline vont subir une série de réarrangements ordonnés appelés réarrangements « V(D)J ». Ces remaniements géniques, qui ont pour but de former des exons codant les régions variables des chaînes lourdes et légères d'immunoglobulines, correspondent à l'aboutage aléatoire de segments V_H , D_H et J_H du locus IgH (fig 5), V_L et J_L des loci des chaînes légères. Le mécanisme de jonction entre les segments V(D)J étant imparfait, seuls les réarrangements dits « productifs » (c'est-à-dire respectant le cadre ouvert de lecture) aboutiront à la production d'une chaîne protéique fonctionnelle.

◆ Les stades pré-proB et pro-B

L'engagement d'un progéniteur lymphoïde vers la lignée lymphocytaire B est dépendant des protéines E2A, du facteur de transcription PU.1 et du récepteur à l'IL7 (Medina et al., 2004; Seet et al., 2004) qui permettront l'expression du facteur de transcription EBF (Early B lymphocyte Factor). EBF active directement l'expression des produits du gène *Pax-5* (O'Riordan and Grosschedl, 1999). *Pax-5* code des facteurs de transcription dont l'isoforme majeure est BSAP (pour B specific activator protein). PAX-5 adapte le programme d'expression génique des cellules progénitrices aux besoins des cellules lymphocytaires B. Il réprime les gènes dont l'expression est inappropriée dans les lymphocytes B et active les gènes spécifiques de la lignée. L'expression de 110 gènes est réprimée par PAX-5, ces gènes codent des protéines impliquées dans des fonctions telles que la communication inter cellulaire, l'adhésion des cellules, la migration... PAX-5 active 170 gènes qui sont principalement impliqués au niveau de la signalisation de la cellule B, la



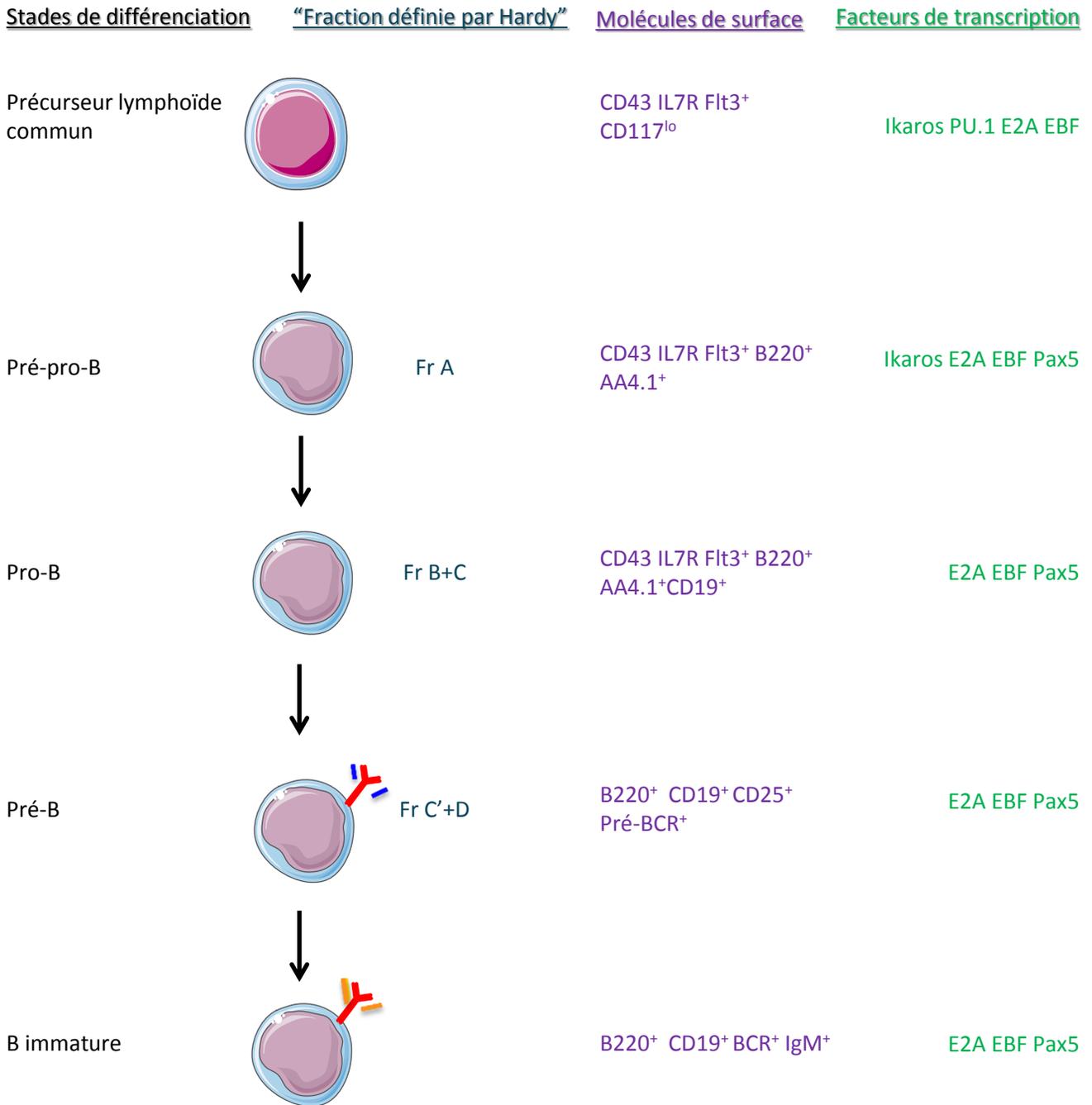


Fig 6: Schéma du développement B précoce.

Représentation des différents stades de différenciation dans la moelle osseuse, des molécules de surface et des principaux facteurs de transcription exprimés.

présentation antigénique, la formation de centre germinatif... Parmi ces gènes, PAX-5 active des gènes codant des composants essentiels du pré-BCR tels que CD79a mais aussi des molécules costimulatrices comme CD19 et CD21 (Cobaleda et al., 2007) (fig 6).

Les réarrangements ordonnés débutent au locus IgH dès le stade pré-pro-B. Les premiers réarrangements sont de type « DJ » : un segment D_H est abouté à un segment J_H, ces remaniements s'opèrent quasi-simultanément sur les deux allèles.

Au stade pro-B, le locus IgH subit un second type de réarrangement de type « VDJ » : il se produit, sur un premier allèle, entre un segment V_H et le segment DJ_H préalablement réarrangé. Dans le cas où ce premier réarrangement n'est pas productif (le réarrangement V(D)J décale le cadre ouvert de lecture), un réarrangement du même type s'opère alors sur le deuxième allèle ; statistiquement, seul le tiers des événements de recombinaison est productif (Alt et al., 1987). Le produit d'un réarrangement fonctionnel (en phase) permet la synthèse d'une chaîne lourde μ dont l'expression caractérise le stade suivant : pré-B.

◆ Le stade pré-B

A ce stade, la chaîne lourde μ s'associe avec une pseudo-chaîne légère codée par les produits des gènes *Vpré-B* et $\lambda 5$ (Melchers et al., 1993; Monroe and Dorshkind, 2007). La molécule ainsi constituée est exprimée à la surface de la cellule en association avec les molécules de transduction du signal Ig α et Ig β , l'ensemble forme le récepteur pré-B ou pré-BCR (pre-B Cell Receptor).

Les réarrangements des chaînes lourdes, séquentiellement ordonnés, n'autorisent l'expression que d'un seul allèle et donc d'un seul type de pré-BCR à la surface de la cellule B.

L'expression du pré-BCR à la surface de la cellule permet les réarrangements aux loci des chaînes légères d'immunoglobuline. Ces derniers s'effectuent également de façon séquentielle, tout d'abord sur les allèles des gènes des chaînes légères κ , puis sur ceux des chaînes λ . Si cette deuxième étape conduit à un réarrangement productif, la cellule peut alors exprimer à sa surface une IgM (composée de deux chaînes lourdes μ et de deux chaînes légères κ ou λ associées aux molécules de transduction du signal Ig α et Ig β ,

l'ensemble formant le récepteur B (BCR) de type IgM. A ce stade, la cellule est appelée « B immature ».

◆ Le stade B immature

Avant de sortir de la moelle osseuse, les cellules B immatures vont être soumises à une sélection négative qui va permettre d'éliminer par apoptose les cellules reconnaissant les antigènes du soi ce qui correspond à 40-60% des cellules (Melchers et al., 1993). A ce stade, il est possible de « sauver » un clone B autoréactif grâce à un phénomène appelé « editing » qui consiste à des réarrangements secondaires produisant de nouvelles chaînes légères (Tiegs et al., 1993; Hertz and Nemazee, 1997; Melamed and Nemazee, 1997; Pelanda et al., 1997). Si toutefois la cellule immature conserve son autoréactivité (malgré l'editing), celle-ci pourra encore devenir anergique (diminution de la prolifération, désensibilisation et sous-expression du BCR (Pike et al., 1982; Goodnow et al., 1988; Vilen et al., 1997) ou être éliminée par apoptose (Hartley et al., 1993; Norvell et al., 1995). Les cellules qui survivent quittent la moelle osseuse et se dirigent vers les organes lymphoïdes périphériques où elles subiront les dernières étapes de maturation.

b) Mécanismes moléculaires des recombinaisons V(D)J

Les recombinaisons s'opérant entre les segments V, D et J nécessitent l'introduction de cassures double brin de l'ADN en amont et aval de ces segments, de telles lésions constituent en quelque sorte une « instabilité volontaire » pour le génome de précurseur B. Afin qu'ils ne conduisent pas à des translocations (la conséquence de recombinaisons entre partenaires illégitimes), les mécanismes moléculaires des recombinaisons VDJ doivent être finement régulés et extrêmement bien surveillés.

Les recombinaisons V(D)J sont initiées par une machinerie enzymatique qui comprend les endonucléases codées par les gènes *Rag-1* et *Rag-2* (Recombination Activating Gene) dont l'expression est restreinte aux lignées lymphocytaires B et T. De plus, leur expression simultanée est nécessaire afin d'obtenir une efficacité optimale du mécanisme de recombinaison (Schatz et al., 1989; Oettinger et al., 1990). L'inactivation des gènes *Rag1* ou *Rag-2* chez la souris aboutit à un blocage complet du développement B aux stades précoces (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992).

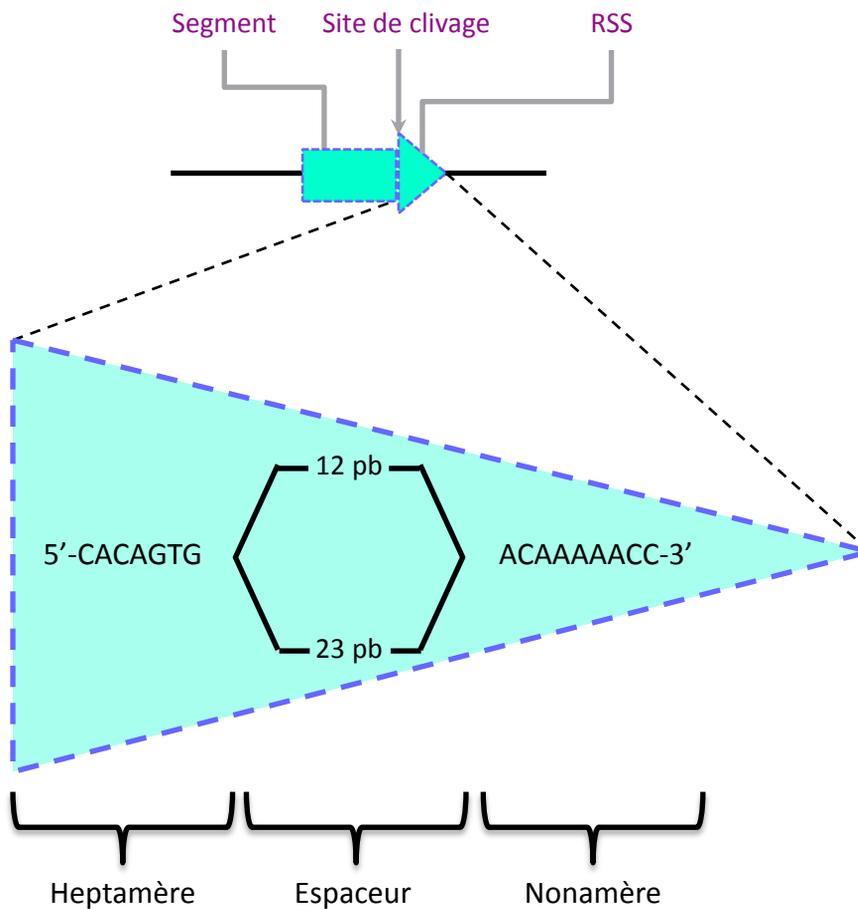


Fig7: Structures moléculaires RSS "séquences signal de recombinaison".

Ces régions sont constituées de motifs de sept et neuf nucléotides, très conservées, séparées par des régions espacées de 12 ou 23 nucléotides.

(D'après Schatz and Ji, 2011)

Les recombinaisons des segments codant les régions variables des chaînes lourdes et légères s'effectuent au niveau de sites spécifiques nommés « séquences signal de recombinaison » (RSS). Ces séquences sont situées en aval des segments V_H et V_L , en amont des segments J_H et J_L ; de part et d'autre de chaque segment D_H . Les RSS sont constituées de deux motifs consensuels très conservés de sept et neuf nucléotides (heptamère CACAGTG et nonamère ACAAAAACC), séparés par des régions de 12 ou 23 nucléotides aléatoires (Tonegawa, 1983; Schlissel, 2003) (fig 7). Les recombinaisons se réalisent majoritairement entre un RSS comportant un séparateur de 12 nucléotides et un séparateur de 23 nucléotides, c'est la règle dite « 12-23 ». Au locus IgH, la règle 12-23 est majoritairement respectée ; elle n'autorise les recombinaisons qu'entre segments D_H et J_H puis V_H et $D-J_H$. Les segments D_H étant flanqués du même type de RSS en 5' et 3', ces derniers ne peuvent réarranger qu'avec les RSS compatibles (V_H en 5' et J_H en 3'), évitant ainsi la formation d'exons V_H-J_H ou $V_H-D_H-J_H$ (Meek et al., 1989). De façon similaire, aux loci des chaînes légères, les combinaisons de RSS 12-23 n'autorisent des recombinaisons qu'entre les segments V_L et J_L .

Le déroulement de la recombinaison VDJ peut être découpé en deux phases : la première consistant en la reconnaissance des sites RSS ainsi que la réalisation d'une cassure double brin de l'ADN, la seconde correspondant à l'aboutage des segments et la réparation de la jonction occasionnée (fig 8).

Lors de la première phase, la protéine RAG-1 s'associe avec l'heptamère et les nucléotides 12/23 adjacents, la protéine RAG-2 collabore afin de stabiliser ce complexe (Swanson, 2004). Ces dernières sont associées aux protéines HMGB1 et HMGB2 (High Mobility Group 1) qui stimulent la formation du complexe ainsi que le clivage au niveau des séquences RSS (van Gent et al., 1997). Les protéines RAG initient la coupure double brin de l'ADN en introduisant tout d'abord une coupure simple brin en 5' de la séquence heptamère. Ceci génère un groupe 3' hydroxyl libre qui attaque alors le second brin d'ADN. Ce clivage génère deux types d'extrémités : deux extrémités « codantes » présentant une structure en épingle à cheveux (nécessaire à l'aboutage des segments ciblés par la recombinaison, par exemple D_H et J_H) et deux extrémités « signal » à bord franc (permettant l'aboutage de la région intergénique clivée, située entre les deux segments d'intérêt). La réparation de ce clivage fait intervenir la voie *Non Homologous End Joining* (NHEJ), voie



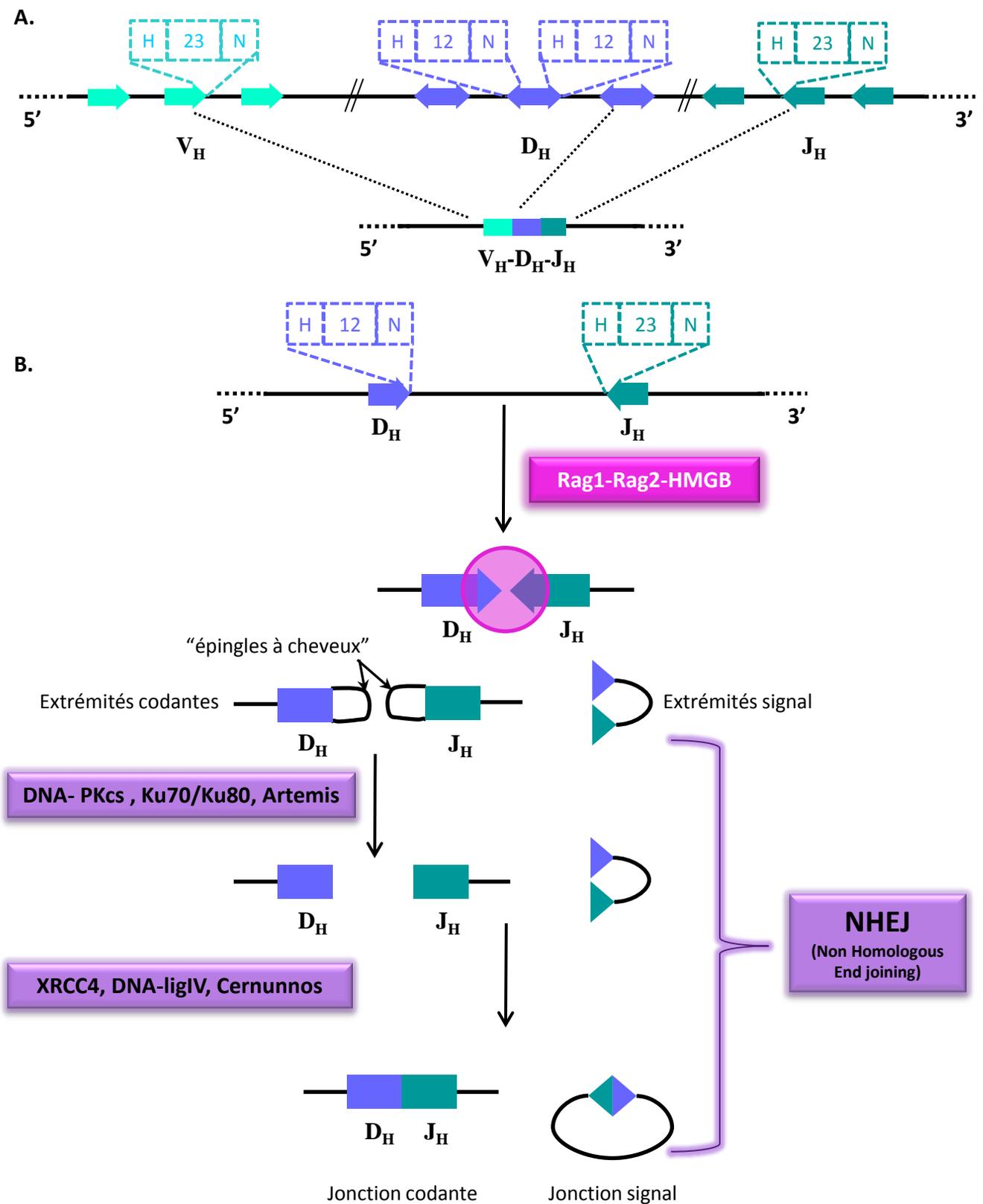


Fig 8 :

A. Recombinaison $V(D)J$ selon la règle des 12/23: La recombinaison s’effectue entre RSS comportant un séparateur de taille différente. Ainsi, les recombinaisons ne peuvent se faire qu’entre un D et un J puis un V et un DJ réarrangé.

B. Mécanisme de réparation mis en jeu lors des recombinaisons VDJ .

Le complexe protéique Rag crée une coupure double brin de l’ADN au niveau de l’heptamère entre D_H et J_H établissant ainsi des extrémités « codantes » en épingles à cheveux et des extrémités du signal à bout franc. Artemis est recruté et phosphorylé par DNAPkcs, ouvre l’épingle à cheveux. Le complexe XRCC4, DNA-ligIV, cernunnos ligature les extrémités codantes et celle du signal.

(D’après Schlissel, 2003; Schatz and Ji, 2011)

prédominante de réparation des cassures double brin non homologues de l'ADN dans les cellules de mammifères. Les facteurs mis en jeu dans cette voie sont Ku70/Ku80, DNA-PKcs, XRCC4 ligase IV, Artemis et Cernunnos (XRCC4-like factor), (Schlissel, 2003; Dudley et al., 2005; Stavnezer et al., 2010).

Les protéines RAG restent associées à l'ADN après les coupures et forment ainsi un complexe de post-clivage. Ce complexe recrute les facteurs Ku70 et 80 en se fixant au niveau des extrémités d'ADN. Les protéines Ku ont pour rôles : de protéger les extrémités de l'ADN des activités exonucléasiques (Taccioli et al., 1994), de rapprocher les segments d'ADN afin de faciliter la ligature de la jonction, de recruter les protéines intervenant dans la réparation de l'ADN. La réalisation de la jonction codante nécessite l'ouverture de l'épingle à cheveux, cette étape étant effectuée grâce à l'activité endonucléasique d'Artémis phosphorylé par la kinase DNA-PKcs (Sérine/Thréonine kinase) (Ma et al., 2002). La ligature est ensuite assurée par les facteurs ligase IV et XRCC4 (Ahnesorg et al., 2006; Buck et al., 2006; Sekiguchi and Ferguson, 2006). Cernunnos stimule l'activité des ligases XRCC4/ligIV (Hentges et al., 2006; Gu et al., 2007). La réalisation de la jonction fait intervenir l'enzyme Terminale deoxynucleotidyl Transferase (TdT) qui ajoute aléatoirement des nucléotides aux extrémités 3' ce qui a pour effet de créer une grande diversité de jonctions et ainsi d'augmenter la diversité antigénique.

2) Phase dépendante de l'antigène

Cette seconde étape se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires et nécessite la présence d'un antigène. Cette phase dépendante de l'antigène conduit à la formation de cellules sécrétrices d'anticorps (plasmocytes) et de cellules B mémoires.

a) La poursuite du développement B au sein des organes lymphoïdes secondaires

◆ *La migration vers la rate : le stade B transitionnel (fig.9)*

Les cellules B qui ne sont pas auto-réactives peuvent quitter la moelle osseuse et passer dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules sortant de la moelle osseuse possèdent les mêmes caractéristiques phénotypiques (Allman et al., 1992) que les cellules B immatures. Elles sont nommées « transitionnelles » pour indiquer leur stade intermédiaire de développement. Le compartiment des cellules transitionnelles est divisé en deux sous-

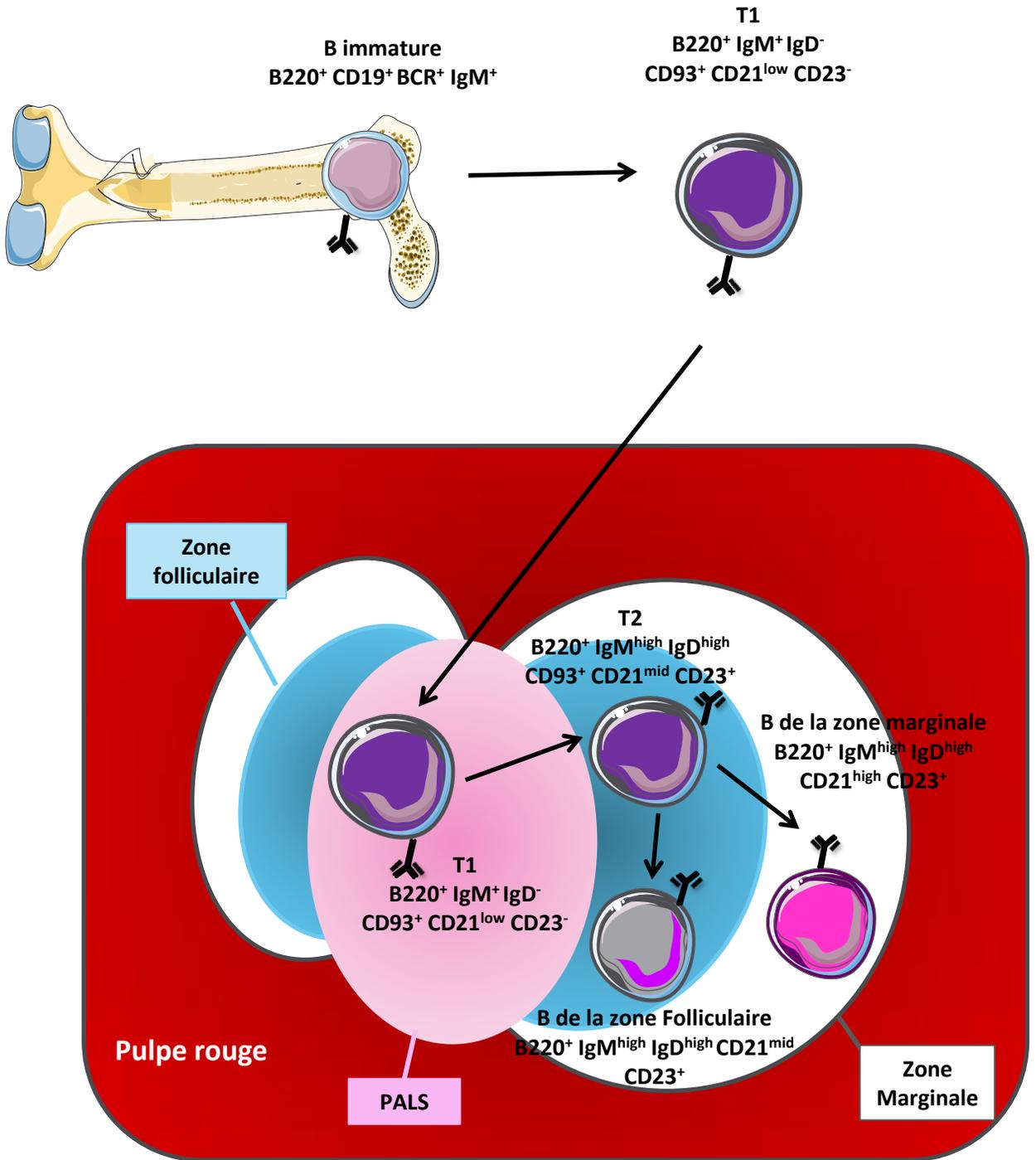


Fig 9 : Ontogénie des cellules B transitionnelles

PALS : manchons lymphoïdes péri-artériolaires

(D'après Chung et al., 2003)

populations : transitionnel T1, transitionnel T2. Ces deux populations sont caractérisées par la présence du récepteur de surface CD93.

Les B transitionnels de type 1 (T1) ont un phénotype proche des cellules B immatures de la moelle osseuse. Ils présentent peu ou pas d'expression d'IgD membranaire, une forte expression d'IgM membranaire et une faible expression des récepteurs CD21 et CD23. Ces cellules semblent être exclues de la zone folliculaire des centres germinatifs (Loder et al., 1999). Les cellules T1 circulent dans le sang et se situent au niveau de la partie externe des manchons lymphoïdes péri-artériolaires (PALS) (Chung et al., 2003). La population T1 est soumise à une sélection négative en périphérie : seules quelques cellules T1 se différencieront en cellules T2 (délétion clonale et anergie). La fixation de BAFF sur leur récepteur BAFF-R présent à la surface des cellules B transitionnelles permet aux cellules de se différencier et devenir des cellules B matures (Sasaki et al., 2004). La différenciation des cellules transitionnelles semble également être dépendante 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.

Les B transitionnels de type 2 (T2) ont migré au sein des zones folliculaires (Loder et al., 1999). Ils possèdent un phénotype intermédiaire entre les cellules B T1 et les lymphocytes B matures. Ces cellules possèdent encore une forte expression d'IgM et expriment les marqueurs CD21 et CD23. Allman et collaborateurs, 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, correspondrait plutôt à une population anergique indépendante qui serait maintenue dans cet état par la présence d'autoantigènes dans la rate (Merrell et al., 2006). Les cellules T2 sont présentes dans la rate, localisées 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 (Chung et al., 2003).

Au cours de leur développement, ces cellules vont acquérir progressivement leur capacité à répondre à un antigène ainsi qu'à une stimulation T dépendante (Chung et al., 2002). En effet, à 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).

◆ Les cellules B matures

Les cellules B transitionnelles vont avoir une destinée différente en fonction de la nature du signal induit par l'activation de leur récepteur B de surface (appelé communément « BCR strenght » qui peut être traduit par « force de l'activation du BCR ») (Niiri and Clark, 2002; Pillai and Cariappa, 2009). Les cellules B matures sont divisées en trois catégories majeures : les B-1, les B de la zone marginale et les B de la zone folliculaire. Ces cellules diffèrent de par leur localisation, leur capacité à migrer ainsi que par leur activation dépendante ou non des cellules lymphocytaires T.

Les cellules B-1 sont localisées au niveau de la cavité péritonéale et de la cavité pleurale. On distingue les cellules B-1a et B-1b, le sous-groupe B-1a est caractérisé par la présence du marqueur de surface CD5. Elles sécrètent spontanément des anticorps naturels (de faible affinité) et procurent ainsi une protection immédiate contre des pathogènes.

Les cellules B de la zone marginale (communément appelées MZ B) sont localisées entre les pulpes blanche et rouge de la rate. Ces cellules conservent une forte expression d'IgM, elles sont caractérisées par une forte expression du marqueur CD21 et une faible expression du marqueur CD23. Elles participent, comme les cellules B-1, à une réponse immunitaire très précoce grâce à une activation indépendante des cellules lymphocytaires T.

Ces deux types cellulaires constituent un intermédiaire entre la réponse immunitaire innée, très rapide, et la réponse immunitaire adaptative apparaissant plus tardivement. Après une stimulation antigénique, elles auront la capacité de générer rapidement des cellules plasmocytaires sécrétant des IgM (Martin et al., 2001) mais aussi des IgA et des IgG (Cerutti et al., 2011).

Les cellules B folliculaires constituent la majorité des cellules lymphocytaires B de la rate. Elles sont localisées au niveau des follicules primaires. Elles possèdent la capacité de se déplacer entre les différents organes lymphoïdes. Les cellules folliculaires possèdent une expression du marqueur de surface CD21 plus faible que les cellules de la zone marginale et une forte expression du marqueur CD23. Ces cellules répondent préférentiellement à une

stimulation T dépendante. Après avoir rencontré un antigène, elles vont former des follicules lymphoïdes appelés centres germinatifs (CG). Au sein de ces microstructures propices aux interactions avec les cellules T et les cellules dendritiques, les cellules B vont subir simultanément de nouvelles modifications de leurs gènes d'immunoglobuline dans le but d'améliorer l'efficacité de la réponse antigénique. Ces processus nommés hypermutation somatique (ou SHM pour *Somatic HyperMutation*) et commutation isotypique (ou CSR pour *Class Switch Recombination*) permettent d'une part d'augmenter l'affinité de l'immunoglobuline pour l'antigène (dans le cas de la SHM) et d'autre part de modifier le type de chaîne lourde d'immunoglobuline (et par conséquent la classe d'immunoglobuline) sans modifier la région variable (c'est-à-dire en conservant le même site de liaison à l'antigène).

Les dernières étapes de la maturation lymphocytaire B vont conduire à la formation d'un pool de cellules B mémoires et de plasmocytes.

◆ Les cellules B mémoires :

Les **cellules B mémoires** sont générées lors d'une réponse primaire, elles procurent à l'organisme une immunité humorale de longue durée. Lors d'une seconde réponse à l'antigène, elles peuvent rapidement proliférer et générer des cellules plasmocytaires. Elles sont formées suite à une réponse T-dépendante (TD) au sein des centres germinatifs ou suite à une réponse T-indépendante (TI) en dehors des centres germinatifs (Dogan et al., 2009).

La réponse lymphocytaire B TD commence après la rencontre avec un antigène et l'interaction appropriée avec des cellules lymphocytaires T. La réponse se produit au sein de centres germinatifs où les cellules B vont subir des remaniements intergéniques secondaires : SHM pour acquérir une plus grande affinité antigénique et CSR pour générer de nouvelles classes d'immunoglobuline (IgG, IgA ou IgE).

La notion de cellules B mémoires TI est loin d'être nouvelle, elle débute avec les travaux des groupes de Muramatsu (Hosokawa, 1979; Hosokawa et al., 1984) et Truffa-Bacchi (Le Moal and Truffa-Bacchi, 1985). Il faut attendre 2004 et les travaux d'Alugupalli pour que l'existence de B mémoire TI soit démontrée (Alugupalli et al., 2004). Leur étude montre pour la première fois que l'immunité humorale antibactérienne d'une grande



longévité peut être produite d'une façon TI. L'existence de cellules B mémoires issues d'une réponse TI de type II a été démontrée par Obukhanych et Nussenzweig. Ils démontrent qu'un pool quiescent de cellules B activées précédemment par une immunisation NP-ficol, persiste 120 jours après l'immunisation (Obukhanych and Nussenzweig, 2006). Les cellules mémoires issues d'une réponse TI, présentent moins de cellules ayant effectué la CSR et moins de mutations (Shlomchik and Weisel, 2012).

Qu'elles se forment suite à une réponse TI ou TD, les B mémoires sont constituées de cellules à IgM et IgG. Ces deux sous-populations présentent des caractéristiques différentes, après une nouvelle rencontre avec l'antigène les cellules IgG se différencient en plasmocytes alors que les cellules IgM sont capables d'entrer à nouveau dans un centre germinatif (Dogan et al., 2009).

◆ Le stade ultime du développement B : les cellules B plasmocytaires

Les **plasmocytes** constituent le stade ultime de développement B. Ce sont des cellules effectrices de la réponse humorale qui produisent et sécrètent les anticorps à destination de l'ensemble de l'organisme. Ces cellules expriment le récepteur de surface CD138 (syndecan-1). Une fois différenciées en cellules plasmocytaires, les cellules B cessent de se diviser. La durée de vie des cellules plasmocytaires ne proliférant plus varie de quelques jours à plusieurs mois. Les plasmocytes sécrétant des IgM sont formés au début de la réponse primaire, ils sont issus de cellules B de la zone marginale activées par l'antigène. Ces cellules ne subissent pas (ou peu) d'hypermutations somatiques et ont une durée de vie de quelques jours (Smith et al., 1996). Les plasmocytes à longue durée de vie sont localisés principalement dans la moelle osseuse, même si certaines cellules plasmocytaires de la rate peuvent également être de longue durée de vie (Calame et al., 2003).

La différenciation plasmocytaire implique principalement deux facteurs de transcription : Blimp-1 et Xbp-1 (Calame et al., 2003; Lin et al., 2003). Blimp-1 réprime des facteurs de transcription indispensables au développement B tel que PAX-5, BCL-6 ou bien encore des protéines exprimées à la surface des cellules B matures (B220, CD19, CD21...) (Calame, 2001). Un autre facteur de transcription, IRF4 est également nécessaire à la différenciation plasmocytaire. Le KO conditionnel de ce facteur de transcription aboutit à une diminution de cellules plasmocytaires post-GC (Klein et al., 2006).

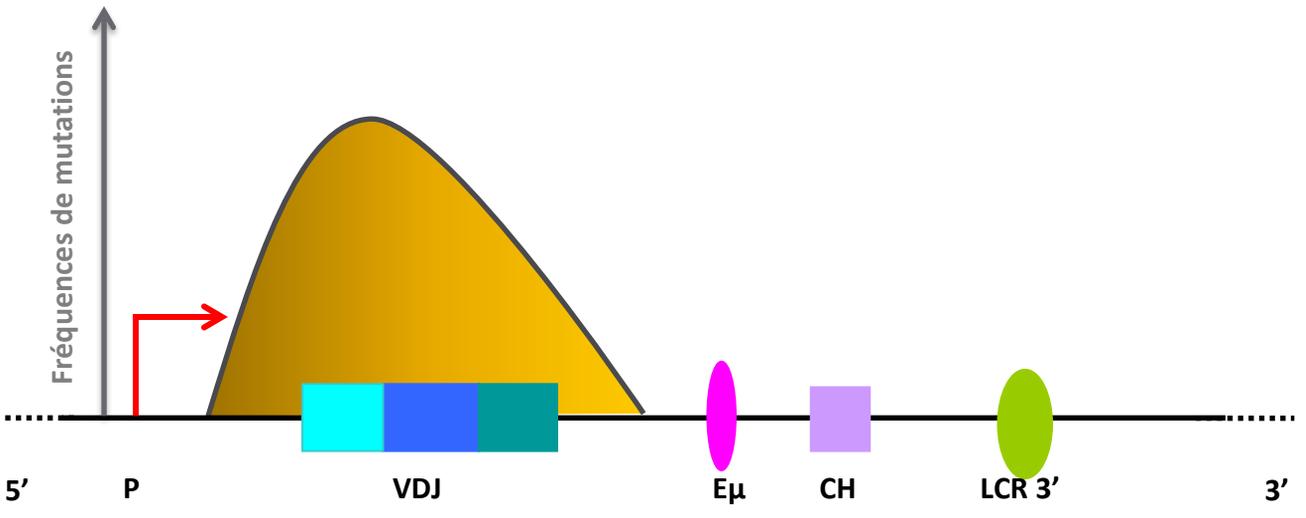


Fig 10 : Fréquence des hypermutations somatiques sur le segment VDJ réarrangé du locus IgH
(D'après Peled et al., 2008)

b) Maturation de la réponse immunitaire : les recombinaisons secondaires

La réponse immunitaire humorale est une réponse spécifique et adaptative, au cours de laquelle les cellules B vont à nouveau remanier leurs gènes d'immunoglobulines par le biais de l'hypermutation somatique (SHM) et de la commutation de classe (CSR) ou commutation isotypique.

◆ *L'hypermutation somatique (SHM)*

Le mécanisme d'hypermutation somatique introduit des mutations ciblées au sein des régions variables des chaînes lourdes et légères d'immunoglobuline. La fréquence des mutations est d'environ 1 pour 1000 bases, ce qui est mille fois plus élevé que le taux de mutations observé au sein des cellules somatiques. L'hypermutation somatique génère principalement des mutations ponctuelles, cependant des insertions ou des délétions peuvent occasionnellement être observées (environ 6% des mutations) (Goossens et al., 1998). Les transitions introduites par SHM sont deux fois plus nombreuses que les transversions et une grande proportion des mutations se produit au niveau de motifs privilégiés ou « hotspots » ayant pour séquence RGYW (A/G G C/T A/T) ou WRCY sur le brin complémentaire. Les mutations sont majoritairement localisées au niveau des régions hypervariables (appelées régions CDR) qui forment le site de fixation antigénique. L'introduction de ces mutations débute environ à 150 paires de base en 3' du promoteur IgV_H et s'étend sur environ 1,5 Kb. La fréquence des mutations décroît exponentiellement avec l'éloignement du site d'initiation (fig 10) (Rada and Milstein, 2001), celle-ci étant directement corrélée au taux de transcription (Bachl et al., 2001).

◆ *La commutation isotypique (CSR) ou commutation de classe*

La cellule B mature exprime à sa surface un BCR de type IgM, à la suite d'une rencontre avec un antigène la commutation de classe va permettre à la cellule d'exprimer à sa surface un nouvel isotype : IgG, IgA ou IgE. Cette nouvelle immunoglobuline diffère de par la nature de sa chaîne lourde. Lors de la CSR, la région variable ne subit aucune modification ; de ce fait, l'affinité pour l'antigène n'est pas affectée.

L'IgG est l'isotype majeur dans le sang et la lymphe. Il existe différents types d'IgG qui diffèrent de par leurs fonctions effectrices : capacités variables à lier les récepteurs Fc, induction de l'ADCC (Antibody-dependant Cell-Mediated Cytotoxicity), activation du

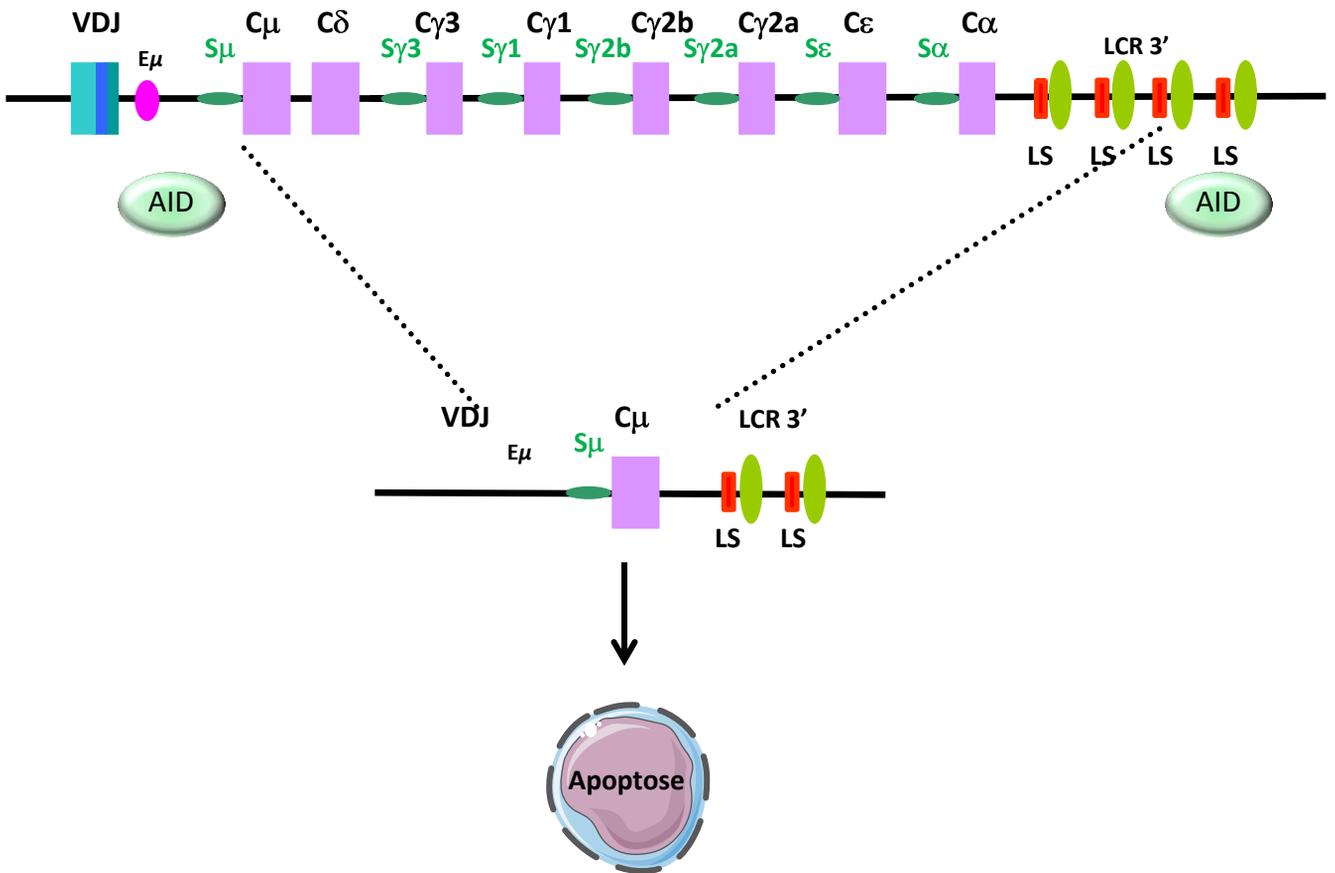


Fig 11 : « Recombinaisons « suicide » du locus IgH (LSR) »

LS : "like-S γ " stretches

(D'après Péron et al., 2012)

complément. Chez la souris, il existe 4 sous-classes d'IgG distinctes : IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3.

L'IgA est l'isotype majoritaire retrouvé dans les sécrétions qu'elles soient respiratoires, digestives ou génitales. Cet isotype est fortement résistant à la protéolyse enzymatique.

L'IgE est impliquée dans la défense parasitaire mais aussi lors des réactions d'hypersensibilité. Les mastocytes et basophiles expriment des récepteurs de haute affinité pour l'IgE (FcεR1) qui peuvent se lier aux IgE monomériques même en absence d'antigène. Les antigènes spécifiques de ces IgE induisent, sur les mastocytes et basophiles, l'agrégation des complexes IgE-FcεR entraînant la libération d'histamine, responsable de l'hypersensibilité.

◆ **« Recombinaison « suicide » du locus IgH (LSR) » (fig.11)**

L'analyse de la région 3'RR a révélé l'existence de séquences allant de 0.5 à 1 Kb où 49 pb sont répétées, ces régions nommées « like-S γ » stretches (LS regions) ressemblent à celles des régions switch. Ces régions LS, ainsi que les régions contenant les activateurs transcriptionnels 3', peuvent être transcrites lors de l'activation de la cellule B (Péron et al., 2012). La transcription de ces régions peut également aboutir au recrutement d'AID : ces régions ont été trouvées mutées et recombinées. Le taux de mutation apparaît plus important aux niveaux des régions LS (0.25%) qu'au sein des activateurs 3', ce taux de mutation approchant celui de S μ (0.42%).

Les 3 éléments requis pour l'accessibilité aux recombinaisons de CSR étant réunis (transcription, structure répétitive, ciblage par AID), la 3'RR apparaît donc comme un substrat potentiel pour une recombinaison du même type. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence l'existence de recombinaisons entre la région S μ et les sites LS de la 3'RR. Ces recombinaisons aboutissent à la délétion de l'ensemble des gènes constants, de ce fait, le locus IgH devient inactif (Péron et al., 2012). Le BCR étant indispensable à la survie de la cellule B, cette délétion entraîne donc la mort de la cellule. Cet événement de recombinaison est donc nommé « recombinaison suicide du locus ». A l'heure actuelle, la régulation de ce mécanisme reste encore à découvrir.

3) Les mécanismes des recombinaisons secondaires

Bien que de finalité différente, les processus d'hypermutation somatique et de commutation de classe sont tous deux initiés par un effecteur enzymatique commun : la protéine AID (pour Activation-Induced Cytidine deaminase).

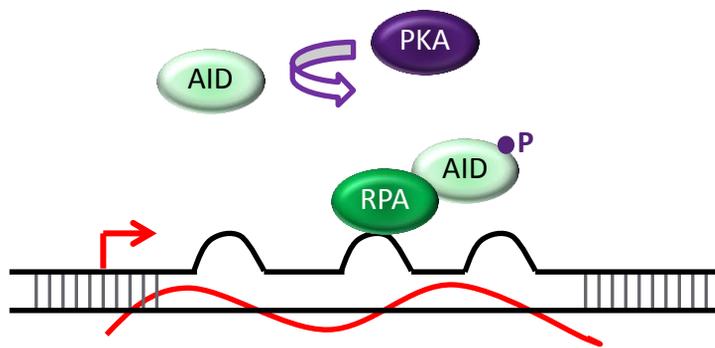
a) AID : enzyme clef des recombinaisons secondaires

La compréhension des recombinaisons secondaires a connu une avancée majeure avec la découverte d'une enzyme B spécifique : AID (Muramatsu et al., 1999). Chez la souris, la délétion d'AID n'altère pas le développement lymphocytaire B mais entraîne un blocage de SHM et de CSR (Muramatsu et al., 2000). Le rôle de cette protéine est confirmé par un syndrome d'hyper IgM chez des patients portant une mutation du gène codant la protéine AID (Revy et al., 2000).

Le locus *Aicda* codant AID contient quatre régions permettant de contrôler sa transcription (Yadav et al., 2006). Ces régions possèdent de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription induits après activation des lymphocytes B. Des régions permettent également la fixation de protéines Id inhibant la transcription d'*Aicda*. Ces protéines pourraient restreindre la transcription du gène au sein des cellules B (Gonda et al., 2003; Tran et al., 2010). De plus, la transcription du gène *Aicda* apparaît comme régulée par deux miRNAs : miR-155 et miR-181b. miR-155 est exprimé dans les centres germinatifs, sa mutation augmente les transcrits du gène *Aicda*. miR-155 est surexprimé dans les cellules effectuant la commutation de classe, sa délétion induit une augmentation de ce processus (Teng et al., 2008). miR-181b possède un profil d'expression différent de miR-155, il est retrouvé principalement dans les cellules B au repos de la rate, une activation par la combinaison LPS+IL4 entraîne une diminution de son expression. miR-181b réduirait l'expression de AID dans les cellules B non stimulées (De Yébenes and Ramiro, 2010).

AID est une enzyme principalement localisée au niveau du cytoplasme (Rada et al., 2002; Schrader et al., 2005), cependant son activité de déamination est exercée sur l'ADN, dans le noyau de la cellule B activée. La protéine est maintenue dans le cytoplasme grâce à un site d'ancrage présent dans la partie C-terminale d'AID (Patenaude et al., 2009). Une séquence signal d'exportation nucléaire (NES) se situe également au niveau de la partie C-terminale (McBride et al., 2004), elle va permettre l'importation de l'enzyme vers le noyau.

A.



B.

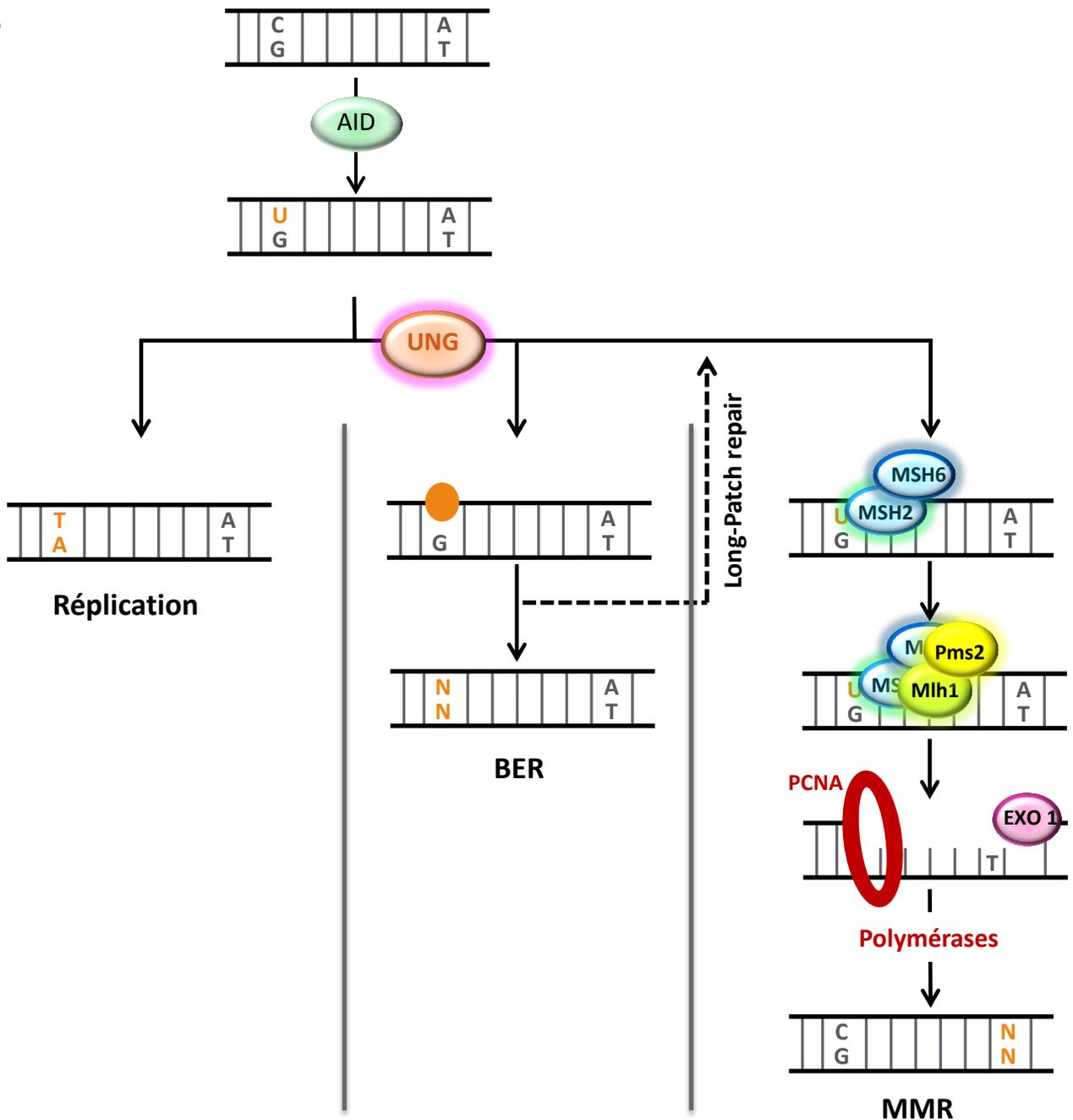


Fig 12: Modèle des mécanismes impliqués au cours du processus d'hypermutation somatique.

A. Recrutement d'AID : Dans les cellules B activées, AID est exprimée et phosphorylée par PKA sur la sérine 38. Cette phosphorylation facilite l'interaction avec RPA qui est une protéine liée à l'ADN simple brin.

B. Différentes voies de réparation des cassures induites par AID. Le mismatch U/G provoqué par AID peut être pris en charge par différentes voies de réparation (BER : Base-Excision Repair ; MMR : MisMatch Repair); UNG : Uracil-DNAGlycosylase ; PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen; EXO1: exonucléase 1 .

(D'après Chaudhuri et Alt, 2004 ; Peled et al., 2008)

La localisation d'AID dans le noyau est temporaire car elle s'y trouve rapidement dégradée après poly-ubiquitination (Aoufouchi et al., 2008).

Alors que la localisation et la dégradation d'AID permettent de coordonner son accès à l'ADN, la phosphorylation de la protéine régule son activité. Elle est augmentée après une phosphorylation de la sérine 38 (S38) par la protéine PKA (c-AMP-dependent protein kinase A) (Basu et al., 2005). PKA est une protéine ubiquitaire qui phosphoryle AID uniquement dans les cellules B activées (McBride et al., 2006). La phosphorylation d'AID permet son activation ainsi que l'interaction avec la protéine de réplication A (RPA) (Chaudhuri et al., 2004; Basu et al., 2005). AID n'a pas besoin de PKA ni de RPA pour se fixer sur l'ADN simple brin (Vuong et al., 2009) cependant l'absence de phosphorylation inhibe son activité. Le rôle précis de la protéine RPA reste encore à éclaircir mais elle semble agir en aval de la déamination de l'ADN produite par AID. RPA pourrait recruter les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme l'Uracil N glycosylase (UNG) ou les protéines de réparation des mésappariements de l'ADN (voie MMR pour « MisMatch Repair »).

b) Le processus d'hypermutation somatique. (fig. 12)

L'hypermutation somatique se déroule en deux phases :

- Déamination d'une base de l'ADN par AID qui crée un mésappariement d'ADN à l'origine d'une lésion simple brin.
- Réparation imparfaite des lésions occasionnées qui génère des mutations.

◆ ***Déamination de l'ADN***

Le processus d'hypermutation somatique des régions variables des chaînes lourdes et légères d'immunoglobuline débute par une activation de la transcription initiée au promoteur du segment V réarrangé (V_H ou V_L). Il est postulé que la transcription par l'ARN-polymérase-II confère une « accessibilité » de la région d'ADN à AID (Peters and Storb, 1996; Chaudhuri et al., 2003), une hypothèse propose que de courtes « boucles de transcription » exposent l'ADN sous la forme simple brin qui serait un meilleur substrat pour la déamination par AID.

Après la phosphorylation d'AID, un complexe RPA/AID se fixe sur la molécule d'ADN en cours de transcription, le rôle de RPA serait de stabiliser l'interaction avec l'ADN simple

brin. Ce complexe se lie à la RNA-polymérase-II par l'intermédiaire du facteur d'élongation Spt5 (Pavri et al., 2010; Yamane et al., 2011).

Une fois liée à l'ADN, l'enzyme catalyse la déamination de déoxycytidine (dC) en déoxyuridine (dU) (Muramatsu et al., 2000). Les lésions introduites par AID sont localisées au niveau de « hotspots » (WRCW), la protéine AID contenant une boucle de reconnaissance des motifs WRC (Kohli et al., 2009). L'apparition d'un dU au sein de la molécule d'ADN crée un mésappariement qui ne peut être conservé.

◆ Devenir du mésappariement dU-dG de l'ADN

L'élimination d'un mésappariement dans la molécule d'ADN pourra être effectuée selon différentes voies : l'ADN peut subir une réplication sans être réparé ou bien la molécule d'ADN est réparée par les voies BER (Base-Excision Repair) et/ou MMR (MisMatch Repair) avec ou sans intervention de l'enzyme UNG (Uracil-N-glycosylase) (Di Noia and Neuberger, 2007; Peled et al., 2008).

Dans le cas où l'ADN contenant le mésappariement est directement répliqué, l'ADN polymérase ignore la mutation et considère la base U comme une base T ; une base A est alors insérée, une mutation de type transition C vers T est introduite.

Dans un second cas, la base U est reconnue et éliminée par UNG. L'action de cette enzyme sur la base U aboutit à l'apparition d'un site abasique. Ce site est alors pris en charge par le mécanisme de BER qui va, avec l'intervention des polymérases de faible fidélité (REV1, pol β , pol η ...), remplacer le site abasique par une base aléatoirement A, C, T ou G (Weill and Reynaud, 2008). Les mutations obtenues peuvent alors être des transitions ou des transversions. Les polymérases peuvent également occasionner des mutations au niveau des bases situées à proximité (en amont ou en aval) du site abasique, ce mécanisme de réparation est appelé « long-patch repair » (Peled et al., 2008).

Dans un dernier cas, le mésappariement est reconnu par un hétérodimère MSH2-MSH6 appartenant à la voie de réparation MMR. La liaison de ces protéines entraîne le recrutement de MLH1 et PSM2 qui à leur tour vont recruter l'exonucléase 1 (EXO1). Cette enzyme excise la base erronée contenue dans la séquence ADN et parfois les bases entourant l'erreur. L'hétérodimère PCNA (proliferating cell nuclear antigen) interagit avec



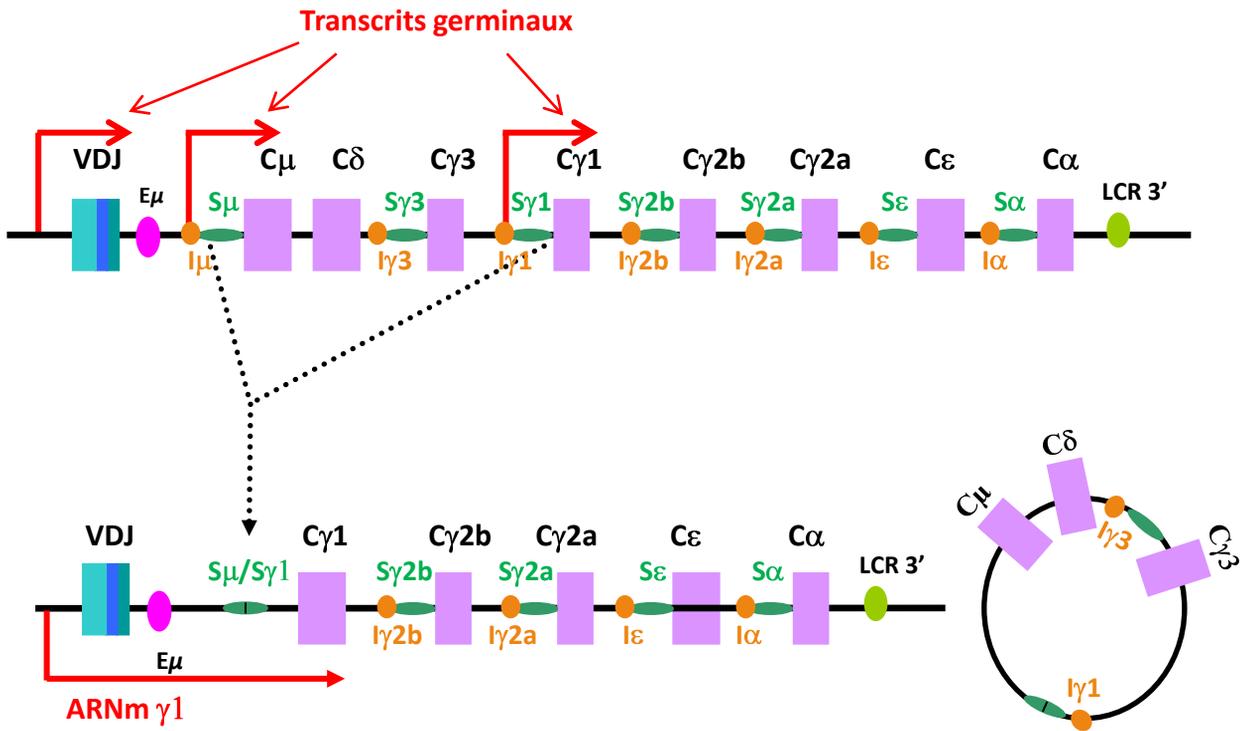


Fig 13 : Commutation isotypique, exemple de CSR vers IgG1

les protéines du MMR (MSH6, MLH1, EXO1) ainsi qu'avec les polymérases. Lors de cette interaction, PCNA est sous forme mono-ubiquitinyllé, il recrute des polymérases infidèles (en particulier la polymérase ϵ) qui génèrent des mutations au cours de la réparation (Peled et al., 2008). Les réparations induites par la polymérase η aboutissent à l'apparition de mutations A/T vers N (Delbos et al., 2007).

Cette voie « long-patch repair » répare environ 60% des mutations totales, les voies « short-patch repair » et la voie de réplication corrigent les 40% restantes.

c) Le processus de commutation isotypique ou commutation de classe (CSR)

◆ Les régions switch (fig.13)

La CSR se produit entre deux régions appelées régions switch (S). Elles sont localisées en 5' de chaque gène constant de la chaîne lourde à l'exception du gène C δ . Ce sont des régions cibles constituées de séquences répétées, très riches en G/C dont la taille varie entre 1 et 12 Kb (la plus longue étant la région S γ 1). Elles peuvent être divisées en deux catégories : S μ , S α et S ϵ sont composées de séquences pentamériques alors que S γ 1, S γ 2a, S γ 2b et S γ 3 contiennent des motifs répétés de 49 à 52 paires de bases.

Différents modèles ont permis d'étudier le rôle des régions switch. Bien que différentes, ces régions peuvent se substituer les unes aux autres : le remplacement de S γ 1 par S γ 3 n'empêche pas le switch vers IgG1 (Zarrin et al., 2008). La délétion des séquences répétées en tandem de S μ entraîne une diminution de CSR mais ne l'abolit pas entièrement (Luby et al., 2001). Une délétion plus importante de la région comprise entre I μ et C μ réduit dramatiquement la CSR sans la supprimer totalement (Khamlichi et al., 2004). La délétion de S γ 1 abolit la CSR vers IgG1 alors que l'inversion de cette région aboutit à une diminution de 75% de la CSR (Shinkura et al., 2003) ce qui suggère que l'efficacité de la CSR est dépendante de l'orientation des régions switch.

◆ La transcription germinale

Tout comme l'hypermutation somatique, la CSR est dépendante de la transcription. En amont de chaque région S se trouve un promoteur germinale (promoteur I) régulé par des facteurs de transcription dont certains sont activés par des cytokines. Chaque région switch est encadrée par des exons qui autorisent l'épissage du transcrit initié au promoteur I : en 5' un exon non codant « I » et en 3' le 1^{er} exon du gène constant. Les transcrits initiés aux



promoteurs I sont appelés « germinaux ou stériles », ces derniers ne codent aucune protéine ; il est admis que le rôle de la transcription germinale est de permettre l'accessibilité de régions cibles (régions S) aux protéines effectrices du mécanisme de CSR (Nambu et al., 2003).

L'importance des promoteurs germinaux et des exons I a été de nombreuses fois démontrée : la suppression des exons I α (autre que I μ) induit un blocage de la transcription germinale du gène constant correspondant, la recombinaison vers l'isotype est alors abolie (Jung et al., 1993; Zhang et al., 1993; Bottaro et al., 1994).

L'activation de cellules B isolées de rate de souris *in vitro* par un agent mitogène (stimulation de la voie TLR4 ou de la voie CD40) combiné à des cytokines est un moyen fréquemment utilisé pour étudier les mécanismes de CSR. L'activation B induite par le lipopolysaccharide (LPS) induit à elle seule la transcription germinale des promoteurs I μ , I γ 2b et I γ 3 et par conséquent la CSR vers les isotypes IgG2b et IgG3. L'ajout d'interleukine 4 (IL-4) au LPS inhibe la transcription germinale aux promoteurs I γ 2b et I γ 3 et active celle des promoteurs I γ 1, induisant la CSR vers IgG1 et IgE. L'ajout d'interféron- γ (IFN- γ) ou de Transforming Growth Factor β (TGF- β) entraîne respectivement la transcription germinale aux promoteurs I γ 2a ou I α et la CSR vers IgG2a ou IgA (Stavnezer, 2000).

Bien qu'elle soit indispensable au mécanisme de CSR, le rôle exact de la transcription germinale des régions S n'est pas clairement élucidé : elle pourrait entraîner la formation de structures particulières et créer des hybrides ARN-ADN, le brin non transcrit pourrait former des boucles dites « R-loop » ou « stem loop », ces structures constitueraient un meilleur substrat pour AID (Tian and Alt, 2000; Yu et al., 2003).

Au-delà de la transcription germinale « sens », Perlot et collaborateurs ont mis en évidence l'existence de transcrits « antisens ». Cette transcription est décelée au niveau de la région « donneuse » S μ ainsi que dans les régions « acceptrices » S γ 1 et S γ 2b. Le rôle de la transcription « antisens » lors de la CSR n'a pour le moment pas été démontré (Perlot et al., 2008).

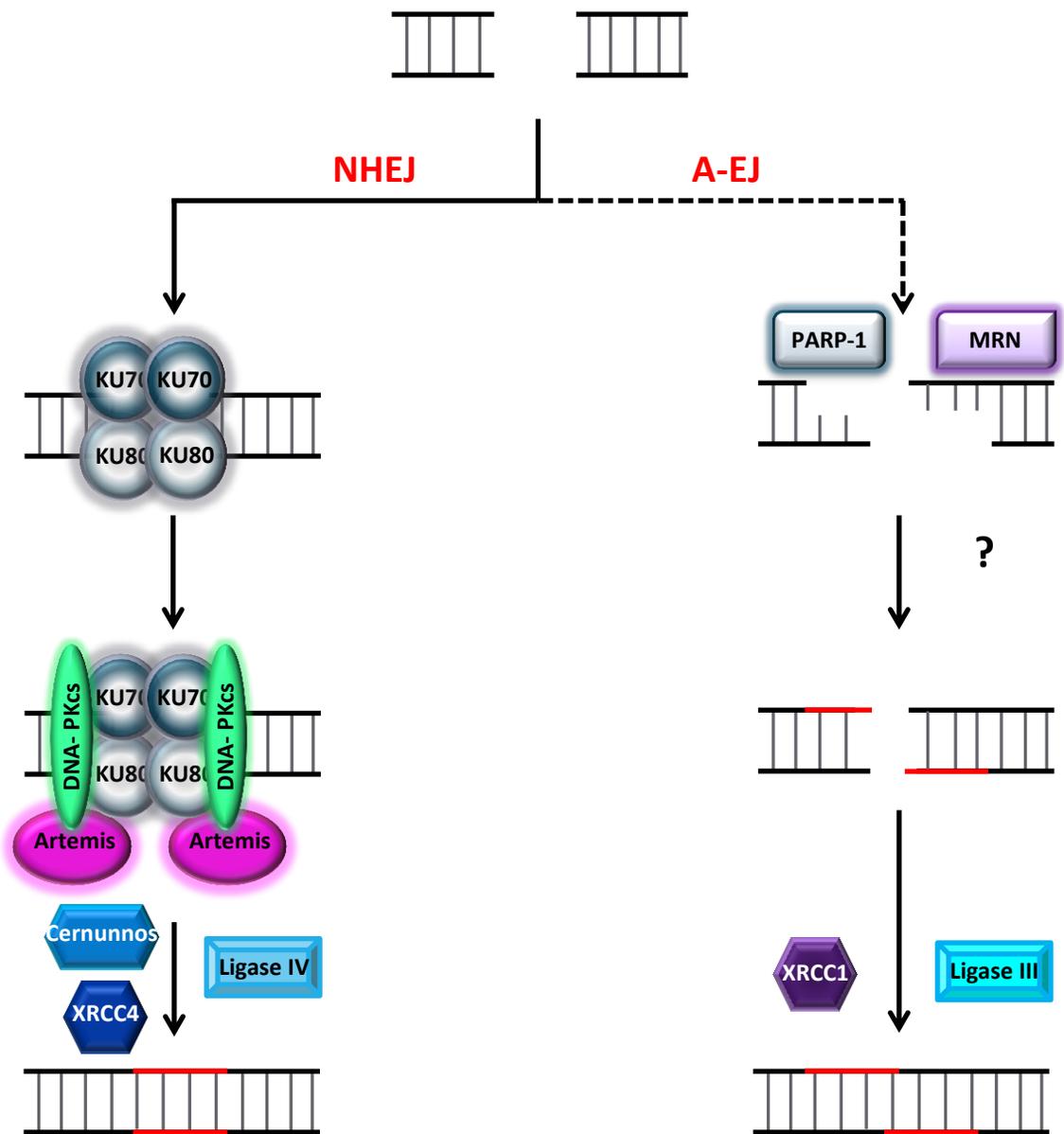


Fig 14 : Voies de réparation NHEJ (Non Homologous End Joining) et A-EJ (Alternative End Joining)

NHEJ : Après la formation de la cassure double de l'ADN, l'hétérodimère KU70/KU80 interagit avec les extrémités de l'ADN endommagé et favorise le recrutement de DNA/PKcs et d'Artemis qui par son activité 5'-3' exonucléasique rend l'ADN accessible au complexe de ligation. La ligation est réalisée par le complexe Cernunnos, ligase IV, XRCC4.

A-EJ : Au cours de cette voie de réparation, les extrémités d'ADN ne sont pas protégées par le complexe KU70/KU80. PARP-1 s'associe aux extrémités double brin de l'ADN. XRCC1 et la ligase III réalisent la jonction. Mre11 appartenant au complexe MRN semble favoriser la voie alternative.

(D'après Kotnis et al., 2009 ; Grabarz et al., 2012)

◆ Mécanismes moléculaires de la commutation de classe

Comme dans le cas de l'hypermutation somatique, la déamination des cytosines de l'ADN par AID est à l'origine du processus de CSR ; ces dernières sont converties en uracile ce qui entraîne un mésappariement. L'uracile est ensuite retiré principalement par la voie de réparation BER (Rada et al., 2004) qui génère une cassure simple brin. La voie MMR intervient lors de la CSR mais son rôle est minoritaire : on suppose que cette voie permet la création d'une cassure double brin lorsque les cassures simple brin sur les brins complémentaires d'ADN sont trop éloignées (Stavnezer and Schrader, 2006). Les régions S étant riches en paire G-C, la fréquence des lésions causées par AID dans ces régions conduit vraisemblablement à des cassures double brin dans la région S donneuse (en général S_{μ}) et la région acceptrice (par exemple $S_{\gamma 1}$). Les cassures double brin générées dans les régions S sont détectées par l'histone H2AX (Paull et al., 2000; Petersen et al., 2001) qui participe, par la formation de foyers de réparation, à la cohésion des régions d'ADN fracturé ainsi qu'à la formation d'une « synapse » entre les deux régions S. La jonction entre les deux régions S recombinantes est ensuite réalisée par la voie NHEJ (fig 14). Les facteurs Ku70 et 80 sont décrits comme étant indispensables à la CSR (Casellas et al., 1998; Manis, Gu, et al., 1998). DNA-PKcs semble non essentielle à la CSR, cependant son rôle reste controversé. Chez la souris, le KO de DNA-PKcs provoque un blocage complet du développement B mais l'ajout d'une immunoglobuline transgénique à ce modèle autorise l'étude de cellules B matures et révèle une diminution globale de la CSR (à l'exception de IgG1) (Manis et al., 2002; Rooney et al., 2005). Alors que des souris présentant un syndrome SCID (severe combined immunodeficiency) dû à une mutation de la partie C-terminale de DNA-PKcs ont une faible réduction de la CSR (Bosma et al., 2002; Cook et al., 2003). Cook et collaborateurs observent une diminution de 25 à 50% de la CSR vers tous les isotypes. Les différences obtenues entre les modèles (souris KO pour DNA-PKcs et mutations SCID) suggèrent que l'activité kinase de la DNA-PKcs peut être remplacée ; ATM (ataxia-telangiectasia mutated) pourrait remplir ce rôle lors de la CSR (Callén et al., 2009; Shrivastav et al., 2009). Une mutation Y288C de la protéine ligase IV entraîne un arrêt du développement B, la délétion aux stades B matures entraîne le blocage de la CSR (Nijnik et al., 2009). Cependant, une CSR normale observée chez les souris déficientes pour XRCC4 laisse penser qu'il existe une voie alternative (A-EJ) (fig 14), indépendante de XRCC4, des protéines KU et de la ligase IV. Cette voie, capable de suppléer la voie NHEJ classique, génère des jonctions des régions S qui incluent

systématiquement des microhomologies (Yan et al., 2007). Les facteurs susceptibles d'intervenir au cours de cette voie de réparation sont la Polymérase I poly ADP-ribose (PARP-1), XRCC1 ainsi que la ligase III (Kotnis et al., 2009; Grabarz et al., 2012).

C) La régulation de l'expression du locus IgH

Notre laboratoire a historiquement abordé l'étude de la régulation de l'expression de ce locus en identifiant et précisant la fonction des nombreux éléments *cis* régulateurs qui le jalonnent : promoteurs, activateurs transcriptionnels (enhancers) et isolateurs de la chromatine (insulators). Cette revue bibliographique décrit la fonction des divers éléments *cis*-régulateurs IgH au travers de nombreux modèles de souris KO et des facteurs *trans* connus pour les moduler. Des éléments activateurs et isolateurs sont présents dans les régions introniques entre les segments V_H - J_H , J_H - C_H ainsi que dans la région 3' du locus. Des promoteurs sont localisés en 5' des segments V_H , D_H et devant la majorité des gènes constants.

1) Les promoteurs

a) Les promoteurs des segments V_H

Chaque segment V_H possède son propre promoteur, ce dernier se situe dans une région d'environ 250 pb en amont du site d'initiation des transcrits germinaux qui sont transcrits avant les réarrangements V_H vers DJ_H . Ces promoteurs possèdent une boîte TATA située entre 25 et 30 pb en amont du site de transcription et un élément initiateur qui chevauche ce site (Johnston et al., 2006). Environ 70 pb en amont du site de transcription, les promoteurs pV_H possèdent une séquence octamérique ATGCAAAT fixant des facteurs de transcription de la famille POU tels que OCT-1 et OCT-2 (Buchanan et al., 1997), cette région est nécessaire mais non suffisante à la transcription des gènes V_H (Mason et al., 1985). A l'exception de ceux de la famille V_H10 , ces promoteurs possèdent également une séquence heptamérique (située environ 20 pb en amont de la séquence octamérique) ainsi qu'une région riche en pyrimidine, l'altération de ces régions entraîne une diminution de l'activité du promoteur pV_H (Eaton and Calame, 1987).

De plus, des sites de fixation de facteurs spécifiques du lignage B tels que PAX-5, PU.1 et Ikaros ont été identifiés pour les différentes familles de V (Johnston et al., 2006).

b) Le promoteur-activateur DQ52

DQ52 est le dernier des segments D_H (situé le plus proche des segments J_H). Avec DFL16.1, DQ52 est le segment le plus utilisé lors des réarrangements DJ (Tsukada et al., 1990). DQ52 inclut des séquences modulatrices ayant à la fois les caractéristiques d'un

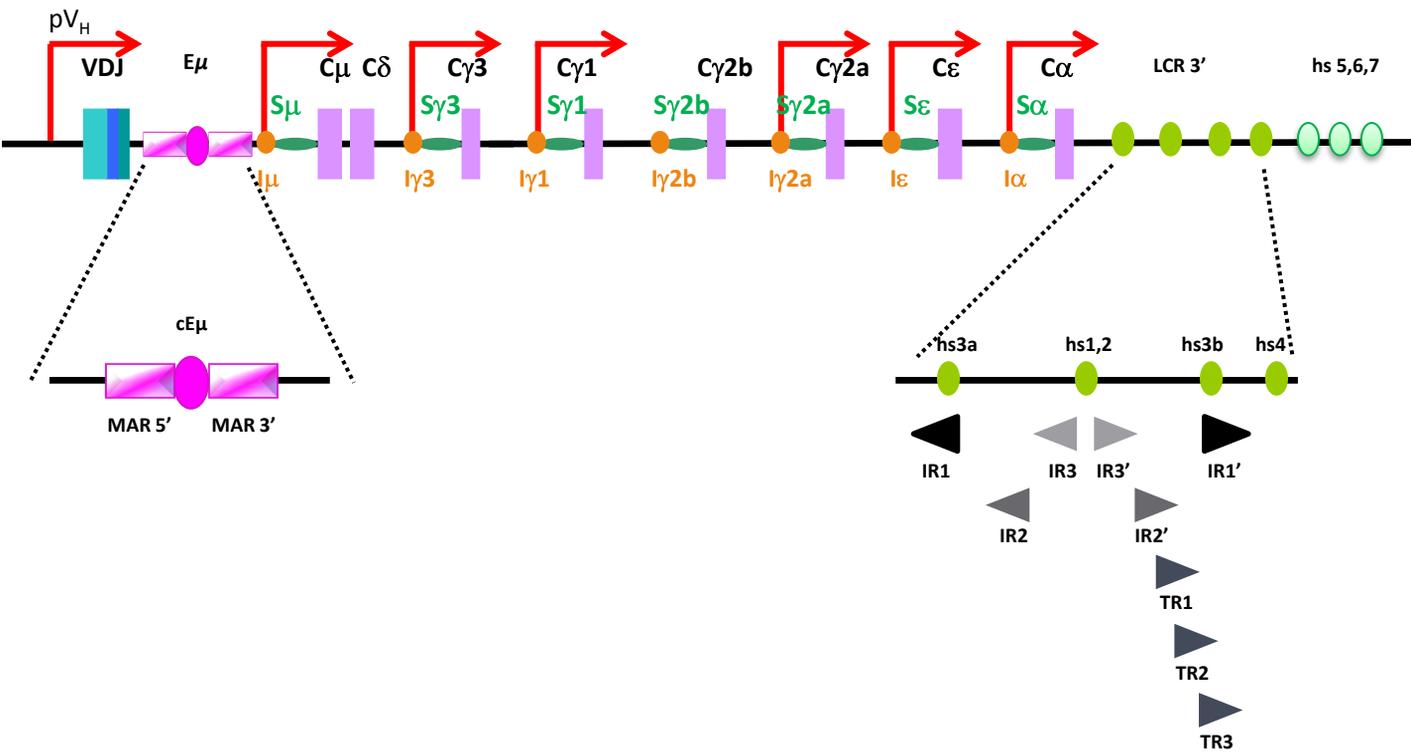


Fig 15: Structure du loci IgH murin

Les gènes variables sont représentés en bleu, l'activateur intronique $E\mu$ et ses MARs (régions d'attachement à la matrice) en rose, les gènes constants en violet avec les régions switch associées en vert-bleu et la région 3' régulatrice : LCR3' (Locus control region) et hs5,6,7 en vert.

TR : régions répétées en tandem, IR : régions répétées inversées.

promoteur et d'un activateur transcriptionnel (Kottmann et al., 1994; Perlot et al., 2008). Le promoteur devient actif avant même le réarrangement d'un segment D_H vers J_H et il est à l'origine du transcrit germinal « $\mu 0$ » (Alessandrini and Desiderio, 1991; Schlissel et al., 1991). La délétion chez l'animal de DQ52 seul n'inhibe pas la recombinaison DJ_H et ne bloque pas la transcription germinale $\mu 0$ (Afshar et al., 2006). Un autre modèle de délétion chez l'animal montre une diminution de l'utilisation des segments J_H3 et J_H4 lors de la recombinaison alors que l'utilisation de J_H1 et J_H2 n'est pas affectée (Nitschke et al., 2001).

c) Les promoteurs I (fig.15)

Ces promoteurs sont situés en amont de chaque gène constant, à l'exception de $C\delta$. Ces éléments initient la transcription germinale en amont de chaque exon I et région switch, qui précède la recombinaison de classe (Xu and Stavnezer, 1992). Bien qu'ils subissent un épissage entre l'exon I et le gène constant C, ces transcrits germinaux I-C ne codent aucune protéine ; ils sont considérés comme des transcrits régulateurs conférant une « accessibilité » accrue des régions switch pour la CSR. L'existence de transcrits antisens a également été mise en évidence au niveau de ces régions, leur initiation se fait de façon imprécise en amont du premier exon du gène constant concerné, aucun promoteur « antisens » n'ayant été décrit à ce jour (Perlot et al., 2008).

2) Les activateurs transcriptionnels ou enhancers

a) L'activateur intronique E_μ et les régions d'attachement à la matrice (MARs)

E_μ est le premier activateur intronique découvert au sein d'une cellule eukaryote (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983). L'élément E_μ est localisé au sein de l'intron entre le segment J_{H4} et le gène C_μ , sa localisation en amont de S_μ lui permet d'être préservé de tous les évènements de recombinaison se produisant au locus IgH (recombinaisons VDJ, CSR, LSR) (fig.15). Cette région activatrice est constituée d'un « core activateur » (cE_μ) de 220 pb, entouré de deux régions d'attachement à la matrice nucléaire (S/MARs, « Matrix Attachment Region »). E_μ possède une activité spécifique du lignage B ; il est supposé être actif tout au long du développement B, cependant son maximum d'activité est observé aux stades précoces du développement.

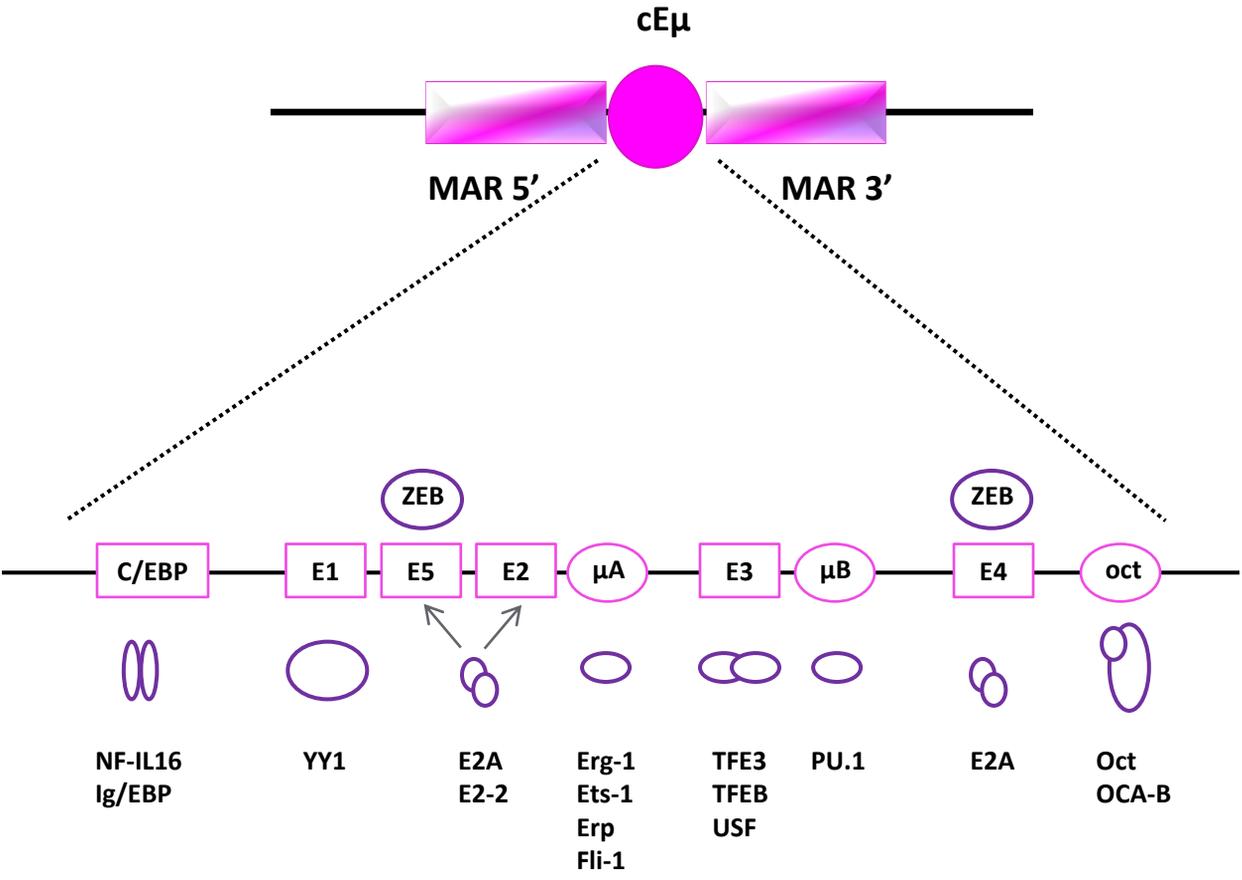


Fig 16 : Sites de fixation des facteurs trans-activateur de l'enhanceur intronique $E\mu$.
 (D'après Ernst and Smale, 1995)

◆ *Le cE μ* :

Le « core » de l'activateur E μ comporte de nombreux sites de fixation pour des protéines activatrices ou inhibitrices de transcription. De 5' en 3' se situe un site C/EBP (Ccaat-enhancer-binding proteins), μ E1, μ E5, μ E2, μ A, μ E3, μ E4 et une séquence octamérique. Cette séquence permet la fixation de facteurs de transcription B spécifiques, OCT-1 et OCT-2. La mutation de cette séquence au sein d'une construction transgénique entraîne une diminution de l'activité de E μ au niveau des organes lymphoïdes mais ne l'abolit pas (Annweiler et al., 1992). L'activité spécifique de E μ au lignage B est liée aux éléments μ E4 et μ E5 : au sein des lignées non lymphoïdes, la protéine ZEB (Zinc finger protein) se fixe à ces deux motifs et entraîne la répression de l'activateur. A l'opposé au sein des lignées lymphoïdes, des protéines de la famille E2A se fixent sur ces éléments et stimulent l'activité de E μ (Ruezinsky et al., 1991; Genetta et al., 1994) (fig 16).

L'étude du rôle de E μ ainsi que des MARs a été menée grâce à de nombreux modèles de souris Knock-out (KO). La présence de E μ au sein d'un transgène est nécessaire et suffisante pour induire le mécanisme de recombinaison D vers J au sein des cellules lymphoïdes (Ferrier et al., 1990). La délétion ou le remplacement du core E μ par un oligonucléotide dans des modèles de souris chimériques entraîne une diminution mais pas le blocage des réarrangements VDJ : les réarrangements D-J sont faiblement diminués alors que les réarrangements V-DJ sont fortement affectés (Chen et al., 1993; Serwe and Sablitzky, 1993; Sakai et al., 1999). Les réarrangements VDJ sont complètement bloqués par le remplacement de E μ par une cassette *pGK-Neor*' (Chen et al., 1993; Sakai et al., 1999; Perlot et al., 2005) ou par son introduction en 5' de l'activateur E μ (Chen et al., 1993; Delpy et al., 2002). L'établissement de lignées de souris KO a précisé le rôle du cE μ lors des premières étapes des réarrangements, c'est-à-dire la recombinaison de D_H vers J_H, induisant chez les animaux KO un blocage (toutefois incomplet) du développement précoce au stade pro-B (Perlot et al., 2005; Afshar et al., 2006). L'activité résiduelle des événements de recombinaison dans ces modèles KO indique cependant l'existence, à ce stade, d'un ou de plusieurs autre(s) élément(s) redondants ou complémentaires à cE μ . Parmi les candidats, le promoteur DQ52 est exclu car un modèle présentant la suppression conjointe de E μ et DQ52 sur le même allèle n'aggrave pas le défaut provoqué par la délétion simple de E μ (Afshar et al., 2006).

Les recombinaisons VDJ sont modulées par l'accessibilité progressive aux endonucléases RAG1&2 des segments D_H et J_H , puis V_H ; cette accessibilité des régions ciblées par la recombinaison est corrélée à des marques de chromatine active (méthylation de l'ADN, modifications d'histones et à l'apparition de plusieurs transcrits germinaux complexes.

Des études de marques chromatiniennes menées dans des précurseurs B (non réarrangés) dépourvus du $cE\mu$ montrent que les réarrangements de D_H vers J_H s'effectuent en deux phases. Au cours de la première phase, indépendante de $cE\mu$, apparaissent des méthylations activatrices de l'histone H3 (H3K4me2) dans les régions DQ52 et DFL16.1 ; il s'en suit une seconde phase au cours de laquelle $cE\mu$ contribue efficacement à l'apparition de marques de chromatine active (H3K9ac et H3K4me3) suivies de la transcription germinale (Chakraborty et al., 2009).

Les premiers réarrangements de D vers J au locus IgH sont précédés par l'apparition de transcrits germinaux $\mu 0$ (initiés au promoteur DQ52) et $I\mu$ (initiés en aval du $cE\mu$) (Alessandrini and Desiderio, 1991) ; simultanément l'apparition de transcrits « antisens » initiés en amont du $cE\mu$ est observée dans les régions J_H et D_H (Bolland et al., 2007). Dans les précurseurs B, la délétion du $cE\mu$ entraîne une diminution de 10 à 20 fois des transcrits $\mu 0$ et $I\mu$ (Perlot et al., 2005). De même, les transcrits antisens de la région D_H ne sont plus détectés en l'absence de $E\mu$ (Afshar et al., 2006; Bolland et al., 2007). La diminution de ces nombreux transcrits régulateurs en l'absence de $cE\mu$ coïncide avec une réduction de la densité de l'ARN polymérase II dans les régions concernées (Chakraborty et al., 2009). A l'inverse, les transcrits germinaux sens et antisens observés dans les régions V_H ne sont pas affectés par les diverses délétions de $E\mu$ (Perlot et al., 2005; Afshar et al., 2006).

Il a également été proposé que l'élément $E\mu$ contrôle le phénomène d'exclusion allélique au locus IgH. Ces résultats ont été obtenus dans un modèle animal présentant un allèle IgH préalablement réarrangé (V_H B1-8). Lorsqu'il est dépourvu de la région $E\mu$, cet allèle préétabli ne réprime plus les réarrangements ainsi que l'expression du second allèle aux stades pré-B et B immature, ce qui a pour conséquence l'apparition de cellules B exprimant deux chaînes lourdes différentes (Li and Eckhardt, 2009).

Le blocage partiel du développement B (au stade pro-B) chez les animaux KO pour $cE\mu$, induit une diminution d'environ 50% de la production de cellules B matures dans les organes périphériques comme la rate (Perlot et al., 2005). Cependant, une fois l'étape médullaire effectuée, $E\mu$ semble jouer un rôle moins important aux stades ultérieurs dépendant des antigènes. Des hybridomes réalisés à partir de cellules B mutantes pour la région $E\mu$ à l'état hétérozygote ont suggéré un rôle non négligeable mais dispensable de l'activateur $E\mu$ pour la commutation de classe (Bottaro et al., 1998; Sakai et al., 1999). Par la suite, les modèles de délétion dans la lignée germinale n'ont pas révélé de défaut important de commutation de classe au regard de la quantité d'immunoglobulines totales produites dans le sérum et de la capacité à effectuer la CSR après stimulation *in vitro*, confirmant ici le rôle secondaire de l'activateur $E\mu$ dans ce mécanisme (Perlot et al., 2005; Li et al., 2010).

Les rôles respectifs de la région $E\mu$ ($cE\mu$ et ses MARs) sur le mécanisme d'hypermutation somatique sont, aujourd'hui encore, sujets à controverse. Une fois encore, une étude de l'hypermutation somatique menée sur des hybridomes a révélé un effet différent des délétions du $cE\mu$, des MARs ou bien de la délétion combinée : en effet, la délétion de la région complète ne semble pas affecter l'hypermutation somatique alors que la délétion du $cE\mu$ seul ou des MARs seules entraîne une diminution très significative de la SHM (Ronai et al., 2005). A l'inverse, les cellules B des centres germinatifs issus d'animaux porteurs de la délétion du $cE\mu$ dans la lignée germinale ne présentent aucune altération évidente du mécanisme de SHM : bien que le nombre des séquences non mutées soit en proportion plus importante, la fréquence des mutations sur les allèles ciblés par le mécanisme de SHM est comparable à celle observée chez les individus contrôles (Perlot et al., 2005). D'autre part, le modèle associant la délétion de la large région $E\mu$ ($cE\mu$ et ses MARs) à un gène V_H déjà réarrangé ne modifie pas significativement la fréquence de mutation dans les cellules B du GC (Li et al., 2010). Dans ce modèle, l'absence de $E\mu$ ne semble affecter significativement que les mutations somatiques d'un allèle ayant subi la CSR, à l'issue d'une réponse immune secondaire (Li et al., 2010). Suite à ces différentes études, le rôle exact joué par l'activateur intronique $E\mu$ reste difficile à déterminer. Néanmoins, ces études se rejoignent sur un point, la délétion n'affecte pas le profil des mutations (transitions vs tranversions).

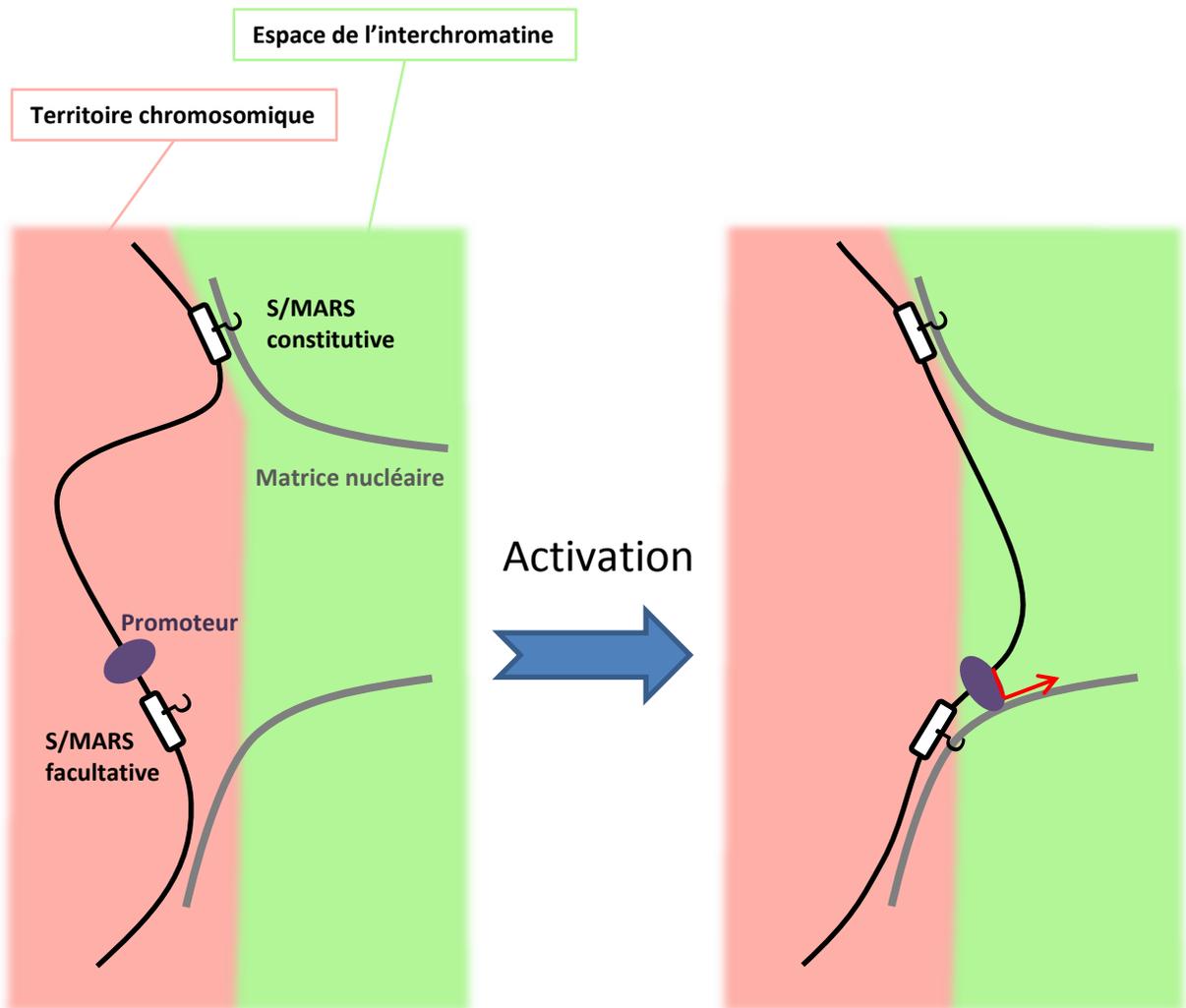


Fig 17 : Régions d'Attachement à la Matrice (MARs) dans le contexte du modèle CT/ICD (Chromosome Territory/Interchromatin Domain Compartment): MARs facultatives et constitutives.
 (d'après Gluch et al., 2008)

Le rôle de l'élément c μ a donc clairement été mis en évidence lors des phases précoces du développement B. Bien que supposé mineur, son implication au cours du développement tardif reste à préciser, il en va de même pour celle des deux régions d'attachement à la matrice qui l'entourent.

◆ Les Régions d'Attachement à la Matrice (MARs) :

Ces régions ont été observées pour la première fois en 1974 par Berezney et Coffey (Berezney and Coffey, 1974). Ce sont des séquences d'ADN qui se lient préférentiellement à la matrice nucléaire. Elles sont constituées de 200 pb à 1000 pb de long et sont caractérisées par des motifs riches en A-T qui peuvent être des sites de liaison pour la topoisomérase II (Razin et al., 1991; Wang et al., 2010). Les MARs sont en général situées à proximité de régions transcrites, dans des introns, des télomères, à proximité d'activateurs transcriptionnels (Gluch et al., 2008). Il existe deux types de MARs : constitutives et facultatives (fig 17). Les MARs constitutives sont en permanence attachées à la matrice nucléaire et caractérisées par une hypersensibilité à la DNase I dans tous les tissus. Les MARs facultatives quant à elles, sont associées de façon réversible avec la matrice nucléaire et possèdent une hypersensibilité à la DNase I corrélée au statut transcriptionnel de la région adjacente. Les MARs entourant le c μ sont des MARs facultatives (Gluch et al., 2008).

Les MARs sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que l'augmentation de la transcription d'un gène (Gluch et al., 2008), elles peuvent jouer le rôle d'isolateurs de la chromatine (Goetze et al., 2005). Les MARs sont également des régions où l'intégration de génomes rétroviraux est fréquemment observée (Cockerill, 1990; Mielke et al., 1996).

Jusqu'à présent, le mécanisme de régulation de la transcription par les MARs reste inconnu. De nombreuses protéines sont connues pour interagir avec les MARs. Les MAR-BPs (MARs Binding Proteins) pourraient être impliquées dans la régulation de la transcription des gènes.

Dans le cas des MARs associées à c μ , quatre MAR-BPs ont été identifiées : Cux/CDP, SATB1, SATB2 et BRIGHT. CUX/CDP (x/CCAAT-displacement protein) initialement nommée NF- μ NR (Wang et al., 1999) est présente au sein des cellules non-B, dans les pré-B mais est absente des cellules B matures et des plasmocytes. CUX/CDP possède 4 sites de fixation au

niveau des MARs entourant $E\mu$. La délétion de CUX/CDP entraîne l'expression d'une construction contenant $E\mu$ dans des cellules non B (Scheuermann and Chen, 1989). L'effet répresseur de NF- μ NR est dû à l'inhibition de l'attachement des MARs $E\mu$ à la matrice nucléaire (Zong and Scheuermann, 1995).

SATB1 fut la première MAR-BPs spécifique d'une lignée cellulaire identifiée, cette protéine s'exprimant de façon prédominante au niveau des thymocytes (Dickinson et al., 1992). Elle a un domaine de liaison aux motifs « BUR » (Base Unpaired Region), caractéristiques des MARs. SATB1 possède trois sites de liaisons dans la MAR $E\mu$ située en 3' de c $E\mu$ et un site dans la MAR $E\mu$ située en 5' (Dickinson et al., 1992). Les souris déficientes pour cette protéine présentent un défaut de développement des cellules T alors que le développement B est normal (Alvarez et al., 2000). Dans ce modèle, plus de 10% des gènes exprimés au sein des cellules T se retrouvent dérégulés, principalement réprimés (Alvarez et al., 2000; Pavan Kumar et al., 2006).

SATB2 présente 67% d'homologie avec SATB1, c'est une protéine abondamment exprimée dans les cellules pré-B mais aussi dans le rein et le cerveau. Sa surexpression dans une lignée plasmocytaire augmente par cinq la transcription d'un transgène codant la chaîne lourde μ ; cet effet activateur n'est plus observé lorsque le transgène est dépourvu des MARs $E\mu$, suggérant que SATB2 s'associerait avec les MARs $E\mu$. Dans cette étude, il n'a été constaté aucun effet activateur dans des cellules T, démontrant ici une activation spécifique à la lignée lymphocytaire B. La capacité de cette protéine à se lier aux MARs $E\mu$ a été par la suite démontrée comme étant régulée dynamiquement par sumoylation de STAB2 (Dobrev, 2003).

BRIGHT (B cell Regulator of IgH Transcription) appelée également ARID 3-A, est une protéine dont l'expression est restreinte à la lignée lymphocytaire B. Elle est exprimée dans les cellules pré-B et les cellules B matures (Webb et al., 1998). BRIGHT possède 4 sites de liaison dans les MARs $E\mu$ sur lesquels il se fixe sous forme tétramérique (Herrscher et al., 1995; Kaplan, 2001). BRIGHT a tout d'abord été identifié comme un facteur de transcription permettant l'augmentation de transcription de la chaîne lourde d'immunoglobuline à la suite d'une stimulation à l'IL5 associée à un Ag (Webb et al., 1991). L'établissement d'une lignée murine KO pour BRIGHT a démontré qu'il jouait un rôle dans la différenciation des

cellules souches hématopoïétiques : sa délétion entraîne un défaut du développement érythrocytaire et aboutit à une létalité embryonnaire, moins de 1% des embryons survivent (An et al., 2010). Les souris homozygotes survivantes présentent un blocage au stade pré-B ainsi qu'une réduction du nombre de cellules B transitionnelles, de la zone marginale et de la sous population B-1 de la cavité péritonéale. Les cellules B matures de ces animaux présentent un déficit de commutation vers IgG1 (Webb et al., 2011).

Le rôle des $MAR_{E\mu}$ reste encore à définir. Initialement, elles ont été décrites comme étant des répresseurs du locus IgH dans les cellules non-B (Kadesch et al., 1986; Wasylyk and Wasylyk, 1986; Imler et al., 1987; Scheuermann and Chen, 1989; Cockerill, 1990). A l'inverse, la délétion des $MAR_{E\mu}$ induit une diminution de 5 à 10 fois de la transcription d'un transgène dans des cellules pré-B (Jenuwein et al., 1997). L'hypothèse de la fonction activatrice des $MAR_{E\mu}$ (la plus récemment avancée) pourrait s'expliquer par une augmentation de l'accessibilité des régions environnantes grâce aux $MAR_{E\mu}$ (Jenuwein et al., 1997) et ce *via* la fixation du facteur de transcription BRIGHT (Lin et al., 2007).

b) La région régulatrice 3'IgH

◆ *Découverte de la région régulatrice 3'IgH*

L'activateur $E\mu$, le premier découvert sur le locus IgH, a longtemps été considéré comme l'élément régulateur majeur du locus. Cependant, il avait été observé, chez l'homme comme chez la souris, des translocations chromosomique du proto-oncogène *c-myc* au locus IgH qui n'intégraient pas l'élément $E\mu$ mais qui cependant entraînaient une forte expression de l'oncogène (Neuberger and Calabi, 1983). Ces observations laissaient soupçonner l'existence d'autres éléments régulateurs pouvant induire la surexpression de l'oncogène. De plus, l'analyse d'un myélome de souris présentant une délétion d'environ 4Kb en aval de $C\alpha$ entraînait une diminution de la transcription du locus IgH, ceci suggérait l'existence d'une région en 3' du locus IgH pouvant contenir des éléments cis-régulateurs (Gregor and Morrison, 1986).

Un second activateur transcriptionnel spécifique des cellules lymphocytaires B et localisé en 3' du locus IgH a été identifié en 1990 chez le rat, il est situé 25 kb en aval du gène $C\alpha$ (Pettersson et al., 1990). Un élément équivalent nommé 3' αE a été identifié en 1991 chez la souris, il est corrélé à la présence de deux sites d'hypersensibilité à la DNase I

(hs) : hs1 et hs2, 12.5 kb en aval du gène $C\alpha$ (Dariavach et al., 1991; Lieberon et al., 1991; Giannini et al., 1993; Saleque et al., 1997).

2 kb en aval de $C\alpha$ se situe un second activateur nommé $C\alpha 3'$, il est correspond au site d'hypersensibilité à la DNase I « hs3a » (Matthias and Baltimore, 1993; Saleque et al., 1997).

Deux nouveaux sites d'hypersensibilité à la DNase corrélés à des activateurs transcriptionnels ont été identifiés par la suite : il s'agit de l'élément hs3b situé à 29 Kb en aval de $C\alpha$ (homologue de hs3a à 97%) et de l'élément hs4 (également nommé $3'\alpha$ -hs4) se situant 4 Kb plus en aval (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995; Saleque et al., 1997).

◆ Structure de la région régulatrice 3'RR

La région s'étend sur plus de 30 kb, sa limite en 3' est constituée par une zone de 3 kb possédant une origine de réplication, 20 kb en aval du gène *Crip2* (cysteine-rich protein2) (Zhou et al, 2002). La région régulatrice 3' du locus possède une structure dite « quasi-palindromique » unique dont le centre est constitué par hs1,2 (Chauveau et Cogné, 1996). De part et d'autre de l'activateur hs1,2 se situent des séquences inversées répétées (IR1 à IR3) et des régions répétées en tandem (TR). Le quasi-palindrome s'étend sur environ 20kb, ses limites sont définies par les éléments hs3a et hs3b (Chauveau and Cogné, 1996; Saleque et al., 1997) (fig 15). En aval (et donc en dehors) de cette structure se situe hs4, le dernier élément activateur transcriptionnel de la région 3'IgH.

◆ La région régulatrice 3'RR : une LCR (Locus Control Region) ?

On définit une région de contrôle du locus (LCR) comme une région d'ADN ayant la capacité d'activer la transcription d'un transgène au sein d'un tissu donné (spécifique), de façon proportionnelle au nombre de copies, et ceci indépendamment du site d'intégration (Dean, 2006).

Les cellules du lymphome de Burkitt chez l'homme ou les plasmocytomes de souris présentent une translocation de l'oncogène *c-myc* au locus IgH entraînant la dérégulation de cet oncogène à l'origine de la lymphoprolifération. En 1994, dans un modèle de lignée cellulaire, Madisen et Groudine démontrent qu'un transgène contenant la région 3'RR

(dépourvue de hs3a) possède une action activatrice sur le proto-oncogène *c-myc*, indépendamment du site d'intégration mais proportionnellement au nombre de copies intégrées (Madisen et Groudine, 1994). Ils définissent dès lors la région 3'RR comme une LCR.

Par la suite, plusieurs modèles de souris transgéniques confirment que l'expression d'un transgène placé sous l'influence des quatre activateurs de la 3'RR (sous la forme « minilocus ») est bien restreinte à la lignée lymphocytaire B et s'opère indépendamment du site d'intégration mais indique que le niveau d'expression du transgène ne dépend pas strictement du nombre de copies intégrées (Chauveau et al., 1999; Guglielmi et al., 2003). Pour les auteurs, il est possible que la combinaison minimale d'activateurs utilisée (« mini 3'RR ») soit insuffisante pour conférer la fonction de LCR complète (*i.e.* dépendance du nombre de copies).

◆ Activité de la 3'RR et conformation de la chromatine au cours du développement B

L'activité globale de la région 3'RR ainsi que l'activité individuelle des différents éléments qui la composent ont été initialement appréciées à l'aide de gènes rapporteurs dans des modèles de lignées cellulaires représentatives des différents stades du développement B. Plus récemment, différents modèles transgéniques et KO ont permis de réévaluer ces données dans un contexte plus physiologique.

Pris individuellement, les différents éléments constituant la région 3'RR possèdent une activité plus faible que l'activateur intronique $E\mu$. De plus, leur activité est majoritairement présente aux stades B tardifs (post-médullaires).

En comparaison à $E\mu$, l'activité de l'élément hs1,2 est relativement faible (environ 25%), elle est restreinte aux stades B tardifs et atteint son maximum au stade plasmocyte (Pettersson et al., 1990; Lieberson et al., 1991; Chauveau et al., 1998). hs3a et hs3b possèdent également une activité plus faible que celle de $E\mu$ (5 à 15%), également restreinte aux stades B mature et plasmocyte (Matthias and Baltimore, 1993; Madisen and Groudine, 1994). Contrairement aux trois éléments précédents, hs4 est actif dès le stade pro-B et ce jusqu'au stade plasmocyte (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995). L'étude du profil de méthylation confirme que la région englobant l'élément hs4 est déméthylée dès

le stade pro-B. Les régions incluant les éléments hs1,2, hs3a et hs3b sont déméthylées dès l'activation des cellules B, ce profil est maintenu au stade plasmocyte (Giambra et al., 2008). L'étude de l'acétylation des histones H3 et H4 ainsi que la déméthylation des histones H3 (H3K4) mesurée par ChIP (Chromatine immunoprecipitation) révèle également l'activation progressive de la région 3'RR au cours du développement B (Garrett et al., 2005). La fenêtre d'activité de la 3'RR étudiée dans plusieurs modèles de souris transgéniques corrèle à celle décrite dans les lignées cellulaires : son activité, restreinte à la lignée lymphocytaire B, débute dès le stade pro-B et atteint son maximum au stade B mature (Chauveau et al., 1999; Guglielmi et al., 2003; Yan et al., 2007).

Séparément, les activateurs transcriptionnels de la région 3' possèdent une activité relativement faible cependant, les premières études de combinaisons d'activateurs vont rapidement révéler des effets synergiques. Madisen et Groudine étudient l'effet de l'association des quatre activateurs sur la transcription d'un gène rapporteur et constatent que ces combinaisons sont particulièrement efficaces : l'activation maximale de la transcription étant induite par l'association des quatre activateurs (Madisen and Groudine, 1994). Dans cette configuration, les activateurs possèdent une activité supérieure à celle de $E\mu$ (Ong et al., 1998; Stevens et al., 2000) ; lorsque l'association des activateurs mime la structure quasi-palindromique de la région 3', l'activité est d'autant plus augmentée (Chauveau et al., 1998). De plus, une fois combinés, ils constituent d'excellents co-activateurs de $E\mu$ (Chauveau et al., 1998). La synergie de ces éléments avec $E\mu$ est observée dès le stade pré-B, elle s'accroît et se prolonge jusqu'au stade plasmocyte (Chauveau et al., 1998).

◆ Rôle de la 3'RR dans le développement B

Les recombinaisons VDJ

La région régulatrice 3' étant active dès le stade pro B (en particulier hs4), il était plausible qu'elle puisse moduler le processus des recombinaisons VDJ. L'analyse des modèles de souris KO incluant la délétion de hs4 (Morvan et al., 2003; Vincent-Fabert et al., 2009) n'ont pas révélé d'effet significatif sur ces événements. Une analyse récente, menée sur le modèle de la délétion complète de la 3'RR, montre que cette région régulatrice n'intervient pas au cours des recombinaisons V(D)J (Rouaud et al., 2012).

L'expression de la chaîne lourde au stade B mature

Les modèles d'animaux KO incluant une délétion de l'élément hs4 (le premier actif au cours du développement B) présentent une diminution de l'expression de la chaîne lourde exprimée à la surface des cellules B matures au repos (et par conséquent du BCR) dans les organes lymphoïdes périphériques (Pinaud et al., 2001; Vincent-Fabert et al., 2009). Il semble toutefois que cet effet soit spécifique du statut « quiescent » des cellules B au repos : en effet, une fois activées, les cellules B déficientes pour hs4 retrouvent une expression normale de la chaîne lourde.

Les recombinaisons secondaires : recombinaison de classe et hypermutations somatiques

La région 3'RR atteint son maximum d'activité aux stades tardifs du développement (B matures et plasmocytes) de ce fait, il était donc probable que cette région joue un rôle important lors des événements secondaires du développement lymphocytaire B. De nombreux modèles de KO chez la souris ont permis de préciser son rôle sur la CSR, l'hypermutation somatique et la transcription accrue dans les plasmocytes.

Le remplacement de l'élément hs1,2 par le gène de résistance à la néomycine (*neo^r*) sous contrôle du promoteur pgk (*pgk- neo^r*) n'affecte pas les recombinaisons V(D)J mais altère la commutation isotypique sur tous les isotypes sauf IgG1 (Cogné et al., 1994; Manis, van der Stoep, et al., 1998). Cette baisse de la CSR est corrélée à la diminution de la transcription germinale des gènes constants concernés. *In vivo*, La synthèse d'IgG3 ainsi que IgG2b est diminuée alors que les isotypes IgM et IgG1 ne sont pas affectés. Le remplacement d'hs3a par la cassette *pGK- neo^r* induit un phénotype similaire (Manis, van der Stoep, et al., 1998). Cependant, la suppression « propre » de chacun de ces éléments (avec élimination de la cassette *pGK- neo^r* via la recombinaison CRE) abolit tout effet sur la CSR (Manis, van der Stoep, et al., 1998). Il est alors apparu que l'insertion du gène *neo^r* au sein de 3'RR était seule responsable du phénotype observé. L'implication de ces éléments au cours de l'hypermutation somatique n'a pas été étudiée chez ces modèles de souris KO. Un modèle animal porteur d'un transgène composé d'un segment VDJ réarrangé associé aux activateurs $\epsilon\mu$ et 3' hs1,2 suggère que ces éléments ne sont pas suffisants pour induire l'hypermutation somatique (Tumas-Brundage et al., 1997).

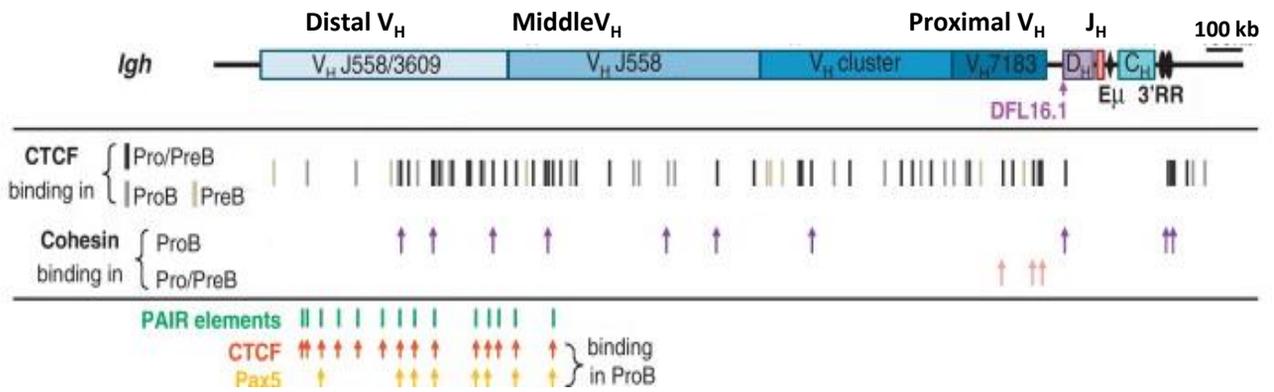


Fig 18 : Représentation schématique des sites de liaison pour CTCF, Pax5, cohésine et localisation des éléments PAIRs au locus *IgH* de souris
 (d'après Chaumeil and Skok, 2012)

Un modèle de souris KO présentant une délétion conjointe des deux activateurs distaux hs3b et hs4 perturbe quant à elle sévèrement la commutation de classe, et ce même après la suppression du gène *neo^r*. La suppression de ces deux activateurs entraîne une diminution de la transcription germinale des régions constantes ainsi que la commutation de classe vers tous les isotypes à l'exception d'IgG1 (Pinaud et al., 2001). Les recombinaisons V(D)J et l'hypermutation somatique ne sont pas affectées par la délétion de ces éléments (Morvan et al., 2003). La redondance de fonction des activateurs de la 3'RR est une nouvelle fois démontrée par les modèles de délétion isolée des éléments hs4 ou hs3b qui ne provoquent aucun effet sur la CSR (Vincent-Fabert et al., 2009; Bebin et al., 2010) la perte de la fonction CSR est aggravée avec la délétion complète de la 3'RR, dans ce cas précis le phénotype est particulièrement sévère car la CSR vers tous les isotypes (IgG1 inclus) se trouve quasiment abolie (Vincent-Fabert et al., 2010).

3) Les isolateurs de la chromatine

Les isolateurs (ou insulateurs) sont des séquences d'ADN impliquées dans le contrôle de l'expression génique. Ils créent des frontières au niveau de la chromatine, délimitant des régions entre lesquelles d'autres éléments régulateurs (comme les activateurs transcriptionnels) exercent leurs effets. Il existe deux types d'isolateurs : le premier établit des domaines qui séparent les activateurs transcriptionnels et les promoteurs, les empêchant ainsi d'interagir. Le second type d'isolateurs crée une « barrière » empêchant la propagation de l'hétérochromatine (Gaszner and Felsenfeld, 2006).

Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser au premier type d'isolateurs. Chez les vertébrés, l'isolateur le plus étudié comporte un motif CCCTC, communément appelé « site CTCF » (liant la protéine CTCF pour CCCTC-binding factor). De nombreux « site CTCF » sont présents sur le locus IgH. Il existe plus de 50 sites au niveau des segments V_H, 2 sites à proximité de DFL16.1 et enfin au niveau des sites hs 5,6 et 7 situés en aval de la région 3'RR (Garrett et al., 2005; Degner et al., 2009, 2011; Chaumeil and Skok, 2012) (fig 18).

Au niveau des segments V_H distaux, 14 éléments intergéniques présentant une structure répétée de 470 pb ont été identifiés. Ces éléments sont appelés « PAX-5-activated intergenic repeated elements » (PAIR elements). 11 d'entre-eux 14 sont situés immédiatement en aval de V_H3609 (IGHV8). Ils n'ont pas été identifiés ailleurs dans le

génomique de la souris. Ces éléments contiennent des sites de liaison fonctionnels pour CTCF, E2A et PAX-5 et seraient des éléments régulateurs du locus. CTCF s'associe aux éléments PAIR au stade pro-B mais cette interaction est réduite voire absente chez les cellules B matures et les lymphocytes T. CTCF pourrait être impliqué dans le processus de contraction du locus IgH au stade précoce du développement B. La présence de PAX-5 au niveau de ces éléments apparaît quant à elle essentielle à l'activation de la chromatine et à l'induction de la transcription antisens de la région V_H (Ebert et al., 2011).

Les 2 sites CTCF présents à proximité du segment DLF16.1 identifiés par Degner et collaborateurs sont placés de façon stratégique pour contrôler les recombinaisons somatiques ainsi que l'exclusion allélique (Degner et al., 2009). Ces éléments régulateurs participeraient à la régulation ordonnée des réarrangements en évitant l'activation de la région V_H avant que la recombinaison DJ_H n'ait eu lieu. Leur présence marque une frontière nette qui arrête la transcription antisens de la région intergénique V_H-D_H , à une distance d'environ 40 Kb avant les gènes V_H (Featherstone et al., 2010). Le « Knock-down » de la protéine CTCF à ce stade induit une augmentation de la transcription antisens au niveau de la région D_H et V_H mais ne provoque pas une extension de la transcription vers les segments V_H proximaux. (Degner et al., 2011). La délétion des 108 kb de la région intergénique V_H-D_H contenant les sites de fixation pour le facteur CTCF résulte également en l'augmentation de la transcription D_H à la fois dans les cellules lymphocytaires B et T (Giallourakis et al., 2010). Degner et collaborateurs proposent que la diminution du « looping » entre les sites CTCF permette à l'activateur E_{μ} d'augmenter la transcription antisens D_H (Degner et al., 2011). La délétion de ces sites CTCF ainsi que des potentiels éléments *cis* adjacents, nommé IGCR1 (Intergenic control region 1), entraîne une modification de l'usage des segments V_H , IGCR1 favoriserait ainsi l'utilisation des segments V_H distaux (Guo, Yoon, et al., 2011).

Des analyses de ChIP (Chromatine immunoprecipitation) et d'hypersensibilité à la DNaseI menées au cours du développement et de l'activation des cellules B ont permis de mettre en évidence des sites *hs* localisés en 3' (*hs5*, *hs6* et *hs7*) du dernier activateur transcriptionnel *hs4*. Ces éléments ne sont pas des *cis*-activateurs transcriptionnels mais contiennent des sites de fixation pour le facteur CTCF (Garrett et al., 2005). Le KO de ces éléments isolateurs 3' induit une diminution de la contraction du locus ainsi qu'une augmentation de l'utilisation des segments V_H proximaux (V_H7183 ou IGHV5). Suite à une

stimulation, les cellules B issues de ces animaux présentent une augmentation de la transcription des gènes situés en aval suggérant un rôle isolateur en 3' du locus.

D) Accessibilité du locus IgH

1) Contrôle de l'accessibilité lors des recombinaisons VDJ

L'hypothèse de « l'accessibilité » des régions sujettes à recombinaison a été proposée par Alt afin d'expliquer la régulation ordonnée des réarrangements des gènes des récepteurs aux Ag (Ig et TCR) (Yancopoulos and Alt, 1985). La découverte de transcrits germinaux dans les régions contenant les segments V_H fût à l'origine de cette hypothèse : ces transcrits sont présents transitoirement au stade pro-B et ne le sont plus lors des stades ultérieurs, conférant une « fenêtre d'accessibilité » de certaines régions du locus (Yancopoulos and Alt, 1985). L'hypothèse de Alt corrobore de nombreuses données récentes sur la régulation épigénétique du locus IgH : chromatine, transcription, positionnement nucléaire des loci.

a) Organisation nucléaire et modification de la chromatine

Dans le noyau des cellules eucaryotes, on distingue plusieurs niveaux d'enroulement de la molécule d'ADN autour des histones qui définissent des niveaux de compaction de la fibre chromatinienne. Le premier niveau de compaction est le nucléosome constitué de huit protéines d'histones autour desquelles s'enroulent 146 paires de bases d'ADN (Felsenfeld and Groudine, 2003). L'extrémité amino-terminale des histones est principalement affectée par des modifications post-transcriptionnelles telles que : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation... Ces modifications affectent l'état de compaction de l'ADN et caractérisent l'accessibilité ou l'inaccessibilité de la chromatine à la transcription (Jenuwein, 2001). L'euchromatine correspond à l'état le moins condensé de la chromatine, elle est très riche en gènes actifs. L'hétérochromatine à l'opposée constitue la forme la plus compactée. Il existe deux formes d'hétérochromatine : constitutive et facultative. L'hétérochromatine constitutive ne contient que très peu de gènes codants, ce type de chromatine est trouvé au niveau des régions encadrant les télomères et les centromères, caractérisées par la présence de petites séquences répétées d'ADN organisées en tandem, les régions « satellites ». L'hétérochromatine constitutive est condensée durant la totalité du cycle cellulaire quel que soit le type cellulaire (Heitz, 1928). A l'inverse, l'hétérochromatine facultative se forme dans une région du génome où la transcription doit être inactivée. L'hétérochromatine facultative subit des variations dynamiques au cours du cycle cellulaire ; elle diffère également d'un type cellulaire à l'autre (Kosak and Groudine, 2004).

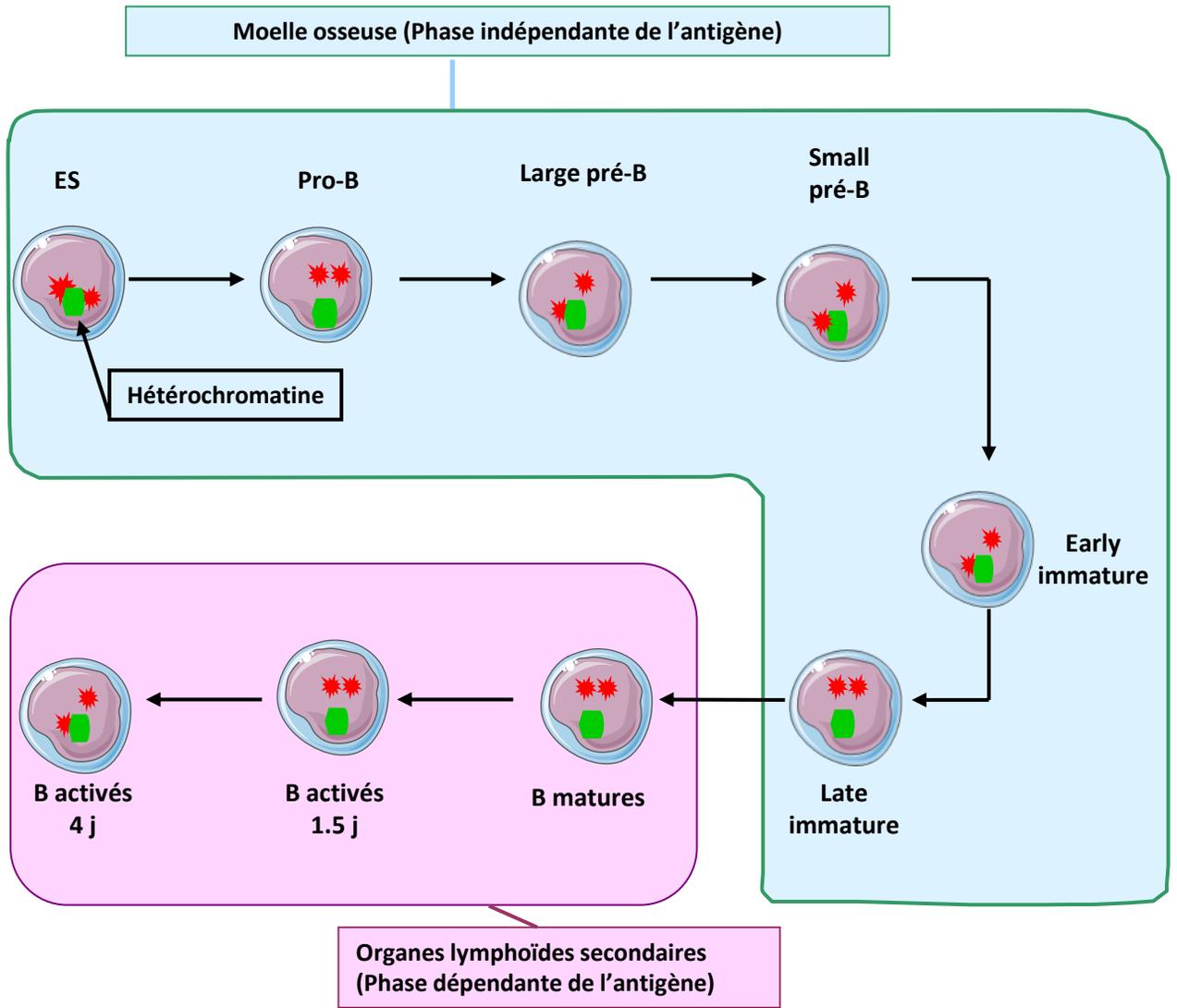


Fig. 19 : Représentation schématique de la localisation nucléaire des allèles des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobuline au cours de l'ontogénie B
 (D'après Roldán et al., 2005; Skok et al., 2001)

L'acétylation des histones est généralement associée à des régions dont la transcription est active. La méthylation des histones a des effets positifs ou négatifs sur la transcription selon le site de méthylation (Kouzarides, 2002). Ainsi l'euchromatine, transcriptionnellement active, est caractérisée par l'acétylation des histones H3 et H4 et par la di ou tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (Dunleavy et al., 2005). Ces marques sont également présentes au niveau des régions promotrices (Kim et al., 2005). Au contraire, l'hétérochromatine est caractérisée par une hypoacétylation ainsi que par la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et la tri-méthylation de la lysine 27 (Dunleavy et al., 2005).

Au sein des cellules souches hématopoïétiques, les allèles IgH sont localisés dans le compartiment hétérochromatinien mais l'engagement dans la voie de différenciation lymphocytaire B induit des changements de position allélique (Kosak, 2002; Fuxa, 2004) (fig 19). Au stade pro-B, la quasi-totalité des cellules ne présentent plus aucun allèle localisé dans l'hétérochromatine : cette localisation corrèle au fait qu'à ce stade, les gènes des chaînes lourdes subissent des réarrangements D_H vers J_H sur les deux allèles. Dans 21% des cellules pro-B une association (« pairing ») des allèles IgH est constatée, elle est sous la dépendance de l'expression de RAG-1. Au sein de cellules déficientes pour RAG-1, une diminution de l'association des allèles (12%) est observée (Hewitt et al., 2009). Au stade suivant pré-B, la majorité des cellules présente une localisation asymétrique des allèles avec l'un d'entre eux localisé dans l'hétérochromatine. A ce stade, la localisation asymétrique des allèles IgH corrèle d'une part avec les réarrangements de V_H vers DJ_H qui s'effectuent de façon ordonnée et d'autre part avec le phénomène d'exclusion allélique. Il a été proposé que seul l'allèle IgH en cours de réarrangement soit maintenu dans un compartiment chromatinien « actif » (autorisant la transcription) alors que le second allèle est « exclu », *i.e.* placé dans une zone de chromatine réprimant la transcription. Cette position non équivalente des allèles est maintenue lors des réarrangements des allèles des chaînes légères. Au stade immature tardif, la cellule B nouvellement produite présente à nouveau deux loci IgH positionnés de manière équivalente (aucun des allèles ne se trouve localisé au sein de l'hétérochromatine).

Les réarrangements VDJ sont également corrélés à des modifications dynamiques et ordonnées de la chromatine au niveau des régions variables. Ainsi dans les cellules pré-pro-



B, les segments D_H localisés en 5' et en 3' de la région D_H ($D_{FL16.1}$ et D_{Q52}) et les segments de la région J_H possèdent des marques d'histone caractéristiques d'une chromatine active. Au contraire, les segments D_{SP} (intermédiaires) ne présentent pas de marque de chromatine active, la lysine 9 des histones H3 est di-méthylé indiquant une chromatine inaccessible à la transcription (Chakraborty et al., 2007). En corrélation avec cette observation, les segments D_{SP} apparaissent comme étant utilisés moins fréquemment que $D_{FL16.1}$ et D_{Q52} (Tsukada et al., 1990). A ce stade cellulaire où s'opèrent les réarrangements de D_H vers J_H , les régions qui incluent les segments V_H possèdent quant à elles les marques d'une chromatine inactive (Morshead et al., 2003; Chakraborty et al., 2007). Au cours de la progression vers le stade suivant, la chromatine des segments V_H proximaux acquiert à son tour un statut actif (histones hyperacétylés), la recombinaison D_H vers J_H est un prérequis à ce changement de statut. Enfin, sous la dépendance de l'IL-7 et de STAT5, les histones des régions incluant les segments V_H distaux deviennent également hyperacétylés (Chowdhury and Sen, 2001, 2004; Bertolino et al., 2005). Au regard de la méthylation de l'histone H3, des différences sont observées entre les segments V_H distaux et proximaux : la méthylation de la lysine 27 (inhibitrice) est constatée uniquement dans la région des segments V_H proximaux. La délétion conditionnelle de l'Histone-lysine N-methyltransferase (EZH2) responsable de la méthylation de cette lysine, induit la diminution de l'utilisation des segments V_H distaux lors des réarrangements. Ainsi, les marques répressives présentes au niveau des segments V_H proximaux contribueraient à l'usage homogène de tous les segments V_H du locus (Xu et al., 2008). Dans les cellules pré-B, lorsqu'une chaîne lourde fonctionnelle est produite, la diminution du signal induit par l'IL7 aboutit à un changement de statut de la chromatine dans la région 5' du locus IgH : les histones localisées aux segments V_H deviennent hypoacétylées, rendant ainsi ces régions moins accessibles aux recombinaisons (Chowdhury and Sen, 2003).

L'étude des marques chromatiniennes dans des précurseurs B porteurs de la délétion du $c\mu$ met en évidence que seules certaines modifications sont dépendantes de l'activateur intronique. En l'absence du $c\mu$, l'acétylation des histones H3K9 des régions $D_{FL16.1}$, D_{Q52} et J_H est sévèrement diminuée, la mutation affecte également la triméthylation H3K4. La diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 semble quant à elle s'opérer indépendamment de cet activateur (Chakraborty et al., 2009).

b) Contribution de RAG1 et RAG2 à l'accessibilité

Au cours des recombinaisons VDJ, il est établi que l'activité endonucléasique du complexe intégrant les protéines RAG1 et 2 nécessite l'accessibilité des régions d'ADN cibles. Au-delà de leur rôle catalytique, il a récemment été montré que les protéines RAG elles-mêmes participaient aux mécanismes d'accessibilité de la chromatine. En effet, la protéine RAG2 possède un domaine PHD (Plant Homeo Domain) qui a la propriété de se fixer de manière spécifique à l'histone H3 tri-méthylée sur la lysine 4 (H3K4me3) (Liu, Subrahmanyam, et al., 2007; Matthews et al., 2007). La mutation de ce domaine PHD abolit la liaison de la protéine avec le motif H3K4me3 et affecte l'efficacité de recombinaison somatique (Liu, Subrahmanyam, et al., 2007).

Au sein des cellules pré-pro-B, avant le réarrangement de D_H vers J_H , les régions des segments $DQ52$ et J_H sont fortement enrichies d'histones H3K4me3 ; à ce stade, la liaison des protéines RAG est particulièrement élevée dans ces régions (Xu and Feeney, 2009; Ji et al., 2010). Du fait de son affinité pour ce motif d'histone particulier, la fixation de RAG2 n'est pas spécifique des loci d'immunoglobuline ; cette protéine peut en effet se fixer sur les motifs H3K4me3 présents en d'autres points du génome. Cependant, l'activité endonucléasique n'est normalement pas observée en dehors des loci des gènes des récepteurs aux antigènes car RAG2 n'est pas associée à RAG1. Du fait de sa spécificité de liaison aux sites RSS flanquant les segments destinés à recombiner, la protéine RAG1 confère au complexe endonucléasique sa spécificité de loci (Ji et al., 2010).

c) Rôle de la transcription germinale sens et antisens ?

A la suite à l'observation de transcrits germinaux dans les régions V_H par l'équipe de Alt en 1985, de nombreux autres transcrits régulateurs ont été mis en évidence au locus IgH aux stades où s'effectuent les réarrangements VDJ. Ces multiples transcrits apparaissent et disparaissent au cours du développement B, ils sont corrélés à la nécessité d'accessibilité des régions sujettes à la recombinaison somatique (Yancopoulos and Alt, 1985). Le rôle que jouent les transcrits germinaux fait encore débat. Sont-ils la cause ou l'effet de la modification de la chromatine? Sont-ils des acteurs ou de simples stigmates de l'accessibilité des régions à recombiner?

Le premier transcrit germinale, nommé μ_0 , est initié avant les réarrangements D_H vers J_H . Il est initié par le promoteur DQ52, en amont du dernier segment D_H et s'étend vers $C\mu$ (Alessandrini and Desiderio, 1991; Schlissel et al., 1991). Après le réarrangement de D_H vers J_H , l'élément DJ_H réarrangé produit des transcrits $D\mu$ (Reth and Alt, 1984; Alessandrini and Desiderio, 1991). Des transcrits antisens ont également été identifiés au niveau des régions D_H (Bolland et al., 2007; Chakraborty et al., 2007) et J_H (Bolland et al., 2007; Perlot et al., 2008). La région des segments D_H contient en effet des promoteurs bidirectionnels mais l'activité de ces promoteurs a seulement été mise en évidence dans des lignées cellulaires dont les segments D_H et J_H sont déjà recombines. L'activité des promoteurs D_H n'a jamais été mise en évidence dans des précurseurs B non réarrangés, probablement à cause de la faible abondance de ces transcrits (Chakraborty et al., 2007).

Dans le même temps, les segments V_H sont transcrits à partir de leur promoteur (Yancopoulos and Alt, 1985). Des transcrits antisens sur les deux allèles ont également été décrits au niveau des régions V_H (Bolland et al., 2004). La transcription antisens de ces régions est observée au cours des réarrangements $D-J_H$, elle est rapidement arrêtée à la suite des réarrangements de V_H vers DJ_H . Compte tenu de la cinétique d'apparition et de disparition de ces transcrits, leur rôle pourrait être de favoriser l'accessibilité de la région V_H , un préalable nécessaire aux réarrangements de V_H vers DJ_H (Bolland et al., 2004). Une étude récente suggère que globalement la transcription sens dans la région V_H est en quantité moins importante que l'antisens. Les transcrits germinaux antisens des régions variables auraient pour origine principale les éléments PAIRs 4 et 6 situés au niveau de la région V_H distale (Verma-Gaur et al., 2012).

d) Modification tridimensionnelle du locus

La régulation d'un locus aussi étendu que le locus IgH passe vraisemblablement par une régulation « spatiale », c'est-à-dire basée sur des changements de conformation (rapprochement et éloignement de régions) au cours du développement B. Des études assez récentes de noyaux en interphase par hybridation in situ fluorescente (FISH-3D) ainsi que des études d'interactions entre régions d'ADN par capture de conformation chromosomique (3C et 4C) ont permis de mettre en évidence des modifications de topologie du locus IgH lors des réarrangements VDJ.

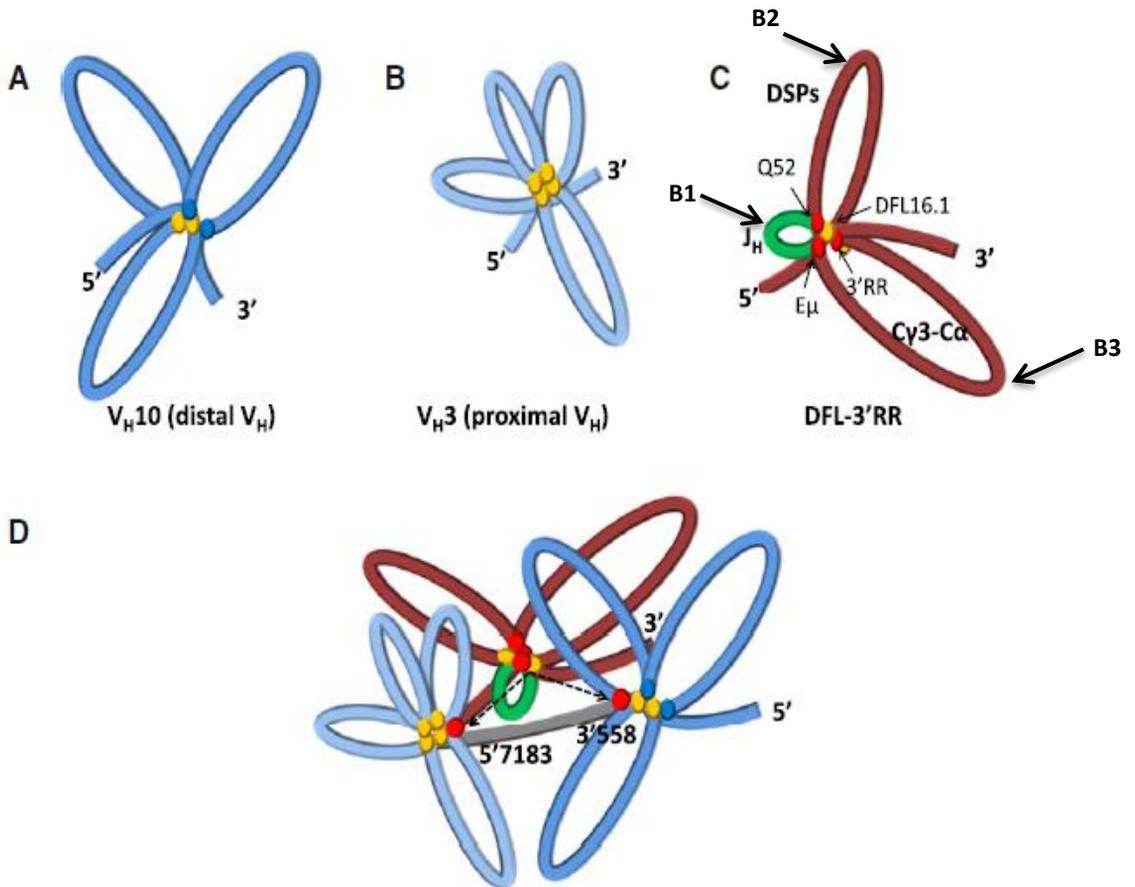
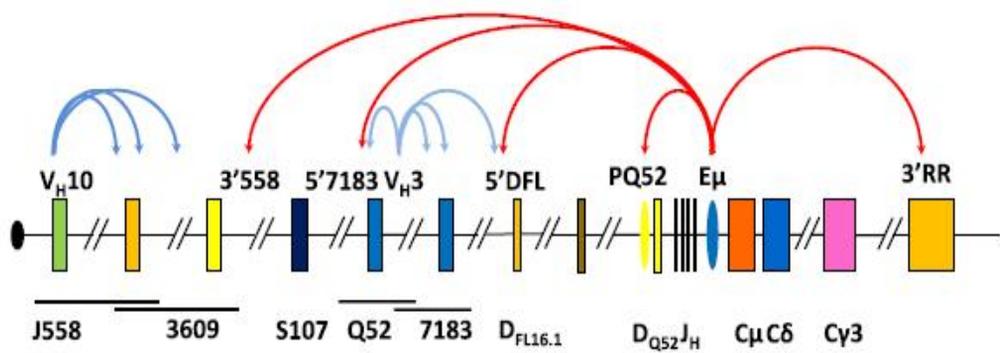


Fig 20 : Compaction de la chromatine au niveau du locus IgH

Le premier niveau de compaction de la chromatine implique la formation de trois domaines constitués de plusieurs boucles. Les sites CTCF sont représentés par des ronds jaunes, Les ronds rouges représente le rôle possible d'YY1 dans l'établissement des interactions.

A et B sont des boucles dont la formation est indépendante de $E\mu$, ces 2 domaines impliquent les segments V_H distaux et proximaux.

C : Trois boucles constituent ce domaine dont la formation est dépendante de $E\mu$. La boucle verte (**B1**) de 2.5 Kb se forme par l'interaction entre DQ52 et $E\mu$. Une deuxième boucle (**B2**) de 57 Kb implique $E\mu$ et DFL16. Une dernière boucle (**B3**) est créée par l'interaction de $E\mu$ et de la région 3' régulateur.

D : Le deuxième niveau de compaction de la chromatine implique l'interaction de $E\mu$ avec des sites spécifiques de la région V_H .

(D'après Guo, Gerasimova, et al., 2011)

Des études de conformation du locus IgH menées à l'aide de 12 sondes génomiques mettent en évidence des changements dynamiques au cours des réarrangements VDJ : au stade pro-B, la région incluant l'ensemble des segments V_H se trouve juxtaposée à la région des segments D_H (Jhunjhunwala et al., 2008). Ce changement de conformation du locus est corrélé à la formation de boucles d'ADN pouvant entraîner soit le rapprochement de régions à recombinaison, ces dernières se trouvant dans la même boucle ; soit la séparation (ou isolation) de régions qui au contraire ne doivent plus interagir, dans ce cas les régions sont placées dans des boucles différentes (Jhunjhunwala et al., 2009; Guo, Gerasimova, et al., 2011). En effet, lors des premiers réarrangements de D_H vers J_H , les régions D_H - J_H - $E\mu$ - C_H sont incluses au sein d'une boucle restreinte qui aurait pour rôle de la séparer des régions situées en amont contenant les gènes V_H (Degner et al., 2011; Guo, Yoon, et al., 2011).

Les contractions des régions cibles de la recombinaison VDJ interviendraient en deux temps avec une première étape dépendante de l'activateur intronique $E\mu$ et une seconde indépendante de ce dernier. Lors de la première étape, les régions D_H , J_H , C_H ainsi que l'activateur $E\mu$ opèrent un rapprochement par la génération de trois boucles d'ADN. Une première boucle de 2,8 Kb se forme entre $E\mu$ et le promoteur DQ52, elle contient les segments J_H et inclut des marques chromatiniennes fixant RAG2 (Liu, Subrahmanyam, et al., 2007; Matthews et al., 2007) (fig 20). Une seconde boucle de 57 Kb, contenant la majorité des segments D_H , est créée par l'interaction de $E\mu$ avec une région située en 5' du segment DFL16. Le rapprochement de ces deux domaines permettrait l'initiation des réarrangements D_H - J_H (Guo, Gerasimova, et al., 2011). La dernière boucle, dont la formation dépend de $E\mu$, est le résultat de l'interaction entre $E\mu$ et l'extrémité de la région 3'RR (Guo, Yoon, et al., 2011). Par des expériences de CHIP, Guo et collaborateurs proposent que les interactions avec $E\mu$ fassent intervenir le facteur de transcription YY1 (Ying Yang 1) dont la délétion avait déjà démontré une implication dans la contraction du locus IgH (Liu, Schmidt-Supprian, et al., 2007). YY1 s'associerait à CTCF fixé d'une part 3 Kb en amont du segment DFL16 et d'autre part aux éléments HS5-7 (Guo, Yoon, et al., 2011). Cette hypothèse corrèle au défaut de compaction du locus IgH observé lors de la délétion conditionnelle de CTCF (Degner et al., 2011).

La contraction du locus intervenant au niveau des régions V_H se produit indépendamment de l'activateur intronique $E\mu$. Le locus IgH contient plus de 60 sites de

liaison pour CTCF dont la majorité est localisée au niveau de la région des segments V_H (Degner et al., 2009), l'implication de ce facteur dans la compaction des régions V_H est fortement suggérée (Guo, Yoon, et al., 2011). L'étude menée par Guo et collaborateurs propose que les régions des segments V_H proximaux et distaux soient incluses dans des domaines (boucles) différents. A ce stade du développement B, ces deux domaines se rapprochent du domaine $D_H-J_H-E\mu-C_H$ soit par une interaction avec $E\mu$ (cas de la boucle des segments V_H distaux), soit par une interaction avec DFL16 (cas de la boucle des segments V_H proximaux) (Guo, Yoon, et al., 2011).

La région des segments V_H distaux possède également des sites PAIRs (PAX-5-activated intergenic repeat elements). Il avait été montré précédemment que PAX5 facilitait les réarrangements des segments V_H distaux en induisant la contraction du locus dans les cellules pro-B (Fuxa, 2004). Des études récentes montrent que la fixation de PAX-5 sur les sites PAIRs est corrélée avec une chromatine active, la transcription antisens de ces régions et la contraction du locus dans les cellules pro-B (Ebert et al., 2011). Quelques exceptions subsistent cependant : en effet le segment V_H10 (situé dans la région distale) ne possède pas d'éléments PAIRs, ce qui suggère la formation d'autres boucles lors des réarrangements VDJ (Guo, Yoon, et al., 2011).

2) Epigénétique et réarrangements secondaires CSR/SHM

a) Localisation nucléaire des allèles IgH

Au sein des cellules B matures, les deux allèles des chaînes lourdes sont de nouveau accessibles à de prochains remaniements géniques faisant suite à la rencontre avec un antigène (Skok et al., 2001; Roldán et al., 2005). En effet, il est bien décrit que les modifications telles que la commutation de classe et l'hypermutation somatique sont des phénomènes majoritairement bialléliques (Delpy et al., 2003). Les données *in vitro* montrent qu'une position équivalente des allèles IgH est maintenue au moins 1,5 jours après activation du lymphocyte B ; au cours de la même expérience, les allèles sont de nouveau non équivalents après quatre jours d'activation (Skok et al., 2001; Roldán et al., 2005) (fig19).

b) Modification des histones lors des réarrangements secondaires : CSR/SHM

Tout comme lors des recombinaisons VDJ, des modifications d'histone ont été mises en évidence lors des recombinaisons secondaires.

Au cours du processus de CSR, toutes les régions S ne présentent pas systématiquement une chromatine accessible à la transcription : par exemple, une stimulation LPS induit des modifications chromatinienne des régions S μ , S γ 2b et S γ 3. Les régions ciblées perdent les marques caractéristiques d'une chromatine « fermée » telles que H3K9me3 pour acquérir des histones caractéristiques d'une chromatine « ouverte » comme H3K4me3 (Wang et al., 2006, 2009; Kuang et al., 2009; Daniel et al., 2010; Pavri et al., 2010; Stanlie et al., 2010). Ces modifications d'histone joueraient un rôle important lors de la CSR, indépendamment du rôle joué par la transcription germinale. En effet, l'induction de la diminution des histones H3K4me3 par « Knock-Down » de méthyltransférases aboutit à la diminution de la CSR vers IgA alors qu'aucune diminution de la transcription germinale n'est observée (Stanlie et al., 2010). La modification des histones (H3K9ac, H3K9me3, H3K4me3, H3K36me3, H3K27ac, ...) s'effectue au niveau des régions switch à la suite de stimulations cytokiniques. Récemment, Jeevan-Raj et collaborateurs ont mis en évidence une relation entre la modification des histones et le recrutement de AID. Au niveau de la région S μ , la marque H3K9me3 est associée à un complexe qui inclut les protéines HP1 (Heterochromatin Protein 1), KAP1 (KRAB domain associated protein 1) et AID. Cette association ne se retrouve pas au niveau des régions switch acceptrices. Les cellules B déficientes pour la protéine KAP1 présentent une diminution de fixation de AID au niveau de la région S μ ainsi qu'une diminution de CSR (Jeevan-Raj et al., 2011). De même, Begum et collaborateurs ont récemment montré qu'une protéine chaperone d'histone nommée Spt6 pouvait réguler les mécanismes de CSR et de SHM. Dans cette étude, l'inhibition de Spt6 par siRNA dans des lignées cellulaires modèles pour la CSR (la lignée CH12F3) ou pour la SHM (BL2) diminue les marques H3k4me3 et de façon corrélée les cassures d'ADN ou les mutations induites par Spt6 réguleraient indirectement la CSR ainsi que l'hypermutation somatique en modulant des marques d'histone (H3K4me3), ces modifications n'induisant pas de diminution drastique de la transcription (Begum et al., 2012).

RESULTATS

Article 1:

The E μ full length enhancer region is critical for optimal immunoglobulin heavy chain expression at early stages of B cell development

Marie Marquet, Armand Garot, Sébastien Bender, Claire Carrion, Sandrine Lecardeur, Pauline Rouaud, Yves Denizot, Michel Cogné, and Eric Pinaud.

Article 2 :

Matrix Attachment Regions flanking the E μ enhancer are critical cis- and trans- regulators of somatic hypermutation

Marie Marquet, Sébastien Bender, Armand Garot, Pauline Rouaud, Claire Carrion, Yves Denizot, Michel Cogné, Claire Francastel and Eric Pinaud.

Etude préliminaire hs3a to hs3b KO :

Modèle murin de délétion de la région quasi-palindromique 3'IgH

Article1:

The E μ full length enhancer region is critical for optimal immunoglobulin heavy chain expression at early stages of B cell development

Marie Marquet, Armand Garot, Sébastien Bender, Claire Carrion, Sandrine Lecardeur, Pauline Rouaud, Yves Denizot, Michel Cogné, and Eric Pinaud.

Article 2 :

Matrix Attachment Regions flanking the E μ enhancer are critical cis- and trans- regulators of somatic hypermutation

Marie Marquet, Sébastien Bender, Armand Garot, Pauline Rouaud, Claire Carrion, Yves Denizot, Michel Cogné, Claire Francastel and Eric Pinaud.

Matrix Attachment Regions flanking the E μ enhancer are critical *cis*- and *trans*- regulators of somatic hypermutation

Marie Marquet¹, Sébastien Bender^{1,2}, Armand Garot¹, Pauline Rouaud¹, Claire Carrion¹, Yves Denizot¹, Michel Cogné¹, Claire Francastel³ and Eric Pinaud^{1,4}.

¹UMR 7276 Centre national de la Recherche Scientifique and Université de Limoges : Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations, 2 rue du Dr. Marcland, 87025 Limoges, France

²Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren : Centre de Référence des Amyloses, 2 Avenue Martin Luther King, F-87042 Limoges, France

³UMR 7216 Centre national de la Recherche Scientifique and Université Paris Diderot - Paris 7, Epigénétique et Destin Cellulaire, Bâtiment Lamarck, 35 Rue Hélène Brion, F-75013 Paris Cedex 13, France

³To whom correspondance should be adressed

Correspondance should be addressed to D. Eric Pinaud, UMR7276, CNRS Université de Limoges, Faculté de Médecine, 2 rue du Dr. Marcland, F-87025 Limoges, France. E-mail address eric.pinaud@unilim.fr

Modèle murin de délétion de la région quasi-palindromique 3'IgH : étude préliminaire

Introduction

Le locus IgH subit de nombreux remaniements géniques au cours du développement lymphocytaire B. Des éléments *cis*-régulateurs organisent ces événements, E_{μ} étant actif aux stades précoces du développement, il est essentiel pour les recombinaisons VDJ. D'autres éléments régulateurs que sont hs3a, hs1-2, hs3b et hs4, situés en 3' du locus, constituent la région 3' régulatrice (3'RR pour 3' Regulatory Region). La région contenant les trois premiers activateurs transcriptionnels hs3a, hs1-2 et hs3b possède de nombreuses séquences répétées inversées encadrant les éléments hs1,2 et constitue une structure de "quasi-palindrome" (Chauveau and Cogné, 1996). Bien que les séquences répétées et inversées de cette région divergent entre espèces, l'architecture du "quasi-palindrome" est remarquablement conservée chez la souris, le rat, l'homme et les primates (Sepulveda et al., 2005; D'Addabbo et al., 2011) ce qui suggère un rôle structurel important soumis à une forte pression sélective au cours de l'évolution naturelle. L'élément hs4 se situant en aval du palindrome est actif beaucoup plus tôt que le reste de la 3'RR au cours du développement des cellules B, dès le stade pro-B (Madisen and Groudine, 1994; Michaelson et al., 1995).

Le rôle de l'élément hs4 a été mis en évidence grâce à la réalisation d'un modèle KO pour cet élément (Vincent-Fabert et al., 2009). Bien qu'actif dès les stades précoces, sa délétion n'entraîne pas de modification au niveau des cellules lymphocytaires B de la moelle osseuse. Le nombre de cellules ainsi que la proportion des cellules pro, pré-B et immatures ne sont pas affectés. Une différence phénotypique est par contre observée au stade B au repos où une diminution du niveau d'expression d'IgM est constatée ; cette particularité est également constatée dans le modèle animal de délétion conjointe des éléments hs3b et hs4 (Pinaud et al., 2001). Les animaux déficients pour l'élément hs4 ne présentent aucun autre défaut majeur au cours du développement B : la CSR n'est pas affectée. Le phénotype quasi-normal des animaux KO pour hs4 fut surprenant au vue de l'activité de cet élément (hypersensibilité à la DNaseI) qui se manifeste tout au long du développement B. Une explication plausible serait que l'absence de hs4 pourrait être compensée par la présence des activateurs inclus dans le « quasi-palindrome » (hs3, hs1-2 et hs3b). Le rôle de la 3'RR

dans sa globalité a été en partie élucidé par la réalisation d'un modèle animal de délétion totale (Vincent-Fabert et al., 2010) qui confirme l'implication de la 3'RR dans les stades B tardifs. Elle est indispensable au bon déroulement de la CSR ainsi qu'à la synthèse d'immunoglobulines. Tout comme il avait été observé dans le modèle de délétion conjointe de hs3b et hs4 (Pinaud et al., 2001), le défaut de CSR présent dans le modèle de délétion totale est la conséquence directe d'un défaut majeur de transcription germinale des régions S. Les différents modèles de délétion d'éléments activateurs transcriptionnels dans la région 3' RR indiquent un rôle primordial de cette région pour l'accessibilité du locus lors de la commutation de classe.

Le « quasi-palindrome » de la région 3'RR est une structure conservée entre les espèces dont le rôle est totalement inconnu. Le locus IgH humain comprend deux blocs de gènes constants, chacun doté d'une propre région régulatrice 3, organisée comme un quasi-palindrome. Les activateurs 3' humains sont semblables à ceux de la souris mais les régions ne possèdent pas d'équivalent de l'élément hs3b (Pinaud et al., 2011) en annexe de ce manuscrit). De la souris à l'homme, l'évolution semble avoir préféré conserver une structure quasi-palindromique plutôt qu'un activateur transcriptionnel redondant (hs3b chez la souris). En effet, nous avons montré précédemment que la délétion de l'élément hs3b de souris ne conférait aucun défaut au sein du lignage B (Bebin et al., 2010). Ce dernier constat plaide en faveur d'un rôle important de la structure quasi-palindromique de la région 3'RR. Selon notre hypothèse, la région 3'RR serait constituée de deux entités distinctes : l'activateur distal hs4 (actif dès le stade pré-B) et la région quasi-palindromique (incluant les éléments hs3a, hs1-2 et hs3b) dont le rôle précis reste à définir mais dont la fenêtre d'activité se situerait aux stades tardifs (post-médullaires : entre les stades B au repos et plasmocyte). Au-delà du rôle global de la région 3'RR, la réalisation du KO de la région « quasi-palindromique » chez la souris devrait permettre de vérifier notre hypothèse des « deux entités », et en parallèle de définir *in vivo* la fonction de cette « région structurée ». Ce modèle permettra également de mesurer la fonctionnalité d'un locus IgH doté d'une région 3'RR réduite au seul élément régulateur hs4.

Résultats

Délétion de la région quasi-palindromique de la 3'RR, génération des souris « *hs3a to hs3b* » KO.

Un vecteur de ciblage a permis de réaliser le remplacement du fragment génomique *EcoRI-PstI* contenant les activateurs transcriptionnels *hs3a*, *hs1,2* et *hs3b* par une cassette *loxP-neo^R-loxP* (figure 1A). Cette délétion permet l'ablation de la structure « quasi-palindromique » de la région 3'RR et laisse intact le dernier activateur de la région, *hs4*. La transfection du vecteur a permis d'obtenir des clones murins de cellules ES, de fond génétique 129, résistants à la double sélection antibiotique G418 et Gancyclovir. L'ADN génomique de chaque clone est préparé puis testé par southern blotting à l'aide de sondes situées en 3' et en 5' des bras d'homologies du vecteur. La recombinaison homologue du vecteur s'étant effectuée sur un des deux allèles IgH, la restriction par *XhoI* produit un fragment génomique recombiné de 31 kb révélé par la sonde 5' (14,7 kb pour l'allèle IgH sauvage), une restriction par *EcoRI* produit un fragment recombiné de 8,6 kb avec la sonde 3' (22 kb pour l'allèle IgH sauvage) (figure 1B). Nous avons identifié 2 clones résistants sur 93 testés appelés « *hs3a to hs3b-neo^f* ». Un de ces clones a été injecté dans des blastocystes de souris C57Bl6 afin de générer des animaux chimériques porteurs de la mutation « *hs3a to hs3b-neo^f* » dans leur lignée germinale. Une lignée de souris Knock-out a été établie à partir de ces animaux chimériques. Ces souris appelées « *hs3a to hs3b-neo^f* » ont été croisées avec des animaux transgéniques exprimant la recombinase *cre* sous la dépendance du promoteur CMV (cytomégalovirus) afin d'éliminer le gène de sélection *neo^R* et d'obtenir une lignée d'animaux porteurs de la délétion de la région quasi-palindromique 3'IgH, soit « *hs3a to hs3b- KO* ». Les souris générées sont testées par PCR (figure 1C).

Les expériences de cette étude préliminaire ont été menées sur des souris de fond génétique mixte (129/C57Bl6), possédant 2 loci IgH de même haplotype *hs3a to hs3b Δ^a/Δ^a* ou sur des souris hétérozygotes (lignée F1 après croisement avec la lignée pure C57Bl6) possédant des loci IgH d'haplotypes différents *hs3a to hs3b Δ^a/wt^b* . Les souris wt utilisées comme contrôle sont également de fond génétique mixte (129/ C57Bl6) avec le même haplotype *wt^a/wt^a* ou des haplotypes différents *wt^a/wt^b*. Les souris mutantes ainsi que leur contrôles sont du même âge et hébergées dans les mêmes conditions sanitaires.

Etude des compartiments B

Les souris utilisées lors de l'étude des différents compartiments cellulaires B sont toutes âgées de 8 semaines.

Dans la moelle osseuse, les compartiments cellulaires pré-pro B (B220⁺CD117⁺), pré-B (IgM⁻B220⁺CD43^{high}) ainsi que pré-B (IgM⁻B220⁺CD43^{low}) sont identiques entre les souris KO et les souris wt (figure 2A ; tableau 1).

Dans la rate, le nombre de cellules lymphocytaires B (B220⁺IgM⁺IgD⁺) et lymphocytaires T (CD3e⁺) est similaire chez les souris KO et wt (figure 2B ; tableau 1). L'analyse de la moyenne de fluorescence de l'IgM à la surface des cellules B de la rate (B220⁺) n'indique aucune différence entre les souris mutantes et contrôles, ce résultat confirme que la seule présence de l'activateur hs4 suffit pour l'expression normale de l'IgM membranaire à la surface des cellules B périphériques. En effet, la délétion de cet activateur chez la souris entraîne à elle seule une diminution de l'expression de l'IgM à la surface des cellules B au repos. L'analyse des sous-populations de cellules B de la rate par cytométrie en flux révèle des différences dans la répartition des cellules B de la zone marginale (B220⁺CD21^{high}CD23⁻) et de la zone folliculaire (B220⁺CD21^{mid}CD23⁺). Le pourcentage de cellules B de la zone folliculaire est en effet fortement diminué chez les souris KO par rapport aux souris wt (12,2% vs 73,1%) (figure 2B). De même, le nombre de cellules B de cette zone est significativement diminué ($p < 0.0001$, t test) : $36.51 \times 10^6 \pm 2.707$ chez les souris wt contre $8.096 \times 10^6 \pm 1.033$ chez les souris KO (tableau 1). A l'opposé, le nombre de cellules B de la zone marginale est faiblement augmenté chez les souris KO, $5.759 \times 10^6 \pm 0.8356$ pour les souris wt contre $9.925 \times 10^6 \pm 1.607$ pour les souris KO ($p = 0.0298$, t test) (tableau 1). Le compartiment des cellules B transitionnelles (B220⁺AA4⁺) n'apparaît quant à lui pas affecté par la mutation (figure 2B, tableau 1).

Dans la cavité péritonéale, l'analyse par cytométrie en flux montre que les sous-populations des cellules B1a (B220⁺CD5⁺IgM⁺) et B1b (B220⁺CD5⁻IgM) ne présentent aucune modification (figure 2C).

L'analyse des plaques de Peyer révèle une augmentation globale significative du nombre de lymphocytes B dans ces organes concernant les populations de cellules B220⁺IgM⁺ et B220⁺IgA⁺ (respectivement : $p < 0.0001$ et $p = 0.0003$, t test) (tableau 1). Le

nombre et la proportion des cellules B du centre germinatif ($B220^+PNA^{High}FAS^{High}$) sont également augmentés (figure 2D) ($P = 0.0120$, t test) (tableau 1).

L'analyse de souris hétérozygotes (F1), présentant des allèles de chaîne lourde d'immunoglobuline d'haplotypes différents ($hs3b\Delta^a/wt^b$ et wt^a/wt^b), permet d'étudier, dans un contexte « d'allèles compétitifs au sein d'un même animal », l'efficacité de l'allèle mutant (« a ») à conduire et orienter le développement des cellules B. Au cours du développement B, l'expression des allèles en compétition conduit à l'expression d'une IgM de surface d'allotype « a » ou « b » (IgM^a ou IgM^b). L'expression des IgM à la surface des cellules du lignage B est évaluée par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques des allotypes IgM^a ou IgM^b , par conséquent le rapport IgM^a/IgM^b traduit donc l'efficacité de l'allèle « a » à conduire le développement B.

Dans la moelle osseuse, la rate ainsi que les plaques de Peyer, la proportion de cellules exprimant l'allotype « a » est identique chez les animaux $hs3b\Delta^a/wt^b$ et wt^a/wt^b (figure 3).

Ces observations suggèrent que l'allèle *hs3a* to *hs3b* Δ est à lui seul capable de conduire un développement B normal. La mutation ne semble pas affecter les recombinaisons V(D)J, elle ne présente aucun handicap évident pour l'expression de la chaîne lourde d'immunoglobuline.

Cependant, nous observons une augmentation légère mais significative, $p = 0.0329$) du nombre de cellules B des plaques de Peyer. L'analyse indique $4.226 \times 10^6 \pm 0.2683$ cellules $B220^+IgM^{a+}$ chez les souris wt et $7.121 \times 10^6 \pm 1.014$ chez les souris KO (tableau 2).

Analyse de la synthèse d'immunoglobuline sérique

L'analyse de la production *in vivo* d'immunoglobuline a été réalisée sur du sérum de souris âgées de 8 semaines, 8 souris *hs3a* to *hs3b* Δ^a/Δ^a et 6 souris $wt^{a/a}$. Les concentrations d'immunoglobuline sérique de type IgM ($p = 0.0004$, t test), IgG1 ($p = 0.0009$, t test), IgG2a ($p < 0.0001$, t test), IgG2b ($p < 0.0001$, t test), IgG3 ($p = 0.0002$, t test), IgE ($p = 0.0088$, t test) et IgA ($p < 0.0001$, t test) sont toutes significativement réduites chez les animaux porteurs de la mutation (figure 4A).

Réponse anticorps *in vivo* après immunisation à l'ovalbumine (figure 4B)

Afin d'étudier l'effet de la mutation *hs3a* to *hs3b* sur la réponse immunitaire *in vivo*, nous avons procédé à une immunisation par l'ovalbumine de souris hétérozygotes présentant des chaînes lourdes d'immunoglobuline d'allotype différent « a » et « b ». Deux cohortes de 5 souris de chaque génotype (wt^a/wt^b et $hs3a$ to $hs3b\Delta^a/wt^b$) âgées de 8 semaines sont utilisées pour cette étude. Une cinétique de la réponse spécifique de l'ovalbumine pour les isotypes IgM, IgG1 et IgG2a a été réalisée pendant 24 jours. La réponse anticorps spécifique d'allotype « a » et « b » permet de distinguer, au sein d'un même animal porteur de deux allèles IgH différents, si la réponse immunitaire est conduite par les cellules B exprimant l'allèle sauvage (« b ») ou l'allèle muté (« a »).

Les expériences d'immunisation réalisées (figure 4B) montrent que, chez les animaux $hs3b\Delta^a/wt^b$, les réponses immunitaires IgG1 et IgG2a sont essentiellement assurées par l'allèle wt^b . Chez ces mêmes animaux $hs3b\Delta^a/wt^b$, seule une réponse immunitaire spécifique de type IgM très faible assurée par l'allèle $hs3b\Delta^a$ a été mise en évidence. Dans le cas des 3 classes d'immunoglobuline, la réponse secondaire (faisant suite au rappel d'immunisation), elle est quasi-inexistante. Chez ces animaux, une réponse efficace (comparable à celle des animaux wt^a/wt^b) assurée par l'allèle wt^b permet de valider l'immunisation par l'ovalbumine chez ces souris.

Les expériences d'immunisation montrent clairement que la mutation *hs3a* to *hs3b* Δ affecte très sévèrement *in vivo* la réponse immunitaire spécifique de type IgM, IgG1 et IgG2a.

Expression d'immunoglobuline suite à une stimulation *in vitro* (figure 5)

Afin de déterminer si la mutation *hs3a* to *hs3b* Δ affecte la production d'Ig de réponse secondaire (autres que IgM), une stimulation de cellules lymphocytaires B est réalisée avec du LPS associé ou non à des cytokines, les Ig produites dans les surnageants de culture ont été dosées par ELISA (figure 5).

Suite à une stimulation avec du LPS la sécrétion d'IgM et d'IgG3 est significativement diminuée ($p = 0.0011$, $p = 0.0021$ et $p = 0.0133$ respectivement, t test), la diminution est moins prononcée dans le cas d'IgG2b. La stimulation des cellules avec du LPS en combinaison avec l'IFN γ induit la recombinaison de classe vers IgG2a. La production de cet

isotype se trouve également significativement diminuée par rapport au contrôle ($p = 0.0388$, t test). Une forte diminution de sécrétion d'IgG1 suite à une stimulation par un anticorps anti-CD40 associé à l'IL4 est également constatée ($p < 0.0001$, t test). Enfin, dans les conditions de stimulation associant le LPS au TGF β , la synthèse d'IgA se trouve également significativement diminuée ($p = 0.0013$, t test).

Les expériences de stimulation *in vitro* indiquent que la production d'Ig de réponse secondaire (vers tous les isotypes testés) est significativement affectée par la mutation *hs3a* to *hs3b* Δ . La diminution de la synthèse d'IgG1, IgG3, IgG2a, IgG2b et IgA après stimulation *in vitro* peut être la conséquence d'un défaut de CSR ou/et d'un défaut de production (et sécrétion) de la chaîne lourde au stade plasmocyte.

Analyse par cytométrie en flux de l'effet de la délétion *hs3a* to *hs3b* Δ sur la CSR (figure 6)

Afin de déterminer si la diminution de sécrétion d'immunoglobuline observée après stimulation *in vitro* résulte d'un défaut de la fréquence de CSR, nous avons estimé, après marquage des Ig de surface en cytométrie de flux, la proportion de cellules exprimant chaque isotype de réponse secondaire. Celle-ci reflète l'efficacité de la recombinaison de classe (CSR) suite à la stimulation *in vitro*.

L'analyse par cytométrie en flux confirme une diminution de CSR vers les isotypes IgG3, IgG2a et IgG1 (figure 6). Compte tenu du défaut sévère de production d'IgG1 dans le surnageant de culture, la diminution de CSR apparaît relativement modeste. La très faible baisse de sécrétion observée dans le cas de l'isotype IgG2b n'est pas corrélée à une diminution significative de commutation de classe vers cet isotype (quasi-identique à celle observé pour le contrôle wt). Il est également difficile de confirmer une diminution de CSR vers IgA ; en effet la proportion de cellules commutées vers à IgA semble identique entre les contrôles et les souris mutantes *hs3a* to *hs3b* Δ .

Analyse de l'hypermutation somatique

Chez des groupes de 6 animaux *hs3a* to *hs3b* Δ/Δ et wt, l'hypermutation somatique est analysée dans les cellules B du centre germinatif triées (B220⁺PNA^{high}FAS^{high}) de plaques de Peyer. Chaque région analysée est amplifiée par PCR puis clonée. L'analyse des séquences du locus IgH montrent que 95% des séquences ne sont pas mutées chez les

souris *hs3a* to *hs3b* Δ/Δ (contre seulement 6% pour les contrôles) (figure 7A). La fréquence de mutation (prenant en compte uniquement les séquences mutées) est divisée par 3 par rapport aux contrôles (figure 7B). En revanche, l'analyse des substitutions nucléotidiques n'indique aucune différence chez les mutants (figure 7C, les proportions des mutations survenant aux bases dC/dT et dA/dT ainsi que les transitions et transversions restent inchangées (figure 7D). La mutation *hs3a* to *hs3b* Δ affecte de façon prononcée la fréquence des mutations somatiques de la région variable de la chaîne lourde réarrangée.

Dans le but de vérifier que les cellules triées des centres germinatifs sont bien ciblées par l'hypermutation somatique, nous avons également étudié, dans les mêmes échantillons, ce processus au locus des chaînes *Ig κ* . Cette analyse révèle un profil de SHM similaire entre souris mutantes et wt. Cette expérience complémentaire valide les analyses de SHM au locus des chaînes lourdes, elle confirme un effet de la mutation *hs3a* to *hs3b* Δ sur le processus de SHM et montre également que la délétion occasionnée au locus *IgH* n'affecte pas le processus de SHM au locus *Ig κ* (figure 7A, B, C, D).

L'hypermutation somatique étant corrélée à la transcription, nous avons recherché si la large délétion occasionnée dans la région *IgH* 3'RR pouvait induire une diminution de la transcription qui serait à l'origine de l'importante diminution de SHM. L'analyse des transcrits au locus *IgH* a été effectuée sur 6 groupes de souris mutantes *hs3a* to *hs3b* Δ et 6 groupes de souris wt. La transcription primaire de la chaîne lourde d'Ig est significativement diminuée (environ 30% de la transcription observée chez les contrôles, $p = 0.0005$, t test) chez les souris *hs3a* to *hs3b* Δ . La diminution de l'hypermutation somatique constatée dans le modèle de mutation *hs3a* to *hs3b* Δ semblerait donc être la conséquence directe d'une diminution de la transcription de la région variable réarrangée de la chaîne lourde d'Ig (figure 7E).

Discussion

Ces résultats préliminaires sont discutés dans la partie DISCUSSION et PERSPECTIVES (p64 à p68).

Matériels et Méthodes

Génération de souris hs3a to hs3b KO

Le bras 5' est homologue à un fragment génomique *HindIII-EcoRI* de 3.6 kb situé en 5' de hs3a. Le bras 3' est homologue à un fragment génomique *PstI-KpnI* de 5.7 kb comprenant hs4. Pour la sélection *in vitro*, le gène de résistance à la néomycine (*neo^r*), flanqué par des sites *lox P*, a été inséré entre les bras d'homologie. Le gène de résistance à la néomycine est placé sous la dépendance du promoteur de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex. De plus, en amont du bras 5' le gène thymidine kinase est placé sous la dépendance du promoteur pGK a été introduit pour permettre une sélection négative évitant l'intégration aléatoire du vecteur dans le génome. Une fois linéarisé, le vecteur est transfecté dans des cellules souches embryonnaires de souris (lignée cellulaire E14). Les clones transfectés sont sélectionnés avec 300 mg/ml de généticine et 2 mM de gancyclovir. Un clone correctement recombiné est injecté dans des blastocystes C57BL/6 afin de générer des animaux chimériques. La transmission germinale de la délétion est vérifiée par Southern blot. La délétion du gène de résistance à la néomycine est effectuée par croisement avec une souris exprimant le transgène *cre* sous la dépendance du promoteur CMV. La transmission de la délétion est confirmée par Southern blot et PCR.

Southern blot

Pour réaliser les Southern blot, environ 20 µg d'ADN génomique sont digérés par *XhoI* ou *SacI*. La migration de l'ADN digéré s'effectue sur un gel de 0.7% d'agarose. L'ADN est transféré par capillarité sur une membrane de nylon (MPBiomedicals, Santa Ana, CA) puis celle-ci est hybridée avec des sondes marquées au 32P. Sonde 5' (X, fragment *EcoRI-HindIII* de 0.8 kb) et sonde 3' (Y, fragment *XhoI-HindIII* de 0.6 Kb) cf figure1.

PCR de génotypage des ES ainsi que des souris hs3a to hs3b néo et hs3a to hs3b KO

La PCR permettant de vérifier si la recombinaison en 5' est correcte sur les ES ou souris néo^r a été réalisée comme précédemment décrite dans Vincent-Fabert et al. 2010.

PCR d'amplification de l'allèle WT : 1 cycle [94°C-5 min], 33 cycles [94°C-30 sec, 55°C-30 sec, 72°C-45 sec], 1 cycle 72°C-7 min. Les couples d'amorces utilisées sont les suivants :

Amorce 5': 5' GCCATGCCTCTACCAATAA 3'; Amorce 3': 5' TGGGTTTCATGGTGAACAGTG 3'. Le fragment amplifié est de 209 pb.

PCR d'amplification de l'allèle $\Delta^{hs3a \text{ to } hs3b}$: 1 cycle [94°C-5 min], 30 cycles [94°C-30 sec, 55°C-1 min, 65°C-2 min], 1 cycle 65°C-10 min. Les couples d'amorces utilisées sont les suivants :

Amorce 5': 5' GACCTTCCTCACCTCTTCC 3'; Amorce 3': 5' TGGGTTTCATGGTGAACAGTG 3'. Le fragment amplifié est de 1.1 kb.

Cytométrie en flux

Les marquages de cytométrie en flux sont réalisés comme précédemment décrits pour l'article 1 : « The E μ full length enhancer region is critical for optimal immunoglobulin heavy chain expression at early stages of B cell development ».

Dosage des immunoglobulines sériques et immunisation à l'ovalbumine

Cf article 2 : « Matrix Attachment Regions flanking the E μ enhancer are critical cis- and trans- regulators of somatic hypermutation»

Dosage des immunoglobulines après stimulation in vitro

Les dosages ont été réalisés comme décrit précédemment dans Vincent-Fabert et al., 2010.

Hypermuation somatique

L'étude a été menée de la même manière que dans l'article 2 : « Matrix Attachment Regions flanking the E μ enhancer are critical cis- and trans- regulators of somatic hypermutation»

Bibliographie

- Bebin, A.-G., Carrion, C., Marquet, M., Cogne, N., Lecardeur, S., Cogne, M., Pinaud, E., 2010. In Vivo Redundant Function of the 3' IgH Regulatory Element HS3b in the Mouse. *The Journal of Immunology* 184, 3710–3717.
- D'Addabbo, P., Scascitelli, M., Giambra, V., Rocchi, M., Frezza, D., 2011. Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1.2 within the palindrome of IgH 3' Regulatory Region. *BMC Evol. Biol.* 11, 71.
- Madisen, L., 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 & Development* 8, 2212–2226.
- Michaelson, J.S., Giannini, S.L., Birshtein, B.K., 1995. Identification of 3 α -hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic acids research* 23, 975–981.
- Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M., Cogné, M., 2001. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* 15, 187–199.
- Pinaud, E., Marquet, M., Fiancette, R., Péron, S., Vincent-Fabert, C., Denizot, Y., Cogné, M., 2011. The IgH locus 3' regulatory region: pulling the strings from behind. *Adv. Immunol.* 110, 27–70.
- Sepulveda, M.A., Garrett, F.E., Price-Whelan, A., Birshtein, B.K., 2005. Comparative analysis of human and mouse 3' Igh regulatory regions identifies distinctive structural features. *Mol. Immunol.* 42, 605–615.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., Denizot, Y., 2010. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 116, 1895–1898.
- Vincent-Fabert, C., Truffinet, V., Fiancette, R., Cogné, N., Cogné, M., Denizot, Y., 2009. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J. Immunol.* 182, 6926–6932.

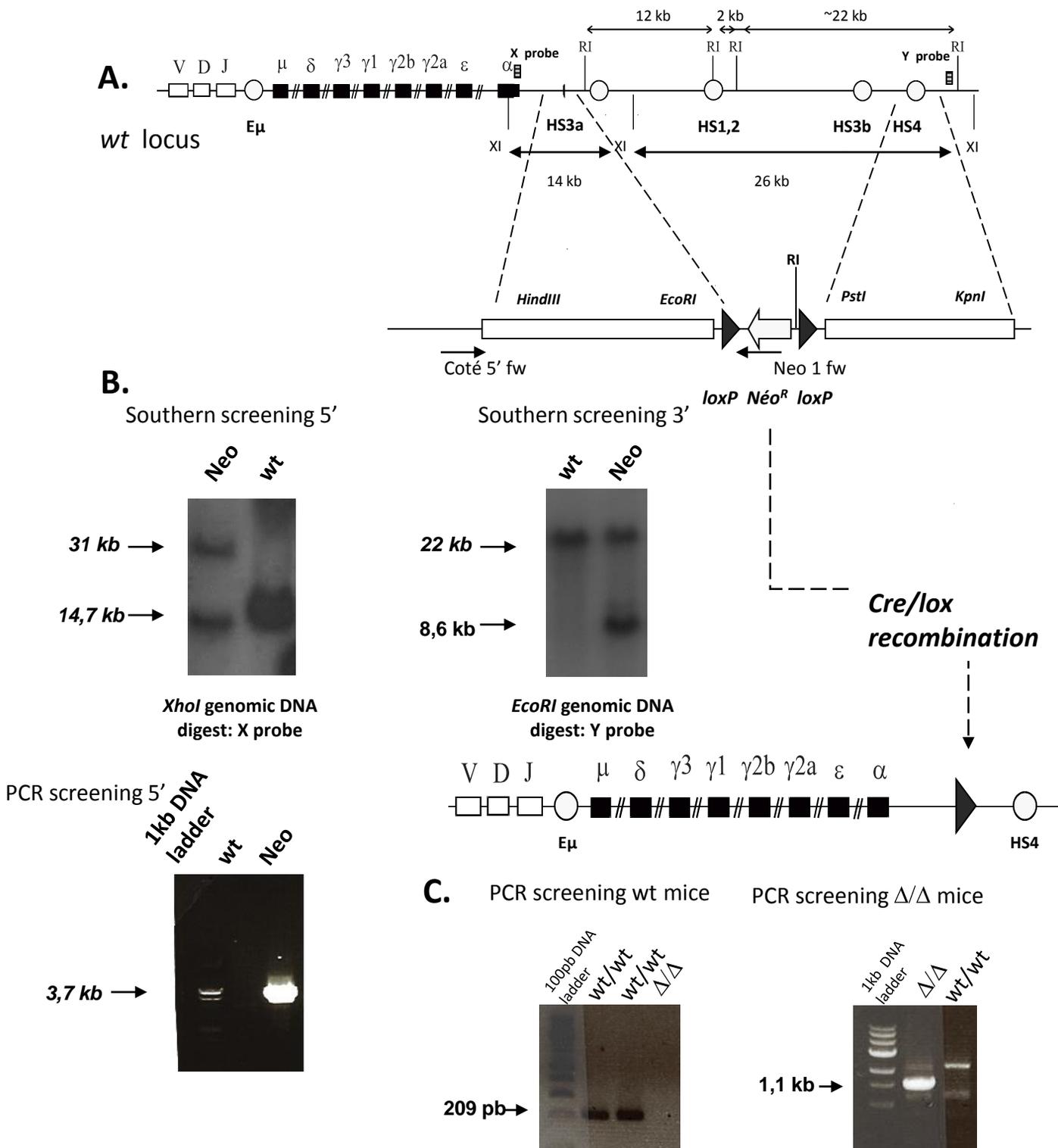


Figure 1. Targeting of the *hs3a* to *hs3b* region

(A) Map of the mouse IgH 3' regulatory region. Closed circles stand for transcriptional enhancers.

(B) Targeting construct and Southern blot of knockout ES cells or animals with *NeoR* insertion (N). The 5' probe (X, 0.8 kb *EcoRI-HindIII* fragment) detects a genomic *XhoI* band of 14.7 kb and a 31 kb band after homozygous recombination. The 3' probe (Y, 0.6 kb *XhoI-HindIII* fragment) detects a genomic *EcoRI* band of 22 kb band and a 8.6 kb band in the targeted locus.

(C) Map of the *cre*-deleted targeted locus. PCR on *wt* and knockout animals DNA. The "wt" PCR generates a 209 pb band only for the *wt* IgH allele. The " Δ/Δ " PCR amplifies a 1.1 kb band only for the (Δ) IgH allele.

Figure 1.

Figure 2.

(A) Bone marrow cells of wt and *hs3a to hs3b* Δ/Δ mice were stained with fluorescent Abs. Top row: B220⁺ CD43^{High} (pro-B) and B220⁺CD43^{Low} (pre-B) cell populations are shown after staining with V450–anti-B220, FITC–anti-IgMa, and PE–anti-CD43 Abs, gated on the IgM⁻ population. Second row: B220⁺ CD117⁺ (pre-pro- and pro-BI B cells) and B220⁺ CD117⁻ (preB, immature and recirculating B cells) were stained with V450-anti-B220, PE-anti-CD117 Abs.

(B) Splenic cells of wt and *hs3a to hs3b* Δ/Δ mice were stained with fluorescent Abs. Top row: B220⁺ B cells and CD3e T cells populations are shown after staining with V450–anti-B220 and FITC–anti-CD3e Abs. Second row: IgD⁺ mature B cells population is stained with FITC–anti-IgD Abs and IgM⁺ mature B cell population is stained with PE–anti-IgM^{total} Abs gated on B220 population. Third row: CD21^{High} CD23^{Low} marginal zone and CD21^{Low} CD23^{High} follicular B cell populations were stained with V450-anti-B220, PE–anti-CD21 and FITC–anti-CD23 Abs, gated on B220 population. Fourth row: B220⁺ AA4.1⁺ (transitional B cells) are shown after staining with V450–anti-B220 and PE–anti-CD93 Abs. Bottom row : Ig surface expression level on wt and *hs3a to hs3b* Δ/Δ splenic mature B cell population (gated on B220⁺ cells) were stained with PE-anti-IgM^{tot} (right pannel) or FITC-anti-IgD (left pannel).

(C) B cells from peritoneal cavity of wt and *hs3a to hs3b* Δ/Δ mice were stained with fluorescent Abs. First row: IgM⁺ CD5⁺ B cells population is shown after staining with V450-anti-B220, PE-anti-IgM^{total} Abs, FITC-anti-CD5, gated on the B220 population. Second row: IgM⁺ mature B cell populations were stained with PE–anti-IgM^{total} Abs.

(D) Peyer's Patch B cells of wt and *hs3a to hs3b* Δ/Δ mice were stained with fluorescent Abs. First row: PNA^{High} FAS^{High} germinal centre B cells population is stained with APC-anti-B220, FITC-anti-PNA PE-anti-FAS Abs gated on B220 population. IgM⁺ and IgA⁺ B cell populations were stained with V450-anti-B220, FITC–anti-IgM^{total} and PE–anti-IgD Abs, gated on B220 population.

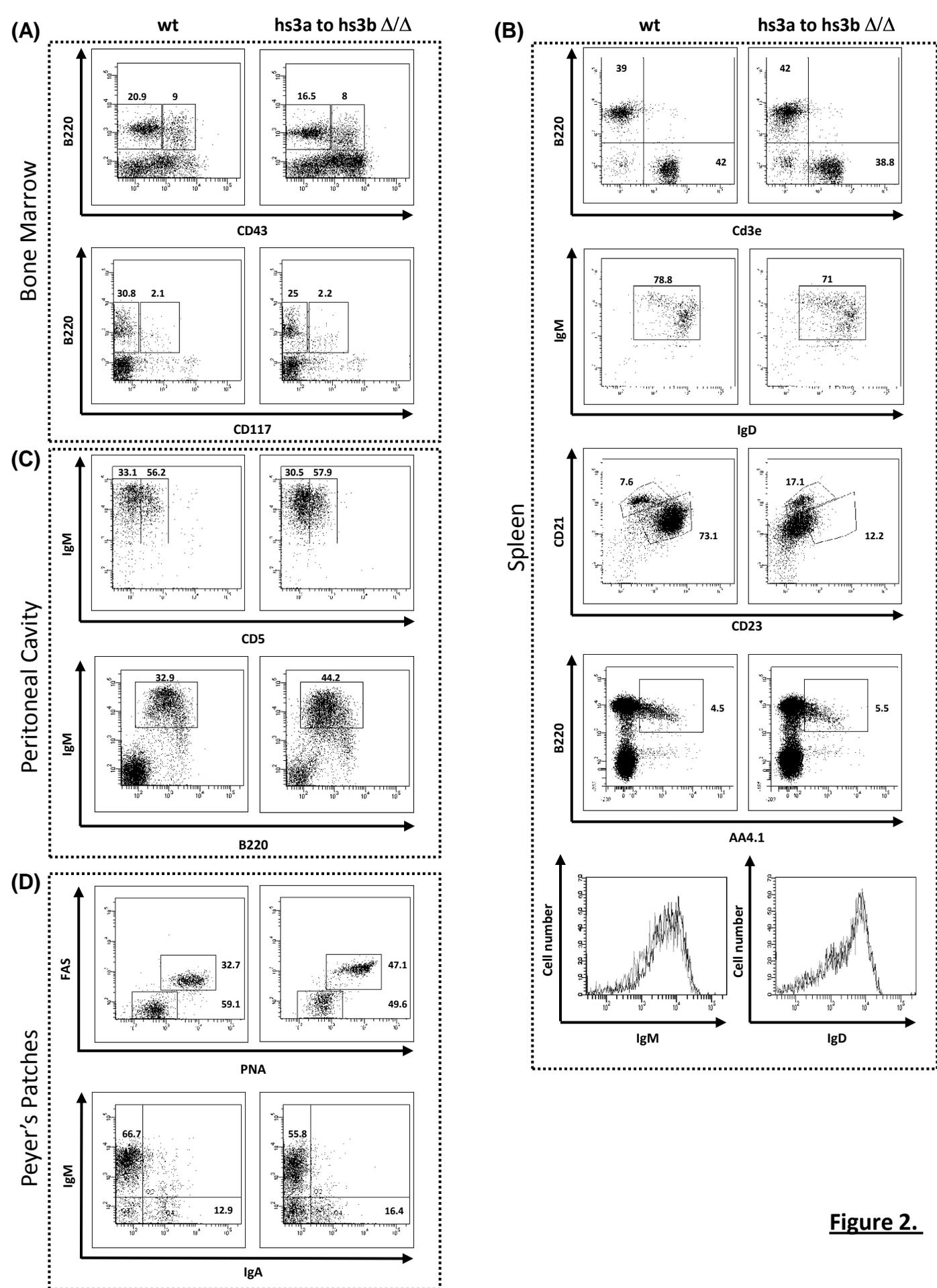


Figure 2.

Table1	wt	Δ/Δ mice	Significance
<i>Bone Marrow</i>			
Leucocytes (x10 ⁶)	68.54 ± 4.298 N=6	68.23 ± 2.960 N=6	NS
B220 ⁺ cells (x10 ⁶)	26.76 ± 4.307 N=5	18.76 ± 1.433 N=6	NS
IgM ⁻ /B220 ⁺ /CD43 ^{low} cells (x10 ⁶)	10.60 ± 1.760 N=6	7.413 ± 1.053 N=6	NS
IgM ⁻ /B220 ⁺ /CD43 ^{high} cells (x10 ⁶)	5.441 ± 1.096 N=6	4.090 ± 0.2812 N=6	NS
B220 ⁺ /CD117 ⁺ cells (x10 ⁶)	2.183 ± 0.1974 N=6	2.637 ± 0.9187 N=6	NS
B220 ⁺ /CD117 ⁻ cells (x10 ⁶)	22.71 ± 4.002 N=6	16.36 ± 1.704 N=6	NS
<i>Spleen</i>			
Leucocytes (x10 ⁶)	119.0 ± 10.75 N=14	114.7 ± 6.482 N=14	NS
B220 ⁺ cells (x10 ⁶)	50.60 ± 3.533 N=14	45.76 ± 3.492 N=14	NS
IgM ⁺ /IgD ⁺ cells (x10 ⁶)	40.97 ± 2.568 N=13	35.03 ± 2.205 N=14	NS
Marginal B cells (x10 ⁶)	5.759 ± 0.8356 N=14	9.925 ± 1.607 N=14	P = 0.0298
Follicular B cells (x10 ⁶)	36.51 ± 2.707 N=14	8.096 ± 1.033 N=14	P<0.0001
Transitional B cells (x10 ⁶)	7.588 ± 1.903 N=5	6.430 ± 2.092 N=5	NS
<i>Peritoneal Cavity</i>			
Leucocytes (x10 ⁶)	3.540 ± 0.4214 N=6	2.880 ± 0.5826 N=5	NS
B220 ⁺ cells (x10 ⁶)	1.403 ± 0.3028 N=6	1.405 ± 0.3846 N=5	NS
CD5 ⁺ /IgM ⁺ cells (x10 ⁶)	0.5924 ± 0.1002 N=5	0.4191 ± 0.1116 N=5	NS
CD5 ⁻ /IgM ⁺ cells (x10 ⁶)	1.076 ± 0.2745 N=5	0.8410 ± 0.2596 N=5	NS
<i>Peyer's Patches</i>			
Leucocytes (x10 ⁶)	10.58 ± 1.194 N=12	21.66 ± 1.760 N=12	P<0.0001
B220 ⁺ cells (x10 ⁶)	6.540 ± 0.8077 N=12	12.49 ± 0.8993 N=12	P<0.0001
B220 ⁺ /IgA ⁺ cells (x10 ⁶)	0.5625 ± 0.1273 N=6	2.326 ± 0.2981 N=6	P = 0.0003
B220 ⁺ /IgM ⁺ cells (x10 ⁶)	2.828 ± 0.5269 N=6	7.838 ± 0.6091 N=6	P<0.0001
B220 ⁺ /PNA ^{low} /FAS ^{low} cells (x10 ⁶)	3.967 ± 0.4319 N=8	5.516 ± 0.6363 N=6	NS
B220 ⁺ /PNA ^{high} /FAS ^{high} cells (x10 ⁶)	2.513 ± 0.4518 N=8	4.728 ± 0.6232 N=6	P = 0.0120

Table 1. Bone Marrow and peripheral cell counts in *hs3a* to *hs3b* Δ/Δ and wt mice:

Absolute numbers are reported as mean ±SEM. Significance was assessed with Student T test

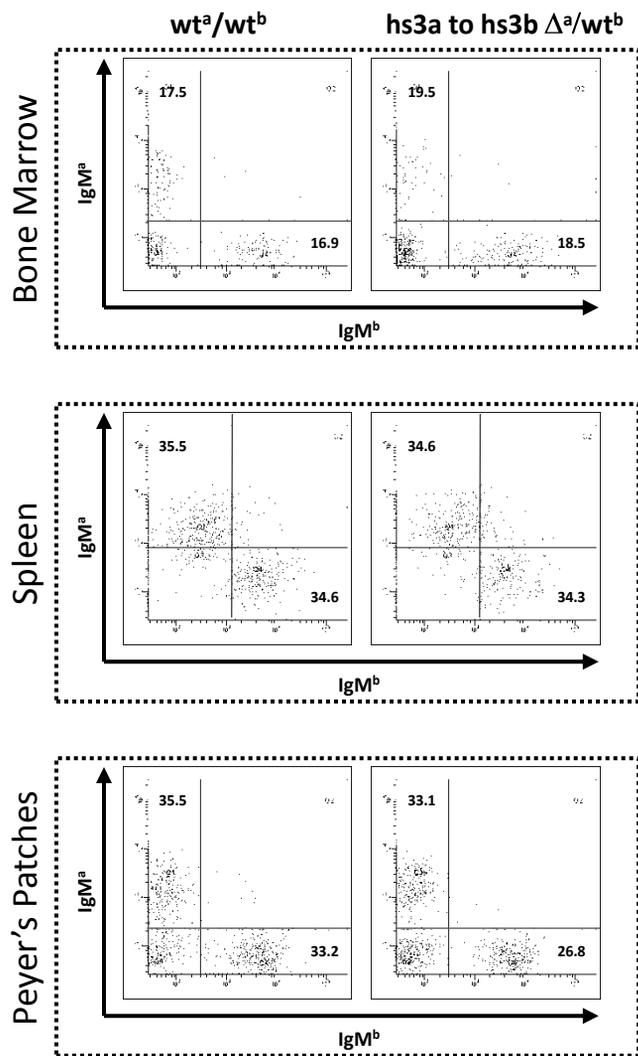


Figure 3. IgM allotype expression in heterozygous 129:C57Bl6 animals. Analysis of surface IgM^a expression in heterozygous *hs3a* to *hs3b*Δ^a/*wt*^b and control 129:C57Bl6 F1 in the bone marrow and spleen compartment. Cells were labeled with APC-anti-B220, FITC-anti-IgM^a and PE-anti-IgM^b.

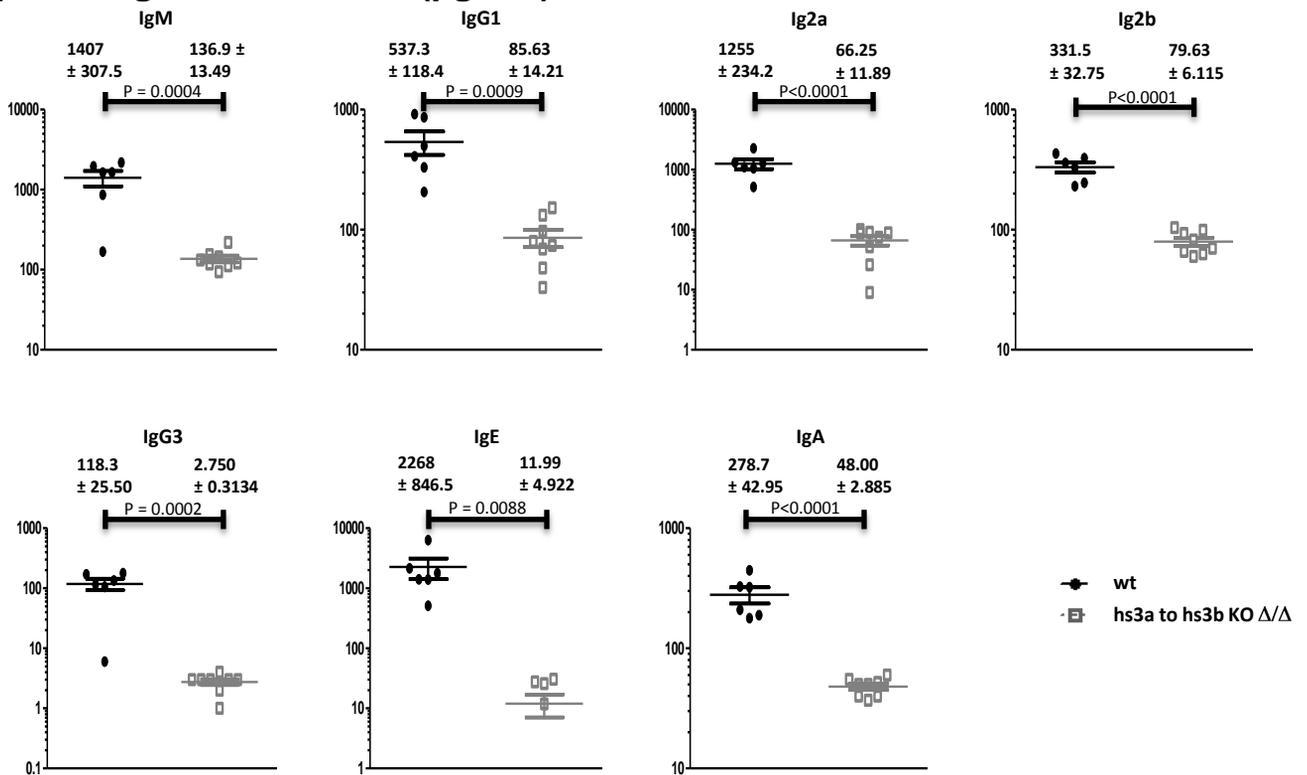
Figure 3.

Table 2	<i>wt</i> ^a / <i>wt</i> ^b	<i>hs3a</i> to <i>hs3b</i> Δ ^a / <i>wt</i> ^b	Significance
Bone Marrow			
B220 ⁺ cells (x10 ⁶)	24.79 ± 4.234 N=4	32.86 ± 5.926 N=4	NS
B220 ⁺ /IgM ^a ⁺ cells (x10 ⁶)	4.246 ± 0.6135 N=4	4.525 ± 0.6108 N=4	NS
B220 ⁺ /IgM ^b ⁺ cells (x10 ⁶)	4.180 ± 0.5438 N=4	4.597 ± 0.6066 N=4	NS
Spleen			
B220 ⁺ cells (x10 ⁶)	40.60 ± 7.521 N=4	57.23 ± 5.738 N=4	NS
B220 ⁺ /IgM ^a ⁺ cells (x10 ⁶)	15.80 ± 3.106 N=4	20.71 ± 2.019 N=4	NS
B220 ⁺ /IgM ^b ⁺ cells (x10 ⁶)	14.29 ± 2.536 N=4	20.23 ± 2.141 N=4	NS
Peyer's Patches			
Leucocytes	18.13 ± 0.9492 N=4	30.00 ± 5.103 N=4	NS
B220 ⁺ cells (x10 ⁶)	12.02 ± 0.6831 N=4	21.84 ± 3.656 N=4	p = 0.0386
B220 ⁺ /IgM ^a ⁺ cells (x10 ⁶)	4.226 ± 0.2683 N=4	7.121 ± 1.014 N=4	p = 0.0329
B220 ⁺ /IgM ^b ⁺ cells (x10 ⁶)	3.999 ± 0.2897 N=4	5.842 ± 0.9451 N=4	NS

Table 2. Splenic counts of B cells expressing IgM^a or IgM^b allotypes in heterozygous *hs3a* to *hs3b*Δ^a/*wt*^b and *wt*^a/*wt*^b mice:

Absolute numbers are reported as mean ± SEM. Significance was assessed with Student T test.

(A) Seric Ig concentration ($\mu\text{g/mL}$)



(B) Ovalbumine immunization halotype response

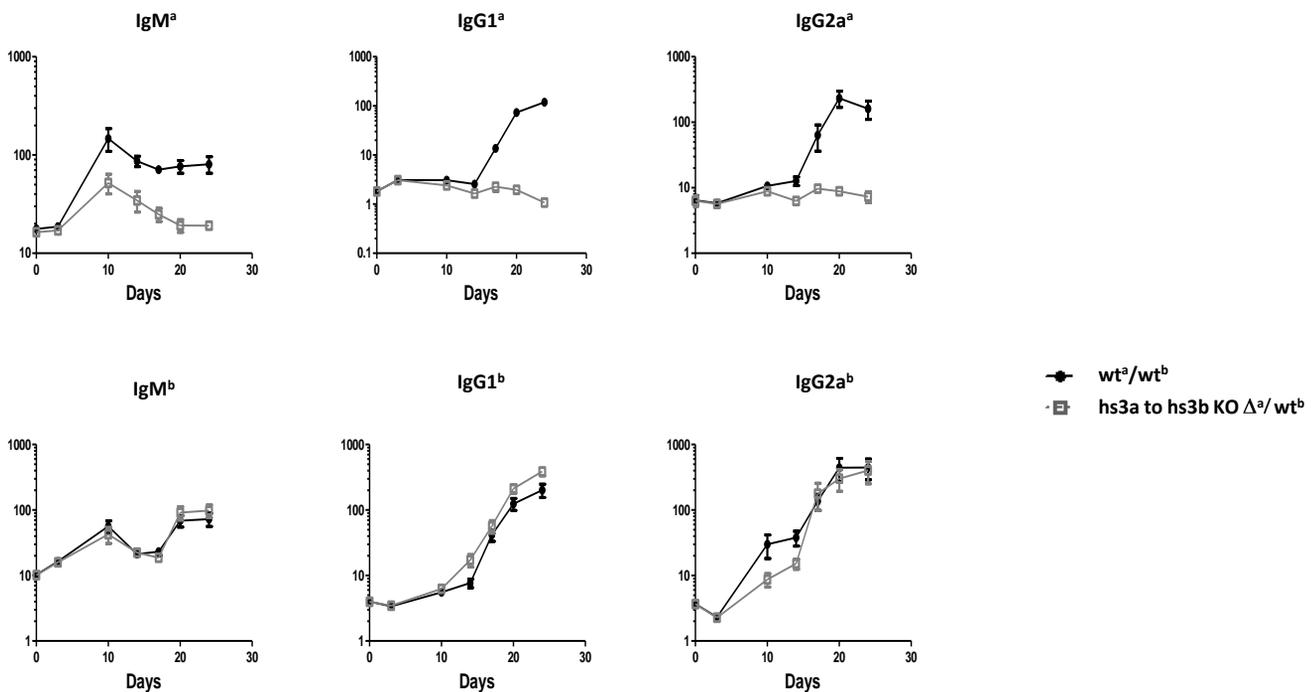


Figure 4.

(A) Serum Ig isotype level

ELISA analysis of immunoglobulin secretion in 8-week-old mice sera. WT littermates are shown on the left part of graphs, followed by homozygous *hs3a* to *hs3b* Δ/Δ . Mean and SEM are indicated for each case. Significant differences are indicated with p values, according to Student T test.

(B) Specific-antibody response in the serum of *hs3a* to *hs3b* Δ^a/wt^b mice immunized with ovalbumine

Antibody levels, detected by ELISA, are expressed in arbitrary units by comparison with a control serum. Time after immunization is indicated in days. Each point is the mean (\pm SEM) of serum determinations from five mutant and five *wt* mice. One representative experiment out of two is shown.

Figure 4.

Ig concentration in supernatant

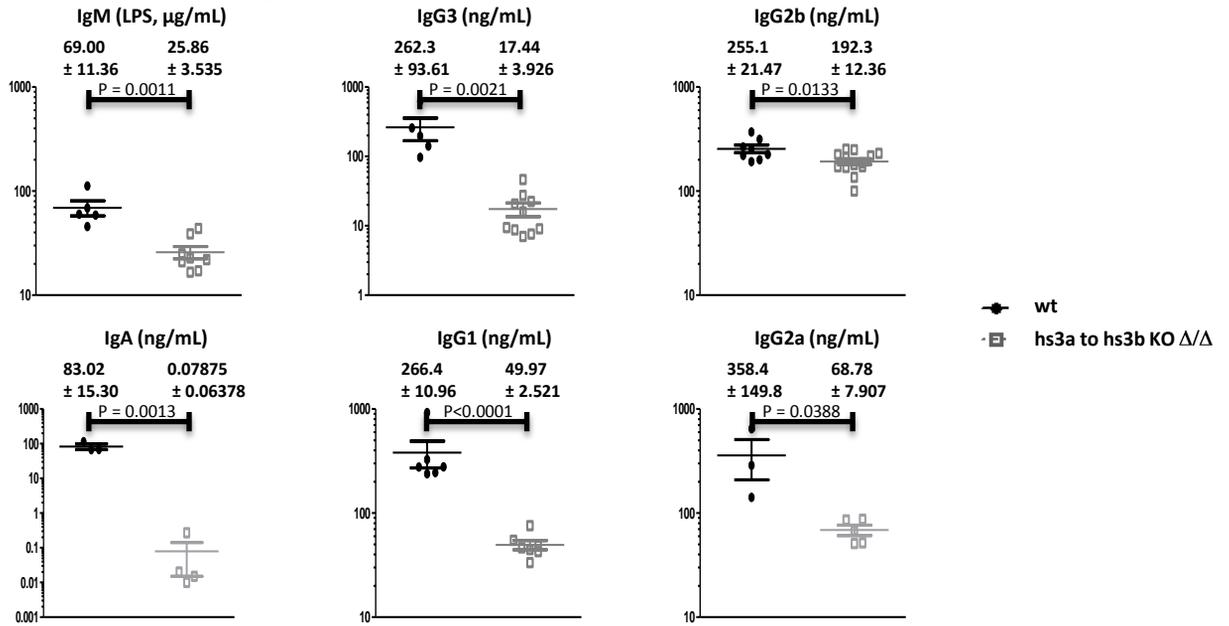


Figure 5. *In vitro* Ig secretion

ELISA analysis of immunoglobulin in supernatants of B cells cultured for 4 days with LPS with or without cytokines. Mean and SEM are indicated for each case. Significant differences are indicated with p values, according to Student T test.

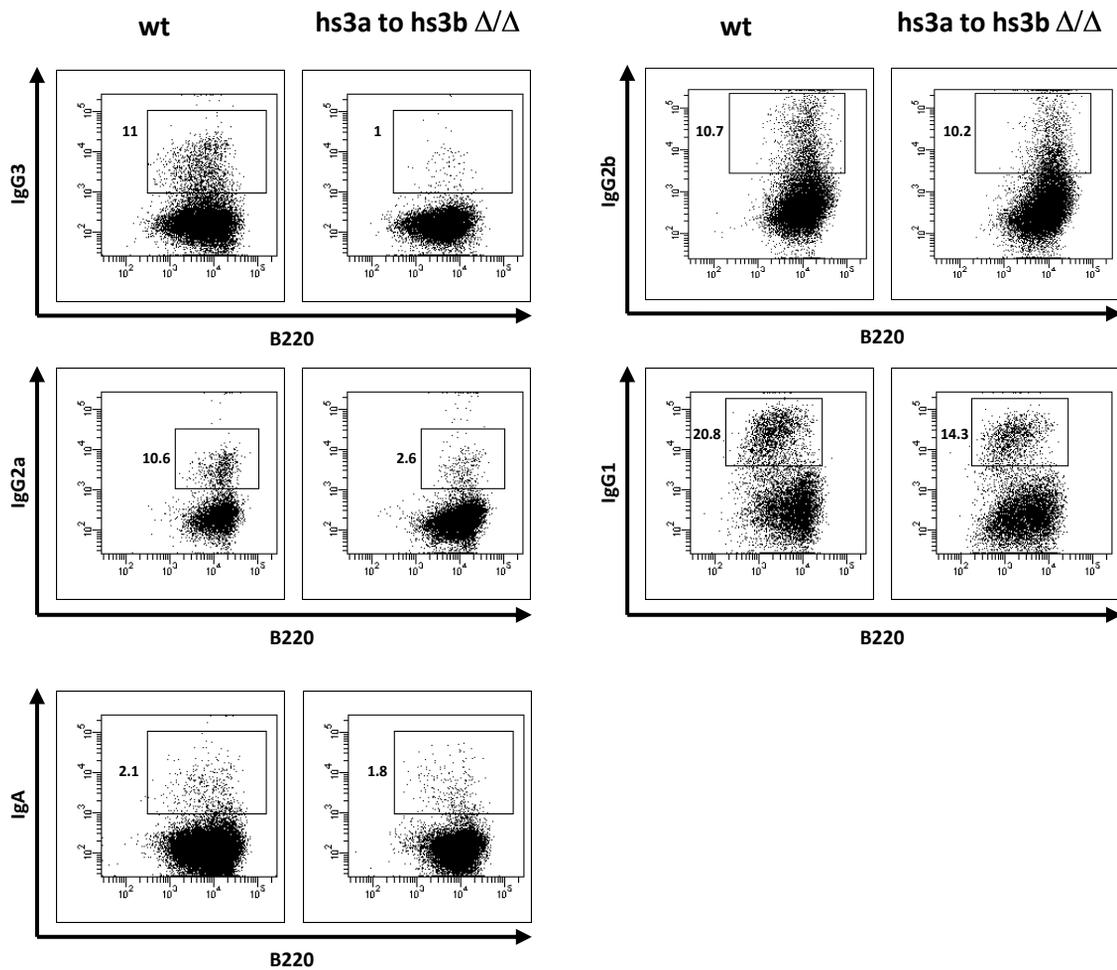


Figure 6. Surface immunoglobulin expression in activated splenic B cells.

Sorted splenic B cells were cultured for 4 days with LPS with or without cytokines at 1×10^6 cells/ml and stained with V450-anti-B220, APC-anti-B220, APC-anti-IgG1, PE-anti-IgG2b, FITC-anti-IgG3, FITC-anti-IgG2a and FITC-anti-IgA.

Figure 7. Somatic hypermutation of the IgH and IgKappa locus in *wt*, *hs3a* to *hs3b* Δ/Δ mice.

GC cell DNA was isolated from B220 PNA^{high}/FAS^{high} Peyer's patches cells of a non-immunized 8-wk-old animal.

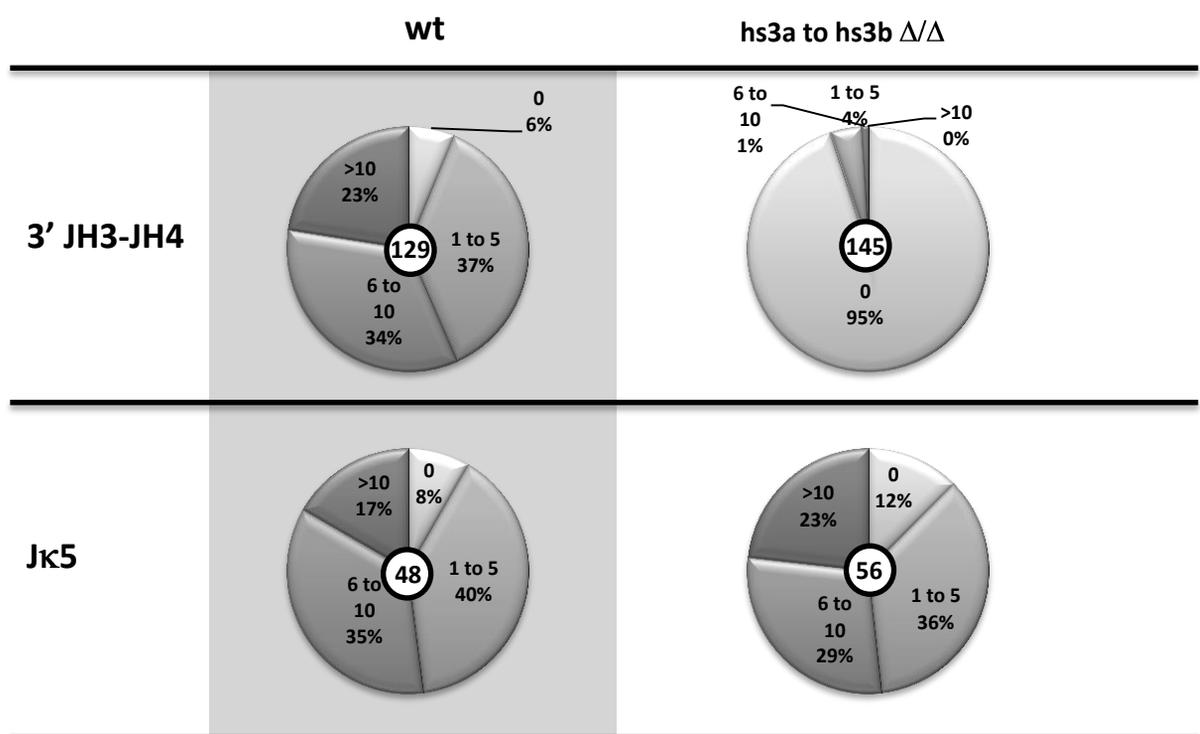
(A) Pie plots showing the percentage of the total number of clones for each percentage group (proportional to the area in each slice); the total number of clones analyzed for each genotype is noted in the center.

(B) Number of mutations versus total length of DNA sequence analyzed, and the mutation frequency. Only sequences that contain at least one mutation were included, and clonally related sequences were excluded.

(C) Pattern of nucleotide substitutions. The table shows the percent of mutations for each type of nucleotide present in the germ-line sequence (vertical axis) to a different nucleotide (horizontal axis). The table below compares the ratio of mutations at dC-dG to those at dA-dT as well as the ratio of transitions: transversions substitutions at both dC-dG and dA-dT.

(D) Relative IgH transcripts : RT-qPCR was performed using IgH^{wt} probe and normalized with CD79a probe.

(A)



(B)

		Total number of sequences	Percentage of mutated sequences	Total length (bp) analysed	Number of mutations	Mutation Frequency (mutation per bp)
3' JH3-JH4	wt	129	93.8%	68841	902	0.01398
	hs3a to hs3b Δ/Δ	145	28.3%	77559	100	0.00458
Jk5	wt	48	91.7%	26592	296	0.0121431
	hs3a to hs3b Δ/Δ	56	87.5%	31024	346	0.0127459

(C)

wt	G	A	T	C	TOTAL
G		14.41%	5.32%	8.76%	28.49%
A	16.08%		10.42%	8.54%	35.03%
T	4.66%	6.21%		10.75%	21.62%
C	3.77%	2.00%	9.09%		14.86%

hs3a to hs3b Δ/Δ	G	A	T	C	TOTAL
G		16.00%	4.00%	3.00%	23.00%
A	24.00%		6.00%	8.00%	38.00%
T	2.00%	11.00%		19.00%	32.00%
C	1.00%	0.00%	6.00%		7.00%

(D)

	Mutations at dC/dG: mutation at dA/dT	Transitions: transversions at dC/dG	Transitions: transversions at dA/dT
wt	43,35/56,65	65,2/34,78	60/40
hs3a to hs3b Δ/Δ	30/70	73,3/26,7	61,4/38,6

(E)

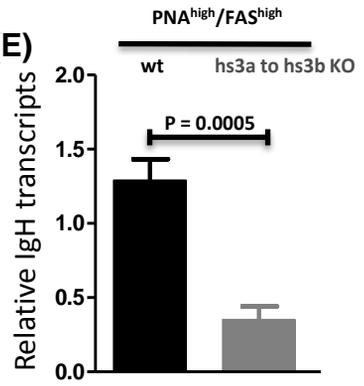


Figure 7.

DISCUSSION-PERSPECTIVES

Afin d'étudier le rôle des éléments régulateurs du locus IgH et plus particulièrement les régions $E\mu$ et 3'RR, nous avons établi trois modèles KO.

Etude de la région $E\mu$

L'élément régulateur $E\mu$ fût le premier activateur transcriptionnel décrit chez les eucaryotes (Banerji et al., 1983; Gillies et al., 1983). Depuis sa découverte, la réalisation de nombreux modèles d'étude a permis d'établir un rôle essentiel de la région $E\mu$ lors du développement B précoce. En effet, la délétion de $cE\mu$ chez la souris entraîne une sévère diminution de l'efficacité des recombinaisons VDJ (Chen et al., 1993; Serwe and Sablitzky, 1993; Sakai et al., 1999; Perlot et al., 2005; Afshar et al., 2006). Le KO de l'activateur intronique induit un sévère blocage des recombinaisons D_H vers J_H sans toutefois bloquer le développement des cellules lymphocytaires B (Perlot et al., 2005). La délétion du $cE\mu$ et de ses MARs n'aggrave pas le phénotype, de plus la délétion des MARs $_{E\mu}$ seules ne provoque pas de diminution des recombinaisons VDJ. Nous avons confirmé grâce à nos deux modèles KO (full length $E\mu$ et MARs $_{E\mu}$) que le « core » activateur seul est essentiel au bon déroulement des recombinaisons. Nos études confirment également que les régions flanquantes MARs $_{E\mu}$ sont dispensables à ces processus. L'activateur intronique $cE\mu$, par le contrôle de la transcription germinale « $\mu 0$ », favorise l'accessibilité des régions D_H et J_H pour les premières étapes de réarrangement de D vers J (Perlot et al., 2005). De même, Bolland et collaborateur montrent que la diminution des réarrangements est corrélée à une diminution de la transcription antisens dans la région D_H (Bolland et al., 2007).

Les réarrangements VDJ étant largement compromis par la délétion de la région $E\mu$ (modèle KO full length $E\mu$), nous avons également vérifié si cette mutation affectait le répertoire B pré-immun. Nous avons ainsi constaté que l'usage des différents segments V_H n'est pas modifié par la mutation. Ce constat indique que, bien qu'influençant la fréquence et l'efficacité des recombinaisons VDJ, la région $E\mu$ (vraisemblablement le $cE\mu$) ne participe pas au choix des segments à réarranger (V_H en l'occurrence). Ce résultat peut paraître étonnant car selon différents auteurs, l'activateur intronique $cE\mu$ est impliqué dans la

réalisation de boucles permettant le rapprochement des différents segments V_H , D_H et J_H (Jhunjunwala et al., 2008; Guo, Gerasimova, et al., 2011; Verma-Gaur et al., 2012). Guo et collaborateurs montrent que la contraction permettant le rapprochement des segments D_H - J_H est dépendante de $cE\mu$, sa délétion entraînant en effet une diminution des interactions (Guo, Gerasimova, et al., 2011). Cependant, il semble que ces interactions physiques (boucles) observées au sein du locus n'entraînent pas systématiquement la transcription des régions impliquées : des données plus anciennes montrent en effet que la délétion du $cE\mu$ ou de la région $MAR_{E\mu}$ 5' - $cE\mu$ n'affecte pas la transcription germinale des segments V_H (Bolland et al., 2007; Chakraborty et al., 2009).

L'ensemble des modèles précédents indiquent que l'efficacité de la recombinaison VDJ (dépendante de l'activateur $E\mu$) peut être corrélée au rapprochement physique entre les régions impliquées ; l'analyse de nos modèles indique cependant que le choix de l'utilisation (aléatoire ?) des segments V_H est indépendant de ces interactions physiques.

Dans le but de préciser le rôle des éléments de la région $E\mu$ sur la transcription de la chaîne lourde d'immunoglobuline, nous envisageons d'étudier l'accessibilité du locus lors des recombinaisons VDJ dans nos souris KO et ce, uniquement sur l'allèle subissant les réarrangements. Pour cela, nous envisageons le croisement de nos modèles murins avec une lignée *Knock In fr-Vk* (Reynaud et al., 2005) chez qui, l'allèle portant la mutation est non fonctionnel, les réarrangements « en phase » étant impossible.

Un défaut partiel de recombinaison VDJ dans le modèle « full length $E\mu$ », n'abolit pas complètement le développement B et permet donc l'étude des compartiments B périphériques. Nous avons constaté que la délétion de cette région engendrait des déséquilibres conséquents sur les compartiments cellulaires B périphériques. Nous notons, comme il l'avait été observé lors de la délétion du $cE\mu$ (Perlot et al., 2005), une forte diminution du nombre de cellules B périphériques. Nous observons également un défaut de répartition des compartiments B périphériques en majorité dans la rate où le nombre de cellules B folliculaires est fortement diminué chez les souris KO « full length $E\mu$ ». Ce défaut n'est pas retrouvé chez les souris KO $MAR_{E\mu}$ qui présentent un développement B normal.

Nous avons recherché une relation de cause à effet entre la délétion de l'activateur intronique et l'orientation du développement B vers le compartiment de la zone marginale.

Il a été précédemment rapporté qu'une telle orientation phénotypique serait induite par une diminution de la « force » du signal du BCR (ou du pré-BCR). Selon le modèle proposé, les cellules B transitionnelles présentant une forte signalisation de leur BCR sont orientées vers le compartiment de la zone folliculaire alors que celles présentant une faible signalisation de leur BCR sont orientées vers le compartiment de la zone marginale (Pillai and Cariappa, 2009). Plusieurs modèles de souris transgéniques ou Knock-in chez lesquels une diminution de l'expression de la chaîne lourde est observée aux stades précoces du développement B présentent en effet une orientation vers le compartiment de la zone marginale (Li and Eckhardt, 2009; Li et al., 2010; Brenner et al., 2011). Nous avons dans ce sens observé que la suppression de la région $E\mu$ induit une diminution conséquente d'expression de la chaîne lourde au stade pré-B. Jusqu'à présent, les effets indirects liés à la délétion de la région intronique IgH sur le développement B périphérique n'étaient pas clairement décrits. Nous montrons par notre étude qu'un activateur transcriptionnel dont l'activité est restreinte aux stades précoces du développement B se révèle important pour l'équilibre des populations B périphériques. Les cellules B de la zone marginale sont particulièrement connues pour leur rôle central dans la réponse immunitaire T-indépendante. Nous avons recherché les conséquences de la délétion de la région $E\mu$ sur les réponses anticorps T-dépendantes et T-indépendantes. Après immunisation *in vivo*, les souris KO « full length $E\mu$ » ne montrent aucun défaut de réponse, suggérant que la forte proportion de cellules de la zone marginale chez ces animaux ne semble pas avoir d'impact sur leur capacité à développer des réponses immunes efficaces.

Un enrichissement de la zone marginale en cellules B auto-réactives est un phénotype observé dans des modèles de souris transgéniques et des modèles de souris auto-immunes (Chen et al., 1997; Li et al., 2002). De même, les cellules B de la zone marginales sont connues pour leur implication dans certaines pathologies auto-immunes comme le lupus (Wither et al., 2000). A ce titre, nous envisageons de rechercher la présence d'anticorps auto-réactifs dans le modèle KO « full length $E\mu$ ».

Le blocage partiel du développement B et ses conséquences sur l'afflux réduit de cellules B en périphérie caractérisant les animaux KO $cE\mu$ et full length $E\mu$ ont rendu l'analyse de l'hypermutation somatique assez difficile. Perlot et collaborateurs ont étudié ce processus chez les souris KO $cE\mu$ et identifié une diminution du nombre de séquences

mutées dans les cellules B du centre germinatif ; diminution corrélée à l'afflux réduit de cellules B en périphérie décrit précédemment. Cependant, dans ce modèle, la fréquence des mutations est comparable à celle observée chez les animaux contrôles (Perlot et al., 2005), ces résultats montrent que l'activateur transcriptionnel (« core ») de la région $E\mu$ n'est pas impliquée dans le ciblage de la région variable de la chaîne lourde par l'hypermutation somatique. Une autre étude, menée par l'équipe de L. Eckhardt, utilise un modèle de souris Knock-in combinant la délétion de $cE\mu$ et des MARs à un exon V_H préalablement réarrangé. Ces animaux ne présentent pas de diminution significative des mutations somatiques dans les cellules du centre germinatif des plaques de Peyer. Ce modèle met cependant en évidence l'implication de la région $E\mu$ au cours des réponses secondaires, en effet seules les cellules B ayant effectué la commutation de classe présentent un défaut d'hypermutation. (Li et al., 2010). Notre modèle KO « full length $E\mu$ » présente en revanche une diminution significative de la fréquence des hypermutations dans les cellules du centre germinatif. De façon inattendue, un phénotype identique est également observé pour notre modèle KO $MAR_{E\mu}$. Alors qu'aucun rôle n'avait clairement été attribué aux régions $MAR_{E\mu}$, nos modèles permettent d'affirmer que ces régions sont impliquées dans la régulation du processus hypermutation somatique au locus IgH.

Plus étonnamment, nos modèles ont mis en évidence un rôle des régions IgH $MAR_{E\mu}$ sur la régulation en « *trans* » de l'hypermutation somatique. En effet, leur délétion entraîne non seulement une diminution des mutations des régions variables au locus IgH mais aussi au locus des chaînes légères Ig κ . La manière dont les $MAR_{E\mu}$ régulent l'hypermutation en « *trans* » demeure inconnue. Nous envisageons d'étudier le positionnement nucléaire des allèles IgH et Ig κ dans les cellules du centre germinatif ($B220^+PNA^{high}FAS^{high}$). En effet, si les changements dynamiques de position des loci des gènes d'immunoglobuline ont été amplement décrits au cours du développement B précoce, aucune étude ne rapporte leur position dans les cellules effectuant l'hypermutation. Il est possible que les deux loci (IgH et Ig κ) soient co-localisés dans les cellules du centre germinatif, favorisant ainsi l'accessibilité simultanée d'AID aux deux loci. Les régions d'attachement à la matrice $MAR_{E\mu}$ pourraient être impliquées dans ce rapprochement. Il est également envisageable que la région équivalente au locus κ ($MAR_{E\kappa}$) collabore au processus. Ce schéma semble assez pertinent

car le KO de la région MAR_{EiK} indique un rôle *cis* activateur de cette région pour l'hypermutation somatique (Yi et al., 1999).

Cette étude nécessite la mise au point d'un protocole d'hybridation *in situ* fluorescente en 3 dimensions (FISH - 3D) sur des noyaux en interphase. Une collaboration a été établie avec le Dr Claire Francastel (UMR 7216 épigénétique & destin cellulaire).

Parmi les effecteurs protéiques potentiellement impliqués, quatre protéines (CUX/CDP, STAB1, STAB2 et BRIGHT/ARID3A) sont connues pour se fixer au niveau des $MAR_{E\mu}$ (Scheuermann and Chen, 1989; Dickinson et al., 1992; Herrscher et al., 1995; Dobрева, 2003). Il est légitime de poser la question du rôle éventuel de ces protéines lors de l'hypermutation somatique. SATB1 et CUX/CDP sont connues pour exercer des fonctions répressives ; SATB2 et BRIGHT/ARID3A sont quant à elles spécifiquement exprimées dans les cellules B mais leur niveau d'expression dans les cellules du centre germinatif n'a pas été exploré. Après avoir défini le profil d'expression de ces facteurs dans les cellules B du centre germinatif, nous envisageons de réprimer le ou les facteurs d'intérêt dans un système biologique permettant de mesurer la fréquence des hypermutations somatiques, par exemple la lignée cellulaire BL2 stimulée dans des conditions déjà décrites (Denépoux et al., 1997; Faili et al., 2002).

Etude de la région régulatrice 3'

La 3'RR est une structure complexe comprenant quatre activateurs transcriptionnels dont la fonction n'est pas encore entièrement élucidée. Cette région large de 25 kb présente une structure quasi-palindromique, comprenant l'activateur central hs1,2 entouré de séquences inversées et répétées, qui incluent les activateurs hs3a et hs3b. L'activateur hs4 est situé en dehors de cette structure, à 2kb de la fin du quasi-palindrome. Contrairement aux activateurs transcriptionnels inclus dans le palindrome, hs4 est actif non seulement dans les cellules B matures et les plasmocytes mais dès le stade pro-B (Garrett et al., 2005).

La grande majorité des études menées sur la 3'RR été menée aussi bien grâce à des lignées cellulaires que des modèles de souris transgéniques. Quelques études ont évalué l'effet direct de la délétion des activateurs transcriptionnels en 3'du locus IgH. Le KO des activateurs hs1,2 et hs3a indiquent qu'ils ne sont pas indispensables aux processus de

recombinaison de classe, d'hypermutation somatique ou bien à la production d'immunoglobulines (Manis, van der Stoep, et al., 1998). Par contre la délétion conjointe des éléments *hs3b* et *hs4* entraîne une diminution de l'expression du BCR au sein des cellules B au repos associée à une diminution de la transcription germinale, de la recombinaison de classe pour tous les isotypes à l'exception d'IgG1 (Pinaud et al., 2001). Toutefois, l'hypermutation somatique n'est pas affectée par cette délétion (Morvan et al., 2003) alors qu'une étude précédente menée sur des souris transgéniques indiquait que les éléments *hs3b* et *hs4* favorisaient ce processus (Terauchi et al., 2001). En complément de l'étude de délétion conjointe *hs3b-hs4*, les délétions individuelles des éléments *hs3b* ou *hs4* ont été réalisées sans provoquer de défaut de recombinaison de classe (Vincent-Fabert et al., 2009; Bebin et al., 2010). Ces multiples études par KO suggèrent qu'il existe une redondance fonctionnelle des éléments de la région 3'RR. Récemment la délétion complète de la 3'RR a été réalisée, elle confirme l'importance de cette région lors des stades B tardifs (Vincent-Fabert et al., 2010). La région 3'RR est indispensable à la CSR car elle module la transcription germinale (et par conséquent l'accessibilité aux recombinaisons) des régions switch précédant cet événement. La région 3'RR semble également impliquée dans la production d'immunoglobulines (y compris l'IgM, indépendamment du mécanisme de CSR) (Vincent-Fabert et al., 2010), ce constat suggère également que la transcription de la chaîne lourde d'immunoglobuline au stade plasmocyte serait régulée par cette région. Au jour d'aujourd'hui et malgré les nombreux modèles d'étude disponibles, il est encore difficile d'aborder la fonction précise de chaque élément régulateur constituant la 3'RR (activateurs transcriptionnels, régions répétées inversées). La redondance entre éléments, les synergies possibles et les interactions que ces derniers peuvent assurer avec d'autres éléments situés à distance par exemple $E\mu$ (Wuerffel et al., 2007) rendent ces études fonctionnelles particulièrement complexes. La question du rôle de la structure quasi-palindromique dans l'activité de la 3'RR, conservée au sein de nombreuses espèces, reste une question particulièrement pertinente qu'il convient de continuer à (Sepulveda et al., 2005; D'Addabbo et al., 2011).

Notre hypothèse des « deux entités » de la 3'RR (que nous envisageons être le quasi-palindrome et l'élément distal *hs4*) est étayée par les résultats préliminaires du modèle de délétion (*hs3a to hs3b*Δ) présentés ici : notre modèle KO constitue une nouvelle pièce du

puzzle et apporte un début de réponse. Comme observé lors des précédents modèles KO (Manis, van der Stoep, et al., 1998; Pinaud et al., 2001; Vincent-Fabert et al., 2009, 2010; Bebin et al., 2010), nous confirmons que notre délétion n'affecte en rien le développement B précoce. La diminution d'expression d'IgM (et par conséquent du BCR) à la surface des cellules B matures au repos décrite dans les modèles KO supprimant *hs4* (Pinaud et al., 2001; Vincent-Fabert et al., 2009) n'est au contraire pas constatée dans notre modèle supprimant le quasi-palindrome. Notre étude semble confirmer que *hs4* (le seul activateur 3' conservé dans notre modèle) est un élément clef permettant une expression optimale de la chaîne lourde μ dans les cellules B au repos. L'interaction physique entre la région 3'RR et $E\mu$ ayant été précédemment mise en évidence récemment (Ju et al., 2007; Wuerffel et al., 2007; Guo, Gerasimova, et al., 2011), *hs4* apparaîtrait comme le candidat idéal impliqué dans la régulation du promoteur de la chaîne lourde au stade B mature.

De façon surprenante, notre modèle présente un phénotype inattendu affectant les sous populations B de la rate. Nous observons une diminution drastique du nombre de cellules B de la zone folliculaire (diminution d'environ 4 fois chez les souris KO) et une augmentation modeste du compartiment des cellules B de la zone marginale. L'origine de ces déséquilibres reste encore à déterminer. Le développement des cellules B dans la moelle ne présentant pas de défaut évident, il est possible que la suppression de la région quasi-palindromique affecte l'expression de la chaîne lourde aux stades B immatures. Nous envisageons d'étudier avec précision l'expression de la chaîne lourde μ et la signalisation du BCR aux stades B immatures ; il est en effet admis que la nature et la force de ces signaux modulent le devenir des sous-populations B périphériques (Pillai and Cariappa, 2009).

L'analyse des plaques de Peyer des souris *hs3a to hs3b Δ* montre une augmentation du nombre de cellules B. Dans le but de rechercher un éventuel avantage conféré par la mutation pour la colonisation de ces organes, nous avons analysé la colonisation des plaques de Peyer d'animaux hétérozygotes *hs3a to hs3b Δ^a /wt^b* par un marquage des allotypes d'IgM. Ce marquage a révélé une contribution égale des cellules B exprimant les deux allotypes.

L'analyse de la commutation de classe *in vivo* chez des souris KO pour la totalité de la 3'RR a démontré l'importance capitale de cette région dans ce processus. Tous les isotypes



sont en effet affectés par cette mutation bien que $\gamma 1$, l'isotype majeur chez la souris, soit le moins touché (Vincent-Fabert et al., 2010). La délétion des trois activateurs transcriptionnels de la région quasi-palindromique, entraîne un défaut de CSR proche de celui observé pour le KO complet (tous les isotypes sont affectés, y compris $\gamma 1$). Nous pouvons conclure que l'activateur hs4, situé en dehors du quasi-palindrome n'intervient pas dans le processus de CSR ou que sa seule présence ne suffit pas à compléter la perte des 3 autres activateurs. De même, les souris mutantes présentent un profond déficit de réponse anticorps après une immunisation T-dépendante. L'analyse *in vitro* de la commutation de classe semble confirmer le défaut de CSR observé *in vivo*, cependant, l'effet de la mutation sur la CSR vers l'isotype $\gamma 2b$ reste à confirmer par des expériences complémentaires. Dans le but de rechercher l'origine du défaut de CSR chez les animaux mutants, la quantification précise des transcrits germinaux des régions switch reste à déterminer (par RT Q-PCR par exemple).

Les études de CSR *in vivo* s'accompagnent d'une diminution de la sécrétion d'Ig dans les surnageants de culture. A ce titre, au-delà d'un défaut de CSR, il est possible que la région quasi-palindromique influence également la synthèse des immunoglobulines (et la sécrétion) au stade plasmocyte. Cette hypothèse semble très probable car nous observons une conséquente diminution de la production d'IgM (d'un facteur 10) dans le sérum des animaux mutants ; ce défaut est également observé après immunisation. Nous envisageons d'étudier ce point précis par la quantification précise des transcrits de chaîne lourde dans les plasmocytes d'animaux mutants.

L'implication de la 3'RR a été étudiée ultérieurement à l'aide de transgènes. En 2009, Dunnick et collaborateurs étudient l'hypermutation somatique dans des souris transgéniques possédant un BAC dont la 3'RR est entièrement délétée. Cette délétion entraîne une réduction significative de l'hypermutation somatique qui serait directement corrélée à une diminution du taux de transcription (Dunnick et al., 2009). L'analyse de l'hypermutation somatique a également été réalisée sur le modèle de souris KO pour les éléments hs3b et hs4 chez lesquels les auteurs n'ont alors pas identifié de diminution de SHM (Morvan et al., 2003). Dans le cas des délétions d'élément isolé de la 3'RR, il semble possible que la redondance des activateurs de cette région suffise à assurer un niveau suffisant de mutations (car assurant un niveau suffisant de transcription). Dans notre étude,

nous montrons que la délétion de la région quasi-palindromique suffit à diminuer drastiquement l'hypermutation somatique, en corrélation avec une diminution de la transcription, tout comme Dunnick et collaborateurs, l'avaient précédemment observé dans leur modèle dépourvu de l'intégralité la 3'RR. L'activateur hs4 ne semble pas avoir la faculté à lui seul de remplacer les fonctions remplies par les 3 activateurs du quasi-palindrome. Dans le cas de la SHM, notre modèle supprime-t-il un nombre trop important d'éléments pour que l'activateur restant (hs4) compense la perte occasionnée ? Ou bien est-ce l'importance de la structure semi-palindromique qui est en cause ?

Bien que notre modèle de délétion conforte l'hypothèse des « deux entités » de la région 3'RR par des similitudes avec le modèle de délétion totale, la question du rôle de la structure quasi-palindromique (en dehors des éléments « core activateurs ») reste posée.



ANNEXES

Annexe 1:

Regulatory Element HS3b in the Mouse *In Vivo* Redundant Function of the 3'IgH.

Anne-Gaëlle Bébin, Claire Carrion, Marie Marquet, Nadine Cogné, Sandrine Lecardeur, Michel Cogné and Eric Pinaud.

The Journal of immunology 2010, volume 184, numéro 7, pages 3710-3717

Annexe 2:

The IgH Locus 3' Regulatory Region: Pulling the Strings from Behind.

Eric Pinaud, Marie Marquet, Rémi Fiancette, Sophie Péron, Christelle Vincent-Fabert, Yves Denizot, and Michel Cogné.

Advances in Immunology 2011, Volume 110, pages 27-70.

Annexe 3:

The IgH 3' regulatory region controls transcription-coupled somatic hypermutation in germinal center B-cells

Running title: SHM in IgH 3'RR-deficient mice

Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Marie Marquet, Michel Cogné, Eric Pinaud, Yves Denizot

Annexe 1:

Regulatory Element HS3b in the Mouse *In Vivo* Redundant Function of the 3'IgH.

Anne-Gaëlle Bébin, Claire Carrion, Marie Marquet, Nadine Cogné, Sandrine Lecardeur, Michel Cogné and Eric Pinaud.

The Journal of immunology 2010, volume 184, numéro 7, pages 3710-3717.

New ImageStream^x Mark II

Cytometry without compromise



amnis[®]
part of EMD Millipore



In Vivo Redundant Function of the 3' *IgH* Regulatory Element HS3b in the Mouse

Anne-Gaëlle Bébin, Claire Carrion, Marie Marquet, Nadine Cogné, Sandrine Lecardeur, Michel Cogné and Eric Pinaud

This information is current as of July 24, 2012.

J Immunol 2010; 184:3710-3717; Prepublished online 22 February 2010;

doi: 10.4049/jimmunol.0901978

<http://www.jimmunol.org/content/184/7/3710>

References This article **cites 32 articles**, 19 of which you can access for free at:
<http://www.jimmunol.org/content/184/7/3710.full#ref-list-1>

Subscriptions Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscriptions>

Permissions Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.
Copyright © 2010 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



Annexe 2:

The IgH Locus 3' Regulatory Region: Pulling the Strings from Behind.

Eric Pinaud, Marie Marquet, Rémi Fiancette, Sophie Péron, Christelle Vincent-Fabert, Yves Denizot, and Michel Cogné.

Advances in Immunology 2011, Volume 110, pages 27-70.

Annexe 3:

The IgH 3' regulatory region controls transcription-coupled somatic hypermutation in germinal center B-cells

Running title: SHM in IgH 3'RR-deficient mice

Pauline Rouaud, Christelle Vincent-Fabert, Rémi Fiancette, Marie Marquet, Michel Cogné,
Eric Pinaud, Yves Denizot

The IgH 3' regulatory region controls transcription-coupled somatic hypermutation in germinal center B-cells

Running title: SHM in IgH 3'RR-deficient mice

Pauline Rouaud,¹ Christelle Vincent-Fabert,^{1,2} Rémi Fiancette,^{1,3} Marie Marquet,¹ Michel Cogné,¹ Eric Pinaud,¹ Yves Denizot¹

¹UMR CNRS 7276, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Limoges, France

²Present address: Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U891, 13009 Marseille, France.

³Present address: Medical Research Council, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK

Address correspondence and reprint requests to Dr. Yves Denizot, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 7276, Laboratoire d'Immunologie, 2, rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France. E-mail address: yves.denizot@unilim.fr 

Abbreviations used in this paper: RR, regulatory region; Ig, immunoglobulin; CSR, class switch recombination; SHM; somatic hypermutation; *wt*, wild type

Keywords: B cells, IgH 3' regulatory enhancers, knock-out mice, Somatic hypermutation, AID

BIBLIOGRAPHIE

- Afshar, R., Pierce, S., Bolland, D.J., Corcoran, A., 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, 2439–2447.
- Ahnesorg, P., Smith, P., Jackson, S.P., 2006. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* 124, 301–313.
- Alessandrini, A., Desiderio, S.V., 1991. Coordination of immunoglobulin DJH transcription and D-to-JH rearrangement by promoter-enhancer approximation. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2096–2107.
- Allman, D., Lindsley, R.C., DeMuth, W., Rudd, K., Shinton, S.A., 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, 6834–6840.
- Allman, D.M., Ferguson, S.E., Cancro, M.P., 1992. Peripheral B cell maturation. I. Immature peripheral B cells in adults are heat-stable antigenhi and exhibit unique signaling characteristics. *The Journal of Immunology* 149, 2533–2540.
- Alt, F.W., Blackwell, T.K., Yancopoulos, G.D., 1987. Development of the primary antibody repertoire. *Science* 238, 1079–1087.
- Alugupalli, K.R., Leong, J.M., Woodland, R.T., Muramatsu, M., Honjo, T., Gerstein, R.M., 2004. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 21, 379–390.
- Alvarez, J.D., Yasui, D.H., Niida, H., Joh, T., Loh, D.Y., Kohwi-Shigematsu, T., 2000. The MAR-binding protein SATB1 orchestrates temporal and spatial expression of multiple genes during T-cell development. *Genes & development* 14, 521–535.
- An, G., Miner, C.A., Nixon, J.C., Kincade, P.W., Bryant, J., Tucker, P.W., Webb, C.F., 2010. Loss of Bright/ARID3a Function Promotes Developmental Plasticity. *STEM CELLS* 28, 1560–1567.
- Annweiler, A., Müller, U., Wirth, T., 1992. Functional analysis of defined mutations in the immunoglobulin heavy-chain enhancer in transgenic mice. *Nucleic acids research* 20, 1503–1509.
- Aoufouchi, S., Faili, A., Zober, C., D'Orlando, O., Weller, S., Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., 2008. Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *Journal of Experimental Medicine* 205, 1357–1368.
- Bachl, J., Carlson, C., Gray-Schopfer, V., Dessing, M., Olsson, C., 2001. Increased transcription levels induce higher mutation rates in a hypermutating cell line. *J. Immunol.* 166, 5051–5057.
- Banerji, J., Olson, L., Schaffner, W., 1983. A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy chain genes. *Cell* 33, 729–740.
- Basu, U., Chaudhuri, J., Alpert, C., Dutt, S., Ranganath, S., Li, G., Schrum, J.P., Manis, J.P., Alt, F.W., 2005. The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 438, 508–511.
- Bebin, A.-G., Carrion, C., Marquet, M., Cogne, N., Lecardeur, S., Cogne, M., Pinaud, E., 2010. In Vivo Redundant Function of the 3' IgH Regulatory Element HS3b in the Mouse. *The Journal of Immunology* 184, 3710–3717.

- Begum, N.A., Stanlie, A., Nakata, M., Akiyama, H., Honjo, T., 2012. The Histone Chaperone Spt6 Is Required for Activation-induced Cytidine Deaminase Target Determination through H3K4me3 Regulation. *Journal of Biological Chemistry* 287, 32415–32429.
- Berezney, R., Coffey, D.S., 1974. Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1410–1417.
- Bertolino, E., Reddy, K., Medina, K.L., Parganas, E., Ihle, J., Singh, H., 2005. Regulation of interleukin 7–dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5. *Nature Immunology* 6, 836–843.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Afshar, R., Featherstone, K., Oltz, E.M., Corcoran, A.E., 2007. Antisense Intergenic Transcription Precedes Igh D-to-J Recombination and Is Controlled by the Intronic Enhancer E. *Molecular and Cellular Biology* 27, 5523–5533.
- Bolland, D.J., Wood, A.L., Johnston, C.M., Bunting, S.F., Morgan, G., Chakalova, L., Fraser, P.J., Corcoran, A.E., 2004. Antisense intergenic transcription in V(D)J recombination. *Nat. Immunol.* 5, 630–637.
- Bosma, G.C., Kim, J., Urich, T., Fath, D.M., Cotticelli, M.G., Ruetsch, N.R., Radic, M.Z., Bosma, M.J., 2002. DNA-dependent protein kinase activity is not required for immunoglobulin class switching. *J. Exp. Med.* 196, 1483–1495.
- Bottaro, A., Lansford, R., Xu, L., Zhang, J., Rothman, P., 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, 665–674.
- Bottaro, A., Young, F., Chen, J., Serwe, M., Sablitzky, F., Alt, F.W., 1998. Deletion of the IgH intronic enhancer and associated matrix-attachment regions decreases, but does not abolish, class switching at the mu locus. *International immunology* 10, 799–806.
- Brenner, S., Drewel, D., Steinbart, T., Weisel, F., Härtel, E., Pöttsch, S., Welzel, H., Brandl, A., Yu, P., Mudde, G.C., Schweizer, A., Nitschke, L., Winkler, T.H., 2011. A hypomorphic IgH-chain allele affects development of B-cell subsets and favours receptor editing. *EMBO J.* 30, 2705–2718.
- Buchanan, K.L., Smith, E.A., Dou, S., Corcoran, L.M., Webb, C.F., 1997. Family-specific differences in transcription efficiency of Ig heavy chain promoters. *J. Immunol.* 159, 1247–1254.
- Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondanèche, M.-C., Sanal, O., Plebani, A., Stéphan, J.-L., Hufnagel, M., le Deist, F., Fischer, A., Durandy, A., de Villartay, J.-P., Revy, P., 2006. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124, 287–299.
- Calame, K.L., 2001. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat. Immunol.* 2, 1103–1108.
- Calame, K.L., Lin, K.-I., Tunyaplin, C., 2003. Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 205–230.
- Callén, E., Jankovic, M., Wong, N., Zha, S., Chen, H.-T., Difilippantonio, S., Di Virgilio, M., Heidkamp, G., Alt, F.W., Nussenzweig, A., Nussenzweig, M., 2009. Essential role for DNA-PKcs in DNA double-strand break repair and apoptosis in ATM-deficient lymphocytes. *Mol. Cell* 34, 285–297.
- Casellas, R., Nussenzweig, A., Wuerffel, R., Pelanda, R., Reichlin, A., Suh, H., Qin, X.F., Besmer, E., Kenter, A., Rajewsky, K., Nussenzweig, M.C., 1998. Ku80 is required for immunoglobulin isotype switching. *EMBO J.* 17, 2404–2411.
- Cerutti, A., Puga, I., Cols, M., 2011. Innate control of B cell responses. *Trends in Immunology* 32, 202–211.

- Chakraborty, T., Chowdhury, D., Keyes, A., Jani, A., Subrahmanyam, R., Ivanova, I., Sen, R., 2007. Repeat Organization and Epigenetic Regulation of the DH-C μ Domain of the Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Locus. *Molecular Cell* 27, 842–850.
- Chakraborty, T., Perlot, T., Subrahmanyam, R., Jani, A., Goff, P.H., Zhang, Y., Ivanova, I., Alt, F.W., Sen, R., 2009. A 220-nucleotide deletion of the intronic enhancer reveals an epigenetic hierarchy in immunoglobulin heavy chain locus activation. *Journal of Experimental Medicine* 206, 1019–1027.
- Chaudhuri, J., Khuong, C., Alt, F.W., 2004. Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* 430, 992–998.
- Chaudhuri, J., Tian, M., Khuong, C., Chua, K., Pinaud, E., Alt, F.W., 2003. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422, 726–730.
- Chaumeil, J., Skok, J.A., 2012. The role of CTCF in regulating V(D)J recombination. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 153–159.
- Chauveau, C., Cogné, M., 1996. Palindromic structure of the IgH 3' locus control region. *Nat. Genet.* 14, 15–16.
- Chauveau, C., Jansson, E., Müller, S., Cogné, M., 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. *The Journal of Immunology* 163, 4637–4641.
- Chauveau, C., Pinaud, E., Cogné, M., 1998. Synergies between regulatory elements of the immunoglobulin heavy chain locus and its palindromic 3' locus control region. *Eur. J. Immunol.* 28, 3048–3056.
- Chen, J., Young, F., Bottaro, A., Stewart, V., Smith, R.K., Alt, F.W., 1993. Mutations of the intronic IgH enhancer and its flanking sequences differentially affect accessibility of the JH locus. *EMBO J.* 12, 4635–4645.
- Chen, X., Martin, F., Forbush, K.A., Perlmutter, R.M., Kearney, J.F., 1997. Evidence for selection of a population of multi-reactive B cells into the splenic marginal zone. *Int. Immunol.* 9, 27–41.
- Chowdhury, D., Sen, R., 2001. Stepwise activation of the immunoglobulin heavy chain gene locus. *The EMBO journal* 20, 6394–6403.
- Chowdhury, D., Sen, R., 2003. Transient IL-7/IL-7R signaling provides a mechanism for feedback inhibition of immunoglobulin heavy chain gene rearrangements. *Immunity* 18, 229–241.
- Chowdhury, D., Sen, R., 2004. Regulation of immunoglobulin heavy-chain gene rearrangements. *Immunol. Rev.* 200, 182–196.
- Chung, J.B., Sater, R.A., Fields, M.L., Erikson, J., Monroe, J.G., 2002. CD23 defines two distinct subsets of immature B cells which differ in their responses to T cell help signals. *Int. Immunol.* 14, 157–166.
- Chung, J.B., Silverman, M., Monroe, J.G., 2003. Transitional B cells: step by step towards immune competence. *Trends Immunol.* 24, 343–349.
- Cobaleda, C., Schebesta, A., Delogu, A., Busslinger, M., 2007. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat. Immunol.* 8, 463–470.
- Cockerill, P.N., 1990. Nuclear matrix attachment occurs in several regions of the IgH locus. *Nucleic acids research* 18, 2643–2648.
- Cogné, M., Lansford, R., Bottaro, A., Zhang, J., Gorman, J., Young, F., Cheng, H.L., Alt, F.W., 1994. A class switch control region at the 3' end of the immunoglobulin heavy chain locus. *Cell* 77, 737–747.

- Cook, A.J.L., Oganessian, L., Harumal, P., Basten, A., Brink, R., Jolly, C.J., 2003. Reduced switching in SCID B cells is associated with altered somatic mutation of recombined S regions. *J. Immunol.* 171, 6556–6564.
- D’Addabbo, P., Scascitelli, M., Giambra, V., Rocchi, M., Frezza, D., 2011. Position and sequence conservation in Amniota of polymorphic enhancer HS1.2 within the palindrome of IgH 3’Regulatory Region. *BMC Evol. Biol.* 11, 71.
- Daniel, J.A., Santos, M.A., Wang, Z., Zang, C., Schwab, K.R., Jankovic, M., Filsuf, D., Chen, H.-T., Gazumyan, A., Yamane, A., Cho, Y.-W., Sun, H.-W., Ge, K., Peng, W., Nussenzweig, M.C., Casellas, R., Dressler, G.R., Zhao, K., Nussenzweig, A., 2010. PTIP promotes chromatin changes critical for immunoglobulin class switch recombination. *Science* 329, 917–923.
- Dariavach, P., Williams, G.T., Campbell, K., Pettersson, S., Neuberger, M.S., 1991. The mouse IgH 3’-enhancer. *Eur. J. Immunol.* 21, 1499–1504.
- De Yébenes, V.G., Ramiro, A.R., 2010. MicroRNA activity in B lymphocytes. *Methods Mol. Biol.* 667, 177–192.
- Dean, A., 2006. On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends in Genetics* 22, 38–45.
- Degner, S.C., Verma-Gaur, J., Wong, T.P., Bossen, C., Iverson, G.M., Torkamani, A., Vettermann, C., Lin, Y.C., Ju, Z., Schulz, D., Murre, C.S., Birshtein, B.K., Schork, N.J., Schlissel, M.S., Riblet, R., Murre, C., Feeney, A.J., 2011. CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin influence the genomic architecture of the Igh locus and antisense transcription in pro-B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 9566–9571.
- Degner, S.C., Wong, T.P., Jankevicius, G., Feeney, A.J., 2009. Cutting edge: developmental stage-specific recruitment of cohesin to CTCF sites throughout immunoglobulin loci during B lymphocyte development. *J. Immunol.* 182, 44–48.
- Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili, A., Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., 2007. DNA polymerase eta is the sole contributor of A/T modifications during immunoglobulin gene hypermutation in the mouse. *J. Exp. Med.* 204, 17–23.
- Delpy, L., Decourt, C., Le Bert, M., Cogné, M., 2002. B cell development arrest upon insertion of a neo gene between JH and Emu: promoter competition results in transcriptional silencing of germline JH and complete VDJ rearrangements. *J. Immunol.* 169, 6875–6882.
- Delpy, L., Le Bert, M., Cogné, M., Khamlichi, A.A., 2003. Germ-line transcription occurs on both the functional and the non-functional alleles of immunoglobulin constant heavy chain genes. *Eur. J. Immunol.* 33, 2108–2113.
- Denépoux, S., Razanajaona, D., Blanchard, D., Meffre, G., Capra, J.D., Banchereau, J., Lebecque, S., 1997. Induction of somatic mutation in a human B cell line in vitro. *Immunity* 6, 35–46.
- Di Noia, J.M., Neuberger, M.S., 2007. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 1–22.
- Dickinson, L.A., Joh, T., Kohwi, Y., Kohwi-Shigematsu, T., 1992. A tissue-specific MARSAR DNA-binding protein with unusual binding site recognition. *Cell* 70, 631–645.
- Dobrev, G., 2003. SUMO modification of a novel MAR-binding protein, SATB2, modulates immunoglobulin gene expression. *Genes & Development* 17, 3048–3061.

BIBLIOGRAPHIE

- Dogan, I., Bertocci, B., Vilmon, V., Delbos, F., Mégret, J., Storck, S., Reynaud, C.-A., Weill, J.-C., 2009. Multiple layers of B cell memory with different effector functions. *Nat. Immunol.* 10, 1292–1299.
- Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., Alt, F.W., 2005. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv. Immunol.* 86, 43–112.
- Dunleavy, E., Pidoux, A., Allshire, R., 2005. Centromeric chromatin makes its mark. *Trends in biochemical sciences* 30, 172–175.
- Dunnick, W.A., Collins, J.T., Shi, J., Westfield, G., Fontaine, C., Hakimpour, P., Papavasiliou, F.N., 2009. Switch recombination and somatic hypermutation are controlled by the heavy chain 3' enhancer region. *J. Exp. Med.* 206, 2613–2623.
- Eaton, S., Calame, K., 1987. Multiple DNA sequence elements are necessary for the function of an immunoglobulin heavy chain promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7634–7638.
- Ebert, A., McManus, S., Tagoh, H., Medvedovic, J., Salvagiotto, G., Novatchkova, M., Tamir, I., Sommer, A., Jaritz, M., Busslinger, M., 2011. The distal V(H) gene cluster of the Igh locus contains distinct regulatory elements with Pax5 transcription factor-dependent activity in pro-B cells. *Immunity* 34, 175–187.
- Ernst, P., Smale, S.T., 1995. Combinatorial regulation of transcription II: The immunoglobulin mu heavy chain gene. *Immunity* 2, 427–438.
- Faili, A., Aoufouchi, S., Flatter, E., Guéranger, Q., Reynaud, C.-A., Weill, J.-C., 2002. Induction of somatic hypermutation in immunoglobulin genes is dependent on DNA polymerase iota. *Nature* 419, 944–947.
- Featherstone, K., Wood, A.L., Bowen, A.J., Corcoran, A.E., 2010. The mouse immunoglobulin heavy chain V-D intergenic sequence contains insulators that may regulate ordered V(D)J recombination. *J. Biol. Chem.* 285, 9327–9338.
- Felsenfeld, G., Groudine, M., 2003. Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.
- Ferrier, P., Krippel, B., Blackwell, T.K., Furley, A.J., Suh, H., Winoto, A., Cook, W.D., Hood, L., Costantini, F., Alt, F.W., 1990. Separate elements control DJ and VDJ rearrangement in a transgenic recombination substrate. *EMBO J.* 9, 117–125.
- Fuxa, M., 2004. Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Genes & Development* 18, 411–422.
- Garrett, F.E., Emelyanov, A.V., Sepulveda, M.A., Flanagan, P., Volpi, S., Li, F., Loukinov, D., Eckhardt, L.A., Lobanenko, V.V., Birshtein, B.K., 2005. Chromatin architecture near a potential 3' end of the igh locus involves modular regulation of histone modifications during B-Cell development and in vivo occupancy at CTCF sites. *Molecular and cellular biology* 25, 1511–1525.
- Gaszner, M., Felsenfeld, G., 2006. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 7, 703–713.
- Genetta, T., Ruezinsky, D., Kadesch, T., 1994. Displacement of an E-box-binding repressor by basic helix-loop-helix proteins: implications for B-cell specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Molecular and cellular biology* 14, 6153–6163.
- Giallourakis, C.C., Franklin, A., Guo, C., Cheng, H.-L., Yoon, H.S., Gallagher, M., Perlot, T., Andzelm, M., Murphy, A.J., Macdonald, L.E., Yancopoulos, G.D., Alt, F.W., 2010. Elements between the IgH variable (V) and diversity (D) clusters influence antisense

- transcription and lineage-specific V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 22207–22212.
- Giambra, V., Volpi, S., Emelyanov, A.V., Pflugh, D., Bothwell, A.L.M., Norio, P., Fan, Y., Ju, Z., Skoultchi, A.I., Hardy, R.R., Frezza, D., Birshtein, B.K., 2008. Pax5 and Linker Histone H1 Coordinate DNA Methylation and Histone Modifications in the 3' Regulatory Region of the Immunoglobulin Heavy Chain Locus. *Molecular and Cellular Biology* 28, 6123–6133.
- Giannini, S.L., Singh, M., Calvo, C.F., Ding, G., Birshtein, B.K., 1993. DNA regions flanking the mouse Ig 3'alpha enhancer are differentially methylated and DNAase I hypersensitive during B cell differentiation. *The Journal of Immunology* 150, 1772–1780.
- Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T., Tonegawa, S., 1983. A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell* 33, 717–728.
- Gluch, A., Vidakovic, M., Bode, J., 2008. Scaffold/matrix attachment regions (S/MARs): relevance for disease and therapy. *Handb Exp Pharmacol* 67–103.
- Goetze, S., Baer, A., Winkelmann, S., Nehlsen, K., Seibler, J., Maass, K., Bode, J., 2005. Performance of genomic bordering elements at predefined genomic loci. *Molecular and cellular biology* 25, 2260–2272.
- Gonda, H., Sugai, M., Nambu, Y., Katakai, T., Agata, Y., Mori, K.J., Yokota, Y., Shimizu, A., 2003. The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *J. Exp. Med.* 198, 1427–1437.
- 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., 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, 676–682.
- Goossens, T., Klein, U., Küppers, R., 1998. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2463–2468.
- Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J., Lopez, B.S., 2012. Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *Am J Cancer Res* 2, 249–268.
- Gregor, P.D., Morrison, S.L., 1986. Myeloma mutant with a novel 3' flanking region: loss of normal sequence and insertion of repetitive elements leads to decreased transcription but normal processing of the alpha heavy-chain gene products. *Mol. Cell. Biol.* 6, 1903–1916.
- Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M.F., Lieber, M.R., 2007. XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J.* 26, 1010–1023.
- Guglielmi, L., Le Bert, M., Comte, I., Dessain, M.L., Drouet, M., Ayer-Le Lievre, C., Cogné, M., Denizot, Y., 2003. Combination of 3' and 5' IgH regulatory elements mimics the B-specific endogenous expression pattern of IgH genes from pro-B cells to mature B cells in a transgenic mouse model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1642, 181–190.

- Guo, C., Gerasimova, T., Hao, H., Ivanova, I., Chakraborty, T., Selimyan, R., Oltz, E.M., Sen, R., 2011. Two Forms of Loops Generate the Chromatin Conformation of the Immunoglobulin Heavy-Chain Gene Locus. *Cell* 147, 332–343.
- Guo, C., Yoon, H.S., Franklin, A., Jain, S., Ebert, A., Cheng, H.-L., Hansen, E., Despo, O., Bossen, C., Vettermann, C., Bates, J.G., Richards, N., Myers, D., Patel, H., Gallagher, M., Schlissel, M.S., Murre, C., Busslinger, M., Giallourakis, C.C., Alt, F.W., 2011. CTCF-binding elements mediate control of V(D)J recombination. *Nature* 477, 424–430.
- Hartley, S.B., Cooke, M.P., Fulcher, D.A., Harris, A.W., Cory, S., Basten, A., Goodnow, C.C., 1993. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell* 72, 325–335.
- Heitz, E., 1928. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrb Wiss Botanik* 69, 762 – 818.
- Hentges, P., Ahnesorg, P., Pitcher, R.S., Bruce, C.K., Kysela, B., Green, A.J., Bianchi, J., Wilson, T.E., Jackson, S.P., Doherty, A.J., 2006. Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *J. Biol. Chem.* 281, 37517–37526.
- Herrscher, R.F., Kaplan, M.H., Lelsz, D.L., Das, C., Scheuermann, R., Tucker, P.W., 1995. The immunoglobulin heavy-chain matrix-associating regions are bound by Bright: a B cell-specific trans-activator that describes a new DNA-binding protein family. *Genes & Development* 9, 3067–3082.
- Hertz, M., Nemazee, D., 1997. BCR ligation induces receptor editing in IgM+IgD- bone marrow B cells in vitro. *Immunity* 6, 429–436.
- Hewitt, S.L., Yin, B., Ji, Y., Chaumeil, J., Marszalek, K., Tenthorey, J., Salvagiotto, G., Steinel, N., Ramsey, L.B., Ghysdael, J., Farrar, M.A., Sleckman, B.P., Schatz, D.G., Busslinger, M., Bassing, C.H., Skok, J.A., 2009. RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nat. Immunol.* 10, 655–664.
- Hosokawa, T., 1979. Studies on B-cell memory. II. T-cell independent antigen can induce B-cell memory. *Immunology* 38, 291–299.
- Hosokawa, T., Tanaka, Y., Aoike, A., Kawai, K., Muramatsu, S., 1984. Studies on B-cell memory. III. T-dependent aspect of B memory generation in mice immunized with T-independent type-2(TI-2) antigen. *Immunology* 53, 97–104.
- Imler, J.L., Lemaire, C., Wasylyk, C., Wasylyk, B., 1987. Negative regulation contributes to tissue specificity of the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2558–2567.
- Jeevan-Raj, B.P., Robert, I., Heyer, V., Page, A., Wang, J.H., Cammas, F., Alt, F.W., Losson, R., Reina-San-Martin, B., 2011. Epigenetic tethering of AID to the donor switch region during immunoglobulin class switch recombination. *Journal of Experimental Medicine* 208, 1649–1660.
- Jenuwein, T., 2001. Translating the Histone Code. *Science* 293, 1074–1080.
- Jenuwein, T., Forrester, W.C., Fernández-Herrero, L.A., Laible, G., Dull, M., Grosschedl, R., 1997. Extension of chromatin accessibility by nuclear matrix attachment regions. *Nature* 385, 269–272.
- Jhunjunwala, S., van Zelm, M.C., Peak, M.M., Cutchin, S., Riblet, R., van Dongen, J.J.M., Grosveld, F.G., Knoch, T.A., Murre, C., 2008. The 3D Structure of the Immunoglobulin Heavy-Chain Locus: Implications for Long-Range Genomic Interactions. *Cell* 133, 265–279.

- Jhunjunwala, S., van Zelm, M.C., Peak, M.M., Murre, C., 2009. Chromatin architecture and the generation of antigen receptor diversity. *Cell* 138, 435–448.
- Ji, Y., Resch, W., Corbett, E., Yamane, A., Casellas, R., Schatz, D.G., 2010. The In Vivo Pattern of Binding of RAG1 and RAG2 to Antigen Receptor Loci. *Cell* 141, 419–431.
- Johnston, C.M., Wood, A.L., Bolland, D.J., Corcoran, A.E., 2006. Complete sequence assembly and characterization of the C57BL/6 mouse Ig heavy chain V region. *J. Immunol.* 176, 4221–4234.
- Ju, Z., Volpi, S.A., Hassan, R., Martinez, N., Giannini, S.L., Gold, T., Birshtein, B.K., 2007. Evidence for physical interaction between the immunoglobulin heavy chain variable region and the 3' regulatory region. *J. Biol. Chem.* 282, 35169–35178.
- Jung, S., Rajewsky, K., Radbruch, A., 1993. Shutdown of class switch recombination by deletion of a switch region control element. *Science* 259, 984–987.
- Kadesch, T., Zervos, P., Ruezinsky, D., 1986. Functional analysis of the murine IgH enhancer: evidence for negative control of cell-type specificity. *Nucleic acids research* 14, 8209–8221.
- Kaplan, M.H., 2001. Transcriptional Activation by a Matrix Associating Region-binding Protein. CONTEXTUAL REQUIREMENTS FOR THE FUNCTION OF BRIGHT. *Journal of Biological Chemistry* 276, 21325–21330.
- Khamlichi, A.A., Glaudet, F., Oruc, Z., Denis, V., Le Bert, M., Cogné, M., 2004. Immunoglobulin class-switch recombination in mice devoid of any S mu tandem repeat. *Blood* 103, 3828–3836.
- Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y., Green, R.D., Ren, B., 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436, 876–880.
- Klein, U., Casola, S., Cattoretti, G., Shen, Q., Lia, M., Mo, T., Ludwig, T., Rajewsky, K., Dalla-Favera, R., 2006. Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 7, 773–782.
- Kohli, R.M., Abrams, S.R., Gajula, K.S., Maul, R.W., Gearhart, P.J., Stivers, J.T., 2009. A portable hot spot recognition loop transfers sequence preferences from APOBEC family members to activation-induced cytidine deaminase. *J. Biol. Chem.* 284, 22898–22904.
- Kosak, S.T., 2002. Subnuclear Compartmentalization of Immunoglobulin Loci During Lymphocyte Development. *Science* 296, 158–162.
- Kosak, S.T., Groudine, M., 2004. Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation. *Genes Dev.* 18, 1371–1384.
- Kotnis, A., Du, L., Liu, C., Popov, S.W., Pan-Hammarström, Q., 2009. Non-homologous end joining in class switch recombination: the beginning of the end. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 364, 653–665.
- Kottmann, A.H., Zevnik, B., Welte, M., Nielsen, P.J., Köhler, G., 1994. A second promoter and enhancer element within the immunoglobulin heavy chain locus. *Eur. J. Immunol.* 24, 817–821.
- Kouzarides, T., 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Current opinion in genetics & development* 12, 198–209.
- Kuang, F.L., Luo, Z., Scharff, M.D., 2009. H3 trimethyl K9 and H3 acetyl K9 chromatin modifications are associated with class switch recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 5288–5293.



BIBLIOGRAPHIE

- Le Moal, M.A., Truffa-Bachi, P., 1985. Immune memory expression to Tnp-Ficolin in CB.20 mice: evidence for a multigenic control. *Cell. Immunol.* 95, 428–436.
- Li, F., Eckhardt, L.A., 2009. A role for the IgH intronic enhancer E μ in enforcing allelic exclusion. *J. Exp. Med.* 206, 153–167.
- Li, F., Yan, Y., Pieretti, J., Feldman, D.A., Eckhardt, L.A., 2010. Comparison of identical and functional Igh alleles reveals a nonessential role for E μ in somatic hypermutation and class-switch recombination. *J. Immunol.* 185, 6049–6057.
- Li, Y., Li, H., Weigert, M., 2002. Autoreactive B Cells in the Marginal Zone that Express Dual Receptors. *J. Exp. Med.* 195, 181–188.
- Lieberson, R., Giannini, S.L., Birshtein, B.K., Eckhardt, L.A., 1991. An enhancer at the 3' end of the mouse immunoglobulin heavy chain locus. *Nucleic Acids Res.* 19, 933–937.
- Lin, D., Ippolito, G.C., Zong, R.-T., Bryant, J., Koslovsky, J., Tucker, P., 2007. Bright/ARID3A contributes to chromatin accessibility of the immunoglobulin heavy chain enhancer. *Mol. Cancer* 6, 23.
- Lin, K.-I., Tunyaplin, C., Calame, K., 2003. Transcriptional regulatory cascades controlling plasma cell differentiation. *Immunol. Rev.* 194, 19–28.
- Liu, H., Schmidt-Suppran, M., Shi, Y., Hobeika, E., Barteneva, N., Jumaa, H., Pelanda, R., Reth, M., Skok, J., Rajewsky, K., Shi, Y., 2007. Yin Yang 1 is a critical regulator of B-cell development. *Genes Dev.* 21, 1179–1189.
- Liu, Y., Subrahmanyam, R., Chakraborty, T., Sen, R., Desiderio, S., 2007. A Plant Homeodomain in Rag-2 that Binds Hypermethylated Lysine 4 of Histone H3 Is Necessary for Efficient Antigen-Receptor-Gene Rearrangement. *Immunity* 27, 561–571.
- Loder, F., Mutschler, B., Ray, R.J., Paige, C.J., Sideras, P., Torres, R., Lamers, M.C., 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. *The Journal of experimental medicine* 190, 75–90.
- Luby, T.M., Sigurdardottir, D., Berger, E.D., Selsing, E., 2001. Sequences associated with the mouse Smu switch region are important for immunoglobulin heavy chain transgene expression in B cell development. *Eur. J. Immunol.* 31, 2866–2875.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., Lieber, M.R., 2002. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell* 108, 781–794.
- Madisen, L., 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 & Development* 8, 2212–2226.
- Manis, J.P., Dudley, D., Kaylor, L., Alt, F.W., 2002. IgH class switch recombination to IgG1 in DNA-PKcs-deficient B cells. *Immunity* 16, 607–617.
- Manis, J.P., Gu, Y., Lansford, R., Sonoda, E., Ferrini, R., Davidson, L., Rajewsky, K., Alt, F.W., 1998. Ku70 is required for late B cell development and immunoglobulin heavy chain class switching. *J. Exp. Med.* 187, 2081–2089.
- Manis, J.P., van der Stoep, N., Tian, M., Ferrini, R., Davidson, L., Bottaro, A., Alt, F.W., 1998. Class switching in B cells lacking 3' immunoglobulin heavy chain enhancers. *J. Exp. Med.* 188, 1421–1431.
- Martin, F., Oliver, A.M., Kearney, J.F., 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14, 617–629.



- Mason, J.O., Williams, G.T., Neuberger, M.S., 1985. Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell* 41, 479–487.
- Matthews, A.G.W., Kuo, A.J., Ramón-Maiques, S., Han, S., Champagne, K.S., Ivanov, D., Gallardo, M., Carney, D., Cheung, P., Ciccone, D.N., Walter, K.L., Utz, P.J., Shi, Y., Kutateladze, T.G., Yang, W., Gozani, O., Oettinger, M.A., 2007. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. *Nature* 450, 1106–1110.
- Matthias, P., Baltimore, D., 1993. The immunoglobulin heavy chain locus contains another B-cell-specific 3'enhancer close to the alpha constant region. *Molecular and cellular biology* 13, 1547–1553.
- McBride, K.M., Barreto, V., Ramiro, A.R., Stavropoulos, P., Nussenzweig, M.C., 2004. Somatic hypermutation is limited by CRM1-dependent nuclear export of activation-induced deaminase. *J. Exp. Med.* 199, 1235–1244.
- McBride, K.M., Gazumyan, A., Woo, E.M., Barreto, V.M., Robbiani, D.F., Chait, B.T., Nussenzweig, M.C., 2006. Regulation of hypermutation by activation-induced cytidine deaminase phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8798–8803.
- Medina, K.L., Pongubala, J.M.R., Reddy, K.L., Lancki, D.W., Dekoter, R., Kieslinger, M., Grosschedl, R., Singh, H., 2004. Assembling a gene regulatory network for specification of the B cell fate. *Dev. Cell* 7, 607–617.
- Meek, K.D., Hasemann, C.A., 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., Nemazee, D., 1997. Self-antigen does not accelerate immature B cell apoptosis, but stimulates receptor editing as a consequence of developmental arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9267–9272.
- Melchers, F., Karasuyama, H., Haasner, D., Bauer, S., Kudo, A., Sakaguchi, N., Jameson, B., Rolink, A., 1993. The surrogate light chain in B-cell development. *Immunol. Today* 14, 60–68.
- Merrell, K.T., Benschop, R.J., Gauld, S.B., Aviszus, K., Decote-Ricardo, D., Wysocki, L.J., Cambier, J.C., 2006. Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire. *Immunity* 25, 953–962.
- Michaelson, J.S., Giannini, S.L., Birshtein, B.K., 1995. Identification of 3 α -hs4, a novel Ig heavy chain enhancer element regulated at multiple stages of B cell differentiation. *Nucleic acids research* 23, 975–981.
- Mielke, C., Maass, K., Tümmler, M., Bode, J., 1996. Anatomy of highly expressing chromosomal sites targeted by retroviral vectors. *Biochemistry* 35, 2239–2252.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., Papaioannou, V.E., 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869–877.
- Monroe, J.G., Dorshkind, K., 2007. Fate decisions regulating bone marrow and peripheral B lymphocyte development. *Adv. Immunol.* 95, 1–50.
- Morshead, K.B., Ciccone, D.N., Taverna, S.D., Allis, C.D., Oettinger, M.A., 2003. Antigen receptor loci poised for V (D) J rearrangement are broadly associated with BRG1 and flanked by peaks of histone H3 dimethylated at lysine 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 11577–11582.

BIBLIOGRAPHIE

- Morvan, C.L., Pinaud, E., Decourt, C., Cuvillier, A., Cogné, M., 2003. The immunoglobulin heavy-chain locus hs3b and hs4 3' enhancers are dispensable for VDJ assembly and somatic hypermutation. *Blood* 102, 1421–1427.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T., 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553–563.
- Muramatsu, M., Sankaranand, V.S., Anant, S., Sugai, M., Kinoshita, K., Davidson, N.O., Honjo, T., 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274, 18470–18476.
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.-G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., Shimizu, A., 2003. Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* 302, 2137–2140.
- Neuberger, M.S., Calabi, F., 1983. Reciprocal chromosome translocation between c-myc and immunoglobulin gamma 2b genes. *Nature* 305, 240–243.
- Niuro, H., Clark, E.A., 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 945–956.
- Nijnik, A., Dawson, S., Crockford, T.L., Woodbine, L., Visetnoi, S., Bennett, S., Jones, M., Turner, G.D., Jeggo, P.A., Goodnow, C.C., Cornall, R.J., 2009. Impaired lymphocyte development and antibody class switching and increased malignancy in a murine model of DNA ligase IV syndrome. *J. Clin. Invest.* 119, 1696–1705.
- Nitschke, L., Kestler, J., Tallone, T., Pelkonen, S., Pelkonen, J., 2001. Deletion of the DQ52 element within the Ig heavy chain locus leads to a selective reduction in VDJ recombination and altered D gene usage. *J. Immunol.* 166, 2540–2552.
- Norvell, A., Mandik, L., Monroe, J.G., 1995. Engagement of the antigen-receptor on immature murine B lymphocytes results in death by apoptosis. *J. Immunol.* 154, 4404–4413.
- O’Riordan, M., Grosschedl, R., 1999. Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity* 11, 21–31.
- Obukhanych, T.V., Nussenzweig, M.C., 2006. T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J. Exp. Med.* 203, 305–310.
- Oettinger, M.A., Schatz, D.G., Gorka, C., Baltimore, D., 1990. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science* 248, 1517–1523.
- Ong, J., Stevens, S., Roeder, R.G., Eckhardt, L.A., 1998. 3'IgH enhancer elements shift synergistic interactions during B cell development. *The Journal of Immunology* 160, 4896–4903.
- Patenaude, A.-M., Orthwein, A., Hu, Y., Campo, V.A., Kavli, B., Buschiazzi, A., Di Noia, J.M., 2009. Active nuclear import and cytoplasmic retention of activation-induced deaminase. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 517–527.
- Paull, T.T., Rogakou, E.P., Yamazaki, V., Kirchgessner, C.U., Gellert, M., Bonner, W.M., 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10, 886–895.
- Pavan Kumar, P., Purbey, P.K., Sinha, C.K., Notani, D., Limaye, A., Jayani, R.S., Galande, S., 2006. Phosphorylation of SATB1, a Global Gene Regulator, Acts as a Molecular Switch Regulating Its Transcriptional Activity In Vivo. *Molecular Cell* 22, 231–243.
- Pavri, R., Gazumyan, A., Jankovic, M., Di Virgilio, M., Klein, I., Ansarah-Sobrinho, C., Resch, W., Yamane, A., Reina San-Martin, B., Barreto, V., Nieland, T.J., Root, D.E., Casellas,



- R., Nussenzweig, M.C., 2010. Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell* 143, 122–133.
- Pelanda, R., Schwers, S., Sonoda, E., Torres, R.M., Nemazee, D., Rajewsky, K., 1997. Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity* 7, 765–775.
- Peled, J.U., Kuang, F.L., Iglesias-Ussel, M.D., Roa, S., Kalis, S.L., Goodman, M.F., Scharff, M.D., 2008. The biochemistry of somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 481–511.
- Perlot, T., Alt, F.W., Bassing, C.H., Suh, H., Pinaud, E., 2005. Elucidation of IgH intronic enhancer functions via germ-line deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14362–14367.
- Perlot, T., Li, G., Alt, F.W., 2008. Antisense transcripts from immunoglobulin heavy-chain locus V(D)J and switch regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3843–3848.
- Péron, S., Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Cook-Moreau, J., Tinguely, A., Delpy, L., Denizot, Y., Pinaud, E., Cogné, M., 2012. AID-driven deletion causes immunoglobulin heavy chain locus suicide recombination in B cells. *Science* 336, 931–934.
- Peters, A., Storb, U., 1996. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* 4, 57–65.
- Petersen, S., Casellas, R., Reina-San-Martin, B., Chen, H.T., Difilippantonio, M.J., Wilson, P.C., Hanitsch, L., Celeste, A., Muramatsu, M., Pilch, D.R., others, 2001. AID is required to initiate Nbs1/g-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* 414, 660–665.
- Petro, J.B., Gerstein, R.M., Lowe, J., Carter, R.S., Shinnars, N., Khan, W.N., 2002. Transitional type 1 and 2 B lymphocyte subsets are differentially responsive to antigen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 277, 48009–48019.
- Pettersson, S., Cook, G.P., Brüggemann, M., Williams, G.T., Neuberger, M.S., 1990. A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* 344, 165–168.
- Pike, B.L., Boyd, A.W., Nossal, G.J., 1982. Clonal anergy: the universally anergic B lymphocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 2013–2017.
- Pillai, S., Cariappa, A., 2009. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 767–777.
- Pinaud, E., Khamlichi, A.A., Le Morvan, C., Drouet, M., Nalesso, V., Le Bert, M., Cogné, M., 2001. Localization of the 3' IgH locus elements that effect long-distance regulation of class switch recombination. *Immunity* 15, 187–199.
- Rada, C., Di Noia, J.M., Neuberger, M.S., 2004. Mismatch recognition and uracil excision provide complementary paths to both Ig switching and the A/T-focused phase of somatic mutation. *Mol. Cell* 16, 163–171.
- Rada, C., Jarvis, J.M., Milstein, C., 2002. AID-GFP chimeric protein increases hypermutation of Ig genes with no evidence of nuclear localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 7003–7008.
- Rada, C., Milstein, C., 2001. The intrinsic hypermutability of antibody heavy and light chain genes decays exponentially. *EMBO J.* 20, 4570–4576.
- Razin, S.V., Vassetzky, Y.S., Hancock, R., 1991. Nuclear matrix attachment regions and topoisomerase II binding and reaction sites in the vicinity of a chicken DNA replication origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 265–270.

- Reth, M.G., Alt, F.W., 1984. Novel immunoglobulin heavy chains are produced from DJH gene segment rearrangements in lymphoid cells. *Nature* 312, 418–423.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labelouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A.G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L.D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., Durandy, A., 2000. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565–575.
- Reynaud, S., Delpy, L., Fleury, L., Dougier, H.-L., Sirac, C., Cogné, M., 2005. Interallelic class switch recombination contributes significantly to class switching in mouse B cells. *J. Immunol.* 174, 6176–6183.
- Roldán, E., Fuxa, M., Chong, W., Martinez, D., Novatchkova, M., Busslinger, M., Skok, J.A., 2005. Locus “decontraction” and centromeric recruitment contribute to allelic exclusion of the immunoglobulin heavy-chain gene. *Nat. Immunol.* 6, 31–41.
- Ronai, D., Iglesias-Ussel, M.D., Fan, M., Shulman, M.J., Scharff, M.D., 2005. Complex regulation of somatic hypermutation by cis-acting sequences in the endogenous IgH gene in hybridoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11829–11834.
- Rooney, S., Alt, F.W., Sekiguchi, J., Manis, J.P., 2005. Artemis-independent functions of DNA-dependent protein kinase in Ig heavy chain class switch recombination and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2471–2475.
- Rouaud, P., Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Cogne, M., Pinaud, E., Denizot, Y., 2012. Enhancers Located in Heavy Chain Regulatory Region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) Are Dispensable for Diversity of VDJ Recombination. *Journal of Biological Chemistry* 287, 8356–8360.
- Ruezinsky, D., Beckmann, H., Kadesch, T., 1991. Modulation of the IgH enhancer’s cell type specificity through a genetic switch. *Genes & development* 5, 29–37.
- Sakai, E., Bottaro, A., Davidson, L., Sleckman, B.P., Alt, F.W., 1999. Recombination and transcription of the endogenous Ig heavy chain locus is effected by the Ig heavy chain intronic enhancer core region in the absence of the matrix attachment regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1526–1531.
- Saleque, S., Singh, M., Little, R.D., Giannini, S.L., Michaelson, J.S., Birshstein, B.K., 1997. Dyad symmetry within the mouse 3’IgH regulatory region includes two virtually identical enhancers (C alpha3’E and hs3). *The Journal of Immunology* 158, 4780–4787.
- Sasaki, Y., Casola, S., Kutok, J.L., Rajewsky, K., 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, 2245–2252.
- Schatz, D.G., Ji, Y., 2011. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 251–263.
- Schatz, D.G., Oettinger, M.A., Baltimore, D., 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59, 1035–1048.
- Scheuermann, R.H., Chen, U., 1989. A developmental-specific factor binds to suppressor sites flanking the immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Genes & Development* 3, 1255–1266.
- Schlissel, M.S., 2003. Regulating antigen-receptor gene assembly. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 890–899.

- Schlüssel, M.S., Corcoran, L.M., Baltimore, D., 1991. Virus-transformed pre-B cells show ordered activation but not inactivation of immunoglobulin gene rearrangement and transcription. *J. Exp. Med.* 173, 711–720.
- Schrader, C.E., Linehan, E.K., Mocheгова, S.N., Woodland, R.T., Stavnezer, J., 2005. Inducible DNA breaks in Ig S regions are dependent on AID and UNG. *J. Exp. Med.* 202, 561–568.
- Seet, C.S., Brumbaugh, R.L., Kee, B.L., 2004. Early B cell factor promotes B lymphopoiesis with reduced interleukin 7 responsiveness in the absence of E2A. *J. Exp. Med.* 199, 1689–1700.
- Sekiguchi, J.M., Ferguson, D.O., 2006. DNA double-strand break repair: a relentless hunt uncovers new prey. *Cell* 124, 260–262.
- Sepulveda, M.A., Garrett, F.E., Price-Whelan, A., Birshtein, B.K., 2005. Comparative analysis of human and mouse 3' Igh regulatory regions identifies distinctive structural features. *Mol. Immunol.* 42, 605–615.
- Serwe, M., 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. *The EMBO journal* 12, 2321.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68, 855–867.
- Shinkura, R., Tian, M., Smith, M., Chua, K., Fujiwara, Y., Alt, F.W., 2003. The influence of transcriptional orientation on endogenous switch region function. *Nat. Immunol.* 4, 435–441.
- Shlomchik, M.J., Weisel, F., 2012. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol. Rev.* 247, 52–63.
- Shrivastav, M., Miller, C.A., De Haro, L.P., Durant, S.T., Chen, B.P.C., Chen, D.J., Nickoloff, J.A., 2009. DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst.)* 8, 920–929.
- Skok, J.A., Brown, K.E., Azuara, V., Caparros, M.L., Baxter, J., Takacs, K., Dillon, N., Gray, D., Perry, R.P., Merckenschlager, M., Fisher, A.G., 2001. Nonequivalent nuclear location of immunoglobulin alleles in B lymphocytes. *Nat. Immunol.* 2, 848–854.
- Smith, K.G., Hewitson, T.D., Nossal, G.J., Tarlinton, D.M., 1996. The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *Eur. J. Immunol.* 26, 444–448.
- Stanlie, A., Aida, M., Muramatsu, M., Honjo, T., Begum, N.A., 2010. Histone3 lysine4 trimethylation regulated by the facilitates chromatin transcription complex is critical for DNA cleavage in class switch recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 22190–22195.
- Stavnezer, J., 2000. Molecular processes that regulate class switching. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 245, 127–168.
- Stavnezer, J., Björkman, A., Du, L., Cagigi, A., Pan-Hammarström, Q., 2010. Mapping of switch recombination junctions, a tool for studying DNA repair pathways during immunoglobulin class switching. *Adv. Immunol.* 108, 45–109.
- Stavnezer, J., Schrader, C.E., 2006. Mismatch repair converts AID-instigated nicks to double-strand breaks for antibody class-switch recombination. *Trends Genet.* 22, 23–28.
- Stevens, S., Ong, J., Kim, U., Eckhardt, L.A., Roeder, R.G., 2000. Role of OCA-B in 3'-IgH enhancer function. *The Journal of Immunology* 164, 5306–5312.



- Su, T.T., Rawlings, D.J., 2002. Transitional B lymphocyte subsets operate as distinct checkpoints in murine splenic B cell development. *J. Immunol.* 168, 2101–2110.
- Swanson, P.C., 2004. The bounty of RAGs: recombination signal complexes and reaction outcomes. *Immunol. Rev.* 200, 90–114.
- Taccioli, G.E., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P., Jeggo, P.A., 1994. Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science* 265, 1442–1445.
- Teng, G., Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R., Papavasiliou, F.N., 2008. MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity* 28, 621–629.
- Terauchi, A., Hayashi, K., Kitamura, D., Kozono, Y., Motoyama, N., Azuma, T., 2001. A pivotal role for DNase I-sensitive regions 3b and/or 4 in the induction of somatic hypermutation of IgH genes. *J. Immunol.* 167, 811–820.
- Tian, M., Alt, F.W., 2000. Transcription-induced cleavage of immunoglobulin switch regions by nucleotide excision repair nucleases in vitro. *J. Biol. Chem.* 275, 24163–24172.
- Tiegs, S.L., Russell, D.M., Nemazee, D., 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J. Exp. Med.* 177, 1009–1020.
- Tonegawa, S., 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575–581.
- Tran, T.H., Nakata, M., Suzuki, K., Begum, N.A., Shinkura, R., Fagarasan, S., Honjo, T., Nagaoka, H., 2010. B cell-specific and stimulation-responsive enhancers derepress Aicda by overcoming the effects of silencers. *Nat. Immunol.* 11, 148–154.
- Tsukada, S., Sugiyama, H., Oka, Y., Kishimoto, S., 1990. Estimation of D segment usage in initial D to JH joinings in a murine immature B cell line. Preferential usage of DFL16.1, the most 5'D segment and DQ52, the most JH-proximal D segment. *The Journal of Immunology* 144, 4053–4059.
- Tumas-Brundage, K.M., Vora, K.A., Manser, T., 1997. Evaluation of the role of the 3'alpha heavy chain enhancer [3'alpha E(hs1,2)] in Vh gene somatic hypermutation. *Mol. Immunol.* 34, 367–378.
- van Gent, D.C., Hiom, K., Paull, T.T., Gellert, M., 1997. Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. *EMBO J.* 16, 2665–2670.
- Verma-Gaur, J., Torkamani, A., Schaffer, L., Head, S.R., Schork, N.J., Feeney, A.J., 2012. Noncoding transcription within the Igh distal VH region at PAIR elements affects the 3D structure of the Igh locus in pro-B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Vilen, B.J., Famiglietti, S.J., Carbone, A.M., Kay, B.K., Cambier, J.C., 1997. B cell antigen receptor desensitization: disruption of receptor coupling to tyrosine kinase activation. *J. Immunol.* 159, 231–243.
- Vincent-Fabert, C., Fiancette, R., Pinaud, E., Truffinet, V., Cogné, N., Cogné, M., Denizot, Y., 2010. Genomic deletion of the whole IgH 3' regulatory region (hs3a, hs1,2, hs3b, and hs4) dramatically affects class switch recombination and Ig secretion to all isotypes. *Blood* 116, 1895–1898.
- Vincent-Fabert, C., Truffinet, V., Fiancette, R., Cogné, N., Cogné, M., Denizot, Y., 2009. Ig synthesis and class switching do not require the presence of the hs4 enhancer in the 3' IgH regulatory region. *J. Immunol.* 182, 6926–6932.
- Vuong, B.Q., Lee, M., Kabir, S., Irimia, C., Macchiarulo, S., McKnight, G.S., Chaudhuri, J., 2009. Specific recruitment of protein kinase A to the immunoglobulin locus regulates class-switch recombination. *Nat. Immunol.* 10, 420–426.

BIBLIOGRAPHIE

- Wang, L., Whang, N., Wuerffel, R., Kenter, A.L., 2006. AID-dependent histone acetylation is detected in immunoglobulin S regions. *J. Exp. Med.* 203, 215–226.
- Wang, L., Wuerffel, R., Feldman, S., Khamlichi, A.A., Kenter, A.L., 2009. S region sequence, RNA polymerase II, and histone modifications create chromatin accessibility during class switch recombination. *Journal of Experimental Medicine* 206, 1817–1830.
- Wang, T.-Y., Han, Z.-M., Chai, Y.-R., Zhang, J.-H., 2010. A mini review of MAR-binding proteins. *Mol. Biol. Rep.* 37, 3553–3560.
- Wang, Z., Goldstein, A., Zong, R.T., Lin, D., Neufeld, E.J., Scheuermann, R.H., Tucker, P.W., 1999. Cux/CDP homeoprotein is a component of NF- μ NR and represses the immunoglobulin heavy chain intronic enhancer by antagonizing the bright transcription activator. *Mol. Cell. Biol.* 19, 284–295.
- Wasylyk, C., Wasylyk, B., 1986. The immunoglobulin heavy-chain B-lymphocyte enhancer efficiently stimulates transcription in non-lymphoid cells. *The EMBO journal* 5, 553.
- Webb, C.F., Bryant, J., Popowski, M., Allred, L., Kim, D., Harriss, J., Schmidt, C., Miner, C.A., Rose, K., Cheng, H.-L., Griffin, C., Tucker, P.W., 2011. The ARID Family Transcription Factor Bright Is Required for both Hematopoietic Stem Cell and B Lineage Development. *Molecular and Cellular Biology* 31, 1041–1053.
- Webb, C.F., Das, C., Eneff, K.L., Tucker, P.W., 1991. Identification of a matrix-associated region 5' of an immunoglobulin heavy chain variable region gene. *Molecular and cellular biology* 11, 5206–5211.
- Webb, C.F., Smith, E.A., Medina, K.L., Buchanan, K.L., Smithson, G., Dou, S., 1998. Expression of Bright at two distinct stages of B lymphocyte development. *The Journal of Immunology* 160, 4747–4754.
- Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., 2008. DNA polymerases in adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 302–312.
- Wither, J.E., Roy, V., Brennan, L.A., 2000. Activated B cells express increased levels of costimulatory molecules in young autoimmune NZB and (NZB x NZW)F(1) mice. *Clin. Immunol.* 94, 51–63.
- Wuerffel, R., Wang, L., Grigera, F., Manis, J., Selsing, E., Perlot, T., Alt, F.W., Cogne, M., Pinaud, E., Kenter, A.L., 2007. S-S synapsis during class switch recombination is promoted by distantly located transcriptional elements and activation-induced deaminase. *Immunity* 27, 711–722.
- Xu, C.R., Feeney, A.J., 2009. The epigenetic profile of Ig genes is dynamically regulated during B cell differentiation and is modulated by pre-B cell receptor signaling. *The Journal of Immunology* 182, 1362–1369.
- Xu, C.-R., Schaffer, L., Head, S.R., Feeney, A.J., 2008. Reciprocal patterns of methylation of H3K36 and H3K27 on proximal vs. distal IgVH genes are modulated by IL-7 and Pax5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 8685–8690.
- Xu, M.Z., Stavnezer, J., 1992. Regulation of transcription of immunoglobulin germ-line gamma 1 RNA: analysis of the promoter/enhancer. *EMBO J.* 11, 145–155.
- Yadav, A., Olaru, A., Saltis, M., Setren, A., Cerny, J., Livák, F., 2006. Identification of a ubiquitously active promoter of the murine activation-induced cytidine deaminase (AICDA) gene. *Molecular Immunology* 43, 529–541.
- Yamane, A., Resch, W., Kuo, N., Kuchen, S., Li, Z., Sun, H., Robbiani, D.F., McBride, K., Nussenzweig, M.C., Casellas, R., 2011. Deep-sequencing identification of the genomic targets of the cytidine deaminase AID and its cofactor RPA in B lymphocytes. *Nat. Immunol.* 12, 62–69.



BIBLIOGRAPHIE

- Yan, Y., Park, S.S., Janz, S., Eckhardt, L.A., 2007. In a model of immunoglobulin heavy-chain (IGH)/MYC translocation, the 3' regulatory region induces MYC expression at the immature stage of B cell development. *Genes, Chromosomes and Cancer* 46, 950–959.
- Yancopoulos, G.D., Alt, F.W., 1985. Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* 40, 271–281.
- Yi, M., Wu, P., Trevorrow, K.W., Claflin, L., Garrard, W.T., 1999. Evidence that the Igh kappa gene MAR regulates the probability of premature V-J joining and somatic hypermutation. *J. Immunol.* 162, 6029–6039.
- Yu, K., Chedin, F., Hsieh, C.-L., Wilson, T.E., Lieber, M.R., 2003. R-loops at immunoglobulin class switch regions in the chromosomes of stimulated B cells. *Nat. Immunol.* 4, 442–451.
- Zarrin, A.A., Goff, P.H., Senger, K., Alt, F.W., 2008. Sgamma3 switch sequences function in place of endogenous Sgamma1 to mediate antibody class switching. *J. Exp. Med.* 205, 1567–1572.
- Zhang, J., Bottaro, A., Li, S., Stewart, V., Alt, F.W., 1993. A selective defect in IgG2b switching as a result of targeted mutation of the I gamma 2b promoter and exon. *EMBO J.* 12, 3529–3537.
- Zong, R.T., Scheuermann, R.H., 1995. Mutually exclusive interaction of a novel matrix attachment region binding protein and the NF- μ NR enhancer repressor. Implications for regulation of immunoglobulin heavy chain expression. *J. Biol. Chem.* 270, 24010–24018.

